Influence des communautés microbiennes sédimentaires sur la répartition faunistique dans les sites hydrothermaux et les zones d'émissions de fluides froids du bassin de Guaymas

Perrine Cruaud

▶ **To cite this version:**

Perrine Cruaud. Influence des communautés microbiennes sédimentaires sur la répartition faunistique dans les sites hydrothermaux et les zones d'émissions de fluides froids du bassin de Guaymas. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2014. Français. NNT : 2014BRES0059 . tel-02111535

HAL Id: tel-02111535
https://theses.hal.science/tel-02111535

Submitted on 26 Apr 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE
sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE
Mention: Écologie Microbienne
École Doctorale des Sciences de la Mer

Perrine Cruaud

Préparée à l'UMR 6197, Ifremer-CNRS-UBO

Établissement de rattachement : Ifremer, Centre de Brest

Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes

Influence des communautés microbiennes sédimentaires sur la répartition faunistique dans les sites hydrothermaux et les zones d'émissions de fluides froids du Bassin de Guaymas

Thèse soutenue le 1er avril 2014
devant le jury composé de :

Roberto Geremia (Rapporteur)
Directeur de recherche CNRS, Grenoble

Pierre Galand (Rapporteur)
Chargé de recherche CNRS, Banyuls s/ mer

Thierry Nadalig (Examinateur)
Maître de Conférence, Université de Strasbourg

Gwenaëlle Le Blay (Examinateur)
Professeur, Université de Bretagne Occidentale

Vianney Pichereau (Examinateur)
Professeur, Université de Bretagne Occidentale

Anne Godfroy (Directrice de thèse)
Directrice du LMEE, UMR6197

Marie-Anne Cambon-Bonavita (Directrice de thèse)
Chargé de recherche, Ifremer Centre de Brest

Préambule

Arrêtons-nous quelques instants pour regarder la mer. Regardons cette immensité bleue, grise, noire ou verte, écoutons les vagues se fracasser dans les rochers, le roulis des vaguelettes s'évanouissant sur la plage ou encore le clapotis délicat de l'eau sur la coque du bateau. La surface de l'eau forme comme un grand rideau opaque nous empêchant de voir le monde sous-marin. Les seules vies qui apparaissent à nos yeux sont quelques oiseaux marins, des poissons ou des cétacés jaillissant parfois de cette étrange étendue. Pourtant, sous cet immense rideau, il existe une multitude de vies, très petites, ou très grandes. Dans les premiers mètres sous la surface, là où la lumière peut encore pénétrer, les poissons nous sont familiers. Ils vivent en bancs ou nagent seuls, le plancton et les algues y prolifèrent, les cétacés et les requins y font bombance. Peu à peu, la lumière disparaît avec la profondeur pour faire place à une obscurité des plus totales, trouée par quelques organismes bioluminescents. Plus on descend, plus la vie se fait rare, la température diminue, et seuls les phares d'un sous-marin nous permettent de distinguer les différents animaux qui passent à notre proximité…Ceux-ci nous paraissent de plus en plus étranges… Bientôt, nous atteignons le fond de l'océan. Que ce soit au milieu d'une fosse gigantesque, au milieu de montagnes immenses ou dans une plaine sans relief, ce monde semble appartenir à une autre planète. Tout nous paraît d'abord désert. Quelques poissons, sans couleur, nous frôlent, quelques éponges jonchent le fond et des petits trous le perforent. Cependant, non loin de ces déserts qui nous paraissent infinis, des écosystèmes surprenants existent. Des endroits très localisés où la vie devient luxuriante. Ici, un cadavre de baleine ou un tronc d'arbre échoué apportent des sources considérables de matières organiques qui vont permettre de nourrir de nombreux organismes. Un peu plus loin, de hautes cheminées minérales qui crachent un fluide à plus de 350°C au beau milieu de l'océan vont permettre le développement d'un écosystème à l'apparence très particulière. Ou encore des patches de vie présents, là, sans formation visuelle particulière…

C'est ce monde étonnant, ce monde d'oasis de vie au milieu des déserts abyssaux que nous allons tenter d'explorer dans ce manuscrit de thèse. Deux sites bien particuliers ont été étudiés, un site de suintements froids présent sur la marge de Sonora, au large des côtes mexicaines et une zone hydrothermale, Southern Trough, à quelques kilomètres de distance. Ces deux zones sont caractérisées par une mosaïque de vie présente sur le sédiment : des sites colonisés par des bivalves, d'autres par de grands vers tubicoles ou encore des zones totalement recouvertes de tapis microbiens. Le travail présenté dans ce manuscrit consiste en l'étude des communautés microbiennes qui peuplent les sédiments de ces deux écosystèmes, afin de comprendre leur rôle éventuel sur la répartition des différents colonisateurs de surface. Quelle est la structure des communautés microbiennes sédimentaires associées aux différents assemblages faunistiques ? Quelles sont les caractéristiques métaboliques et fonctionnelles de ces communautés en fonction des caractéristiques physico-chimiques de leur environnement ?

TABLE DES MATIERES

Préambule I

Table des illustrations V

PREMIERE PARTIE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le fond des océans 3

II. Les environnements chimiosynthétiques 4

1) Les suintements froids 5

2) Les sources hydrothermales 6

3) Les carcasses de baleines 7

III. Vivre dans des environnements chimiosynthétiques 8

1) Les communautés microbiennes 10

A/ La nutrition microbienne 11

(1) Généralités 11

(2) Cycle du carbone 12

(3) Cycle du soufre 19

(4) Cycle de l'azote 21

B/ Les principaux groupes microbiens rencontrés au niveau des écosystèmes chimiosynthétiques 23

C/ Cas particuliers des tapis microbiens 31

2) Les symbioses 32

A/ Les vésicomyidés 33

(1) Brève taxonomie des bivalves *Vesicomyidae* 33

(2) Petite anatomie du vésicomyidé 34

(3) La symbiose côté hôte 35

(4) La symbiose côté symbiontes 36

(5) Répartition des vésicomyidés dans les écosystèmes sous-marins 37

B/ Les siboglinidés 37

3) Les autres animaux 38

4) Le Bassin de Guaymas, site de l'étude 39

DEUXIEME PARTIE

REFLEXIONS AUTOUR DES TECHNIQUES UTILISEES

I. La campagne BIG 43

1) Description générale 43

2) Prélèvements et conditionnements 45

II. L'étude des différents habitats en surface des sédiments 47

1) Les bivalves vésicomyidés 48

A/ Échantillonnage 49

B/ Petit manuel de dissection 49

C/ Identification des vésicomyidés 49

D/ Caractérisation des symbiontes 51

(1) Identification moléculaire par l'étude du gène codant l'ARNr 16S 51

(2) Identification des gènes fonctionnels présents chez les symbiontes 52

(3) Localisation des symbiontes 55

(4) Dosage des composés soufrés 56

2) Les vers tubicoles siboglinidés 56

3) Les tapis microbiens 56

4) La faune colonisant le pourtour des tapis 56

III. L'étude des communautés microbiennes sédimentaires 57

1) Échantillonnage et conditionnement 58

2) Choix des Échantillons 58

3) Extraction de l'ADN 59

4) ARISA 59

5) Pyroséquencage 454 60

A/ Un peu d'histoire 61

B/ Principe 62

C/ Fragment de l'ADN utilisé et amorces 66

D/ Multiplexage des échantillons 67

E/ Expérience pilote 69

F/ Pôle froid 71

(1) Création des amorces de fusion 71

(2) Réalisation des PCR 74

G/ Pôle Chaud 75

H/ Analyse des données 75
(1) Le logiciel *MEGAN* ou la découverte de l'affiliation automatisée par BLAST 77
(2) Création d'une banque de données personnalisée 81
(3) Le logiciel *KoriBLAST* ou l'histoire de la réussite controversée… 83
(4) Les systèmes automatisés d'affiliation des séquences 86
(5) *QIIME* et *Mothur* ou la découverte de l'indépendance… 87

6) Microscopie *94*
A/ FISH 94
B/ MEB 98

7) PCR Quantitative *99*

TROISIEME PARTIE

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. La campagne BIG 103
1) La Marge de Sonora – zone de suintements froids *104*
A/ Le site Ayala 104
B/ Le site Juarez 104
C/ Le site Vasconcelos 105
(1) La zone BIG5 105
(2) La zone BIG13/BIG15 106
(3) La zone BIG18 106
(4) La zone BIG19 106
(5) La zone W12 106

2) Southern Trough – zone de sources hydrothermales *107*
A/ Le site Morelos 107
B/ Le site Mega Mat 107

3) Le site de référence *107*

II. L'étude des différents habitats en surface des sédiments 119
1) Les bivalves vésicomyidés *119*
2) Les vers tubicoles siboglinidés *144*
3) La faune colonisant le pourtour des tapis microbiens (« tapis gris ») *147*
4) Les tapis microbiens *149*

III. L'étude des communautés microbiennes sédimentaires 151
1) Pilote *151*
2) Pôle froid – Marge de Sonora *181*
3) Pôle chaud – Southern Trough *217*

QUATRIEME PARTIE

BILAN ET PERSPECTIVES

I. Bilan sur les techniques utilisées 225
1) Techniques d'échantillonnage *225*
2) Approches moléculaires *227*

II. Bilan et perspectives sur les résultats obtenus 229
1) Bilan de l'étude *229*
2) Perspectives de l'étude *233*

Références Bibliographiques 239

Annexes 267

Remerciements 337

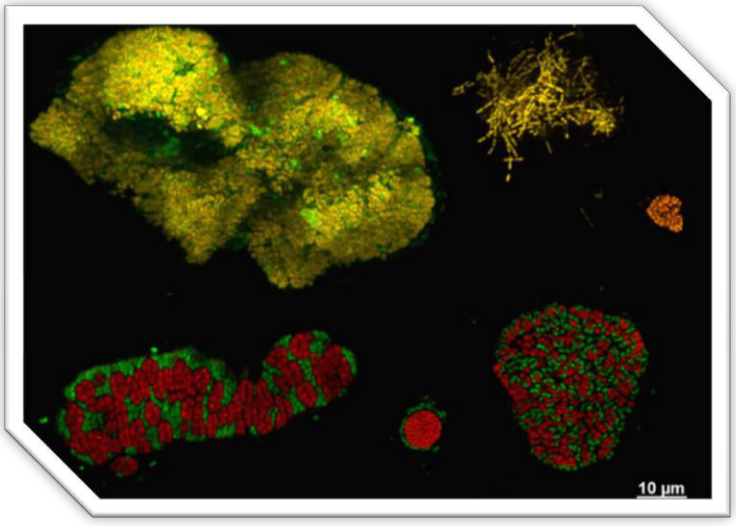


TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : (A) le voilier "Challenger" et (B) le chalut utilisé pour draguer les fonds océaniques 3

Figure 2 : La bathysphère utilisée en 1932 par William Beebe 3

Figure 3 : Les divisions morphologiques des fonds marins 4

Figure 4 : Représentation schématique du processus de suintements froids 5

Figure 5 : Schéma de fonctionnement d'une source hydrothermale et réactions potentielles dans les différents environnements 6

Figure 6 : Carcasses de baleines échouées sur les fonds marins 7

Figure 7 : Colonisation d'un écosystème de suintements froids 8

Figure 8 : Diversité des métabolismes microbiens basés sur les sources d'énergie, d'électrons et de carbone 9

Figure 9: Petit aperçu de la diversité microbienne10

Figure 10 : Accumulation de polyhydroxyalcanoate (PHA) chez la bactérie *Halomonas profundus* 11

Figure 11 : Cycle simplifié du carbone en milieu marin 13

Figure 12 : Hydrate de méthane dans la pince du ROV Victor 6000 13

Figure 13 : Dégradation méthanogènique de la matière organique 14

Figure 14 : Essaim de crevettes *Rimicaris exoculata* 15

Figure 15 : Bivalves *Bathymodiolus* 15

Figure 16 : Méthanotrophes en forme de "*donuts*" 15

Figure 17 : Agrégats AOM 16

Figure 18: Principe schématisé de l'AOM dans les sédiments marins 16

Figure 19 : Le cycle de Calvin-Benson 18

Figure 20 : Unité dimérique commune à toutes les formes de RuBisCO 18

Figure 21 : Le cycle inverse de l'acide citrique 19

Figure 22 : Oxydation des composés soufrés réduits 20

Figure 23 : Stockage du soufre élémentaire 21

Figure 24 : Oxydation de l'ammonium en conditions anaérobies 22

Figure 25 : Tapis microbiens 31

Figure 26 : *Thioploca araucae* 31

Figure 27 : Quelques exemples d'invertébrés vivant en symbiose avec des microorganismes 32

Figure 28 : Coeur de vésicomyidés. Golfe de Guinée 33

Figure 29 : Position des vésicomyidés dans le sédiment 33

Figure 30 : *Calyptogena magnifica* 34

Figure 31 : Anatomie du vésicomyidé 34

Figure 32 : Diagramme schématique du fonctionnement physiologique d'un bivalve vésicomyidé (*Calyptogena magnifica*) 35

Figure 33 : Représentation transversale schématique de la branchie d'un vésicomyidé (*Calyptogena phaseoliformis*) et détail de l'épithélium branchial vu en microscopie 36

Figure 34 : Buisson de siboglinidés 37

Figure 35 : Schéma de coupe transversale de vestimentifère 38

Figure 36 : Des ophiures sur le sédiment du Bassin de Guaymas 38

Figure 37 : *Acharax* et ophiures 39

Figure 38 : Une galathée 39

Figure 39 : Navire océanographique L'*Atalante* 43

Figure 40 : Le sous-marin *Nautile* en plongée 44

Figure 41 : Carte bathymétrique 44

Figure 42 : Instantané d'une vidéo de plongée prise par le Nautile 45

Figure 43 : Un carottier tube juste avant prélèvement 45

Figure 44 : Un grand carottier lame à la sortie du sédiment 46

Figure 45 : Exemple de rapport de plongée 46

Figure 46 : Prélèvement de vésicomyidés à l'aide du filet 48

Figure 47 : L'ascenseur du *Nautile* 49

Figure 48 : Orientation d'un vésicomyidé avant dissection 50

Figure 49 : Vésicomyidé ouvert, identification des organes 50

Figure 50 : Principe schématisé du séquençage de Sanger 52

Figure 51 : Polymérisation de l'ADN, désoxyribonucléotide triphosphate et séquençage de Sanger 53

Figure 52 : Fiche de renseignement sur la séquence d'ARNr 16S enregistrée sur le portail du NCBI au numéro d'accession AB479077 54

Figure 53 : Observations au microscope électronique à balayage (MEB) 55

Figure 54 : Appareil utilisé pour les mesures de soufre 56

Figure 55 : Zone grise autour des tapis 56

Figure 56 : Surface d'une carotte prélevée dans la zone "*tapis gris*". 57

Figure 57 : Carottiers tubes plantés dans du sédiment colonisé par un tapis microbien 57

Figure 58 : Conditionnement des sédiments pour la microbiologie 58

Figure 59 : Jean-Claude Caprais, chimiste au Laboratoire Environnements Profonds (LEP) préparant une carotte pour analyses dans la chambre froide du NO Pourquoi pas ? 58

Figure 60 : Tube et billes utilisés pour l'extraction kit 59

Figure 61 : Exemple de résultats ARISA 60

Figure 62 : Séquenceur 454 60

Figure 63 : Polymérisation de l'ADN et libération d'un pyrophosphate 61

Figure 64 : Principe du pyroséquençage 62

Figure 65 : Schéma d'un pyrogramme obtenu pour la séquence d'ADN ACGTTAGCCGAAAT à séquencer 63

Figure 66 : Isolement d'un fragment d'ADN par bille 63

Figure 67 : Mise en émulsion des billes 64

Figure 68 : PCR en émulsion 64

Figure 69 : Récupération des billes portant de l'ADN à leur surface 65

Figure 70 : Dépôt des réactifs et des billes porteuses d'ADN sur la plaque en fibres optiques 65

Figure 71 : Séquençage 454 66

Figure 72 : Positions des neuf régions hypervariables sur l'ARNr 16S 67

Figure 73 : Principe du multiplexage des échantillons 68

Figure 74 : Principe des amorces de fusion pour le pyroséquençage 72

Figure 75 : Stratégie utilisée pour dessiner des amorces de fusion 73

Figure 76 : Stratégie de séquençage de duplicats vrais de PCR 74

Figure 77 : Résultats d'un BLAST sur le portail du NCBI d'une séquence d'archée des sédiments de la Marge de Sonora 76

Figure 78 : Affiliation d'une séquence de banque 77

Figure 79 : Extrait du fichier de sortie obtenu après un BLAST en local sur les séquences de l'expérience pilote 78

Figure 80 : Exemple d'arbre obtenu avec le logiciel *MEGAN* 79

Figure 81 : Classifications et nomenclatures trouvées sur le "*Taxonomy Browser*" du NCBI 80

Figure 82 : Classification et ID Taxon donnés aux "*Uncultured archaeon*" sur le portail du NCBI 81

Figure 83 : Extrait du travail effectué sur l'article de Lloyd et al., 2010 82

Figure 84 : Extrait du fichier Excel regroupant toutes les séquences retenues pour la banque personnalisée des *Archaea* 83

Figure 85 : Extrait des résultats obtenus pour un des échantillons de l'expérience pilote après analyse avec le logiciel *ngKlast* en utilisant la base de données créée et la taxonomie modifiée 84

Figure 86 : 19 premiers hits de BLAST obtenus pour une séquence requête affiliée aux *Thermoplasmatales* par *ngKlast* 84

Figure 87 : Exemple de représentation obtenue avec le logiciel *ngKlast* pour un des échantillons de l'expérience pilote en utilisant la base de données créée et la taxonomie modifiée 85

Figure 88 : Réseau représentant les OTUs trouvées dans une étude d'écologie microbienne 87

Figure 89 : Extrait des deux fichiers nécessaires à l'étape de classification pour *QIIME* 88

Figure 90 : Le fichier ".oligos" 89

Figure 91 : Exemple de tableau généré par la commande *summary.seqs()* de *Mothur* 90

Figure 92 : Formation d'une séquence chimérique durant une PCR 90

Figure 93 : Principe de détection des chimères par *UCHIME* 91

Figure 94 : Format des deux fichiers nécessaires à la fonction *classify.seqs()* utilisés comme base de référence pour *Mothur* 92

Figure 95 : Principe du FISH sur l'ARNr 16S 95

Figure 96 : Le CARD-FISH par A. Pernthaler 97

Figure 97 : Principe du CARD-FISH 97

Figure 98 : Photographie au MEB de l'avant de la coquille d'un gastéropode 98

Figure 99 : Localisation de la zone hydrothermale et de la zone de suintements froids du Bassin de Guaymas 103

Figure 100 : Le site Ayala 104

Figure 101 : Le site Juarez 105

Figure 102 : Le marqueur BIG13 en place 105

Figure 103 : Le site Vasconcelos BIG5 105

Figure 104 : Le site Vasconcelos BIG13 106

Figure 105 : Le site Vasconcelos BIG18 106

Figure 106 : Le site Morelos BIG6 107

Figure 107 : Le site MegaMat 107

Figure 108 : Plan détaillé de l'échantillonnage sur le site Ayala 109

Figure 109 : Plan détaillé de l'échantillonnage sur le site Juarez BIG12 110

Figure 110 : Plan détaillé de l'échantillonnage sur le site Juarez BIG7 111

Figure 111 : Plan détaillé de l'échantillonnage sur le site Vasconcelos BIG5 112

Figure 112 : Plan détaillé de l'échantillonnage sur le site Vasconcelos BIG13/BIG15 113

Figure 113 : Plans détaillés de l'échantillonnage sur les sites Vasconcelos BIG18 – BIG19 – W12 114

Figure 114 : Plan détaillé de l'échantillonnage sur le site Morelos BIG10 115

Figure 115 : Plan détaillé de l'échantillonnage sur le site Mega Mat M27 116

Figure 116 : Plan détaillé de l'échantillonnage sur le site de référence BIG16 117

Figure 117 : Individu du genre *Lamellibrachia* 144

Figure 118 : Individu du genre *Escarpia* 144

Figure 119 : Arbre phylogénétique des siboglinidés basé sur l'analyse du gène codant la cytochrome oxydase c sous-unité I (COI) 146

Figure 120 : Arbre phylogénétique des symbiontes des siboglinidés basé sur l'analyse du gène codant l'ARNr 16S 146

Figure 121 : *Ampharetidae* 147

Figure 122 : *Hyalogyrina* 147

Figure 123 : Gastéropodes *Provanna laevis* de la marge du Costa Rica et d'Hydrate Ridge 147

Figure 124 : Surface d'un *Hyalogyrina* sp. du tapis gris de Vasconcelos BIG18 148

Figure 125 : Tapis microbiens 149

Figure 126 : Arbre phylogénétique des bactéries composant les tapis microbiens basé sur l'analyse du gène codant l'ARNr 16S 150

Figure 127 : Résultats du séquençage de l'expérience pilote 151

Figure 128 : Le site Morelos 217

Figure 129 : Le site MegaMat 217

Figure 130 : Résultats ARISA Pôle chaud / Pôle froid 219

Figure 131 : Résultats de PCR quantitative pour le « *Pôle chaud* » 220

Figure 132 : Observations préliminaires FISH pour le « *Pôle chaud* » 220

Figure 133 : Profils géochimiques associés au « *Pôle chaud* » 221

Figure 134 : Profils de températures dans les sédiments du « *Pôle chaud* » 221

Figure 135 : Mise à l'eau d'un carottier multitube 225

Figure 136 : Cœur de vésicomyidés 226

Figure 137 : Prélèvement à l'aide d'un grand carottier lame 226

Figure 138 : Transect d'échantillonnage 226

Figure 139 : Observation FISH d'un agrégat sphérique d'archées et de bactéries 235

Figure 140 : Microstructures framboïdes observées au MEB 235

Tableau 1 : Sites étudiés au cours de cette thèse 48

Tableau 2: Bilan des plongées de la campagne BIG 2010 108

Introduction bibliographique

I. Le fond des océans

Pendant longtemps, l'exploration du monde sous-marin était restreinte à des prélèvements à l'aveugle, depuis la surface, grâce à des chalutages de plus en plus profonds. Malgré la profondeur croissante des prélèvements, les filets remontaient toujours des preuves de vie dans les profondeurs (Gage and Tyler, 1991). Que ce soit en 1844, où Edward Forbes voulant renforcer son concept d'absence de vie au-delà de 600 mètres avait réussit des échantillonnages plus profonds sous la surface de la mer Égée (Gage and Tyler, 1991; Tyler, 2003) ou lors de campagnes océanographiques de plus grande envergure comme celle à bord du voilier *Challenger* organisée par Charles Wyville Thomson, entre 1872 et 1876, qui préleva des animaux jusqu'à 5 500 m de profondeur (Figure 1) (Gage and Tyler, 1991; Tyler, 2003) ou celle encore, organisée par les danois à bord du *Galathea* entre 1950 et 1952 durant laquelle des invertébrés et des bactéries présentes dans les sédiments furent remontés lors d'un chalutage dans la fosse des Philippine à plus de 10,19 km (Gage and Tyler, 1991), l'aspect des fonds restait inconnu. Il fallait aller voir directement sur place. C'est en 1932 que l'américain William Beebe s'y risqua et atteignit la profondeur de 2 200 pieds (environ 670 mètres) à bord de sa bathysphère d'où il ramena quelques images et des descriptions sur les phénomènes de bioluminescence (Figure 2) (Kroll, 2008). Le 23 janvier 1960, Jacques Piccard réalisa une plongée record à 10 910 mètres dans la fosse des Mariannes à bord du sous-marin *Trieste* (Piccard and Dietz, 1961; Kato et al., 1997; Nakanishi and Hashimoto, 2011). Il écrivit : « Au moment où nous arrivâmes sur le fond, après quatre heures et trente minutes, nous eûmes la chance immense de voir, juste au milieu du cercle de lumière apporté par un de nos projecteurs, un poisson. Ainsi donc, en une seconde, mais après des années de préparation, nous pouvions répondre à la question que des milliers d'océanographes s'étaient posée. La vie, sous forme supérieurement organisée, était donc possible quelle que soit la profondeur ».

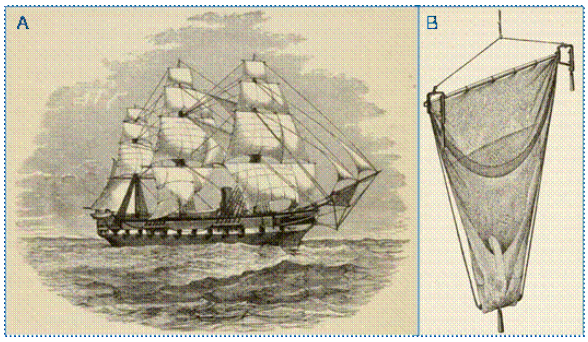


Figure 1 : (A) le voilier "*Challenger*" et (B) le chalut utilisé pour draguer les fonds océaniques (Wyville Thomson, 1878)

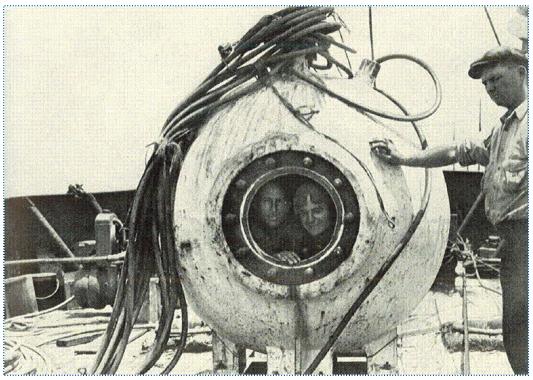


Figure 2 : La bathysphère utilisée en 1932 par William Beebe (Beebe, 1931)

Dans les abysses, au fond des océans, la lumière est absente, la pression énorme, la température très basse et la nourriture rarissime (Bruun, 1957; Lythgoe, 1988; Gage and Tyler, 1991; Van Dover, 2000). Malgré cela, la vie existe à toutes les profondeurs jusque dans les fonds abyssaux les plus profonds (Piccard and Dietz, 1961; Kato et al., 1997). En l'absence de lumière, et donc de production photosynthétique locale, la vie dans les fonds abyssaux dépend principalement des apports organiques de surface (Bruun, 1957; Gage and Tyler, 1991; Van Dover, 2000). Les pluies de particules issues du plancton, des déjections d'animaux vivant dans la colonne d'eau, des carcasses d'animaux morts ou encore des apports terrigènes comme des troncs d'arbres qui coulent, sédimentent vers les grandes profondeurs (Gage and Tyler, 1991). La matière organique qui constitue ces différents apports est souvent dégradée et décomposée dans la colonne d'eau et n'atteint pas le fond (Karl et al., 1988). Le reste vient former les sédiments sur les fonds marins (Müller and Suess, 1979). L'eau située juste au-dessus du sédiment peut contenir une certaine quantité d'O_2 libre, selon la circulation au niveau du

fond (Hargrave, 1969; Van Dover, 2000). En revanche, dans le sédiment, le peu d'O_2 libre disponible est rapidement consommé par l'oxydation de la matière organique. De ce fait, les conditions dans les sédiments deviennent rapidement anoxiques, c'est-à-dire sans O_2 (Hargrave, 1969; Jørgensen, 1977; Frenzel et al., 1990). La matière organique, composée de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'azote est, dans ce milieu, protégée de l'oxydation, mais pas de l'action des microorganismes anaérobies (Jørgensen, 1977; Frenzel et al., 1990).

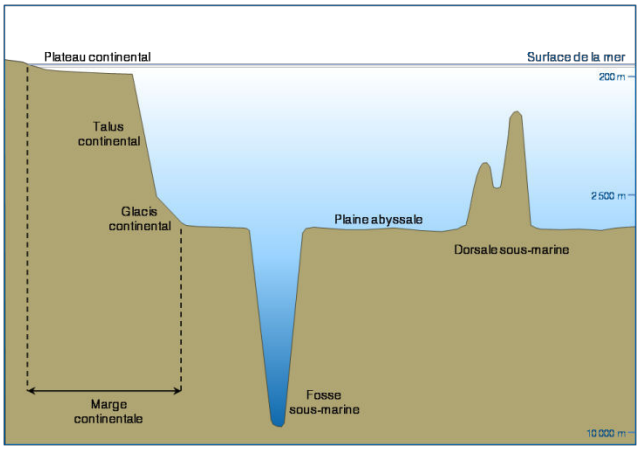


Figure 3 : Les divisions morphologiques des fonds marins
(d'après Dercourt et al., 2006)

Le fond des océans présente un aspect très tourmenté avec des chaînes de montagnes, des volcans et d'immenses plaines, bordées de fosses gigantesques (Dercourt et al., 2006). La faune y est très dispersée, ce qui veut dire que l'on peut parcourir de très longues distances sur le fond sans rencontrer d'animaux. Si l'on s'intéresse de plus près à la topographie générale des fonds marins, on trouve, du rivage vers le large (Figure 3) (Gage and Tyler, 1991; Dercourt et al., 2006), le plateau continental qui forme une plateforme partant des côtes et pouvant atteindre quelques centaines de mètres de profondeur, puis le talus continental, très pentu, au niveau duquel la profondeur chute brusquement jusqu'à plusieurs milliers de mètres de profondeur. Il vient marquer la limite entre le plateau continental et les bassins océaniques à proprement parler qui recouvrent plus de la moitié de la surface de la Terre et sont formés essentiellement d'immenses plaines (Dercourt et al., 2006). Les dorsales océaniques viennent casser le paysage monotone de ces grandes plaines abyssales. Lieu de formation de la nouvelle croûte océanique, ces dorsales forment de gigantesques chaînes de montagnes qui parcourent le fond des océans (Dercourt et al., 2006). Certains sommets dépassent même la surface de la mer, comme l'Islande. Les parties les plus profondes se trouvent, elles, en bordure des bassins océaniques, le long de certaines marges continentales ou de lignes d'îles formant un arc insulaire. Les marges continentales sont des zones de transitions entre une plaque continentale, constituée d'une croûte continentale, et une plaque océanique, constituée d'une croûte océanique. Les marges continentales sont donc des zones sous-marines situées au bord des continents. C'est à ce niveau que les dépôts de sédiments sont les plus importants et peuvent atteindre plusieurs kilomètres d'épaisseur. Ils sont composés à la fois des apports sédimentaires terrestres et de ceux provenant de la colonne d'eau (Orcutt et al., 2011). Différent types de marges existent : les marges passives, comme la marge armoricaine (Dercourt et al., 2006), les marges continentales transformantes, comme celle présente au niveau du Bassin de Guaymas dans le golfe de Californie ou encore les marges actives situées à la frontière de deux plaques convergentes, au niveau de zones de subduction. Ces dernières sont le siège de phénomènes géodynamiques intenses qui se manifestent par des séismes et une activité volcanique, notamment sur le continent, comme c'est le cas de la cordillère des Andes en Amérique du Sud (Dercourt et al., 2006).

II. Les environnements chimiosynthétiques

Au niveau des fonds océaniques, souvent considérés comme des déserts aux conditions de vie extrêmes, des oasis luxuriants de vie existent pourtant. Leur existence est rendue possible grâce à la

présence d'activités géodynamiques au niveau de structures topographiques particulières comme les dorsales océaniques, les marges continentales ou simplement par une arrivée massive de carbone organique, comme une carcasse de baleine échouée sur le fond ou du bois coulé (Dubilier et al., 2008).

C'est la découverte des sources hydrothermales en 1977 sur la dorsale du Pacifique au large des Galápagos (Corliss and Ballard, 1977; Lonsdale, 1977), puis celle des zones d'émissions de fluides froids dans le golfe du Mexique en 1984 (Paull et al., 1984; Hecker, 1985), qui vont profondément modifier la vision des océanographes sur la biologie de l'océan profond : le plus vaste écosystème de la planète ne se limite pas à de vastes habitats froids et obscurs. Les sources hydrothermales et les suintements froids, principalement localisés au niveau des dorsales océaniques et des marges continentales, vont apporter des composés chimiques supplémentaires par rapport aux fonds abyssaux, qui vont permettre le développement de communautés microbiennes et animales particulières. Ces environnements sont basés sur la présence de communautés microbiennes chimiosynthétiques qui vont, par opposition aux organismes photosynthétiques qui utilisent l'énergie de la lumière, utiliser l'énergie provenant de réactions chimiques d'oxydo-réduction pour transformer les éléments chimiques en matière organique (Somero et al., 1989; Gage and Tyler, 1991).

*Les **Bactéries** (ou Bacteria) et les **Archées** (ou Archaea) sont des Procaryotes (cellules sans noyau), par opposition aux Eucaryotes (cellules avec noyau), dont nous faisons partie. Bactéries et Archées sont des microorganismes unicellulaires partageant la même structure cellulaire générale. Ils sont pourtant différents, notamment au niveau de la structure de leur membrane cellulaire, de leur système de réplication de l'ADN et surtout d'un point de vue évolutif (Madigan and Martinko, 2007).*

1) Les suintements froids

Les marges continentales sont des zones d'accumulation de sédiments d'origines diverses. Ces sédiments, riches en matières organiques, vont être enfouis progressivement au fil du temps. La matière organique va être dégradée au cours de cet enfouissement, ce qui va, au cours des temps, entraîner la formation de réservoirs d'hydrocarbures enfouis. Différents processus peuvent ensuite contribuer à la résurgence de ces hydrocarbures à la surface du sédiment. Pour les marges continentales passives, c'est la pression des sédiments accumulés au-dessus des réservoirs qui va forcer la sortie de fluides hors des réservoirs d'hydrocarbures, vers la surface des sédiments, créant ainsi des suintements de fluides riches en hydrocarbures. Dans le cas des marges actives, c'est le processus de subduction qui va entraîner cette migration par remontée de matière. Ces émissions sont appelées « émissions de fluides froids » par opposition aux fluides chauds des sources hydrothermales. Les fluides émis sont généralement riches en hydrocarbures légers, dont le méthane, qui est une des sources d'énergie pour les microorganismes chimiosynthétiques (méthanotrophes), qui permettront à leur tour l'installation de riches communautés

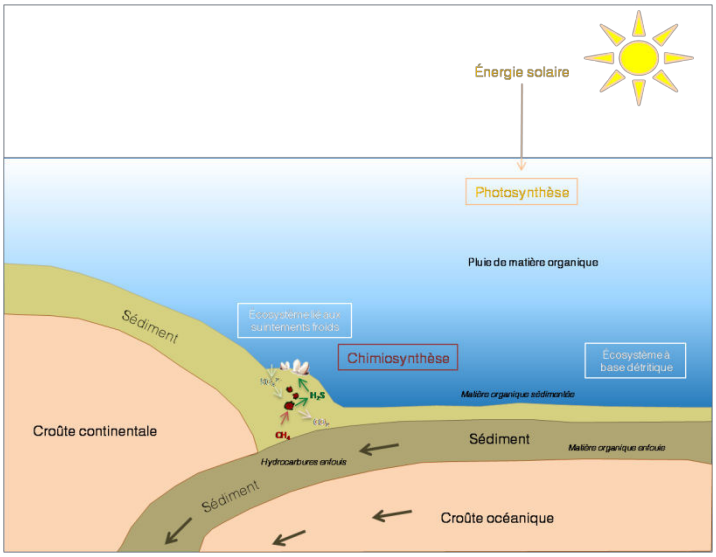


Figure 4 : Représentation schématique du processus de suintements froids, cas d'une marge active (d'après Vigneron, 2012)

animales. Les fluides peuvent être également enrichis en H_2S, issu de la réduction microbienne des sulfates. Dans le cas de remontées massives de fluides, il peut y avoir formation d'édifices particuliers comme les volcans de boue sous-marins (Niemann et al., 2006; Lösekann et al., 2007; Omoregie et al., 2008; Lazar et al., 2012) ou encore les pockmarks qui sont des dépressions coniques à la surface des sédiments (Ondreas et al., 2005; Olu-Le Roy et al., 2007; Cambon-Bonavita et al., 2009).

2) Les sources hydrothermales

Les dorsales océaniques sont le lieu de formation de la nouvelle croûte océanique par écartement de deux plaques tectoniques (Van Dover et al., 2002; Dercourt et al., 2006). Ces zones de frontière entre deux plaques divergentes sont le lieu d'intenses activités tectonique, volcanique et hydrothermale. A ce niveau, l'eau de mer, dense et froide, va s'infiltrer par les anfractuosités générées par le refroidissement rapide de la nouvelle croûte océanique formée (Edmond et al., 1982; Fornari and Embley, 1995; Dercourt et al., 2006). Cette eau va progressivement se réchauffer à l'approche des chambres magmatiques présentes sous l'axe des dorsales. Elle va alors atteindre un état hyper-critique et le fluide ainsi formé, chaud, moins dense, acide et appauvri en oxygène et en divers composés (Mg^{2+}, SO_4^{2-}, NO^{3-}…), va remonter vers la surface, tout en lessivant les roches qu'il traverse. Sa composition va donc varier en fonction des roches traversées, ou, dans certains cas comme au niveau du Bassin de Guaymas, des sédiments, et du parcours emprunté (Hannington et al., 1995; Kelley et al., 2001). A la surface, ce fluide, alors chargé notamment d'hydrogène sulfuré, de fer et de métaux lourds, va brusquement jaillir dans une eau de mer froide et ayant une composition chimique totalement différente. Le mélange de ce fluide chaud et réduit avec l'eau de mer froide et oxygénée va entraîner la formation de gradients physico-chimiques importants (Hessler and Smithey Jr, 1983). Certains minéraux présents dans le fluide hydrothermal vont précipiter et former progressivement des cheminées hydrothermales par lesquelles le fluide surchauffé, pouvant atteindre 400°C, va sortir. Le fluide qui jaillit sous pression est limpide, mais peut se colorer par précipitation des sulfures polymétalliques. Bien que beaucoup de composés chimiques précipitent rapidement lorsque le fluide arrive dans l'eau de mer, des signaux chimiques d'origine hydrothermale sont présents à plusieurs

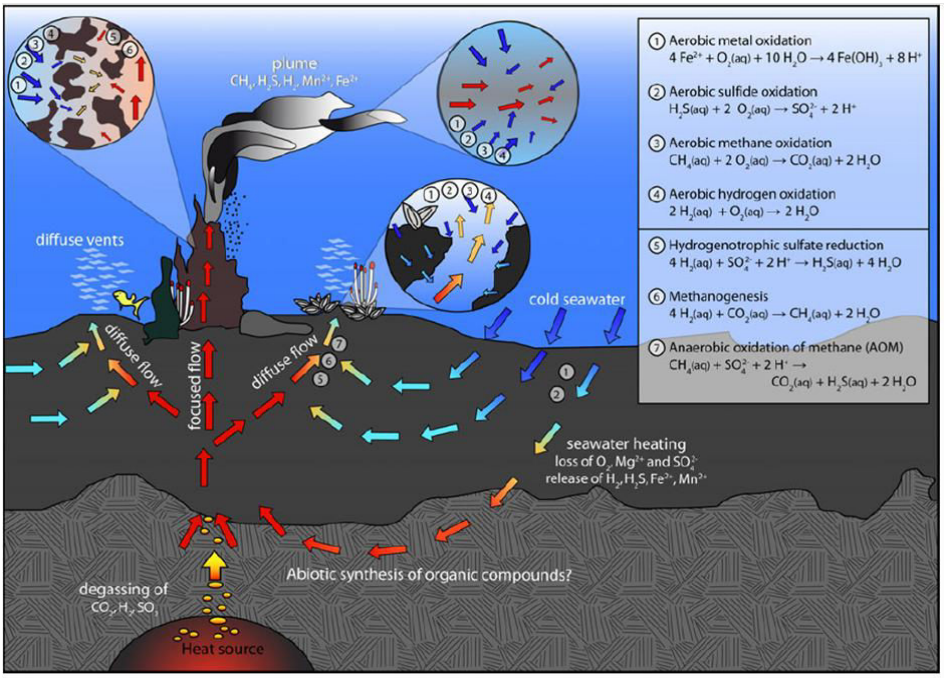


Figure 5 : Schéma de fonctionnement d'une source hydrothermale et réactions potentielles dans les différents environnements (Hentscher and Bach, 2012)

kilomètres de la source (Orcutt et al., 2011). Autour de ces cheminées hydrothermales, une faune luxuriante va pouvoir se développer, la distribution des communautés microbiennes et animales étant influencée notamment par les gradients de température (Hessler and Smithey Jr, 1983; Van Dover et al., 2002; Fabri et al., 2011).

3) Les carcasses de baleines

Lorsqu'une baleine meurt près des côtes, là où la profondeur d'eau n'est pas très importante, elle commence d'abord par couler puis se gonfle de gaz sous l'effet de la fermentation bactérienne dans le cadavre en décomposition. Elle remonte alors et se décompose à la surface de la mer ou vient s'échouer sur nos côtes. En pleine mer, les cadavres de baleines vont en revanche couler progressivement jusqu'au fond. En effet, la température de l'eau ralentissant la fermentation microbienne, la baleine ne va pas se gonfler suffisamment de gaz pour remonter à la surface (Allison et al., 1991). Durant sa descente vers les abysses, certains charognards, comme les requins, vont venir se nourrir du cadavre. A son arrivée sur le fond, plusieurs étapes vont se succéder (Figure 6) (Smith and Baco, 2003). D'abord, comme au cours de la descente, des charognards mobiles comme les requins, d'autres poissons ou encore des crabes, des myxines, des lithodes, vont venir se nourrir des chairs restantes sur les os du cadavre (stade des charognards, Figure 6A). Vient ensuite le stade des charognards immobiles (stade des opportunistes, Figure 6B). Il ne reste alors en général plus beaucoup de chair sur les os de la baleine, mais la décomposition se poursuit au niveau des os et des sédiments alentours, enrichis en matière organique. Enfin arrive le stade dit sulfophylique. Les os se recouvrent de tapis microbiens, utilisant comme source d'énergie le H_2S produit par les bactéries qui décomposent les graisses à l'intérieur des os (Figure 6C et D) (Goffredi and Orphan, 2010). Tout comme les carcasses de baleines, les bois coulés constituent des apports massifs de matières organiques dans les fonds abyssaux et engendrent la formation d'écosystèmes à la faune luxuriante. En effet, la décomposition du bois par des microorganismes libère des composés réduits comme le méthane ou l'hydrogène sulfuré, à la base d'une activité chimiosynthétique (Palacios et al., 2006; Pailleret et al., 2007).

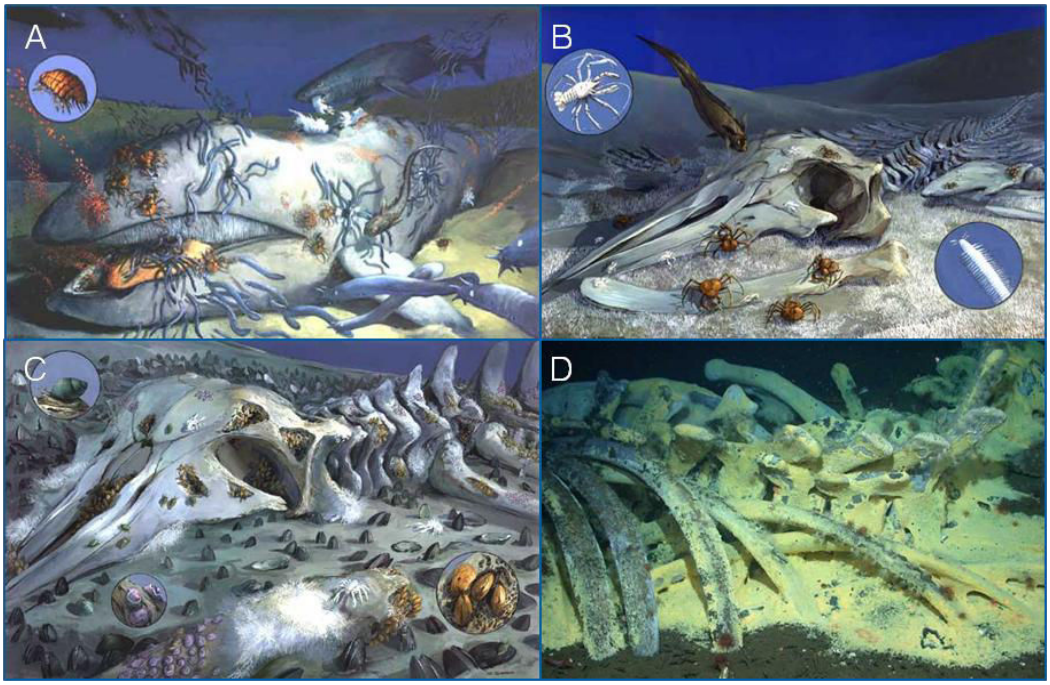


Figure 6 : Carcasses de baleines échouées sur les fonds marins. De (A) à (C) Vues d'artiste de la succession des animaux se nourrissant du cadavre © Michael Rothman. (A) Stade des charognards, (B) stade des opportunistes et (C) stade sulfophylique. (D) Os de baleine recouverts de tapis microbien jaune, source : C. Smith, Université d'Hawai

Ces écosystèmes très particuliers créés par des cadavres de baleine ou des bois arrivés sur le fond possèdent certaines analogies avec les écosystèmes présents au niveau des suintements froids et des sources hydrothermales. Ces carcasses de cétacés pourraient d'ailleurs servir de relais entre les différents sites d'émissions de fluides chauds ou froids, facilitant la dispersion des espèces des écosystèmes chimiosynthétiques comme les sources hydrothermales et les suintements froids, dont la situation géographique est fixe et localisée (Smith and Baco, 2003).

III. Vivre dans des environnements chimiosynthétiques

Des communautés animales et microbiennes variées vont venir s'installer au niveau de ces différents types d'environnements chimiosynthétiques (Figure 7). Les plus étonnantes et les plus colorées sont sans doute celles qui colonisent les zones de sources hydrothermales avec, notamment, le fameux vers géant *Riftia pachyptila*. Cependant, de nombreux autres animaux, non moins étonnants, colonisent ces écosystèmes très particuliers. Derrière les noms barbares de *Vesicomyidae, Siboglinidae, Mytilidae* ou encore *Alvinocarididae* se cachent de curieux animaux (Figure 7) capables de vivre en *symbiose* avec des microorganismes qu'ils abritent au sein de leurs organes (Cavanaugh, 1985). D'autres, comme les ophiures, les holothuries, plus connues sous le nom de concombres des mers, ou encore les poissons, se nourrissent d'animaux morts, de déchets produits par les autres animaux ou de microorganismes (Sibuet and Olu, 1998). A la base de toutes ces communautés se trouvent les microorganismes. Présents notamment dans le sédiment, ils produisent des composés chimiques particuliers qui, directement ou indirectement vont faire vivre toutes les autres communautés (Jannasch, 1985; Sibuet and Olu, 1998).

Figure 7 : Colonisation d'un écosystème de suintements froids. *Siboglinidae, Mytilidae*, crevettes et hydrates de gaz. Site REGAB, Campagne WACS – 2011 - Ifremer

Que ce soit au niveau des sources hydrothermales, des suintements froids, des carcasses de baleines ou de tout autre environnement abyssal, une des grandes différences avec la vie que nous connaissons à la surface de notre planète est l'absence totale de lumière (Bruun, 1957). Au-delà d'une centaine de mètres de profondeur sous la surface de la mer, la lumière du soleil ne pénètre plus (Bruun, 1957; Kirk, 1994; Orcutt et al., 2011). Or, la vie sur notre planète, et notamment au niveau des écosystèmes marins de surface (zone euphotique), est rendue possible en grande partie grâce à cette lumière solaire (Karl, 2007; Blankenship, 2008). En effet, les organismes photosynthétiques, tels que les végétaux, fixent le dioxyde de carbone grâce à l'énergie lumineuse et le

*La **symbiose** au sens large est un association entre deux ou plusieurs partenaires, qu'il soit obligatoire ou non, à bénéfice réciproque ou non. Les partenaires peuvent appartenir à des domaines différents tels que les Eucaryotes et les bactéries comme dans le cas de Vibrio fischeri, responsable de la bioluminescence dans l'organe lumineux de la seiche Euprymna scolopes (Kimbell and McFall-Ngai, 2003). Ces interactions sont basées sur les échanges entre un hôte et un symbionte, l'hôte étant le plus gros partenaire.*

transforme en sucres assimilables par les organismes non photosynthétiques tels que les animaux. Ainsi, les organismes photosynthétiques, *autotrophes*, assimilent le carbone inorganique, non assimilable par les organismes non photosynthétiques, *hétérotrophes*, et le rendent assimilable sous forme de carbone organique (Karl, 2007; Blankenship, 2008). Dans les profondeurs des océans, tout processus photosynthétique est donc impossible. Le carbone inorganique présent dans ces environnements ne peut donc pas être assimilé grâce à l'énergie lumineuse. On pourrait d'ailleurs penser que la vie en milieu abyssal est totalement indépendante de la lumière solaire. Cependant, comme nous l'avons vu plus haut, la matière organique qui sédimente vers le fond des océans, matière organique dépendante à l'origine de la photosynthèse et donc de la lumière, alimente tout de même de nombreuses communautés microbiennes et animales dans les profondeurs marines (Figure 4) (Gage and Tyler, 1991; Van Dover, 2000). Le fond des océans n'est donc pas indépendant de la lumière du soleil. En revanche, la sédimentation de matière organique seule ne pourrait être suffisamment conséquente pour permettre un tel foisonnement de vie au niveau des écosystèmes que sont les sources hydrothermales, les suintements froids ou encore les carcasses de cétacés (exemple d'un site de suintements froids à la Figure 7) (Corliss et al., 1979). Une autre source d'énergie est donc nécessaire pour permettre l'installation de tels écosystèmes. Le métabolisme alternatif est la chimiosynthèse (Corliss and Ballard, 1977; Van Dover, 2000). Par analogie à la photosynthèse, qui se sert de l'énergie des photons, les organismes chimiosynthétiques vont utiliser l'énergie provenant de réactions d'oxydo-réduction de composés chimiques. Les organismes chimiosynthétiques autotrophes, qui font partie du monde microbien, sont donc à la base de ces écosystèmes, appelés écosystèmes chimiosynthétiques (Somero et al., 1989). Ces organismes vont donc assimiler le carbone inorganique (CO_2, CO, CH_4) grâce à l'énergie provenant de réactions chimiques et le rendre assimilable pour les hétérotrophes qui ont besoin d'une source de carbone organique, tels que les animaux, qui vont ainsi pouvoir coloniser ces environnements.

Dans ces écosystèmes chimiosynthétiques, différents types d'organismes vont donc cohabiter. Les microorganismes *chimiosynthétiques autotrophes* qui assimilent le carbone inorganique grâce à une énergie d'origine chimique et les organismes *chimiosynthétiques hétérotrophes* qui ont besoin de carbone organique (Figure 8) (Karl, 2007; Madigan and Martinko, 2007). Une seconde distinction peut-être faite sur l'origine de l'énergie chimique utilisée. Les *chimiolithotrophes* ont un métabolisme basé sur l'oxydation des composés inorganiques réduits comme le fer (Fe^{2+}), l'hydrogène sulfuré (H_2S) ou l'ammonium (NH_4^+) alors que les *chimioorganotrophes* ont un métabolisme basé sur l'oxydation des composés organiques comme, par exemple, les hydrocarbures, les lipides ou les

Source d'énergie	Donneurs d'électrons	Source de carbone
Lumière *(photo-)*	Inorganique (ex : Fer (Fe^{2+}), Hydrogène sulfuré (H_2S)) *(-litho-)*	Inorganique (ex : Dioxyde de carbone CO_2) *(-autotrophe)*
	Organique (ex : hydrocarbure, lipides) *(-organo-)*	Organique (ex : Glucose) *(-hétérotrophe)*
Chimique *(chimio-)*	Inorganique (ex : Fer (Fe^{2+}), Hydrogène sulfuré (H_2S)) *(-litho-)*	Inorganique (ex : Dioxyde de carbone CO_2) *(-autotrophe)*
	Organique (ex : hydrocarbure, lipides) *(-organo-)*	Organique (ex : Glucose) *(-hétérotrophe)*

Figure 8 : Diversité des métabolismes microbiens basés sur les sources d'énergie, d'électrons et de carbone.
Note : Un « mixotrophe » est un organisme qui utilise plus d'une source d'énergie, d'électrons ou de carbone. D'après Karl et al., 2007.

alcools. Tous ces métabolismes peuvent être combinés, certains organismes seront ainsi *chimiolithoautotrophes* et d'autres, *chimioorganohétérotrophes* (Figure 8) (Karl, 2007; Madigan and Martinko, 2007). Il faut savoir que la chimioautotrophie est un métabolisme connu uniquement dans le monde microbien (Madigan and Martinko, 2007).

1) Les communautés microbiennes

Les microorganismes sont présents partout et sont essentiels dans tous les écosystèmes. Au cours des dernières ~3.5 milliards d'années, les microorganismes ont façonné et défini la biosphère de la planète Terre de part leurs activités métaboliques et ont créé des conditions qui ont permis l'évolution des macro-organismes et des communautés biologiques complexes, y compris celle des sociétés humaines (DeLong and Pace, 2001; Karl, 2007). Le terme « *microorganisme* » est aujourd'hui utilisé pour décrire tous les petits organismes vivants, dont la taille ne dépasse en général pas 100 à 150 µm (Figure 9). Ce terme « fourre-tout » inclut des représentants des trois domaines du vivants (*Archaea, Bacteria* et *Eukarya*) (Karl, 2007). Nous ne parlerons ici que des *Archaea* et des *Bacteria*, regroupés parfois sous le terme de « *procaryotes* ».

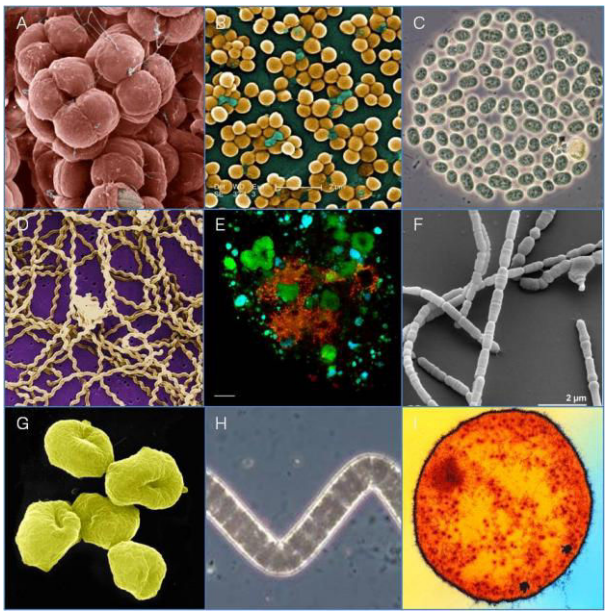


Figure 9 : Petit aperçu de la diversité microbienne. (A) *Halococcus,* (B) *Staphylococcus*, (C) *Aphanothece*, (D) *Leptospira*, (E) Microscopie sur des boues activées de stations d'épuration, (F) *Coriobacterium,* (G) *Sulfolobus*, (H) *Beggiatoa*, (I) *Methanococcoides.* (Sources = A, G et I © Eye Of Science / Science Photo Library, B, C, D, H Encyclopedia of Life, E (Dolinšek et al., 2013) et F (Stackebrandt et al., 2013))

A première vue, les *Archaea* et les *Bacteria* se ressemblent beaucoup. Cependant, un certain nombre de caractéristiques les différencient, notamment la structure chimique des lipides qui composent leur membrane cytoplasmique et leur système de réplication de l'ADN (Grabowski and Kelman, 2003; Valentine, 2007; Albers and Meyer, 2011). La distinction entre *Archaea* et *Bacteria* comme étant deux domaines à part entière de l'arbre du vivant (le troisième domaine étant les Eucaryotes) a été initialement proposée par Carl Woese (Woese and Fox, 1977; Woese et al., 1990). Elle était alors basée sur l'analyse phylogénétique de la séquence des gènes codant l'ARNr 16S, qui est d'ailleurs très utilisée depuis dans les études d'écologie microbienne, comme nous le verrons plus loin dans ce manuscrit. Bien que les *Archaea* aient tout d'abord été cultivées à partir d'environnements extrêmes, elles ont été détectées dans presque toutes les niches écologiques colonisées par les bactéries (Cavicchioli, 2010).

A/ LA NUTRITION MICROBIENNE

(1) Généralités

La nutrition microbienne regroupe tous les processus par lesquels les cellules incorporent les nutriments indispensables à leur croissance, comme le carbone qui est l'élément de base de toutes les classes de macromolécules ou l'azote qui entre dans la composition des protéines et des acides nucléiques (Madigan and Martinko, 2007).

Pour exécuter ces différentes fonctions, un organisme vivant a besoin d'énergie. Cette énergie va être acquise soit par photosynthèse pour les organismes photosynthétiques, soit par l'intermédiaire de réactions chimiques qui vont libérer de l'énergie. En effet, les réactions chimiques sont accompagnées de variations d'énergie, appelées *enthalpie libre de Gibbs* ΔG (Germain et al., 2001). Si ΔG est négative, la réaction est spontanée et libère de l'énergie, la réaction est *exergonique*. Si ΔG est supérieure à 0, la réaction nécessite un apport extérieur d'énergie, c'est une réaction *endergonique* (Cooper, 1999; Germain et al., 2001). Si de l'énergie est libérée, elle peut être stockée par la cellule, notamment sous forme d'ATP, molécule possédant des liaisons très énergétiques (Cooper, 1999). Pour le stockage d'énergie à plus long terme, les cellules peuvent la stocker sous forme de polymères insolubles (polymère de glucose, soufre élémentaire…) qui s'accumulent alors sous forme de granules dans les cellules, et pourront être hydrolysés pour récupérer de l'énergie quand cela sera nécessaire (Figure 10) (Madigan and Martinko, 2007). Dans les cellules, les réactions mises en jeu pour la conservation de l'énergie sont des réactions d'oxydo-réduction (Orcutt et al., 2011). La quantité d'énergie libérée au cours de ces réactions va dépendre des composés réactionnels. La capacité d'un composé chimique à être oxydé ou réduit par un autre composé va dépendre du potentiel d'oxydo-réduction (E_0' dans les conditions standards) qui caractérise le couple redox auquel il appartient (Hennen, 2002). Le composé réduit d'un couple va donner ses électrons à l'oxydant d'un autre couple ayant un potentiel d'oxydo-réduction plus élevé. On parle de donneur d'électrons dans le cas du réactif réducteur et d'accepteur d'électrons dans le cas du réactif oxydant. Par exemple, entre le couple redox $2H^+/H_2$ qui a un potentiel d'oxydo-réduction standard de E_0'=-0.42 V et le couple redox ½ O_2/H_2O qui a un potentiel d'oxydo-réduction standard de E_0'=0.82 V, le réducteur du premier couple, c'est-à-dire H_2, donne ses électrons au composé oxydé du second groupe, c'est-à-dire O_2 (Moussard, 2006). Dans cet exemple, H_2 est le donneur d'électrons et O_2 est l'accepteur d'électrons. Plus la différence de potentiel d'oxydo-réduction entre les deux couples intervenant dans une réaction d'oxydo-réduction est élevée, plus la quantité d'énergie libérée est élevée (Hennen, 2002). Cette différence de potentiel est liée à la variation d'énergie libre abordée un peu plus haut par la relation :

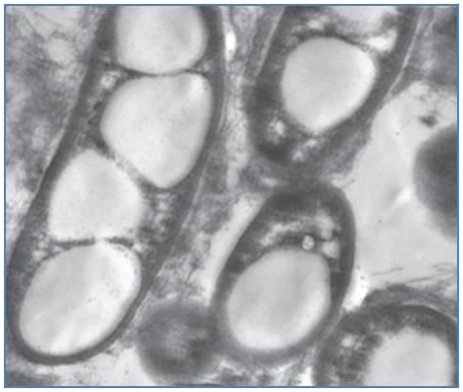


Figure 10 : Accumulation de polyhydroxyalcanoate (PHA) chez la bactérie *Halomonas profundus* De nombreuses bactéries peuvent stocker de l'énergie sous forme de polymères PHAs (photo MET) (Simon-Colin et al., 2008)

$$\Delta G = -nF(E_B - E_A)$$

Avec E_B le potentiel de « l'oxydant » et E_A le potentiel du « réducteur », n le nombre d'électrons échangés dans la réaction et F la constante de Faraday (Hennen, 2002). Le potentiel de réduction de la réaction globale,

$$\beta_A A_{red} + \beta_B B_{ox} \rightarrow \alpha_A A_{ox} + \alpha_B B_{red}$$

soit $\Delta E = E_B - E_A$ est donné par la relation de Nernst :

$$\Delta E = ({E^0}_B - {E^0}_A) - \frac{RT}{nF} \times Ln \left(\frac{[B_{ox}]^{\beta}{}_B [A_{red}]^{\beta}{}_A}{[A_{ox}]^{\alpha}{}_A [B_{red}]^{\alpha}{}_B} \right)$$

R étant la constante des gaz parfaits et *T* la température absolue, l'équilibre étant atteint quand $\Delta G = 0$, soit quand $E_A = E_B$ (Hennen, 2002). Cette formule nous aide à visualiser le fait que le système, qui cherche à atteindre l'équilibre, va réagir dans le sens qui s'oppose à une modification qu'on lui inflige (loi de modération de Le Chatelier) (Germain et al., 2001). Pour illustrer, si on soustrait au système les produits de la réaction (A_{ox} et B_{red}), de nouveaux produits vont être synthétisés, et des réactifs consommés, afin de retrouver l'état d'équilibre chimique. Cette propriété est très importante pour comprendre notamment les réactions de syntrophie associées à la méthanogenèse que nous aborderons un peu plus loin. L'O_2, qui appartient à un couple redox dont le potentiel de réduction est très positif, est un des accepteurs d'électrons les plus favorables connus (Madigan and Martinko, 2007). Dans les réactions d'oxydo-réduction, le transfert d'électrons requiert des intermédiaires, appelés transporteurs comme le couple NAD^+/NADH (Hennen, 2002). Le donneur initial d'électron est alors appelé *donneur primaire* et l'accepteur final, *accepteur terminal d'électrons*. Par ailleurs, les réactions des grandes voies métaboliques vont nécessiter la présence de catalyseurs pour se réaliser. Ces catalyseurs sont les enzymes, qui vont rendre les réactions possibles (Hennen, 2002). Un microorganisme donné possède, au sein de son génome, la capacité de synthétiser un certain nombre de ces enzymes. Elles lui donneront la possibilité d'utiliser tel ou tel composés.

Comme nous l'avons vu, au niveau des sédiments marins profonds, le développement des microorganismes est basé sur la chimiosynthèse, c'est-à-dire qu'ils utilisent l'énergie libérée lors de réactions d'oxydo-réduction. Les réactifs utilisés dans ces réactions d'oxydo-réduction vont dépendre des composés disponibles dans leur environnement immédiat et vont faire intervenir tous les grands cycles géochimiques. Au sein de ces écosystèmes, il existe des gradients physico-chimiques plus ou moins marqués. Par exemple, l'oxygène, présent dans l'eau de mer, va pénétrer en surface du sédiment mais, rapidement, le milieu sédimentaire va devenir anoxique (Jørgensen, 1977). De la même façon, le sulfate de l'eau de mer va pénétrer plus ou moins profondément dans les sédiments alors que le méthane libéré, notamment au niveau des zones de suintements froids, va remonter vers l'eau de mer. Les composés disponibles dans les sédiments à un endroit donné vont donc dépendre de différents paramètres comme leur diffusion, leur consommation respective ou la vitesse des flux circulants au sein des sédiments (Jørgensen, 1977; Orcutt et al., 2011). On comprend donc bien qu'étant donné la possibilité des microorganismes d'utiliser seulement certains composés, la colonisation des sédiments va se faire suivant les gradients géochimiques en présence (Jørgensen, 1977; Orcutt et al., 2011).

(2) Cycle du carbone

Base du cycle

Comme nous l'avons vu précédemment, le carbone organique peut être produit par photosynthèse et chimiosynthèse par les organismes autotrophes, à partir de carbone inorganique (Jannasch, 1985). La photosynthèse, à partir d'eau et de dioxyde de carbone, va produire du carbone organique, des sucres, grâce à l'énergie issue de la lumière (van Niel, 1949; Gregory, 1989; Kirk, 1994). La chimiosynthèse va quant à elle produire du carbone organique grâce à l'énergie issue de réactions chimiques, des réactions d'oxydo-réduction (Enrich-Prast and Crill, 2009). La respiration, à l'opposé, va consommer ce carbone organique et produire du carbone inorganique. En règle générale, la biosphère va recycler toute la matière organique produite (déchets provenant des organismes

vivants, cadavres…). En milieu marin cependant, une petite minorité de cette matière organique va tout de même sédimenter sur le fond des océans puis être enfouie progressivement au sein de la matière minérale (Figure 11). Cette matière organique va en premier lieu être oxydée par des microorganismes, puis fermentée et du méthane va finalement être formé par les méthanogènes. Au fur et à mesure de son enfouissement, cette matière organique va croître en température et en pression et finir par former de façon abiotique des hydrocarbures comme le pétrole. Au final, la matière organique qui constitue tous les organismes vivants va être dégradée en deux formes majeures de composés carbonés, le méthane (CH_4) et le dioxyde de carbone (CO_2). Le méthane produit dans les environnements anoxiques des fonds marins est insoluble. Il va migrer vers les environnements oxygénés, en surface des sédiments, où il va être oxydé, c'est-à-dire transformé en un autre composé, par les bactéries méthanotrophes. Ces méthanotrophes vont ainsi jouer un rôle important dans le cycle du carbone en transformant le méthane en nouveau matériel cellulaire et en CO_2. Le méthane peut aussi être oxydé en conditions anaérobies dans les sédiments marins, principalement par des agrégats cellulaires constitués d'archées méthanogènes et de bactéries sulfato-réductrices (Boetius et al., 2000). Les autres hydrocarbures, riches en matière organique, comme le pétrole, peuvent aussi être oxydés en CO_2 par certains microorganismes.

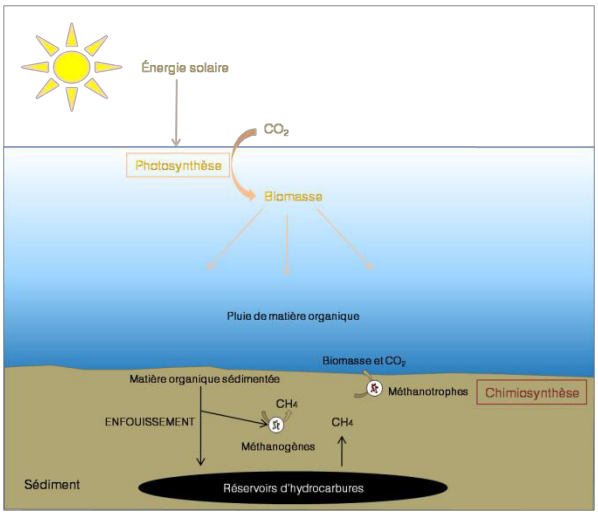


Figure 11 : Cycle simplifié du carbone en milieu marin

Figure 12 : Hydrate de méthane dans la pince du ROV Victor 6000. Campagne WACS 2011 - Ifremer

L'impact du méthane comme gaz à effet de serre étant beaucoup plus important que celui du CO_2, il est intéressant de noter que, d'après des estimations récentes, l'océan ne contribuerait qu'à une petite partie du méthane présent dans l'atmosphère (Schubert et al., 2011). Ceci serait dû à une oxydation du méthane très efficace au niveau des sédiments et de la colonne d'eau. Par ailleurs, le méthane peut être présent sous une forme particulière dans les sédiments marins, appelée *hydrate de méthane* (Figure 7, Figure 12). Ces hydrates sont un mélange de molécules d'eau et de gaz ayant l'apparence et la consistance de la glace. Ils ne sont stables que dans des conditions de température et de pression particulières, correspondant notamment à certaines marges continentales au-delà de 300 m de profondeur. La déstabilisation de ces hydrates, suite, par exemple, au réchauffement climatique global, pourrait libérer de grandes quantités de méthane qui pourrait jouer un rôle fondamental dans les changements climatiques globaux, en les amplifiant de façon exponentielle.

Méthanogenèse

La méthanogenèse est le processus de formation du méthane. Elle conduit à une reminéralisation du carbone organique sous forme de CO_2 et CH_4. Le méthane peut être produit par des microorganismes, il a alors une origine biologique et est dit *biogénique* (Liu and Whitman, 2008). Il peut aussi être produit par des processus principalement thermiques, sans intervention biologique, il est alors dit *thermogénique* (Schaefer et al., 1999). Le méthane biogénique est produit exclusivement

par des *Archaea* anaérobies strictes méthanogènes. La méthanogenèse constitue l'étape finale de la dégradation anaérobie de la matière organique.

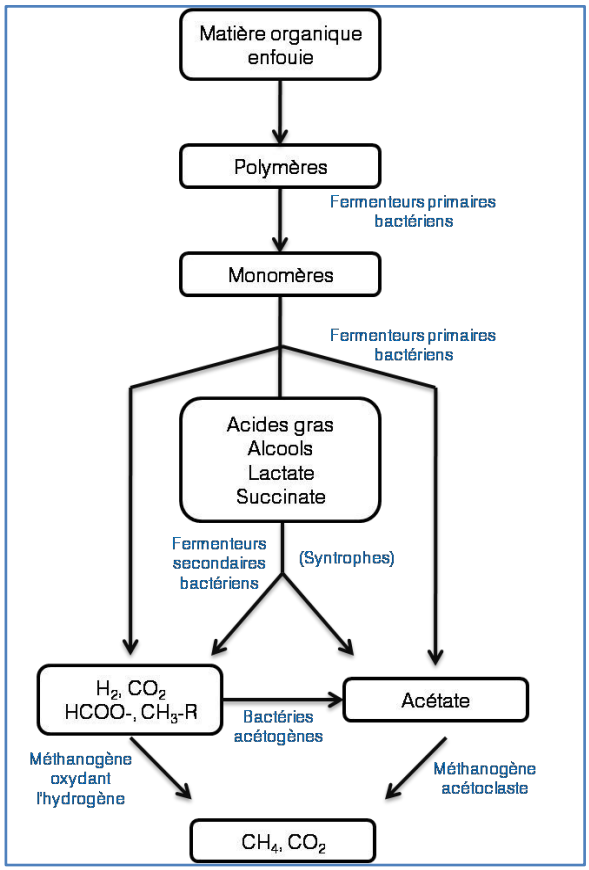


Figure 13 : Dégradation méthanogènique de la matière organique. D'après Schink and Stams, 2006.

Revenons donc sur le cycle du carbone. Dans les sédiments marins, la matière organique complexe est dégradée progressivement (Figure 11). En effet, les polymères tels que les polysaccharides, les protéines et les graisses subsistent à la mort d'un organisme, et sont convertis en CO_2 et CH_4 grâce notamment à des interactions syntrophiques de plusieurs groupes de microorganismes (Madigan and Martinko, 2007). La dégradation initiale est réalisée par des organismes détritivores de surface. Les polymères organiques issus de cette dégradation vont ensuite être transformés en sucres simples, acides gras volatils et alcools, par différents groupes microbiens, au cours du processus appelé diagenèse précoce. Ces métabolites vont alors être dégradés à leur tour par d'autres communautés microbiennes qui vont libérer de l'acétate, de l'hydrogène et du CO_2, constituant les principaux substrats utilisables par les méthanogènes (Ferry and Lessner, 2008). Cette succession de communautés impliquées dans la production de méthane à partir de la matière organique entraîne souvent la formation d'agrégats entre différentes espèces microbiennes (Figure 13). Des consortia syntrophiques entre les microorganismes produisant les substrats de la méthanogenèse et les méthanogènes peuvent donc se former (Schink, 1997; Schink and Stams, 2006). Ainsi, les fermenteurs syntrophes bactériens (*Syntrophobacter, Geobacter…*) fournissent les substrats tel que l'H_2 utilisable par les méthanogènes. En retour, les méthanogènes servent d'accepteurs terminaux d'électrons et recyclent ainsi le pouvoir réducteur des bactéries syntrophes, essentiel pour leur développement (Morita et al., 2011). Prenons l'exemple de l'oxydation du butyrate en acétate et H_2 par *Syntrophonomas,* qui est très défavorable du point de vue énergétique (réaction endergonique, $\Delta G^{0,}$ positif). Si un autre microorganisme consomme l'hydrogène produit et le maintien à une concentration très basse, cela déplace l'équilibre de la réaction, comme nous l'avons vu plus haut, et la réaction devient exergonique, c'est-à-dire qu'elle est favorable du point de vue énergétique (loi de modération de Le Chatelier). Ce sont ici les méthanogènes, en association syntrophique avec ce type de bactéries, qui vont utiliser cet hydrogène, pour produire du méthane, tout en rendant la réaction d'oxydo-réduction de la bactérie, énergétiquement favorable en maintenant très basse la concentration d'hydrogène dans le milieu.

Méthanotrophie

Environ 90% du méthane sont consommés dans les sédiments marins par les microorganismes méthanotrophes (Hinrichs and Boetius, 2002; Knittel and Boetius, 2009). Ces méthanotrophes peuvent être aérobies et nécessiter la présence d'oxygène, c'est la voie d'oxydation du méthane la plus connue.

Certains sont anaérobies et oxydent le méthane en utilisant un autre accepteur d'électrons que l'oxygène, c'est l'oxydation anaérobie du méthane (AOM) (Hinrichs and Boetius, 2002).

L'oxydation aérobie du méthane est réalisée par un certain nombre de bactéries aérobies strictes, notamment parmi les Alphaprotéobactéries et les Gammaprotéobactéries, dans les couches oxygénées des sédiments ou en symbiose avec certains organismes invertébrés (crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata* (Figure 14) (Williams and Rona, 1986; Segonzac, 1992; Zbinden and Cambon-Bonavita, 2003), bivalves *Bathymodiolinae* (Figure 15) (Duperron et al., 2005)). Ces bactéries possèdent une enzyme particulière, la *methane monooxygenase*, qui permet l'oxydation du méthane (CH_4) en méthanol (CH_3OH) en présence d'oxygène et de dihydrogène (Anthony, 1982). Il existe deux types de *methane monooxygenase* (MMO) : une forme cytoplasmique soluble (sMMO) et une forme particulaire liée à la membrane (pMMO). L'expression du gène *pmoA*, qui code la sous-unité A de la *methane monooxygenase* particulaire (pMMO), est souvent utilisée comme marqueur phylogénétique et comme marqueur pour la méthanotrophie (Pernthaler and Amann, 2004). On distingue différents groupes de méthanotrophes aérobies. Le type I regroupe des Gammaprotéobactéries méthylotrophes obligatoires, possédant des membranes internes organisées en couches de vésicules discoïdales distribuées partout dans la cellule. Ce système membranaire interne renvoie les ribosomes en périphérie des cellules et présente des structures cellulaires caractéristiques observables en FISH, les « *donuts* » (Figure 16). Le type II regroupe des Alphaprotéobactéries dont les membranes internes sont distribuées uniquement en périphérie de la cellule. Et enfin le type X est taxonomiquement affilié aux Gammaprotéobactéries (Trotsenko and Murrell, 2008).

Figure 14 : Essaim de crevettes *Rimicaris exoculata*. Campagne Serpentine 2007 - Ifremer

Figure 15 : Bivalves *Bathymodiolus*. Campagne Momardream 2008 - Ifremer

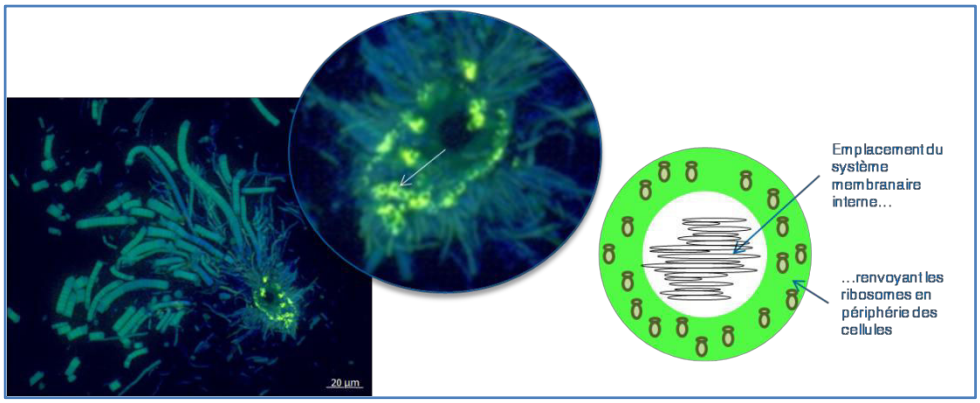


Figure 16 : Méthanotrophes en forme de "*donuts*". Hybridation fluorescente *in situ* des bactéries présentes sur une soie des pièces buccales de la crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata*. Les méthanotrophes apparaissent en vert fluorescent à la base des soies bactériophores. Photo P. Cruaud 2010

Une grande partie du méthane est aussi convertie en CO_2 par oxydation anaérobie (AOM) non seulement dans les sédiments marins (Boetius et al., 2000), mais aussi au niveau des sédiments de lacs alpins (Schubert et al., 2011), et dans d'autres environnements limniques et terrestres (Eller et al.,

2005; Alain et al., 2006; López-Archilla et al., 2007). Cette réaction est énergétiquement défavorable dans des conditions standards et, à l'instar de l'oxydation du butyrate par *Syntrophomonas* exposé un peu plus haut, nécessiterait l'intervention d'un partenaire syntrophe, qui, en consommant l'hydrogène produit lors de l'oxydation du méthane, rendrait la réaction exergonique. Ce processus serait rendu possible grâce à l'association syntrophique entre des archées méthanogènes et des bactéries sulfato-réductrices (Figure 17, Figure 18) (Boetius et al., 2000). Les archées pourraient consommer le méthane par un processus de méthanogenèse inversée (Krüger et al., 2003; Hallam et al., 2004), les gènes codant ce processus ayant été détectés au sein des archées concernées (Meyerdierks et al., 2005), et ainsi libérer du dioxyde de carbone et de l'hydrogène. L'hydrogène produit serait alors utilisé par les bactéries sulfato-réductrices comme donneur d'électrons, rendant ainsi énergétiquement favorable la réaction d'oxydation du méthane par les archées. Une meilleure efficacité de transfert des intermédiaires de réaction par diffusion moléculaire serait rendue possible grâce à la formation d'agrégats cellulaires mixtes denses d'archées et de bactéries (Figure 17), observés en très forte abondance dans les sédiments des zones de suintements froids (Boetius et al., 2000; Orphan et al., 2001). La réaction globale serait alors la suivante (Boetius et al., 2000):

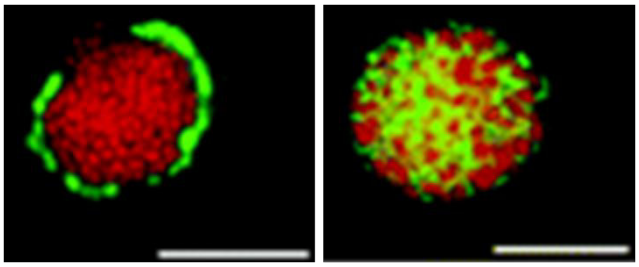


Figure 17 : Agrégats AOM. Photographies FISH d'agrégats d'archées ANME (en rouge) et de bactéries sulfato-réductrices (en vert) provenant des sédiments d'Haakon Mosby. Barres d'échelle 10 µm. (Lösekann et al., 2007)

$$CH_4 + SO_4^{2-} \rightarrow HCO_3^- + HS^- + H_2O$$

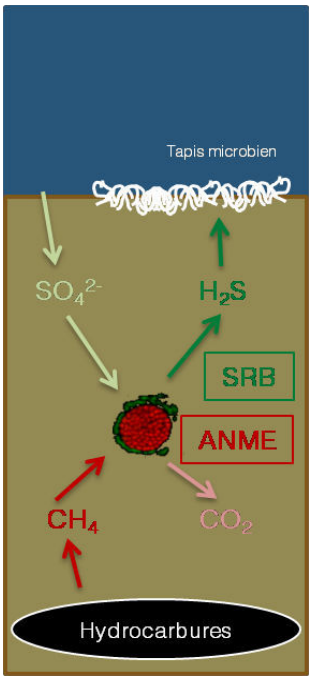


Figure 18 : Principe schématisé de l'oxydation anaérobie du méthane dans les sédiments marins.

Le sulfate, qui serait alors l'accepteur terminal d'électrons dans ce processus (Hinrichs and Boetius, 2002), limiterait la zone d'oxydation anaérobie du méthane à des horizons sédimentaires où méthane (venant des sédiments) et sulfate (provenant de l'eau de mer) seraient présents (Treude et al., 2005). Au niveau des suintements froids, c'est donc au niveau des zones où les vitesses d'émission du fluide sont assez faibles pour permettre un apport descendant de sulfate vers les zones anoxiques, que l'AOM pourra se produire. L'AOM réduira alors les flux de méthane vers la surface des sédiments et vers la colonne d'eau et conduira à la production de sulfure d'hydrogène et de carbonates. Le sulfure d'hydrogène percolera alors vers les couches superficielles du sédiment et permettra le développement de nombreuses communautés chimiolithotrophiques alors que les carbonates précipiteront (Treude et al., 2005) et entraîneront la formation d'encroûtements et de concrétions carbonatées donnant ainsi naissance à des édifices parfois impressionnants.

Les archées associées au processus d'AOM appartiennent principalement aux groupes phylogénétiques des archées méthanogènes (Krüger et al., 2003). On distingue les ANME-1, les ANME-2 et les ANME-3. Presque tous les gènes typiquement associés à la production du méthane sont présents dans ces groupes spécifiques d'archées (Hallam et al., 2004; Knittel et al., 2005). Les partenaires microbiens appartiendraient quant à eux au groupe des *Deltaproteobacteria* et plus particulièrement aux groupes des *Desulfosarcina/Desulfococcus* et des *Desulfobulbus* (Lösekann et al., 2007; Schreiber et al., 2010).

Récemment cependant, il a été montré que l'oxydation anaérobie du méthane pourrait être également couplée à d'autres processus de réduction bactérienne tels que la réduction des nitrates (Raghoebarsing et al., 2006), du manganèse ou du fer (Beal et al., 2009).

Cette hypothèse d'association syntrophique impliquerait donc un flux d'électrons entre les ANMEs et les bactéries. Cependant, les intermédiaires syntrophiques potentiels (hydrogène, formate, acétate ou méthanol) ne semblent pas être utilisés comme donneurs d'électrons dans la réduction des sulfates durant l'AOM (Milucka et al., 2012). D'autres théories suggèrent un rôle du méthanethiol, l'utilisation des nanowires ou des contacts directs cellules à cellules pour les transferts d'électrons (Stams and Plugge, 2009). Une autre hypothèse serait la formation d'acétate par les ANMEs à partir de méthane et de CO_2 qui serait alors utilisé par les bactéries sulfato-réductrices (Knittel and Boetius, 2009). Enfin, il a été démontré récemment que certaines ANMEs étaient capables à la fois de l'oxydation du méthane et de la réduction du soufre élémentaire (S^0). Ces ANMEs seraient en effet capables de réaliser seules l'oxydation anaérobie du méthane sans l'assistance d'un partenaire syntrophique. La réduction des sulfates en soufre élémentaire S^0 serait dans ce cas réalisée par les ANMEs en utilisant une nouvelle voie de sulfato-réduction dissimilatrice, aboutissant, potentiellement, à la production de sulfures. En parallèle, les bactéries associées aux ANMEs disproportionneraient ce soufre élémentaire en le réduisant en sulfure et en l'oxydant en sulfate (Milucka et al., 2012). Le sulfate formé lors de cette disproportionation pourrait être partiellement réutilisé par les ANMEs (Milucka et al., 2012). Enfin, il est intéressant de noter que des bactéries, appartenant à la division candidate NC-10, pourraient également oxyder le méthane sans partenaire microbien, couplant l'AOM avec la réduction des nitrates (Raghoebarsing et al., 2006; Ettwig et al., 2009).

Assimilation du carbone

L'assimilation du CO_2 en composés organiques par les autotrophes est un des processus biologiques les plus importants. Comme nous l'avons vu, les organismes autotrophes, capables de fixer le carbone inorganique (CO_2, CO, CH_4), jouent en effet un rôle essentiel dans les écosystèmes en fournissant une source continuelle de carbone organique pour les hétérotrophes. Plusieurs mécanismes biochimiques impliqués dans la fixation du carbone et son incorporation dans le matériel cellulaire existent. Le plus répandu est le cycle de Calvin. Actuellement, cinq autres voies métaboliques effectuant la fixation du carbone sont recensées (Bar-Even et al., 2010; Hügler and Sievert, 2011). Ce sont le cycle inverse de l'acide citrique (rTCA *Reductive Tricarboxylic acid*) (Evans et al., 1966) ; la voie réductrice de l'acétyl CoA, sensible à l'oxygène (rAcCoA) (Ragsdale and Pierce, 2008) ; le cycle du 3-hydroxypropionate (Herter et al., 2002) mis en évidence chez la bactérie phototrophe anoxygénique *Chloroflexus* et chez certaines *Archaea* hyperthermophiles ; le cycle du 3-hydroxypropionate / 4-hydroxybutyrate (Berg et al., 2007) mis en évidence chez des *Archaea* et le cycle récemment découvert du dicarboxylate / 4-hydroxybutyrate (Huber et al., 2008) mis en évidence chez une *Archaea* hyperthermophile, autotrophe, anaérobie *Ignicoccus hospitalis*.

Le cycle de Calvin-Benson-Basham (CBB) est le cycle enzymatique prédominant dans la biosphère grâce auquel les microorganismes autotrophes, les algues et les plantes terrestres fixent le CO_2 (Tabita, 1999). Le cycle de Calvin nécessite du NAD(P)H et de l'ATP ainsi que deux enzymes clefs : la *ribulose bisphosphate carboxylase* ou RuBisCO et la *phosphofructokinase*. Le reste du cycle est réalisé par une série d'enzymes qui sont présentes chez de nombreux organismes, à la fois autotrophes et hétérotrophes (Figure 19). La RuBisCO catalyse la formation de deux molécules d'acide 3-phosphoglycérique (PGA) à partir du ribulose bisphosphate et du CO_2 (Figure 20). Le PGA est ensuite phosphorylé et réduit en un intermédiaire clef de la glycolyse, le glycéraldéhyde 3-

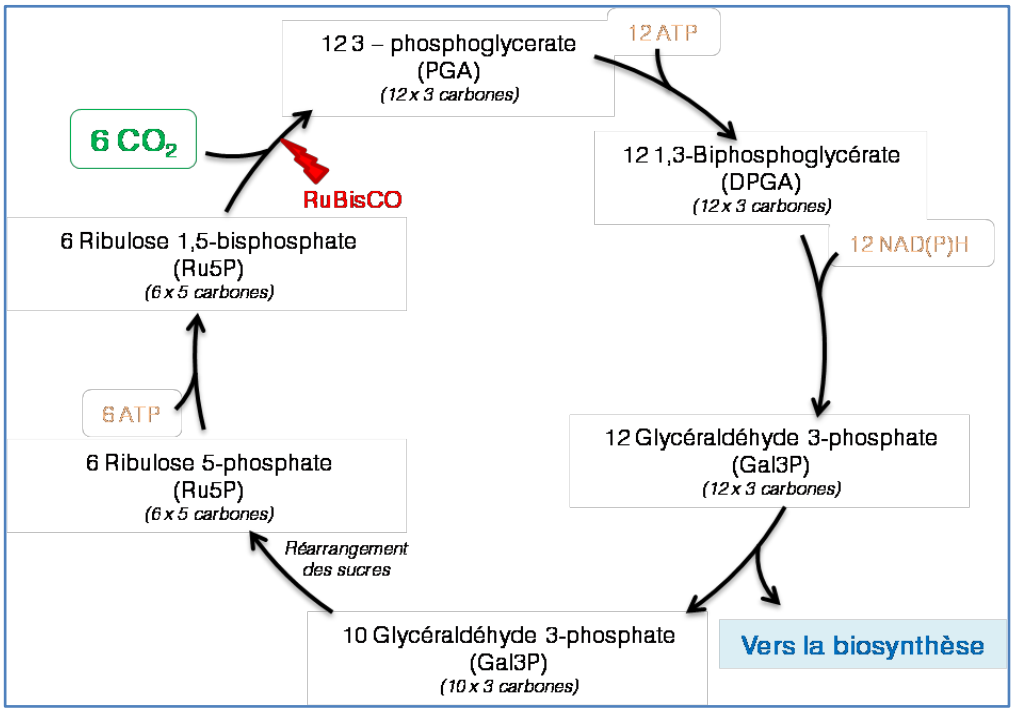


Figure 19 : Le cycle de Calvin-Benson-Basham. D'après Madigan and Martinko, 2007.

phosphate. A partir de là, le glucose peut être formé par inversion des premières étapes de la glycolyse (néoglucogenèse). La Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) est donc une enzyme clef de ce cycle. La RuBisCO est présente dans beaucoup d'organismes autotrophes, allant des procaryotes, incluant bactéries photosynthétiques et chimiolithoautotrophiques et archées, aux eucaryotes, algues et plantes. La RuBisCO n'est pas un parfait catalyseur puisqu'elle a une faible affinité pour son substrat, le CO_2. Elle est inhibée par la présence d'O_2, qui est un substrat alternatif et a des rendements de réactions relativement bas (Badger and Bek, 2008) (Figure 20). L'efficacité de la catalyse dépend donc de la capacité que possède l'enzyme à discriminer l'O_2 du CO_2 (Tabita et al., 2008). Quatre formes différentes de RuBisCO sont recensées, basées sur des différences de séquences et de structures (Tabita, 1999; Tabita et al., 2008). Des quatre formes, c'est la forme I qui semble être la plus abondante. Elle est aussi très diversifiée. La forme II de la RuBisCO a une affinité faible pour le CO_2 et est peu discriminante vis-à-vis de son inhibiteur compétitif, l'O_2. Cette forme de l'enzyme serait plutôt adaptée aux environnements où il y a peu d'O_2 et beaucoup de CO_2. Les formes I et II pourraient donc être utilisées sous des conditions différentes de concentrations en O_2 et CO_2 (Tabita, 1988; Badger and Bek, 2008). Beaucoup d'archées possèdent, elles, une forme différente de RuBisCO, la forme III (Tabita, 1999). Certains microorganismes possèdent plusieurs formes différentes de RuBisCO. Cette caractéristique pourrait leur permettre une flexibilité métabolique leur permettant de s'adapter à des fluctuations importantes des concentrations environnementales en CO_2 et O_2 (Badger and Bek, 2008). A l'opposé, les microorganismes ne possédant qu'une seule forme de RuBisCO, et donc un seul gène correspondant, pourraient être considérés comme des « *spécialistes* », vivant dans des conditions environnementales peu variables au regard des concentrations en CO_2 et O_2.

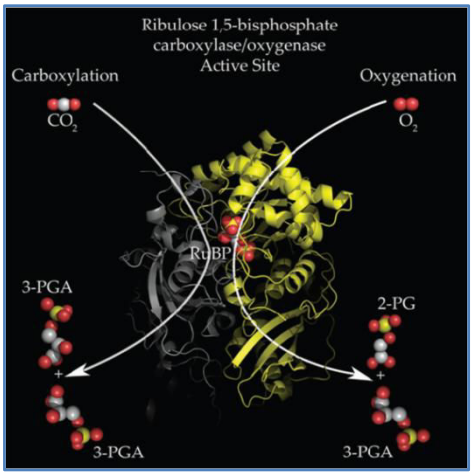


Figure 20 : Unité dimérique commune à toutes les formes de RuBisCO. (Tabita et al., 2008)

Chez certains microorganismes, la fixation du CO_2 est rendue possible grâce à une inversion des étapes du cycle oxydatif de l'acide citrique, ou cycle de Krebs. Alors que le cycle oxydatif de l'acide citrique est utilisé par les organismes hétérotrophes pour oxyder l'acétyl-CoA en CO_2, générant ainsi le pouvoir réducteur nécessaire à la synthèse d'ATP, le cycle rTCA peut être utilisé pour le processus inverse, la biosynthèse de l'acétyl-CoA à partir de CO_2 (Hügler and Sievert, 2011) (Figure 21). La plupart des réactions du cycle sont catalysées par des enzymes qui fonctionnent dans les deux sens possibles de ce cycle. Certaines enzymes sont cependant spécifiques au cycle inverse de l'acide citrique comme la *fumarate reductase*, la *2-oxoglutarate synthase* et la *citrate lyase* (Hügler and Sievert, 2011).

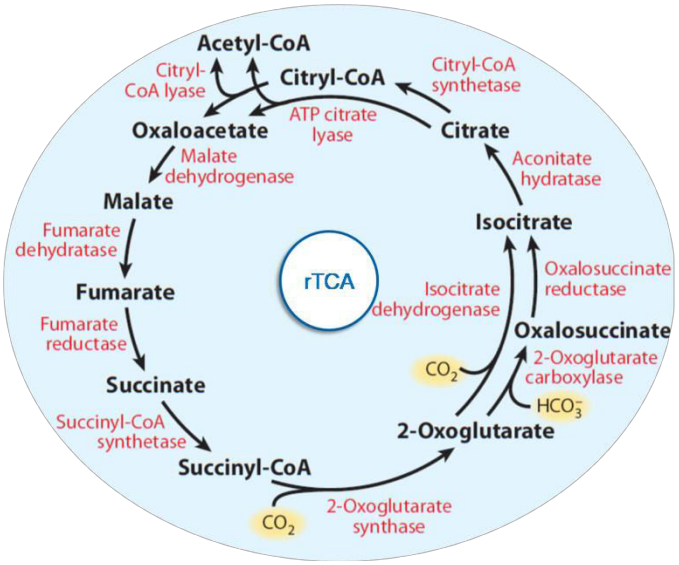


Figure 21 : Le cycle inverse de l'acide citrique. (Hügler and Sievert, 2011)

Chez les méthanogènes, l'autotrophie s'effectue *via* la voie de l'acétyl CoA. Plusieurs parties de cette voie sont déjà intégrées dans le catabolisme du méthanol et de l'acétate. Contrairement aux autres voies métaboliques autotrophes telles que le cycle de Calvin, le cycle inverse de l'acide citrique, ou celui de l'hydroxypropionate, la voie de l'acétyl CoA n'est pas un cycle. Elle est au contraire constituée de voies linéaires pour la réduction du CO_2. Une molécule de CO_2 est réduite dans le groupe méthyle de l'acétate et l'autre molécule de CO_2 est réduite dans le groupe carbonyle. Elles s'assemblent à la fin pour former l'acétyl CoA.

(3) Cycle du soufre

Le soufre est un élément essentiel pour tous les êtres vivants. Il intervient notamment dans la formule de deux acides aminés, la cystéine et la méthionine et, par conséquent, dans de nombreuses protéines (Madigan and Martinko, 2007). L'essentiel du soufre sur Terre se trouve dans les sédiments et dans les roches sous forme de minéraux sulfatés (gypse, $CaSO_4$) et sulfurés (pyrite, FeS_2), et au niveau des océans, sous forme de sulfates SO_4^{2-}, qui constituent un des réservoirs les plus significatifs de soufre pour la biosphère (Friend, 1973; Canfield, 2004). Les sédiments marins sont riches en composés soufrés plus ou moins réduits. Il existe en effet de nombreux niveaux d'oxydation du soufre. Le sulfate est la forme la plus oxydée (degré d'oxydation du soufre +VI) et l'un des principaux anions présents dans l'eau de mer avec des concentrations voisines de 28 mM. Le sulfate va servir d'accepteur d'électrons pour les bactéries sulfato-réductrices (Jørgensen and Bak, 1991). Les sulfures sont la forme la plus réduite du soufre (degré d'oxydation du soufre -II). Le soufre élémentaire S^0 (degré d'oxydation du soufre 0) est surtout connu sous la forme de cristaux de couleur jaune. On peut le trouver sous forme native notamment dans les régions volcaniques. Il existe d'autres composés soufrés correspondant à différents degrés d'oxydation du soufre, comme par exemple le thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$, degré d'oxydation du soufre +II) et le sulfite (SO_3^{2-}, +IV). Cette large gamme d'états d'oxydation du soufre le place au centre d'un large éventail de réactions d'oxydo-réduction.

Un des processus chimiques les plus importants au niveau des sédiments marins riches en matière organique est la décomposition de cette dernière par l'intermédiaire de la sulfato-réduction bactérienne (Berner, 1982). La réduction des sulfates et du thiosulfate présents dans l'eau de mer nécessite des donneurs d'électrons organiques comme le lactate et le pyruvate, les hydrocarbures, les acides gras volatils ou encore les sucres (ou de l'hydrogène moléculaire, produit de la fermentation de la matière organique, principal donneur d'électrons pour les bactéries sulfato-réductrices) (Dhillon et al., 2003; Rabus et al., 2006; Leloup et al., 2007; Leloup et al., 2009). Cette réduction ne se produit donc que si d'importantes quantités de matières organiques sont présentes. Dans la plupart des sédiments marins, le taux de réduction des sulfates est donc limité par l'apport de carbone. Plusieurs composés soufrés inorganiques sont d'importants accepteurs d'électrons pour la respiration anaérobie. Le produit final est l'hydrogène sulfuré H_2S (Madigan and Martinko, 2007). La réduction du sulfate et des formes oxydées intermédiaires du soufre par les bactéries peut servir à la synthèse de la biomasse. L'hydrogène sulfuré formé sera alors immédiatement converti en soufre organique sous forme d'acides aminés, on parle de *réduction assimilative* (Schiff and Fankhauser, 1981; Rabus et al., 2006). Dans le cas de la *réduction dissimilative* en revanche, l'H_2S est excrété, permettant ainsi la minéralisation de la matière organique (Rabus et al., 2006; Fan et al., 2012). Le sulfate est beaucoup moins favorable en tant qu'accepteur d'électrons que l'oxygène ou les nitrates (NO_3^-). Une des enzymes clefs de la sulfato-réduction est la *sulfite reductase* (DSR pour *Dissimilatory sulfite reductase*), qui catalyse la réduction du sulfite (SO_3^{2-}) en sulfures (H_2S). La *sulfite reductase* est présente dans tous les groupes majeurs connus de sulfato-réducteurs et est codée par les sous-unités alpha et beta du gène *dsr* (Odom and Peck Jr, 1984; Lloyd et al., 2006). A l'exception d'*Archaeoglobus*, un membre des *Archaea*, tous les procaryotes sulfato-réducteurs connus appartiennent au domaine des *Bacteria* (Zellner et al., 1989; Burggraf et al., 1990). Certaines de ces bactéries seraient d'ailleurs les partenaires syntrophiques des archées réalisant la méthanogenèse et l'oxydation anaérobie du méthane, comme nous l'avons vu plus haut.

Dans les sédiments marins, l'hydrogène sulfuré H_2S peut donc être produit par la réduction dissimilative bactérienne des sulfates. Il peut aussi avoir une origine géochimique et être notamment apporté par le fluide après lessivage des roches en contexte hydrothermal (Orcutt et al., 2011). Le sulfure d'hydrogène peut être utilisé comme donneur d'électrons par une large diversité de procaryotes. L'accepteur d'électrons est généralement l'oxygène (énergétiquement le plus favorable) mais d'autres accepteurs, comme le nitrate, peuvent également être utilisés (Orcutt et al., 2011). L'oxydation de l'H_2S peut aller jusqu'à la production de sulfate, en passant par divers intermédiaires dont le soufre élémentaire (Figure 22). Certaines bactéries, comme les Thiotrichales, ont d'ailleurs la capacité de stocker ce soufre élémentaire sous forme de granules intracellulaires (Hageage et al., 1970; Kersters et al., 2006) (Figure 23). Cependant, le sulfure produit par la réduction des sulfates ne persiste souvent pas très longtemps sous cette forme. En effet, le sulfure peut être séquestré dans des hydrates de gaz ou se complexer avec le fer sous forme de monosulfide de fer ou de pyrite (espèce minérale composée de disulfure de fer, FeS_2) dans des sédiments riches en fer (Whiticar et al., 1995; Tryon and Brown, 2001). Par ailleurs, en conditions oxygénées, l'ion sulfure HS^- va être

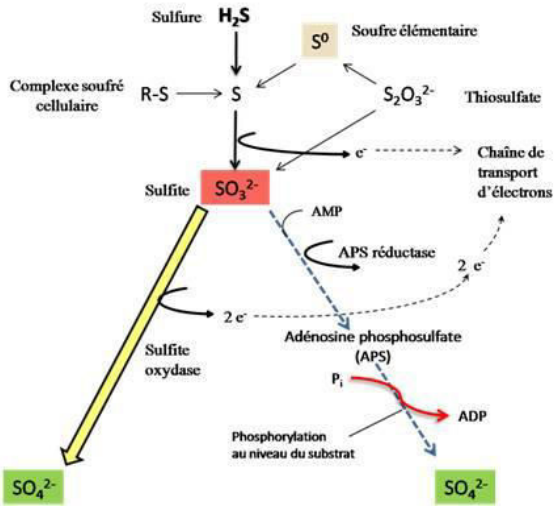


Figure 22 : Oxydation des composés soufrés réduits. Étapes de l'oxydation de différents composés (Madigan and Martinko, 2007)

spontanément et rapidement oxydé à pH neutre. Pour ces raisons, l'oxydation microbienne significative des sulfures, principalement aérobie, ne se produira qu'au niveau des zones où l'H_2S qui provient des zones anoxiques, en quantité suffisante, rencontre l'O_2 des zones oxygénées, c'est-à-dire les zones de transition oxique/anoxique. Les procaryotes oxydant les sulfures peuvent former des biofilms à la surface des sédiments, aussi appelés tapis microbiens (Teske et al., 1999; Gruenke et al., 2010; Gruenke et al., 2011), ou être associés de façon symbiotique avec des invertébrés tels que les vésicomyidés (Duperron et al., 2005; Dubilier et al., 2008).

Le soufre élémentaire S^0 ou encore le thiosulfate $S_2O_3^{2-}$, qui ont des degrés d'oxydation intermédiaires par rapport au sulfure et au sulfate, peuvent également être aisément oxydés ou réduits par des microorganismes (Fauque and Barton, 2012; Schut et al., 2012). Les bactéries qui oxydent le soufre élémentaire sont souvent fortement attachées aux cristaux de soufre. Ces espèces intermédiaires peuvent aussi être l'objet de disproportionation (Finster, 2008; Fauque and Barton, 2012), c'est-à-dire séparation d'un composé en deux nouveaux composés, l'un étant plus oxydé et l'autre plus réduit que le substrat d'origine, ou de comproportionation, c'est-à-dire une réaction dans laquelle deux composés qui comprennent un même élément mais à des degrés d'oxydation différents vont réagir ensemble pour former un produit qui contient le même élément à un degré d'oxydation intermédiaire entre les deux substrats. Le soufre élémentaire (degré d'oxydation du soufre 0) pourra ainsi être disproportioné en sulfate (+VI) et en sulfure (-II). C'est l'hypothèse avancée plus haut au sujet du métabolisme des sulfato-réducteurs associés aux ANMEs réalisant l'AOM (Milucka et al., 2012). De la même façon, le sulfure d'hydrogène et le dioxyde de soufre pourront par exemple être comproportionés en soufre élémentaire.

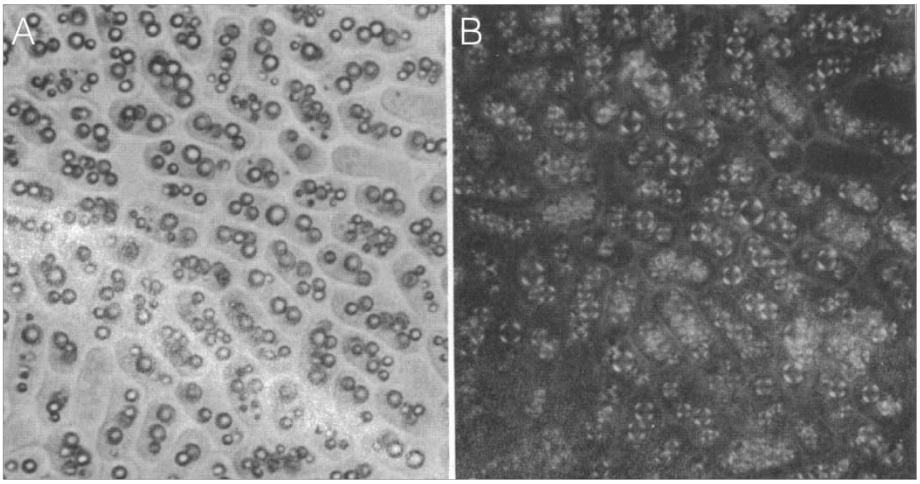


Figure 23 : Stockage du soufre élémentaire. Photographies de *Chromatium okenii* contenant des globules de soufre. X 1500 (A) en lumière visible et (B) en lumière polarisée. (Hageage et al., 1970)

(4) Cycle de l'azote

L'azote est un élément essentiel au développement des microorganismes. Il existe trois principaux processus de transformation microbienne de l'azote : la fixation, la dénitrification et la nitrification.

La fixation de l'azote atmosphérique N_2 est un processus essentiel du cycle de l'azote. Elle permet l'incorporation de l'azote gazeux dans les acides aminés et les protéines. Très peu de microorganismes sont capables de fixer le diazote mais ce processus a été retrouvé à la fois chez les bactéries (*Proteobacteria, Firmicutes, Cyanobacteria*), notamment les bactéries symbiotiques des

plantes, et chez les archées (quelques *Euryarcheaota* méthanogènes et ANME) (Leigh, 2000; Dekas et al., 2009). La fixation du diazote en ammoniac est un processus énergétiquement très coûteux et strictement anaérobie qui fait intervenir le complexe enzymatique de la nitrogénase, codé et régulé par l'opéron *nif* (Herbert, 1999; Raymond et al., 2004). L'ammoniac produit est ensuite converti en molécule organique assimilée par les microorganismes.

La dénitrification est la conversion du nitrate (NO_3^-) en diazote. C'est la voie principale de formation biologique d'azote atmosphérique. Le nitrate est un accepteur d'électrons alternatif utilisé notamment dans les environnements hypoxiques ou anoxiques. C'est une voie métabolique présente chez de nombreuses espèces bactériennes appartenant aux Alphaprotéobactéries (Knowles, 1982).

La nitrification est l'oxydation de l'ammonium NH_4^+ en nitrate NO_3^- par les microorganismes nitrifiants. C'est un processus en deux étapes réalisées par des microorganismes différents (Herbert, 1999). La première étape est l'oxydation de l'ammonium en nitrite. Différents groupes microbiens peuvent être impliqués dont certaines bactéries affiliées aux Béta- et Gammaprotéobactéries (Aakra et al., 2001a; Aakra et al., 2001b) ainsi que des archées affiliées au groupe MG-I des *Thaumarchaeota* (Spang et al., 2010; Brochier-Armanet et al., 2012). L'oxydation de l'ammonium est un processus aérobie faisant intervenir l'enzyme *ammonium monooxygenase*, codée par le gène *amoA*. La deuxième étape est l'oxydation du nitrite en nitrate, principalement réalisée par des bactéries du genre *Nitrobacter* (Lees and Simpson, 1957). Une grande partie des microorganismes nitrifiants peuvent également utiliser des substrats azotés différents tel que l'urée qu'ils dégraderont pour former de l'ammonium (Herbert, 1999; Alonso-Sáez et al., 2012).

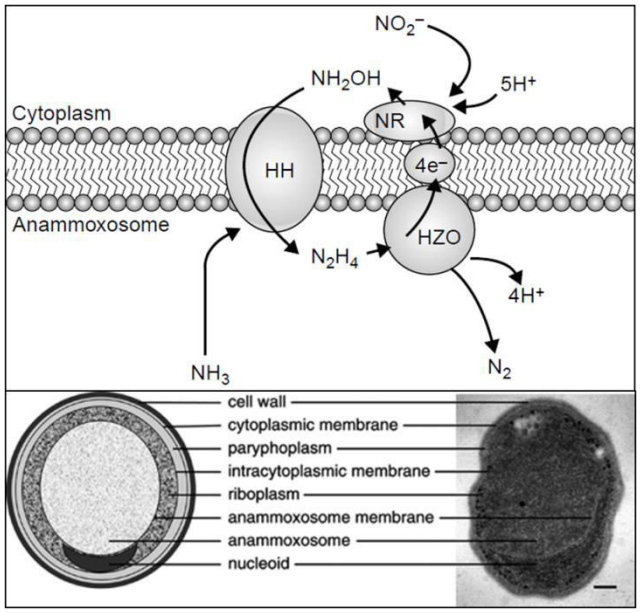


Figure 24 : Oxydation de l'ammonium en conditions anaérobies. En haut, mécanisme de l'ANAMMOX. NR : nitrite reductase, HH : hydrazine hydrolase, HZO : enzyme oxydant l'hydrazine (Jetten et al., 2001). En bas, compartimentation cellulaire d'une bactérie anammox. A gauche, vue schématique, à droite, *Candidatus Brocadia anammoxidans* observée au MET (échelle 100 nm) (Niftrik et al., 2004)

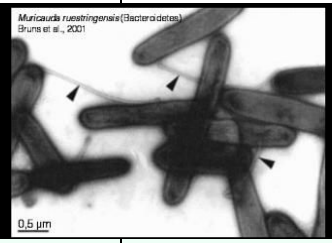
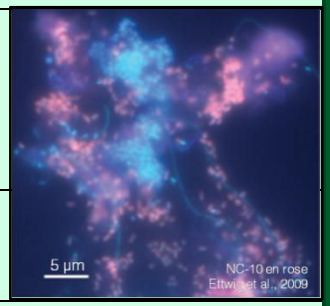
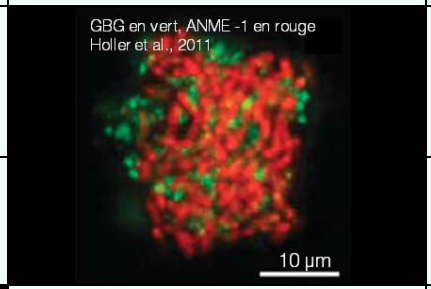
Récemment, il a été observé que l'ammonium pouvait être oxydé par des bactéries anaérobies dites bactéries anammox (pour ANaerobic AMMonium OXidation) (Jetten et al., 2003; Kuypers et al., 2003; Byrne et al., 2008; Yoshinaga et al., 2009). La réaction métabolique anammox permet, sans l'apport d'oxygène, de transformer l'ammonium NH_4^+ et les nitrites NO_2^- en azote gazeux (Figure 24). Cette transformation produit comme intermédiaire l'hydrazine en la confinant dans une vésicule appelée « anammoxosome », vésicule identifiée comme étant le siège de la réaction (Figure 24). Les bactéries anammox, phylogénétiquement regroupées au sein des *Planctomycetes*, utilisent pour leur croissance l'énergie de l'oxydation de l'ammonium en azote atmosphérique en présence de nitrite. Bien que de nombreux gènes soient impliqués dans la cascade enzymatique, l'unique gène fonctionnel marqueur d'une activité anammox est l'*hydrazine synthase* (*hzsA*) (Russ et al., 2013).

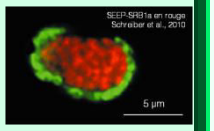
B/ LES PRINCIPAUX GROUPES MICROBIENS RENCONTRES AU NIVEAU DES ÉCOSYSTEMES CHIMIOSYNTHETIQUES

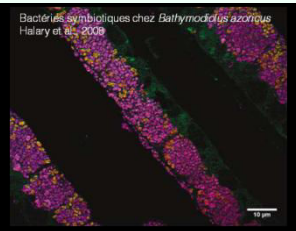
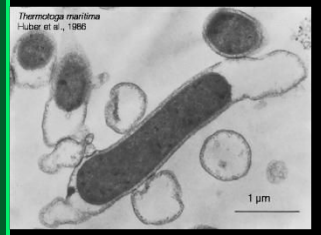
Les microorganismes marins benthiques, phylogénétiquement répartis au sein des *Bacteria* et des *Archaea*, présentent une importante densité et diversité taxonomique et fonctionnelle dans les sédiments, constituant une biomasse et un réseau métabolique considérable, comme nous l'avons vu dans la partie du manuscrit consacrée à la nutrition microbienne. En effet, le nombre de cellules microbiennes présentes dans les sédiments a récemment été estimé à 2.9 x 10^{29} cellules (Kallmeyer et al., 2012). Cette abondance cellulaire varie en fonction des zones étudiées (Kallmeyer et al., 2012) et décroît de manière logarithmique en fonction de la profondeur des sédiments (Parkes et al., 2000). Cette variation semble être corrélée avec la disponibilité en accepteurs d'électrons énergétiquement favorables et en substrats carbonés (Engelen and Cypionka, 2009; Kallmeyer et al., 2012). La colonisation des différentes couches de sédiments va se faire suivant les gradients géochimiques en présence (Jørgensen, 1977; Orcutt et al., 2011).

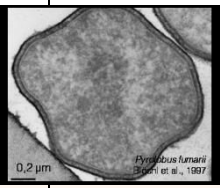
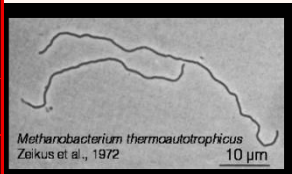
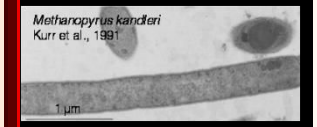
La majorité des microorganismes présents dans les environnements naturels ne peut pas être cultivée ou isolée avec des techniques de culture traditionnelles, du fait de la complexité de leur milieu de vie (Amann et al., 1995; Hugenholtz et al., 1998). Afin de s'affranchir des difficultés culturales, la plupart des études actuelles portant sur la diversité microbienne reposent sur l'étude de gènes marqueurs phylogénétiques et reflets de l'évolution, comme ceux codant l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S) (Woese et al., 1990; Baker et al., 2003). Le séquençage des gènes codant l'ARNr 16S a ainsi permis de détecter dans les environnements naturels de nombreuses séquences génétiques correspondant à de « nouveaux » microorganismes, et il est considéré que les microorganismes identifiés par les techniques culturales représentent moins de 1% des communautés microbiennes environnementales (Rappé and Giovannoni, 2003). La fonction environnementale, la niche écologique et l'écophysiologie de ces nouvelles et nombreuses lignées microbiennes mises en évidence par séquençage nous échappent encore pour la plupart. De même, l'incorporation et le suivi de substrats marqués (isotopes stables ou radioactifs), ou le séquençage de parties entières de génomes environnementaux peuvent révéler certaines particularités métaboliques. La quantification par PCR quantitative du nombre de copies des gènes cibles présents dans les échantillons ainsi que l'observation et le dénombrement *ex situ* de microorganismes spécifiques grâce à l'utilisation de sondes moléculaires fluorescentes (Fluorescent *in situ* Hybridization, FISH) peuvent permettre d'aboutir à une identification des niches écologiques et une localisation précise des espèces microbiennes au sein des échantillons qui peuvent refléter des besoins ou des restrictions environnementales particulières. Les techniques utilisées pour l'étude des communautés microbiennes environnementales seront davantage discutées plus loin dans le manuscrit, dans un chapitre intitulé « *Réflexions autour des techniques utilisées* ».

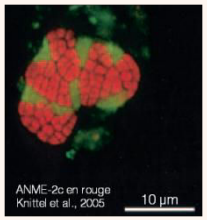
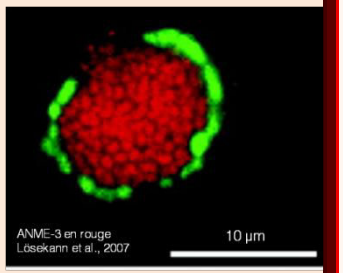
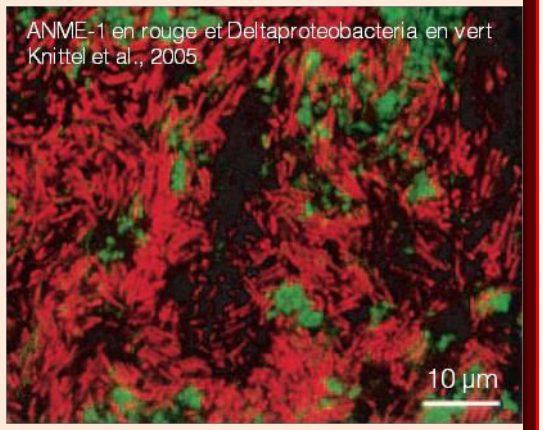
Le but des tableaux présentés dans les pages suivantes de ce manuscrit n'est pas de dresser un inventaire exhaustif de toute la diversité microbienne présente au niveau des écosystèmes marins profonds. Ici, il est plutôt question de survoler brièvement les grands groupes microbiens, ainsi que leurs principales caractéristiques, habituellement retrouvés dans les inventaires moléculaires portant sur les écosystèmes chimiosynthétiques.

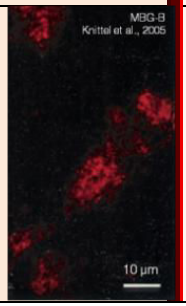
				Environnements colonisés	Métabolismes	Particularités	Références
BACTERIA	Bacteroidetes-CFB Group	Bacteroidia	Bacteroidales			Chimioorganotrophes connus pour dégrader la matière organique dans de nombreux environnements et notamment l'eau de mer	(Bruns et al., 2001; Stevens et al., 2005)
		Sphingobacteriia	Sphingobacteriales				
		Bacteroidetes					
		Flavobacteria	Flavobacteriales				
		Cytophagia	Cytophagales				
	Candidate Division JS1 / OP9			Sédiments anoxiques riches en méthane, nombreux environnements marins, sources hydrothermales, suintements froids, sédiments côtiers et profonds	Anaérobie strict	Suggestion utilisation de l'acétate ou rôle dans la dégradation de la matière organique	(Webster et al., 2004; Webster et al., 2006; Webster et al., 2007; Biddle et al., 2012)
	Candidate division NC-10				Oxydation du méthane sans autres partenaires microbiens, réduction des nitrates	Seraient capables d'AOM couplée à la réduction des nitrates	(Raghoebarsing et al., 2006; Ettwig et al., 2009; Ettwig et al., 2010)
	Chlamydiae/ Verrucomicrobia	Verrucomicrobia		Communément détectées dans les sols, elles sont généralement faiblement représentées dans les sédiments marins			(Sangwan et al., 2005; Freitas et al., 2012)
	GBG Guaymas Bacterial Group ou Hot Seep-1 Cluster			Sédiments riches en méthane, sédiments hydrothermaux du Bassin de Guaymas		Associées en agrégats aux ANME-1	(Holler et al., 2011; Kellermann et al., 2012)
	GNS (Green Non Sulfur Bacteria)	Chloroflexi	Subphylum I (*'Anaerolineae'*)		Anaérobies - Chimioorganotrophes	*Chloroflexi* fréquemment observées dans les sédiments marins profonds. Subphylums I et II parfois même majoritaires	(Björnsson et al., 2002; Rappé and Giovannoni, 2003; Inagaki et al., 2006; Reed et al., 2006; Kragelund et al., 2007; Webster et al., 2007; Durbin and Teske, 2011; Löffler et al., 2013)
			Subphylum II (*'Dehalococcoides)*		Hétérotrophe, dégradation des composés chlorés – Anaérobie		
			Subphylum III (*'Chloroflexi'*)		Hétérotrophe aérobie - Phototrophe		
			Thermomicrobia				

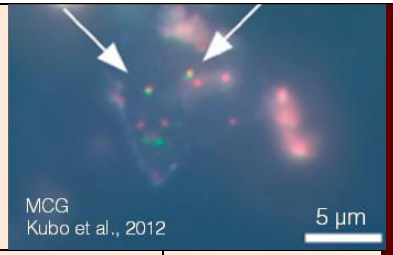
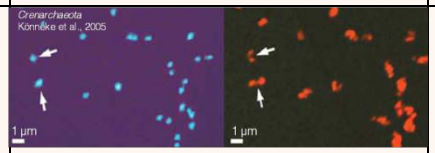
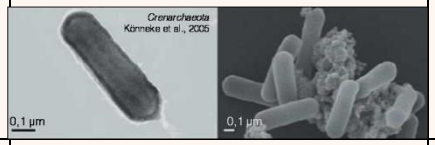
BACTERIA	Planctomycetes	Planctomycetia	C. Brocadiales	C. Brocadiaceae	*C. Brocadia*			Groupe répandu dans de nombreux environnements (sols, sédiments, eaux douces, eaux salées, environnements hydrothermaux), certaines Planctomycetes, voisines des *Pirellula,* sont capables de réaliser l'oxydation anaérobie de l'ammonium (Anamox)	(Schmid et al., 2000; Jetten et al., 2003; Schmid et al., 2005; Strous et al., 2006; Wagner and Horn, 2006; Byrne et al., 2008; Russ et al., 2013)
					C. Kuenenia				
					C. Annamoxoglobus				
					C. Scalindua				
			Planctomycetales	Planctomycetaceae	*Planctomyces*				
					Pirellula				
	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterales	Desulfobacteraceae	SEEP-SRB1 	Sédiments riches en méthane, mangroves, environnements hypersalés	SEEP – SRB1 : Réduction composés soufrés Certains membres des Desulfobacteracea oxydent l'acétate, oxydation des phosphites chez *Desulfotignum phosphitoxidans* (autotrophe anaérobie)	SEEP – SRB1 retrouvées principalement associées aux ANME-2, et aussi aux ANME-3 mais aussi en cellules isolées (surtout SEEP-SRB1a)	(Dhillon et al., 2003; Dhillon et al., 2005; Schreiber et al., 2010; Kleindienst et al., 2012)
				Desulfobulbaceae	SEEP-SRB3	Sédiments riches en méthane	SEEP – SRB3 et 4 : Réduction composés soufrés Certains membres des Desulfobulbaceae oxydent le propionate. Certains sont capables de disproportionation	Retrouvées associées à l'AOM	(Teske et al., 2002; Schreiber et al., 2010; Kleindienst et al., 2012; Milucka et al., 2012)
					SEEP-SRB4				
			SEEP-SRB2			Sédiments riches en méthane	Réduction composés soufrés	Retrouvées associées à l'AOM	(Knittel et al., 2003; Schreiber et al., 2010; Kleindienst et al., 2012)
			Syntrophobacterales - Syntrophobacteraceae					Fermenteurs secondaires syntrophes pour les méthanogènes	(Morita et al., 2011)

BACTERIA			Desulfuromonadales	Desulfuromonadaceae		Réduction des sulfures (*Desulfuromusa*)	Réduction du soufre élémentaire, peut également utiliser des composés soufrés plus oxydés comme le thiosulfate	(Morita et al., 2011)
				Geobacteraceae		Fermenteurs secondaires syntrophes pour les méthanogènes		
			Desulfovibrionales			Dismutation du soufre (*Desulfovibrio sulfodismutans*)		(Bak and Pfennig, 1987)
		Gammaproteobacteria	Thiotrichales - Thiotrichaceae	*Beggiatoa*	Environnements marins, interface eau/sédiments (Tapis microbien)	Sulfo-oxydante, réduction du nitrate Peut stocker le nitrate et le soufre à l'intérieur de la cellule	Principaux groupes détectés dans les sédiments sont autotrophes microaérophiles, certains sont impliqués dans la dégradation des hydrocarbures, certains sont méthanotrophes aérobies (symbioses), bactéries géantes des tapis microbiens (indicateurs de sortie de fluides)	(Weber and Jorgensen, 2002; Dubilier et al., 2008)
				Thioploca				
				Thiomargarita				
			Methylococcales - Methylococcaceae	*Methylobacter*		Méthanotrophes - Aérobie		(Duperron et al., 2005; Niemann et al., 2006; Halary et al., 2008)
				Methylomonas				
		Epsilonproteobacteria	*Sulfurovum*			Généralement aérobies, autotrophes, sulfo-oxydant (oxydation thiosulfate aussi) dans les sédiments marins	Généralement associées à la macrofaune de surface (*Rimicaris*, *Alvinella*)	(Huber et al., 2007; Yamamoto et al., 2010)
	Thermodesulfobacteria - Thermodesulfobacteriaceae					Sulfato-réduction	Thermophile	(Garrity and Holt, 2001; Alain et al., 2010)
	Thermotogae - Thermotogales					Chimioorganotrophes, fermentaires. Réduction du soufre élémentaire ou de composés soufrés plus oxydés comme le thiosulfate		(Huber et al., 1986)

					Environnements colonisés	Métabolismes	Particularités	Références
ARCHAEA	Crenarchaeota	Thermoprotei - Desulfurococcales		Pyrodictiaceae	*Pyrolobus*		Procaryote le plus thermophile connu	(Blöchl et al., 1997; Teske et al., 2002; Dhillon et al., 2005)
	Euryarchaeota	Archaeoglobi - Archaeoglobales		Archaeoglobaceae	*Archaeglobus*	Sources hydrothermales	Sulfato-réducteurs hyperthermophiles	Retrouvées sédiments hydrothermaux du Bassin de Guaymas	(Teske et al., 2002)
		Methanobacteria - Methanobacteriales		Methanobacteriaceae	*Methanobacterium*		Méthanogènes		(Zeikus and Wolee, 1972; Dhillon et al., 2005)
		Methanococci - Methanococcales		Methanococcaceae	*Methanococcus*			Retrouvées dans le Bassin de Guaymas.	(Teske et al., 2002)
				Methanocaldococcaceae	*Methanocaldococcus*			*M. jannaschii*, chimiolithotrophe obligatoire, thermophile	(Dhillon et al., 2005)
		Methanopyri - Methanopyrales		Methanopyraceae	*Methanopyrus*			Retrouvées dans le Bassin de Guaymas, dont *Methanopyrus kandleri* le méthanogène le plus thermophiles identifiés à ce jour (isolé dans Bassin de Guaymas)	(Kurr et al., 1991; Teske et al., 2002; Dhillon et al., 2005)
		Methanomicrobia	Methano-microbiales	Methanocorpusculaceae	*Methanocorpusculum*				(Robinson et al., 1985; Whitman et al., 2001; Dhillon et al., 2005)
				Methanomicrobiaceae	*Methanogenium*				
					Methanomicrobium				
			Methanosarcinales	Methanosaetaceae	*Methanosaeta*			*Methanosaeta concilii* méthanogène acétoclastique	
				Methanosarcinaceae	*Methanolobus*				
					Methanosarcina				
					Methanococcoides				
				GoM-Arc-I		Environnements riches en méthane		Anciennement appelés ANME-2d. Éventuelle implication dans le cycle	(Mills et al., 2004; Lloyd et al., 2006)

							du méthane	
ARCHAEA	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanosarcinales	ANME-2	ANME-2ab	Suintements froids 	Fonction de méthanotrophes anaérobies semble être confirmée	Retrouvées associées aux *Desulfobacteraceae* et notamment aux SEEP-SRB1a. Petite portion retrouvées associées aux *Desulfobulbaceae* et à des *Alpha-* et *Betaproteobacteria.* Fixation éventuelle du diazote	(Hinrichs et al., 1999; Boetius et al., 2000; Orphan et al., 2001; Teske et al., 2002; Niemann et al., 2006; Dekas et al., 2009)
					ANME-2c				
				ANME-3 		Suintements froids	Rôle dans l'oxydation anaérobie du méthane suggéré. Écophysiologie reste discutée	Retrouvées associées majoritairement à des *Desulfobulbaceae* mais aussi à des *Desulfobacteraceae*. Retrouvées aussi sans partenaires bactériens. Aussi observées en amas monospécifiques ou sous forme de cellules isolées	(Hinrichs et al., 1999; Teske et al., 2002; Niemann et al., 2006; Lösekann et al., 2007; Omoregie et al., 2008)
		ANME-1 				Suintements froids, biosphère profonde, environnements terrestres	Pourraient être méthanotrophes anaérobies. Éventuellement méthanogènes en fonction des conditions environnementales. Seraient autotrophes. Fonction écologique reste actuellement débattue.	Retrouvées principalement associées aux *Desulfobacteraceae*, retrouvées associées ou HotSeep-1 Cluster ou GBG du Bassin de Guaymas. ANME-1 retrouvées aussi sans partenaires sous forme d'amas monospécifiques. Groupe monophylétique ANME-1-Guaymas uniquement retrouvées dans le bassin de Guaymas. Pourraient être plus sensible à l'oxygène que les ANME-2.	(Hinrichs et al., 1999; Orphan et al., 2002; Teske et al., 2002; Knittel et al., 2005; Orcutt et al., 2005; Lloyd et al., 2006; Niemann et al., 2006; Omoregie et al., 2008; Pachiadaki et al., 2010; Bowles et al., 2011; Lloyd et al., 2011; Pachiadaki et al., 2011; Kellermann et al., 2012; Maignien et al., 2013)
		Halobacteria - Halobacteriales		Halobacteriaceae	Halobacterium			Archées halophiles	(Madigan and Orent, 1999)
		MBG-E (Marine Benthic Group - E)				Sédiments de zones non actives	Suggestion métabolisme basé sur oxydation du fer		(Vetriani et al., 2003; Suzuki et al., 2004)

ARCHAEA	Euryarchaeota	SAGMEG (South African Goldmine Euryarchaeotal Group)			Sous-sol terrestre profonds, mines d'or, sédiments marins profonds, systèmes hydrothermaux	Pourraient être hétérotrophes, anaérobies. Implication éventuelle dans le cycle du méthane	Fonction environnementale reste méconnue	(Takai et al., 2001; Reed et al., 2002; Inagaki et al., 2003; Sorensen and Teske, 2006; Teske and Sorensen, 2008)
		Thermoplasmata – Thermoplasmatales	MBG-D		Habitats variés marins et limniques, sédiments suintements froids, sédiments marins profonds, sources hydrothermales, volcans de boue mais aussi sols des mangroves et salins	Fonction environnementale actuellement discutée	Retrouvés dans zone AOM, souvent retrouvés dans les habitats de suintements de méthane. MBG-D correspond aux MG-III. Retrouvés dans les sédiments du Bassin de Guaymas. Suggestion d'implication dans le processus d'AOM, autre possibilité, métabolisme basé sur la dégradation de la matière organique	(Takai and Horikoshi, 1999; Orphan et al., 2001; Teske et al., 2002; Mills et al., 2003; Vetriani et al., 2003; Heijs et al., 2005; Knittel et al., 2005; Biddle et al., 2006; Kendall et al., 2007; Teske and Sorensen, 2008; Pachiadaki et al., 2011; Schubert et al., 2011; Biddle et al., 2012; Borrel et al., 2012)
			Picrophilaceae	*Picrophilus*		Le plus acidophile de tous les procaryotes connus	Procaryote le plus acidophile connu	(Schleper et al., 1995)
		Thermococci - Thermococcales	Thermococcaceae			Assimilent et fermentent des composés organiques complexes		(Erauso et al., 1993)
	Thaumarchaeota	MBG-A (Marine Benthic Group - A)			Sédiments marins	Fonction écologique inconnue	Très minoritaires dans les inventaires moléculaires. Fonction écologique inconnue	(Vetriani et al., 2003; Teske and Sorensen, 2008; Dang et al., 2010)
		MBG-B (Marine Benthic Group - B) 			Proche zone suintements froids, sites hydrothermaux, sédiments marins profonds. Environnements marins anoxiques	Pourraient oxyder le méthane sans en assimiler le carbone, pourraient faire méthanogenèse, pourraient être hétérotrophes et utiliser substrats organiques. Pourraient aussi réduire les oxydes de fer. Implication éventuelle dans le cycle du soufre	Pourraient bénéficier directement ou indirectement de l'AOM. Synonyme DSAG (Deep-Sea Archaeal Group). Retrouvés dans le Bassin de Guaymas.	(Takai and Horikoshi, 1999; Vetriani et al., 1999; Teske et al., 2002; Sorensen et al., 2004; Knittel et al., 2005; Biddle et al., 2006; Inagaki et al., 2006; Teske and Sorensen, 2008; Brochier-Armanet et al., 2012; Jorgensen et al., 2012)

ARCHAEA	Thaumarchaeota	MCG (Miscellaneous Crenarchaeotic Group)				Suintements froids, biosphère profonde, environnements terrestres, lacs, sédiments marins de surface, source chaudes terrestres et marines	Utiliseraient le carbone organique enfoui. Pourraient être hétérotrophes anaérobies qui utilisent et assimilent substrats organiques complexes. Éventuelle oxydation dissimilative du méthane (pas d'assimilation)	Groupe qui domine les banques de clones des sédiments marins profonds. Retrouvés dans Bassin de Guaymas	(Barns et al., 1996; Vetriani et al., 1999; Teske et al., 2002; Biddle et al., 2006; Teske, 2006; Teske and Sorensen, 2008; Brochier-Armanet et al., 2012; Jorgensen et al., 2012; Kubo et al., 2012)
		MG-I (Marine Group - 1)	Cenarchaeales - Cenarchaeaceae	*Cenarchaeum*	Fréquemment détectées au niveau des sédiments de surface des planchers océaniques.	 Archées aérobies planctoniques autotrophes, présentant un métabolisme basé sur l'oxydation de l'ammonium en nitrite. Certains membres des MG-I présentent un métabolisme mixotrophe basé sur la dégradation des molécules d'urée 	Groupe procaryote le plus abondant dans les eaux océaniques profondes, aussi retrouvé dans sédiments marins. Certains seraient aérobies, autotrophes et oxyderaient l'ammonium, d'autres seraient anaérobies, mais oxyderaient aussi l'ammonium en nitrite avec un autre accepteur d'électrons (première exemple de nitrification chez les Archées). *Cenarchaeum symbiosum* (symbionte éponge) oxyderait l'ammonium	(DeLong et al., 1999; Konneke et al., 2005; Sorensen and Teske, 2006; Teske and Sorensen, 2008; Dang et al., 2010; Durbin and Teske, 2011; Pachiadaki et al., 2011; Alonso-Sáez et al., 2012; Brochier-Armanet et al., 2012; Jorgensen et al., 2012)
			Nitrosopumilales - Nitrosopumilaceae	*Nitrosopumilus*				
	AAG (Ancient Archaeal Group)				Sources hydrothermales et aussi sédiments de marges continentales, riches en matière organique			(Takai and Horikoshi, 1999; Inagaki et al., 2003; Sorensen and Teske, 2006; Teske and Sorensen, 2008; Dang et al., 2010)
	MHVG (Marine Hydrothermal Vent Group)				Sources hydrothermales et dans sédiments froids de sub-surface			(Takai and Horikoshi, 1999; Takai et al., 2001; Inagaki et al., 2003; Teske and Sorensen, 2008; Dang et al., 2010)

C/ CAS PARTICULIERS DES TAPIS MICROBIENS

Le terme de « tapis microbien » vient de la structure macroscopique que ces écosystèmes microbiens adoptent. Ils forment en effet des voiles denses à la surface des sédiments. Les microorganismes filamenteux à la taille imposante qui les forment se développent en une sorte de masse enchevêtrée avec les particules de sédiments (Stal and Caumette, 1993). Les tapis microbiens se développent souvent dans des environnements caractérisés par des conditions de vie extrêmes qui excluent les métazoaires. Ces derniers dévoreraient dans le cas contraire les microorganismes et les empêcheraient de former un tapis (Stal and Caumette, 1993). Les microorganismes formant les tapis microbiens sont généralement autotrophes et puisent leur énergie dans l'oxydation de composés réduits comme le méthane ou le sulfure (Jørgensen, 1977; Stal and Caumette, 1993).

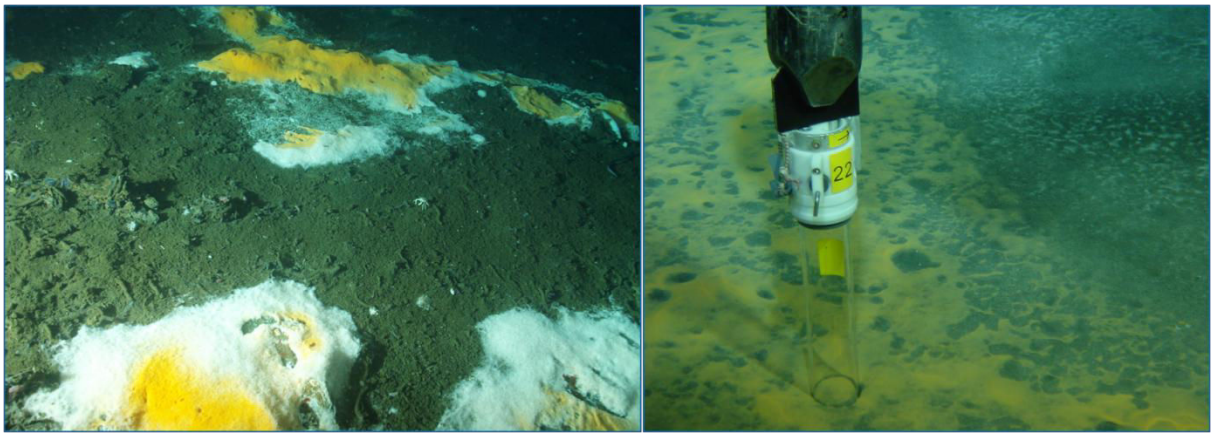


Figure 25 : Tapis microbiens. A gauche, tapis microbiens du Bassin de Guaymas, zone de sources hydrothermales de Southern Trough. Ifremer - BIG 2010. A droite, tapis microbiens orange associés au volcan de Boue Napoli, en mer Méditerranée. Ifremer – MEDECO 2007

Ce sont des bactéries géantes filamenteuses affiliées à l'ordre des Thiotrichales, principalement des genres *Beggiatoa*, *Thiomargarita* et *Thiothrix* (*Gammaproteobacteria*), qui forment souvent ces tapis microbiens (Kalanetra et al., 2004; Grünke et al., 2011; McKay et al., 2012). Ces bactéries géantes peuvent être blanches, jaunes ou oranges et former d'immenses tapis microbiens de plusieurs mètres de diamètre, qui recouvrent la surface des fonds marins au niveau d'écosystèmes riches en sulfures, comme c'est le cas des suintements froids et dans les écosystèmes hydrothermaux sédimentaires (Figure 25) (Mills et al., 2004; Lloyd et al., 2010; McKay et al., 2012). La coloration blanche est due à la nature réfringente des granules de soufre élémentaire qu'elles peuvent stocker dans leur cytoplasme (Schulz and Jorgensen, 2001). Les tapis orange sont quant à eux souvent associés aux zones riches en hydrocarbures, et il a été proposé que la pigmentation des bactéries qui les composent soit reliée à leur source principale de carbone (Larkin and Henk, 1996; Hovland et al., 2005). Cependant, une étude récente a par ailleurs proposé l'existence d'un lien entre la couleur des filaments et leur affiliation phylogénétique (McKay et al., 2012). Les Thiotrichales, des genres *Beggiatoa* et *Thiothrix* sont des bactéries autotrophes sulfo-oxydantes. Elles sont localisées aux interfaces oxiques/anoxiques en surface des sédiments, ce qui leur permet d'utiliser l'oxygène de l'eau de mer pour oxyder les composés soufrés. Ces bactéries sont capables de

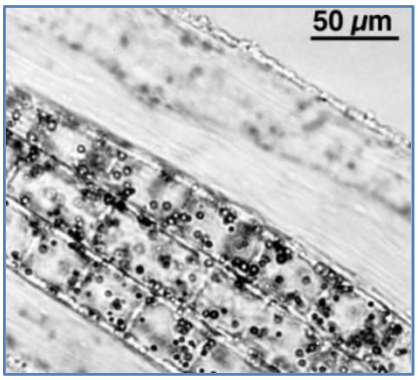


Figure 26 : *Thioploca araucae.* Photographie en microscopie optique montrant des inclusions de soufre (Schulz and Jorgensen, 2001)

se mouvoir par glissement et de s'enfouir dans les sédiments lorsque les conditions environnementales sont moins favorables (Schulz and Jorgensen, 2001; Gruenke et al., 2011). Ces tapis microbiens sont souvent utilisés comme indicateurs visuels de sorties de fluides au niveau des écosystèmes chimiosynthétiques marins (Mills et al., 2004; Lloyd et al., 2010).

2) Les symbioses

*Un **réseau trophique** se définit comme l'ensemble des relations alimentaires entre espèces au sein d'une communauté et par lesquelles l'énergie et la matière circulent (Lindeman, 1942).*

Les microorganismes constituent donc le premier maillon de la chaîne trophique des écosystèmes chimiosynthétiques profonds, ce sont les *producteurs primaires* (Van Dover et al., 2002). Cette production primaire va permettre l'installation des consommateurs primaires (également producteurs secondaires), notamment au sein d'associations symbiotiques. Dans ce cas, les symbiontes microbiens thiotrophes et/ou méthanotrophes apportent à leur hôte l'énergie vitale nécessaire (Dubilier et al., 2008). De nombreux cas de symbioses ont été décrits au niveau des environnements chimiosynthétiques. Parmi eux, on trouve les *Siboglinidae*, dont fait partie le ver géant *Riftia pachyptila*, les *Mytilidae*, comme par exemple le bivalve *Bathymodiolus*, les *Vesicomyidae*, comme *Calyptogena magnifica*, ou encore les *Alvinocarididae*, comme la crevette *Rimicaris exoculata* (Figure 7, Figure 15, Figure 14, Figure 27). Nous allons nous intéresser ici de plus près aux invertébrés vivants en symbiose avec des bactéries et colonisant le Bassin de Guaymas, site d'étude de cette thèse. Nous nous intéresserons tout d'abord aux vésicomyidés, qui ont fait l'objet d'une étude poussée au cours de cette thèse puis aux siboglinidés.

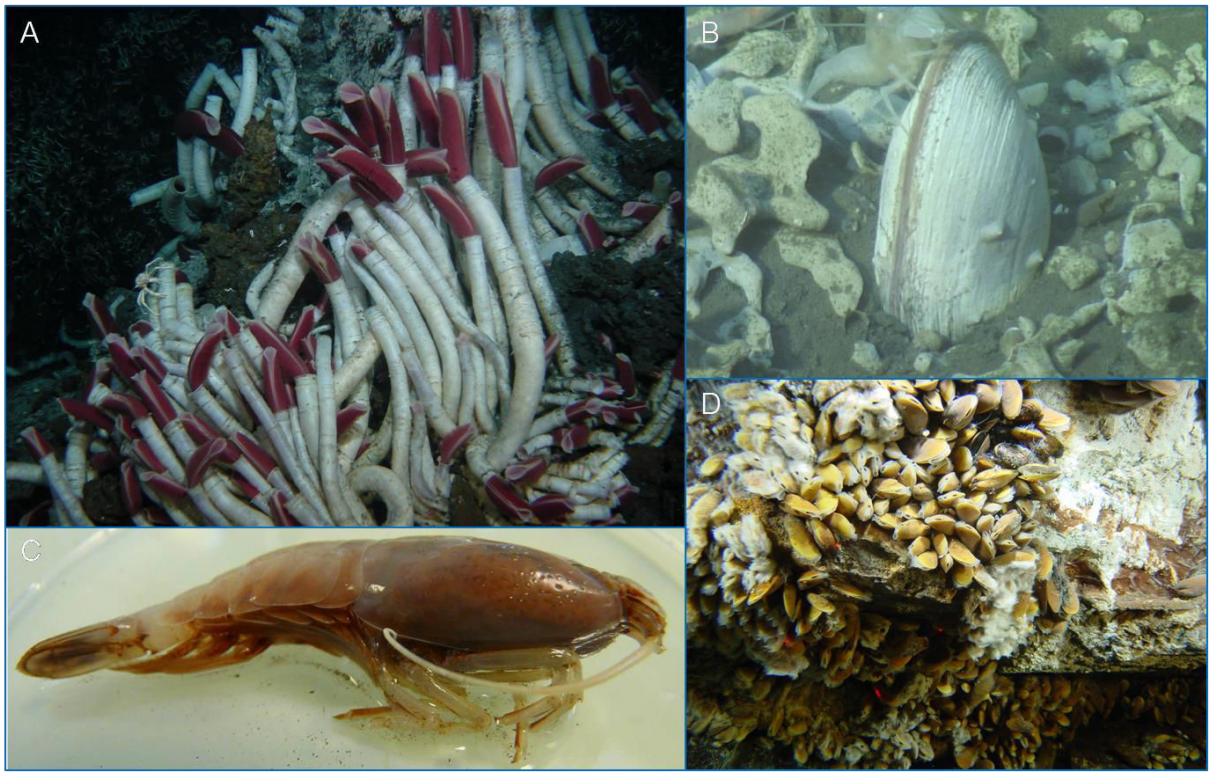


Figure 27 : Quelques exemples d'invertébrés vivant en symbiose avec des microorganismes. (A) Le ver géant *Riftia*. Dorsale Pacifique Oriental. Ifremer – PHARE 2002. (B) Bivalve *Vesicomyidae*. Golfe de Guinée. Ifremer – WACS 2011. (C) Crevette *Rimicaris exoculata*. Photo Cruaud 2010. (D) Moules *Bathymodiolus*. Dorsale médio-Atlantique, site Lucky Strike. Ifremer – EXOMAR 2006

A/ LES VESICOMYIDES

Les vésicomyidés sont un des éléments majeurs de la faune associée aux écosystèmes chimiosynthétiques (Figure 28) (Childress et al., 1991a; Sibuet and Olu-Le Roy, 2002). Ce sont des mollusques bivalves qui vivent en symbiose avec des bactéries oxydant l'hydrogène sulfuré (H_2S). Ils colonisent les habitats riches en sulfures tels que les suintements froids et les sources hydrothermales (Peek et al., 1998). Ils ont un système digestif très réduit (Fiala-Médioni and Métivier, 1986) et dépendent, tout du moins pour une grande partie, de leurs symbiontes pour vivre. Ils sont plus ou moins enfouis dans le sédiment entre environnements oxique et anoxique (Figure 29). Leurs siphons sont dirigés vers l'eau de mer, environnement oxique, où ils captent l'oxygène et le dioxide de carbone nécessaires à leur métabolisme et à celui de leur symbionte. Leur pied est quant à lui enfoui dans le sédiment, environnement anoxique, dans lequel il puise les sulfures pour le métabolisme sulfo-oxydant de leurs symbiontes. Chacun des partenaires de cette association est essentiel à la survie de l'autre, c'est une symbiose obligatoire.

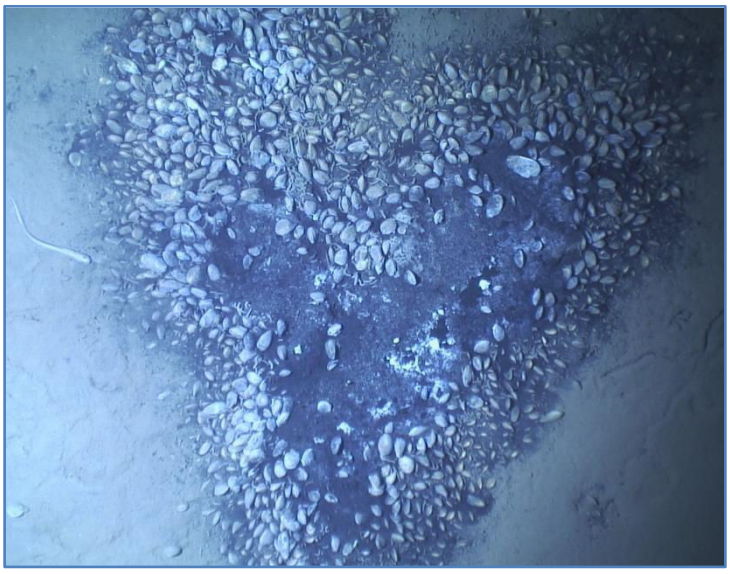


Figure 28 : Coeur de vésicomyidés. Golfe de Guinée. Ifremer – WACS 2011

(1) Brève taxonomie des bivalves *Vesicomyidae*

La famille des mollusques *Vesicomyidae* recense actuellement plus d'une centaine d'espèces vivantes et fossiles décrites ou en cours de description, réparties dans deux sous-familles : les *Vesicomyinae* et le *Pliocardiinae* (Krylova and Sahling, 2010). La sous-famille des *Vesicomyinae* ne contient qu'un seul genre : *Vesicomyia*, qui regroupe des espèces de petite taille (moins de 100 mm), caractérisées par un système digestif non-réduit (Krylova and Sahling, 2010). La présence de bactéries symbiotiques n'a pas été montrée chez les espèces de cette sous-famille et le genre n'est pas restreint aux environnements réduits riches en sulfure (Krylova and Sahling, 2010). La seconde sous-famille des *Vesicomyidae*, les *Pliocardiinae*, regroupe une quinzaine de genres retrouvés dans les environnements réduits riches en sulfure (Krylova and Sahling, 2010). Leur système digestif est très réduit et ils dépendent pour leur nutrition de bactéries symbiontes sulfo-oxydantes localisées dans leurs branchies (Fiala-Médioni and Métivier, 1986; Fisher, 1990; Decker, 2011). Dans ce manuscrit, nous ne parlerons que des *Pliocardiinae* que nous appellerons, pour simplifier, vésicomyidés.

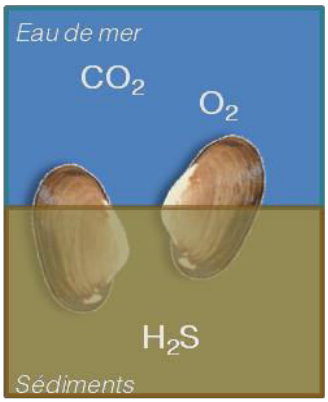


Figure 29 : Position des vésicomyidés dans le sédiment

La taxonomie des vésicomyidés reste relativement instable en ce qui concerne la définition des différents genres et espèces. L'échantillonnage reste encore limité et il est difficile de définir toute la phylogénie de ces bivalves sans en connaître la diversité. D'autant plus

que les études moléculaires révèlent que l'assignation taxonomique des vésicomyidés basée uniquement sur la morphologie est souvent problématique (Vrijenhoek et al., 1994; Peek et al., 1997; Goffredi et al., 2003). Cette dernière conduit parfois à identifier certains individus à de mauvais groupes, et il arrive que certains individus du même groupe soient affiliés à deux groupes différents. Les études détaillées de taxonomie qui comparent les caractères morphologiques et moléculaires sont donc nécessaires (Audzijonyte et al., 2012; Decker et al., 2012).

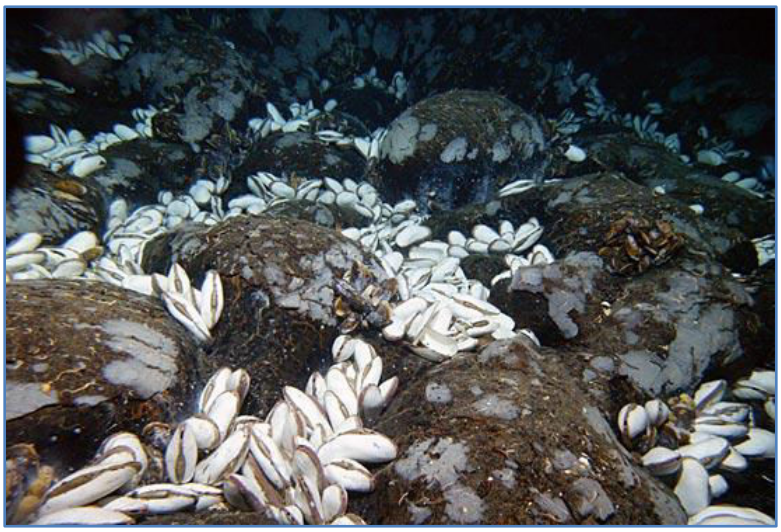


Figure 30 : *Calyptogena magnifica.* Rift des Galapagos. Photo T. Shank – Woods Hole Oceanographic Institution

(2) Petite anatomie du vésicomyidé

La taille des bivalves *Vesicomyidae* varie en fonction des espèces. Les espèces les plus petites appartiennent au genre *Vesicomya* et *Isorropodon* (0,1 à 2 cm) (Krylova and Sahling, 2010) et les espèces les plus grandes sont *Calyptogena magnifica* (30 cm) (Figure 30) et *Abyssogena southwardae* (28 cm).

Les vésicomyidés sont des bivalves possédant, entre autres, un pied, qui leur permet notamment de s'orienter dans le sédiment, des siphons, dirigés vers l'eau de mer et qui permettent les entrées/sorties de l'eau au sein du vésicomyidé, et de très grosses branchies (Figure 31) (Fiala-Médioni and Lepennec, 1989).

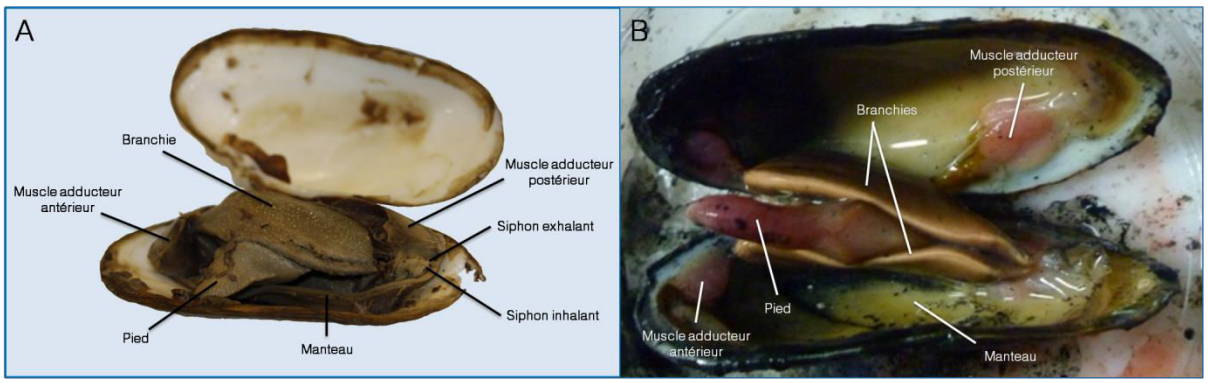


Figure 31 : Anatomie du vésicomyidé. (A) L'individu n'est pas frais mais préalablement fixé au formol, les couleurs et la consistance des organes ne reflètent donc pas la réalité. Les éléments intéressants sont pour autant bien visibles. Ce vésicomyidé correspond à l'espèce *Phreagena soyoae* et provient du Bassin de Guaymas (Campagne BIG 2010). (B) Individu frais, juste ouvert après sa remontée du fond. Il provient du Golfe de Guinée (Campagne CongoLobe 2011)

Le système digestif est très réduit alors que les branchies sont hypertrophiées (Fiala-Médioni and Lepennec, 1989; Fiala-Medioni and Felbeck, 1990; Childress et al., 1991b). Ces branchies contiennent de très nombreux symbiontes microbiens localisés dans des cellules spécialisées. Ces symbiontes sont des bactéries sulfo-oxydantes autotrophes qui vont utiliser l'énergie issue de l'oxydation de l'hydrogène sulfuré pour assimiler le carbone inorganique en carbone organique, ainsi disponible pour l'hôte (Newton et al., 2007). Les branchies ciliées créent un flux d'eau entrant par le

siphon inhalant, ce qui amène le dioxygène et le dioxyde de carbone dissous à la branchie et donc aux symbiontes branchiaux pour le métabolisme, tant la respiration que la symbiose. Ces organes filtrent donc l'oxygène nécessaire à la survie de l'animal, mais aussi au métabolisme sulfo-oxydant de leurs symbiontes. Les sulfures, quant à eux, sont absorbés au niveau du pied, très vascularisé (Childress et al., 1993; Zal et al., 2000). Grâce à leur pied, les vésicomyidés peuvent ainsi puiser le sulfure présent à plusieurs centimètres sous la surface du sédiment et pourraient adapter leur position afin de contrôler les concentrations en sulfure rencontrées au niveau du pied (Sahling et al., 2002). L'hôte invertébré facilite donc l'accès aux substrats (sulfure, oxygène, dioxyde de carbone) nécessaires pour le métabolisme chimioautotrophe des symbiontes. En échange, la fixation du carbone en carbone organique par les symbiontes permet la nutrition de l'hôte (Newton et al., 2007).

(3) La symbiose côté hôte

Le système digestif des vésicomyidés est donc très réduit. Bien qu'une filtration effective chez différentes espèces ait été mise en évidence (présence de phytodétritus dans les intestins (Fiala-Médioni and Lepennec, 1989; Barry et al., 1997), signatures isotopiques différentes dans les tissus autres que les branchies (Fisher et al., 1988)), la réduction importante des organes liés au système digestif (palpes labiaux, estomac) et les signatures d'isotopes stables mesurées sur de nombreuses espèces indiquent une contribution très majoritaire de la nutrition par voie chimioautotrophe *via* des symbiontes sulfo-oxydants (Rau, 1981; Fisher et al., 1988; Vandover et al., 1989; Soto, 2009).

L'oxygène est capté par les siphons, à partir de l'eau de mer. Le transport de l'oxygène se ferait grâce à une hémoglobine présente dans l'hémolymphe des vésicomyidés, observée chez plusieurs espèces (Terwilliger et al., 1983; Zal et al., 2000).

Pour subvenir aux besoins de leurs symbiontes, les vésicomyidés vont donc devoir puiser du sulfure dans leur environnement. Ce dernier est pourtant considéré comme fortement toxique pour tous les organismes utilisant le métabolisme aérobie, comme c'est le cas des vésicomyidés (Vetter et al., 1991). L'hydrogène sulfuré est en effet un puissant inhibiteur des métalloprotéines comme les hémoglobines et la *cytochrome c oxydase* intervenant dans la chaîne respiratoire. Les vésicomyidés surmontent ce problème en utilisant des protéines qui vont transporter le sulfure. Les composés soufrés sont donc puisés par le pied des vésicomyidés et transportés jusqu'aux symbiontes présents dans les tissus branchiaux, grâce à une protéine spécifique du sérum, appelée SBC pour *Sulfide Binding Protein*, identifiée chez plusieurs espèces de vésicomyidés (Arp et al., 1984; Zal et al., 2000; Dubilier et al., 2008). Cette protéine a une double fonction : elle protège l'hémoglobine et la *cytochrome c oxydase* de l'animal contre le sulfure et elle protège également le sulfure contre son oxydation rapide en présence d'oxygène (Vetter, 1985) jusqu'à son arrivée aux branchies (Childress et al., 1987; Ruelas-Inzunza et al.,

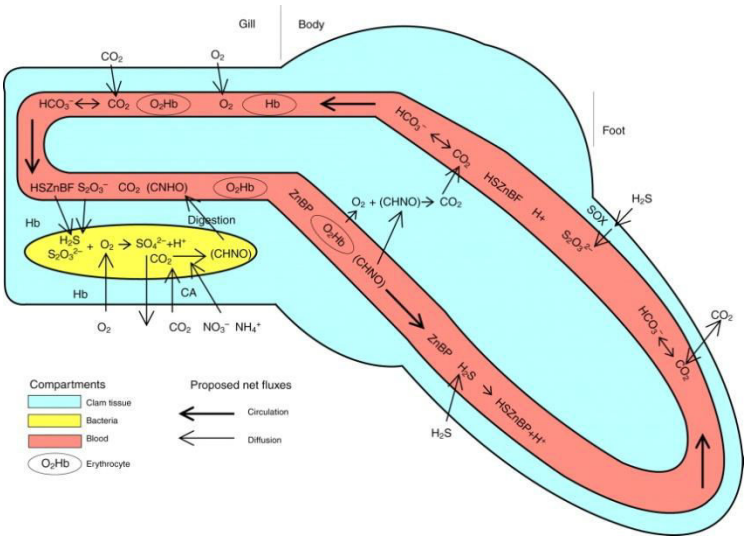


Figure 32 : Diagramme schématique du fonctionnement physiologique d'un bivalve vésicomyidé (*Calyptogena magnifica*). En bleu, le tissu animal, en jaune, les bactéries endosymbiotiques, en orange le système vasculaire. (Childress and Girguis, 2011)

2003). Les branchies sont également protégées par la présence d'une *sulfure oxydase* qui oxyde, comme son nom l'indique, les sulfures (Goffredi and Barry, 2002).

Afin de pouvoir puiser les sulfures dans les sédiments, les vésicomyidés vont devoir s'installer dans des zones où le sulfure est présent. Souvent, la présence des vésicomyidés et des autres animaux qui vivent grâce à la chimiosynthèse sont les témoins qui délimitent approximativement les frontières des fluides libérés au niveau des suintements froids. Lorsque les émissions sont très actives, ils se répartissent toujours majoritairement ou exclusivement dans les zones les moins affectées par les émissions de fluides, et les plus stables (Barry et al., 1997). Dans ces zones, la distribution des vésicomyidés pourrait dépendre de la concentration en sulfure présente dans les sédiments et de la capacité physiologique de l'animal à lier le sulfure. Des variations physiologiques existeraient en effet dans la capacité de stockage et de transport du sulfure entre les différentes espèces de vésicomyidés colonisant des environnements plus ou moins riches. Les affinités des transporteurs respectifs pour l'oxygène et le sulfure pourraient donc influer directement sur les plasticités adaptatives des différentes espèces de vésicomyidés (Barry and Kochevar, 1998; Goffredi and Barry, 2002).

(4) La symbiose côté symbiontes

Chez les bivalves vésicomyidés, les symbiontes sulfo-oxydants sont localisés dans les branchies, à l'intérieur de cellules spécialisées, appelées bactériocytes (Figure 33) (Cavanaugh, 1983; Fiala-Médioni, 1984; Fiala-Médioni and LePennec, 1988). La structure de ces bactériocytes suggèrerait un processus cyclique de colonisation par les bactéries, leur possible résorption et leur remplacement (Fiala-Médioni and Métivier, 1986). Une éventuelle digestion des cellules des symbiontes par l'hôte existerait, ce qui permettrait de cette façon de libérer les nutriments absorbés par la suite, par l'hôte (Kuwahara et al., 2007; Newton et al., 2007).

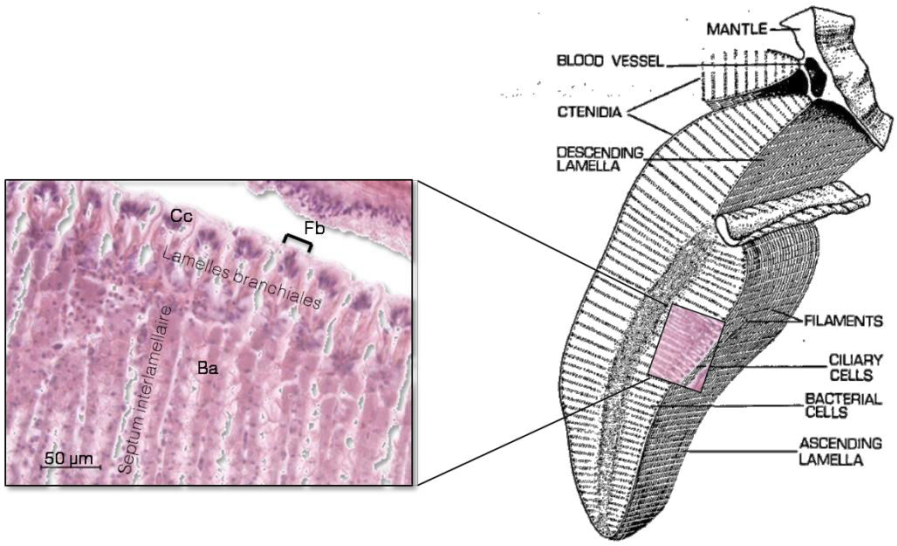


Figure 33 : Représentation transversale schématique de la branchie d'un vésicomyidé (*Calyptogena phaseoliformis*) (à droite) et détail de l'épithélium branchial vu en microscopie (à gauche). Abréviations : Ba = Bactériocytes, Fb = Filament Branchial et Cc = Cellules ciliées. Source Fiala-Médioni and LePennec, 1988 et Ocean Explorer

Ces symbiontes appartiennent au groupe des *Gammaproteobacteria* (Distel et al., 1988; Stewart and Cavanaugh, 2009). Ces bactéries thiotrophes pourraient utiliser différentes voies métaboliques pour la conversion du soufre en énergie, incluant l'oxydation du sulfure, du thiosulfate ou des sulfites. Cette énergie serait ensuite en partie utilisée pour la fixation du carbone par le cycle de Calvin (Kelly, 1989; Nelson and Hagen, 1995). Les produits intermédiaires de l'oxydation du sulfure pourraient aussi

être importants pour la production d'énergie des symbiontes en absence de sulfure environnemental (Goffredi and Barry, 2002). Les symbiontes stockeraient notamment de l'énergie sous forme de soufre élémentaire (Vetter, 1985). Des études ont en effet montré que les symbiontes des vésicomyidés produisent des granules de soufre contenant du soufre élémentaire, des polysulfides ou des polythionates (Vetter, 1985; Fiala-Médioni and Lepennec, 1989; Goffredi and Barry, 2002). Les variations entre individus d'une même espèce (intraspécifiques) et entre individus d'espèces différentes (interspécifiques) dans le contenu en soufre des branchies pourraient être liées à la tolérance des vésicomyidés au regard de la carence en soufre (Goffredi and Barry, 2002).

Une particularité de cette symbiose résulte dans le fait que les bactéries sont transmises d'une génération à l'autre, directement par voie maternelle (Endow and Ohta, 1990; Cary and Giovannoni, 1993; Stewart, 2008; Stewart and Cavanaugh, 2009), sans passage par l'environnement, quoique des cas occasionnels de transmission environnementale et l'échange de symbiontes entre espèces soient également rapportés (Stewart and Cavanaugh, 2009). Il s'ensuit que les symbiontes des vésicomyidés ont évolué vers la réduction de leur génome, perdant ainsi les gènes nécessaires à une vie sous forme libre (Kuwahara et al., 2007). Des études ont d'ailleurs mis en évidence une co-évolution entre hôte et symbiontes (Peek et al., 1998).

(5) Répartition des vésicomyidés dans les écosystèmes sous-marins

Les bivalves de la famille des vésicomyidés sont présents dans un large spectre d'environnements réducteurs profonds (sources hydrothermales, sources de fluides froids, carcasses de baleine) entre 100 et 9 050 m de profondeur et dans le monde entier (Krylova and Sahling, 2010; Audzijonyte et al., 2012). La diversité des vésicomyidés est beaucoup plus importante au niveau des suintements froids qu'au niveau des sources hydrothermales ou des carcasses de baleines (Smith and Baco, 2003). A l'échelle régionale, plusieurs espèces sont souvent présentes, et semblent se distribuer en partie selon un gradient bathymétrique, c'est-à-dire en fonction de la profondeur. Cependant, la cohabitation de plusieurs espèces sur les mêmes sites traduit probablement d'autres adaptations biologiques ou physiologiques à l'hétérogénéité de l'habitat, comme nous l'avons abordé ci-dessus.

B/ LES SIBOGLINIDES

Les siboglinidés sont un des métazoaires emblématiques des environnements chimiosynthétiques, notamment au travers de l'annélide siboglinidé *Riftia pachyptila* qui peut atteindre 2 à 3 mètres de long pour un diamètre de 4 à 5 cm, et qui colonise les sites hydrothermaux du Pacifique (Figure 27A) (Van Dover, 2000). Les siboglinidés vivent dans des tubes de chitine et forment des bouquets au voisinage des sorties de fluides (Figure 34). Ils sont dépourvus de tube digestif, de bouche et d'anus au stade adulte (Felbeck et al., 1981). Leur nutrition est assurée par de

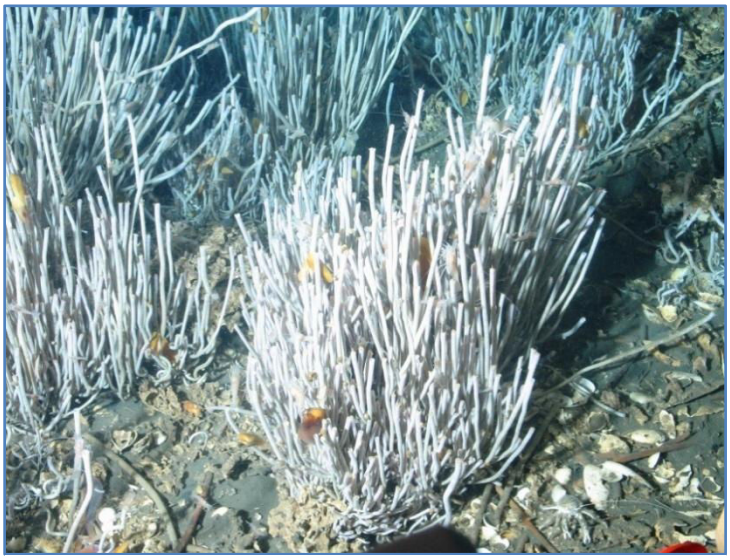


Figure 34 : Buisson de siboglinidés. Golfe de Guinée. Ifremer – WACS 2011

nombreuses bactéries sulfo-oxydantes autotrophes (un endosymbionte par individu (Distel et al., 1988), principalement des *Gammaproteobacteria* (Kimura et al., 2003)) colonisant le trophosome, un organe très vascularisé qui s'étend à toute la région du tronc au sein du tube de chitine (Figure 35) (Cavanaugh et al., 1981; Stahl et al., 1984; Distel et al., 1988; Fisher et al., 1988; Dubilier et al., 2008). La transmission des symbiontes est horizontale et la larve des siboglinidés est aposymbiotique. Ainsi, chaque génération de vers doit être nouvellement colonisée par les symbiontes qui lui sont spécifiques (Cary and Giovannoni, 1993; Di Meo et al., 2000).

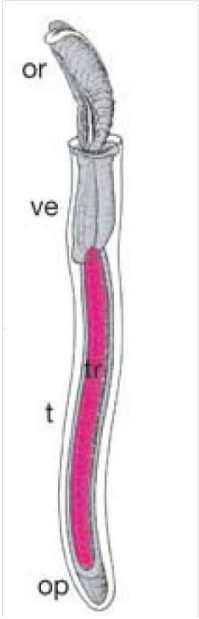


Figure 35 : Schéma de coupe transversale de vestimentifère. Abbréviations : or plume branchiale, ve vestimenteum, t tronc, op opisthosome, tr trophosome. (Nussbaumer et al., 2006)

Alors que chez *Riftia pachyptila* les sulfures nécessaires aux bactéries symbiotiques sont uniquement assimilés au niveau de la branchie (panache rouge sortant du tube de chitine et fixant l'oxygène nécessaire à la respiration du vers) (Van Dover, 2000), les siboglinidés associés aux sources de fluides froids, comme *Lamellibrachia*, peuvent aussi absorber l'hydrogène sulfuré au niveau d'une extension du tube, une sorte de racine, dans le substrat (Julian et al., 1999; Freytag et al., 2001). Cette racine a un rôle structurant pour le milieu car elle entraîne la circulation et l'introduction de sulfate, dissous dans l'eau de mer, jusque dans les sédiments, favorisant, de ce fait, le processus de sulfato-réduction (Boetius, 2005; Cordes et al., 2005). La toxicité de ces sulfures, notamment leur liaison compétitive au site de fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine, est contournée par l'utilisation d'hémoglobine dotée de sites spécifiques de fixation des sulfures à l'aide d'ions zinc (Arp and Childress, 1983; Fisher et al., 1988; Flores et al., 2005). Ces hémoglobines séquestrent et transportent l'H_2S jusqu'au trophosome. Lors de son oxydation par les bactéries, des granules de soufre élémentaire, qui pourraient être une forme de stockage d'énergie, sont formés (Pflugfelder et al., 2005; Dattagupta et al., 2006). L'énergie libérée par l'oxydation des sulfures permet aux bactéries de fixer le carbone inorganique. Cette fixation se ferait en utilisant le cycle de Calvin et une RuBisCO de type II (Robinson et al., 1998). Cependant, certains symbiontes pourraient également utiliser une voie alternative de fixation, le cycle inverse de l'acide citrique (rTCA) (Markert et al., 2007). Ce carbone est ensuite transféré vers l'hôte, soit directement, soit par la digestion des bactéries (Bright et al., 2000).

3) Les autres animaux

Figure 36 : Des ophiures sur le sédiment du Bassin de Guaymas. Ifremer – BIG 2010

De nombreux autres animaux sont présents dans les environnements chimiosynthétiques marins profonds comme les modioles, les crevettes, les crabes ou encore les poissons. Loin d'être exhaustif, voici quelques exemples d'autres invertébrés qui colonisent les environnements chimiosynthétiques

Les ophiures sont des échinodermes voisines des étoiles de mer (Dean, 1999). Elles possèdent cinq bras reliés radialement à un disque central qui leur permettent de se déplacer sur les fonds marins (Watanabe et al., 2012). Leur comportement alimentaire est peu connu : elles peuvent être des omnivores opportunistes (Reimer and Reimer, 1975), des suspensivores (Davoult and Gounin, 1995;

Allen, 1998), des détritivores, des déposivores (Thayer, 1979) ou encore des prédateurs charognards (Aronson and Harms, 1985). Les ophiures ont été longtemps considérées comme absentes des zones de sources hydrothermales, jusqu'à la découverte du nouveau genre *Ophioctenella* (Tyler et al., 1995), qui atteint d'importantes densités le long de la dorsale médio-Atlantique (Sibuet and Olu, 1998). Les ophiures sont aussi bien représentées aux niveaux des zones de suintements froids. Leur présence dans ces zones pourrait s'expliquer par la richesse des sédiments en matière organique (Sibuet and Olu, 1998).

Figure 37 : *Acharax* et ophiures. Bassin de Guaymas. Ifremer – BIG 2010

Les bivalves de la famille des *Solemyidae* vivent en symbiose avec des bactéries autotrophes sulfo-oxydantes dont ils dépendent plus ou moins selon l'espèce (Fisher, 1990). Le genre *Solemya* est généralement retrouvé à faibles profondeurs (0 à 600 m) alors que le genre *Acharax* est retrouvé au niveau de sites plus profonds (de 400 m à 5 379 m) (Figure 37) (Kuznetsov and Schileyko, 1984; Métivier and Von Cosel, 1993; Okutani and Fujikura, 2002). Le genre *Solemya* vit dans les sédiments riches en matière organique, engendrant la présence d'hydrogène sulfuré par sulfato-réduction (Conway et al., 1992). Le genre *Acharax* vit enfoui dans les sédiments réduits, en présence d'hydrogène sulfuré (Sahling et al., 2002; Neulinger et al., 2006). On le trouve au niveau des suintements froids mais aussi au niveau de sédiments proches de sources hydrothermales (Juniper et al., 1992; Métivier and Von Cosel, 1993).

Figure 38 : Une galathée. Golfe de Guinée. Ifremer – WACS 2011

Les galathées sont des crustacés décapodes (Figure 38) (Lovrich and Thiel, 2011). Elles colonisent des environnements marins très variés et peuvent vivre seules ou en agrégats denses (Lovrich and Thiel, 2011). Les galathées sont particulièrement dominantes dans les environnements extrêmes tels que les zones où la concentration en oxygène est très faible, les suintements froids, les sources hydrothermales ou même en Antarctique (Lovrich and Thiel, 2011). Les galathées peuvent être des suspensivores, des déposivores, des charognards, des prédateurs et même, occasionnellement, des cannibales. Elles jouent un rôle important dans le recyclage de la matière organique dans les écosystèmes sédimentaires (Lovrich and Thiel, 2011). Le crabe yéti ou *Kiwa hirsuta* qui colonise les zones de sources hydrothermales fait partie de la famille des galathées (Lovrich and Thiel, 2011).

IV. Le Bassin de Guaymas, site de l'étude

Le Bassin de Guaymas est situé dans le Golfe de Californie (Mexique). Il s'étend sur 1 200 kilomètres de longueur sur 150 kilomètres de large. Il présente la particularité de regrouper à la fois une zone de sources hydrothermales et une zone de suintements froids situées à une soixantaine de kilomètres l'une de l'autre, sans barrière géographique qui les sépare. Par ailleurs, le fond du bassin est recouvert par une importante épaisseur de sédiments. Cela est dû à un taux de sédimentation important (de l'ordre de 2,7 m accumulés tous les 1000 ans) (Simoneit et al., 1990). Le Bassin de Guaymas est en effet alimenté à la fois par de conséquents apports terrigènes qui proviennent de deux fleuves

importants (le Sierra Madre et le Colorado) mais également par une sédimentation de matériel planctonique, riche en matière organique. La couche de sédiments dans le fond du bassin peut ainsi atteindre 500 mètres d'épaisseur. Si la partie hydrothermale du bassin a été plusieurs fois explorée et étudiée (Teske et al., 2002; Dhillon et al., 2003; Dhillon et al., 2005; Biddle et al., 2012; McKay et al., 2012), les communautés microbiennes de la Marge de Sonora, présentant des zones d'émissions de fluides froids, n'ont été que peu étudiées jusqu'à maintenant (Vigneron, 2012; Vigneron et al., 2013; Vigneron et al., 2014). La zone de sources hydrothermales et celle de suintements froids sont colonisées par des assemblages faunistiques comparables : des étendues de bivalves, des buissons de vers tubicoles ainsi que des tapis microbiens blancs ou colorés. La similarité visuelle ainsi que la proximité géographique de ces habitats permettent la réalisation d'une étude comparative inédite et laisseraient suggérer qu'un éventuel transfert de communautés animales et/ou microbiennes pourrait être possible et que ces deux sources d'émissions de fluides pourraient être alimentées par un réservoir commun enfoui profondément dans les sédiments.

Cette thèse fait suite à la campagne BIG (Biodiversité et Interaction à Guaymas ; chef de mission : Anne Godfroy) qui s'est déroulée à l'été 2010. Cette campagne avait pour objectif principal de décrire et de comparer les communautés microbiennes et animales des deux écosystèmes et ce, en liaison étroite avec la caractérisation des gradients physico-chimiques, afin d'évaluer les similitudes taxinomiques et fonctionnelles au sein des deux habitats. Cette thèse avait pour but d'étudier les communautés microbiennes des deux écosystèmes afin de comprendre le rôle structurant de ces communautés sur la répartition des différents assemblages faunistiques. Quelle est la structure des communautés microbiennes des sédiments associées aux différents assemblages faunistiques caractéristiques des écosystèmes hydrothermaux et des zones d'émission de fluides froids ? Quelles sont les caractéristiques métaboliques et fonctionnelles de ces communautés en fonction des caractéristiques physico-chimiques de leur environnement ?

Afin de réaliser cette étude, la diversité des communautés microbiennes (*Bacteria* et *Archaea*) de différents habitats caractérisés par une faune particulière et des profils géochimiques analysés en parallèle, a été étudiée grâce à l'utilisation d'une technique de séquençage haut-débit, le pyroséquençage par la technique du 454. Cette approche a également été combinée avec d'autres techniques comme le FISH ou la PCR quantitative, afin de tenter de reconstituer au mieux le puzzle très complexe du fonctionnement de ces écosystèmes.

Réflexions autour des techniques utilisées

Après cette introduction bibliographique sur les écosystèmes chimiosynthétiques, passons maintenant aux techniques utilisées pour répondre aux problématiques de cette thèse : quelle est la structure des communautés microbiennes des sédiments associées aux différents assemblages faunistiques caractéristiques des écosystèmes hydrothermaux et des zones d'émission de fluides froids du Bassin de Guaymas ? Quelles sont les caractéristiques métaboliques et fonctionnelles de ces communautés en fonction des caractéristiques physico-chimiques de leur environnement ?

Ce chapitre de thèse est donc consacré à tous les aspects techniques de mon travail. Il n'a cependant pas pour but de décrire tous les protocoles, qui seront détaillés dans les articles consacrés. Ici, nous allons plutôt explorer la démarche expérimentale que nous avons adoptée durant ces trois années de thèse. Certains points techniques qui auront retenu notre attention y seront discutés et les difficultés rencontrées, qui nous ont permis d'avancer, permettront de comprendre comment nous sommes arrivés à répondre aux questions scientifiques posées en début de thèse.

Ce travail proposait donc d'étudier l'influence des communautés microbiennes sédimentaires sur les différents assemblages faunistiques des suintements froids et des sources hydrothermales du Bassin de Guaymas. Pour cela, il a tout d'abord fallu prélever différents types d'échantillons lors d'une campagne océanographique. Pour étudier les différents assemblages faunistiques de surface, des prélèvements des organismes de surface ont été effectués. Ces prélèvements ont été complétés par des prélèvements de sédiments sous forme de carottes de quinze à vingt centimètres de longueur, nécessaires à l'étude des communautés microbiennes sédimentaires sous-jacentes aux assemblages de surface (tapis microbiens ou animaux). Une première partie de l'étude a ensuite été consacrée à la caractérisation des habitats de surface, avec l'aide des biologistes du laboratoire des Environnements Profonds. De cette façon, les bivalves vésicomyidés et leurs symbiontes, les vers tubicoles siboglinidés et leurs symbiontes, les tapis microbiens et la faune colonisant les pourtours de ces tapis ont été étudiés. La seconde partie de l'étude a été consacrée à l'analyse de la diversité microbienne des sédiments, qui a été réalisée grâce à la combinaison de différentes techniques complémentaires comme le pyroséquençage, la microscopie et la PCR quantitative.

Ce chapitre sera donc divisé en trois parties : (1) l'échantillonnage, (2) l'étude des organismes présents à la surface des sédiments et enfin (3) l'étude des communautés microbiennes sédimentaires situées sous ces différents assemblages faunistiques.

I. La campagne BIG

1) Description générale

Figure 39 : Navire océanographique *L'Atalante*. Ifremer 2006

La campagne BIG (Biodiversité et Interactions à Guaymas) s'est déroulée dans le Golfe de Californie, peu avant le début de ce doctorat. Dirigée par Anne Godfroy, cette campagne a été réalisée à bord du navire océanographique l'Atalante (Figure 39) du 30 mai au 9 juillet 2010. L'objectif de cette mission, dans laquelle le sous-marin Nautile (Figure 40) a été mis en œuvre, était d'étudier la diversité et le fonctionnement de deux écosystèmes sédimentaires basés sur la chimiosynthèse microbienne.

Cette campagne océanographique était divisée en trois étapes différentes, ou *legs*. La première étape était une étape d'exploration des fonds, aussi bien sur la zone hydrothermale, Southern Trough, que sur la zone de suintements froids, la marge de Sonora. Elle avait pour but d'acquérir des données bathymétriques afin de cartographier les zones d'étude (Figure 41) mais aussi de choisir les sites qui ont par la suite fait l'objet d'un échantillonnage. Les deux étapes suivantes étaient consacrées à l'échantillonnage. Le leg 2 a permis d'échantillonner les différents sites de la marge de Sonora (9 plongées) ainsi qu'un site de référence en dehors des zones actives (1 plongée). Le leg 3 a quant à lui permis d'échantillonner les différents sites de la zone hydrothermale, Southern Trough (9 plongées) ainsi que le site de référence (1 plongée). Différents habitats ont été échantillonnés au cours de ces plongées. Chaque habitat était caractérisé par une macrofaune dominante particulière. Au niveau de la marge de Sonora, c'est-à-dire de la zone de suintements froids, quatre types d'habitats différents ont été échantillonnés : celui dominé par des assemblages de bivalves vésicomyidés (Figure 28), celui dominé par des buissons de vers tubicoles siboglinidés (Figure 34), celui caractérisé par la présence de tapis microbiens (Figure 25) et enfin le pourtour de ces tapis colonisés par des gastéropodes et des polychètes. Au niveau de Southern Trough, la zone de sources hydrothermales, seulement deux types d'habitats ont été retenus pour cette thèse : celui des bivalves vésicomyidés et celui des tapis microbiens. Des vers tubicoles siboglinidés, les biens connus *Riftia* (Figure 27A), étaient également présents sur la zone hydrothermale mais n'ont pas été étudiés au cours cette thèse car uniquement présents sur des substrats durs. Cet habitat n'était donc pas comparable avec les autres, tous recouverts de sédiments mous et permettant un échantillonnage par carottage. D'autres sites ont aussi été explorés lors de cette campagne mais n'ont pas été échantillonnés pour cette étude.

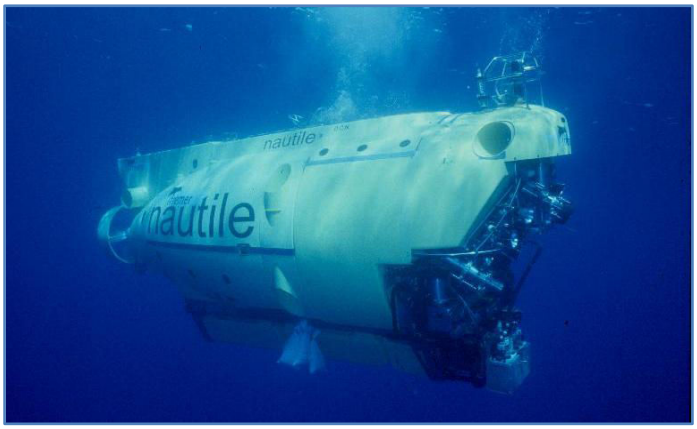


Figure 40 : Le sous-marin Nautile en plongée. Ifremer 2003

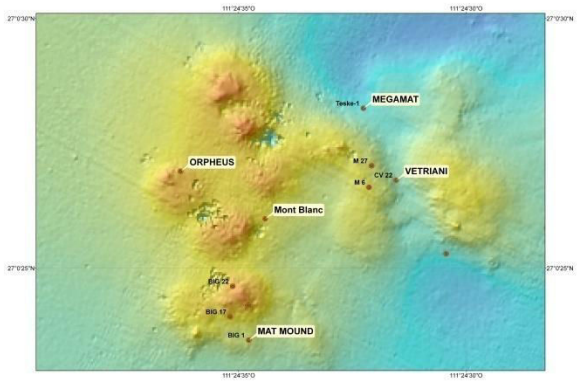


Figure 41 : Carte bathymétrique. Zone Southern Trough. Ifremer – BIG 2010

Le prélèvement des échantillons utilisés pour cette thèse a donc été réalisé avant le début de mon contrat. La première étape de ce travail de thèse a été de découvrir cette campagne, de prendre connaissance des échantillons disponibles, et de définir les sites et échantillons analysés. Pour découvrir cette campagne, différents documents existent. Tout d'abord, (1) les rapports de campagne décrivant brièvement les différents sites explorés, (2) les rapports de plongées (Figure 45), qui décrivent chaque opération réalisée sur le fond, chacune étant complétée avec le site, l'heure, la profondeur et les coordonnées géographiques relevées par le sous-marin, (3) les vidéos de plongées enregistrées à l'aide de deux caméras présentes sur le Nautile (Figure 42) ainsi que les photos réalisées au cours des plongées, (4) un bilan de tous les échantillons prélevés et (5) le cahier de laboratoire de la campagne, pour la partie microbiologie, décrivant la couleur, la consistance et l'odeur des sédiments

prélevés ainsi que les conditionnements effectués. Ce travail a permis d'aboutir à la réalisation de plans détaillés des différents sites de prélèvements, indiquant les positions précises des échantillons et présentés dans la partie « *Résultats* » de ce manuscrit. Tout cela nous a permis de définir un plan de travail pour la suite de la thèse.

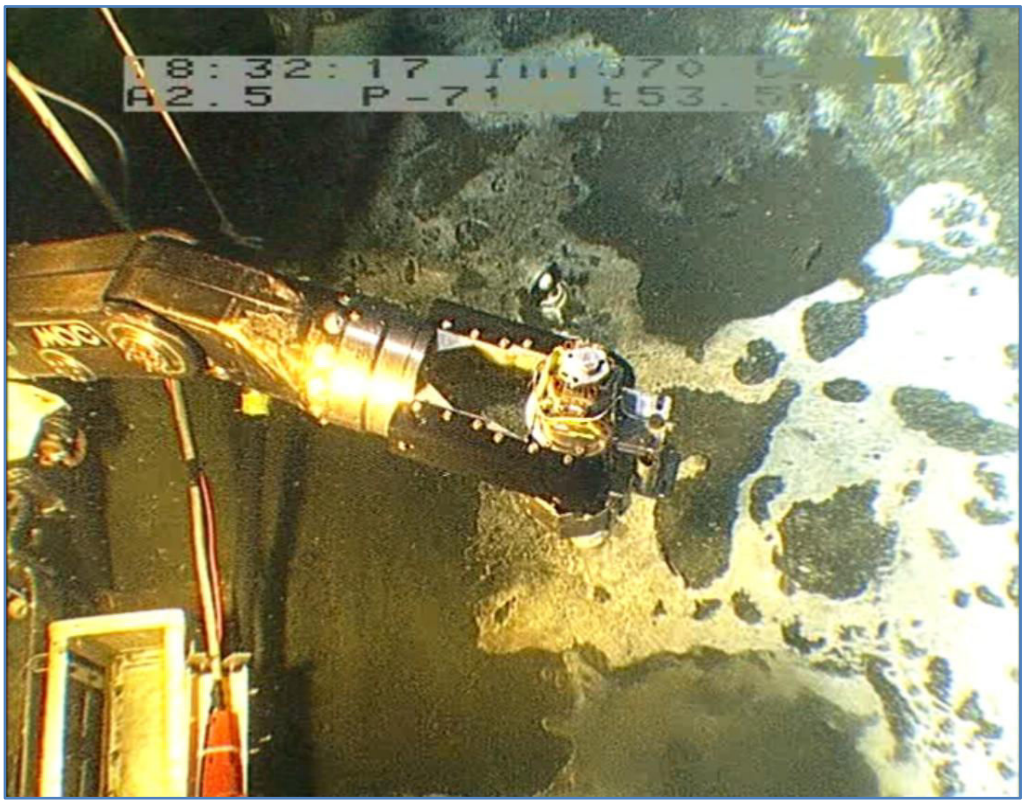


Figure 42 : Instantané d'une vidéo de plongée prise par le Nautile. Marge de Sonora, Plongée 1758-14. Prélèvement d'une carotte de sédiments à l'aide du bras articulé du *Nautile*. Ifremer – BIG2010

Au niveau de la marge de Sonora, c'est-à-dire la zone de suintements froids, trois sites ont été explorés et échantillonnés pour ce travail de doctorat : le site Vasconcelos, le site Ayala et le site Juarez. Au niveau de Southern Trough, c'est-à-dire la zone de sources hydrothermales, deux sites ont été explorés et échantillonnés pour ce travail de doctorat : le site Mega Mat et le site Morelos.

2) Prélèvements et conditionnements

Figure 43 : Un carottier tube juste avant prélèvement. Ifremer – BIG 2010

Différents appareillages ont été utilisés pour échantillonner les habitats explorés au cours de cette campagne. Les principaux sont décrits brièvement dans les phrases qui suivent. Tout d'abord des carottiers tubes de 25 cm de long et environ 5 cm de diamètre ont servi à prélever le sédiment (Figure 42 et Figure 43) (symbolisé CT). Plantés dans les sédiments au niveau de zones d'intérêt grâce au bras articulé du sous-marin Nautile, ces carottiers sont ensuite fermés puis ramenés à la surface dans le panier du sous-marin. Les sédiments prélevés grâce à ces carottiers ont servi à l'étude de la meiofaune, à l'étude de la géochimie des sédiments (sur les plans des sites exposés dans la partie résultats de ce manuscrit : « chimie » pour le méthane et le sulfure, « O_2 *ex-situ* » pour les concentrations d'oxygène),

à l'étude de la microbiologie des sédiments (« Microbio » sur les plans, les carottiers tubes annotés « Microbio Nolwenn » sur les plans étaient destinés au travail de thèse de Nolwenn Callac) et enfin aux mesures d'activités (travail de thèse d'Adrien Vigneron (Vigneron, 2012)). Les grands carottiers lames, symbolisés GCL, sont des carottiers plus grands et rectangulaires (Figure 44). De la même façon, ces carottiers sont enfoncés dans le sédiment par le bras articulé du Nautile et remontés à bord, soit dans le panier du sous-marin, soit dans une annexe, l'ascenseur, indépendant du Nautile et pouvant être remonté en surface en cours de plongée (Figure 47). Ces grands carottiers lames servent aux prélèvements de la faune présente au sein et en surface des sédiments. Pour l'échantillonnage de la faune, des filets manipulés par le bras du sous-marin (Figure 46), un aspirateur à faune ou éventuellement la pince du sous-marin peuvent également être utilisés.

Figure 44 : Un grand carottier lame à la sortie du sédiment. Ifremer – WACS 2011

BIG
Plongée : 1760-16

Date : 21/06/2010
Observateurs : **VIGNERON Adrien**

Station : **Sonora Margin** lat moy : N 27 36.0000 long moy : E 068 32.5000

Objectifs de la plongée :

Objectifs de la plongée
Caractérisation/prélèvement de l'habitat Vesico sur le site Ayala (BIG11/BIGI4)

Aller à l'ascenseur prendre 2 GCL (coté 2)

Sur BIG11/BIG14
Faire 2 GCL dans les cercles CALMAR et mettre les 2 cercles dans le panier
Faire 4 CT (1 chimie/2 microbio/1 meiofaune)
Mesure de température avec la lance thermique 2 points minimum dans les vésico Faire 2X2 bouteilles titanes sur les vésico

Retourner à l'ascenseur déposer 2 GCL et les 2 cercles et les 2 x 2 titanes (coté)Déposer le rack 4CT et en prendre un neuf (coté)

Sur BIG11/BIG14
faire 4CT (1 chimie/1 microbio/2 meiofaune/) sur vésico et récupérer la nasse

Retourner à l'ascenseur y déposer la nasse et les carottier tubes (coté 2) et larguer l'ascenseur

Sur BIG11/BIG14
Faire 2-3 filets vésico
Prélèvement de Blue Mats avec l'Aspirateur 2 bols
Prélèvement de Galathées et/ou Anémones avec l'aspirateur
Prélèvement d'ophiures avec l'Aspirateur

Configuration Nautile :
Sonde température courte
Enregistrement secondaire : Caméra fixe
Aspirateur

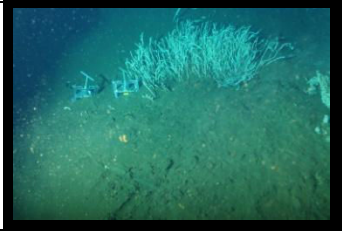
Rapport de plongée :

Date	Heure	Localité	Latitude	Longitude	Prof (m)	Cap	Commentaires
21/06/2010	17:40:15	Sonora Margin	N 27 35.4153	W 111 28.4241	1598	263.3	sur l'ascenseur
21/06/2010	17:45:06	Sonora Margin	N 27 35.4203	W 111 28.4181	1596	201.3	sortie des carottiers du panier de l'ascenseur
21/06/2010	17:54:30	Sonora Margin	N 27 35.3713	W 111 28.3883	1566	133.7	petits agregats de vesico
21/06/2010	17:56:08	Sonora Margin	N 27 35.3667	W 111 28.3872	1566	194.7	etoile de mer
21/06/2010	17:58:00	Sonora Margin	N 27 35.3641	W 111 28.3909	1563	250.3	champs de vesico
21/06/2010	17:58:55	BIG 11	N 27 35.3636	W 111 28.3926	1563	206.7	arrivé sur site avec les cercles chemini
21/06/2010	17:59:07	BIG 11	N 27 35.3635	W 111 28.3929	1563	200.4	cercle n°3
21/06/2010	18:00:22	BIG 11	N 27 35.3631	W 111 28.3941	1563	208.4	CAROTTIER LAME GCL1 - dans cercle
21/06/2010	18:01:31	BIG 11	N 27 35.3629	W 111 28.3945	1563	196.2	carotage GCL1 dans cercle Blanc
21/06/2010	18:07:31	BIG 11	N 27 35.3618	W 111 28.3939	1562	270.5	rangement de GCL1 dans le rack
21/06/2010	18:16:12	BIG 11	N 27 35.3649	W 111 28.3951	1563	218.5	CAROTTAGE GCL2 dans cercle rouge
21/06/2010	18:21:03	BIG 11	N 27 35.3675	W 111 28.3954	1562	194.4	rangement GCL2 dans le rack
21/06/2010	18:23:20	BIG 14	N 27 35.3689	W 111 28.3966	1562	207.5	marqueur BIO14
21/06/2010	18:23:29	BIG 14	N 27 35.3688	W 111 28.3967	1563	219.9	nasse près du marqueur BIO14
21/06/2010	18:24:34	BIG 14	N 27 35.3670	W 111 28.3971	1562	282.1	pose du rack de carottier lame pres de BIO 14
21/06/2010	18:26:11	BIG 14	N 27 35.3642	W 111 28.3986	1561	215.7	agregat de vesico
21/06/2010	18:28:57	BIG 14	N 27 35.3598	W 111 28.4007	1559	249.5	agregat de vesico
21/06/2010	18:35:14	BIG 14	N 27 35.3616	W 111 28.3959	1564	212.3	retour sur site avec les cercles
21/06/2010	18:37:04	BIG 14	N 27 35.3613	W 111 28.3967	1563	225.7	LANCE THERMIQUE 1
21/06/2010	18:37:25	BIG 14	N 27 35.3615	W 111 28.3969	1563	225.8	DEBUT MESURE LANCE THERMIQUE
21/06/2010	18:48:35	BIG 14	N 27 35.3643	W 111 28.3994	1562	233.2	TITANE G1
21/06/2010	18:52:23	BIG 14	N 27 35.3643	W 111 28.3994	1562	238.2	TITANE D1
21/06/2010	18:56:38	BIG 14	N 27 35.3627	W 111 28.3978	1561	286.6	TITANE G2
21/06/2010	18:59:17	BIG 14	N 27 35.3623	W 111 28.3968	1561	290.5	TITANE D2
21/06/2010	19:05:09	BIG 14	N 27 35.3621	W 111 28.3917	1561	290.2	FIN LANCE THERMIQUE 1
21/06/2010	19:06:15	BIG 14	N 27 35.3628	W 111 28.3910	1561	289.5	planté lance thermique 2
21/06/2010	19:06:40	BIG 14	N 27 35.3630	W 111 28.3908	1561	293.3	DEBUT LANCE THERMIQUE 2
21/06/2010	19:09:22	BIG 14	N 27 35.3639	W 111 28.3913	1561	291.1	CAROTTAGE CT5
21/06/2010	19:13:04	BIG 14	N 27 35.3652	W 111 28.3907	1561	290.2	CAROTTAGE CT6
21/06/2010	19:18:31	BIG 14	N 27 35.3624	W 111 28.3924	1561	289.9	CAROTTAGE CT8
21/06/2010	19:21:49	BIG 14	N 27 35.3617	W 111 28.3958	1561	290.2	CAROTTAGE CT7
21/06/2010	19:24:16	BIG 14	N 27 35.3613	W 111 28.3978	1561	289.7	vue d'ensemble
21/06/2010	19:27:23	BIG 14	N 27 35.3611	W 111 28.3990	1561	309.6	recuperation CT7
21/06/2010	19:28:51	BIG 14	N 27 35.3613	W 111 28.3993	1560	317.4	recuperation ct5
21/06/2010	19:30:22	BIG 14	N 27 35.3614	W 111 28.3996	1560	318.4	recuperation ct8
21/06/2010	19:31:59	BIG 14	N 27 35.3613	W 111 28.3998	1560	318.3	recuperation ct 6
21/06/2010	19:34:47	BIG 14	N 27 35.3604	W 111 28.3993	1560	320.5	rangement rack carottier tube
21/06/2010	19:35:30	BIG 14	N 27 35.3604	W 111 28.3991	1560	320.7	FIN LANCE THERMIQUE 2
21/06/2010	19:40:12	BIG 14	N 27 35.3609	W 111 28.3985	1561	313.3	FILET 2 sur vesico du site avec cercles
21/06/2010	19:52:29	BIG 14	N 27 35.3628	W 111 28.3972	1561	299.8	recuperation des cercles
21/06/2010	19:55:18	BIG 14	N 27 35.3648	W 111 28.3983	1561	319.1	quitte le site de prelevement
21/06/2010	19:55:36	BIG 14	N 27 35.3652	W 111 28.3985	1561	320.2	trajet vers la nasse les GCL et le marqueur Big 14
21/06/2010	19:56:50	BIG 14	N 27 35.3668	W 111 28.3993	1562	276.7	marqueur Big 14, nasse, rack de GCL
21/06/2010	19:58:15	BIG 14	N 27 35.3682	W 111 28.4004	1563	227.1	RAMASSAGE de la NASSE avec crevettes
21/06/2010	20:06:00	Sonora Margin	N 27 35.4146	W 111 28.4173	1596	258.0	ascenseur
21/06/2010	20:06:07	Sonora Margin	N 27 35.4147	W 111 28.4174	1596	256.4	depot des GCL

Figure 45 : Exemple de rapport de plongée. Ifremer – BIG 2010

II. L'étude des différents habitats en surface des sédiments

Avant d'étudier les communautés microbiennes présentes au sein des sédiments, nous avons étudié les écosystèmes de surface présents au niveau de chaque site d'échantillonnage (Tableau 1). Quatre grands habitats ont été mis en évidence et caractérisés par la présence d'une faune dominante ou de tapis microbiens. Le premier habitat étudié est caractérisé par la présence de **bivalves vésicomyidés**, présents au niveau de Southern Trough (site Morelos) et de la marge de Sonora (sites Vasconcelos et Ayala). Les différentes espèces de vésicomyidés ont été identifiées par les biologistes du département (Sophie Arnaud-Haond, Karine Olu et Carole Decker). Dans le cadre de cette thèse, c'est la répartition de ces différentes espèces dans le bassin de Guaymas, suintements froids et sources hydrothermales, ainsi que la symbiose associée à ces bivalves qui ont été étudiées. Le second habitat est caractérisé par la présence de **vers tubicoles siboglinidés** (site Juarez). La symbiose associée à ces invertébrés a également été abordée. Le troisième habitat est caractérisé par la présence de **tapis microbiens** (sites Vasconcelos et MegaMat), étudiés dans le cadre de la thèse d'Adrien Vigneron en ce qui concerne les suintements froids (Vigneron et al., 2013; Vigneron et al., 2014) et explorés lors de deux campagnes américaines dirigées par Andreas Teske (Université de Caroline du Nord, Chapel Hill, NC) en ce qui concerne les tapis microbiens présents dans la zone hydrothermale (e.g. Biddle et al., 2012 ; McKay et al., 2012). Enfin, le dernier habitat, situé en bordure des tapis microbiens, était caractérisé par la présence de **gastéropodes et de vers polychètes**, uniquement sur la zone de suintements froids (site Vasconcelos). En raison des échantillons disponibles au laboratoire, l'étude des différents habitats de surface a principalement porté sur l'étude des vésicomyidés et de la symbiose associée. Ce sujet a fait l'objet d'un article présenté dans la partie « *Résultats* » de ce manuscrit.

Sites	Marqueurs	Colonisateurs caractéristiques de surface	Photographies
Ayala	Marge de Sonora - BIG14 et BIG11	Champ de vésicomyidés	
Juarez	Marge de Sonora - BIG12 et BIG7	Buissons de siboglinidés	
Vasconcelos (BIG5)	Marge de Sonora - BIG5	Patch de vésicomyidés en bordure de tapis *(Sédiments non-échantillonnés pour la microbiologie)*	
Vasconcelos (BIG13)	Marge de Sonora - BIG13 et BIG15	Vésicomyidés en bordure de tapis	

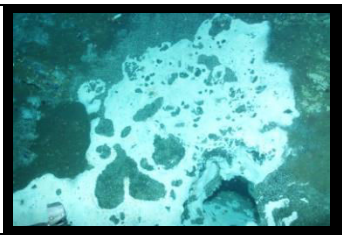
Vasconcelos (BIG18)	Marge de Sonora - BIG18	Tapis microbiens blancs	
Vasconcelos (BIG18)	Marge de Sonora - BIG18	Bordure de tapis, gastéropodes et polychètes	
Morelos	Southern Trough - BIG6 et BIG10	Vésicomyidés en bordure de tapis	
MegaMat	Southern Trough - M27	Tapis microbiens	
Référence	Hors zone active - BIG16	Sédiments nus	

Tableau 1 : Sites étudiés au cours de cette thèse. Photos : Ifremer – BIG 2010

1) Les bivalves vésicomyidés

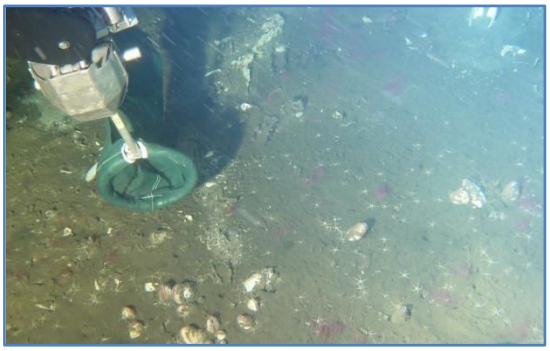


Figure 46 : Prélèvement de vésicomyidés à l'aide du filet. Ifremer – BIG 2010

Les bivalves vésicomydés constituaient la macrofaune dominante au niveau de deux sites explorés de la marge de Sonora (Ayala et Vasconcelos) et au niveau d'un site exploré de Southern Trough (Morelos) (Tableau 1). Ces bivalves ont tout d'abord été échantillonnés grâce au Nautile (Figure 46), remontés, et conditionnés à bord du bateau. Le travail au laboratoire s'est divisé en deux parties : (1) l'identification morphologique et moléculaire des différents vésicomyidés prélevés par l'équipe de biologistes du département et (2) l'identification moléculaire des symbiontes, complétée par des observations au microscope et des analyses chimiques.

A/ LES BIVALVES VESICOMYIDES – *ÉCHANTILLONNAGE*

L'échantillonnage des vésicomyidés présents à la surface des sédiments a été réalisé principalement à l'aide de filets manipulés par le bras articulé du Nautile (Figure 46). Certains individus ont également été prélevés directement avec la pince du Nautile et remontés dans des boîtes prévues pour la faune. Quelques-uns ont aussi été récupérés lors d'échantillonnages à l'aide de grands carottiers lame (GCL) plantés dans le sédiment (Figure 44) ou encore à l'aide de l'aspirateur à faune associé au Nautile (cette dernière possibilité est rarement utilisée car les bivalves risquent de boucher l'aspirateur).

Une fois prélevés, les vésicomyidés ont été ramenés à bord en fin de plongée avec le Nautile ou au cours de la plongée grâce à l'ascenseur (Figure 47). A bord, les vésicomyidés vont connaître différents conditionnements selon leur destination finale. Certains sont mesurés puis conservés dans l'alcool ou le formol par les biologistes. D'autres sont disséqués en chambre froide dès leur remontée, ce sont ceux qui nous intéressent dans le cadre de cette thèse. Les vésicomyidés destinés à la dissection sont rincés, pré-identifiés sur des critères morphologiques puis ouverts. Certains tissus sont alors échantillonnés pour des études spécifiques. Les muscles abducteurs, qui permettent l'identification moléculaire des espèces de vésicomyidés, le sang, les gonades, le pied, le manteau ou encore une partie des branchies, pour l'étude des symbioses, sont conservés dans l'azote liquide à bord du navire puis conservés à -80°C au laboratoire, afin de conserver au mieux l'ADN et l'ARN présents au niveau de ces structures. En parallèle, une partie des branchies est aussi fixée pour le FISH dans un mélange d'eau de mer stérile et de formaldéhyde (2%) pendant 3h à 4°C. Les échantillons sont ensuite rincés dans de l'eau de mer et conservés à -20°C dans un mélange eau de mer – éthanol (1 : 1) (Duperron et al., 2005).

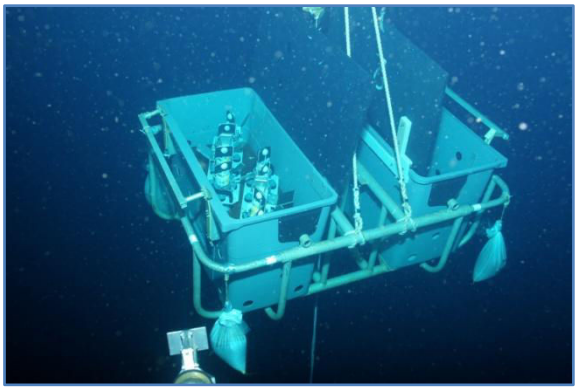


Figure 47 : L'ascenseur du Nautile. Ifremer – BIG

B/ LES BIVALVES VESICOMYIDES – *PETIT MANUEL DE DISSECTION*

Comme vous l'aurez sans doute compris, les vésicomyidés utilisés dans cette étude n'ont pas été disséqués à bord par mes soins. Cependant, j'ai pu, au cours de ma thèse, ouvrir quelques-unes de ces petites bêtes pour mieux comprendre leur fonctionnement… Ma participation à la campagne CongoLobe (2011) m'a également permis de réaliser le conditionnement des vésicomyidés avec l'aide d'une post-doctorante du département, Carole Decker, biologiste.

Le petit manuel qui suit est illustré par des photos d'une dissection réalisée sur un individu échantillonné lors de la campagne BIG sur le site Ayala. Il correspond à l'espèce *Phreagena soyoae*. Le vésicomyidé entier a été conservé dans le formol 3% pendant 72h puis transféré dans l'éthanol 70% et stocké à température ambiante. Les couleurs des tissus sur les figures ne correspondent donc pas aux couleurs d'un individu frais. Par ailleurs, la fixation a aussi durci les tissus.

La première chose à faire lorsque l'on se trouve en face d'un vésicomyidé fermé, que l'on doit disséquer, c'est identifier les pôles antérieur, postérieur, dorsal et ventral. Pour cela, il faut trouver l'umbo, la bosse du côté antérieur de la valve. L'umbo est la région la plus âgée des valves. C'est autour de ce dernier que les cernes de croissance s'accumulent. Ensuite, il faut identifier le ligament

charnière, qui relie ensemble les deux valves de la coquille. Le vésicomyidé est maintenant orienté sur le plan de dissection.

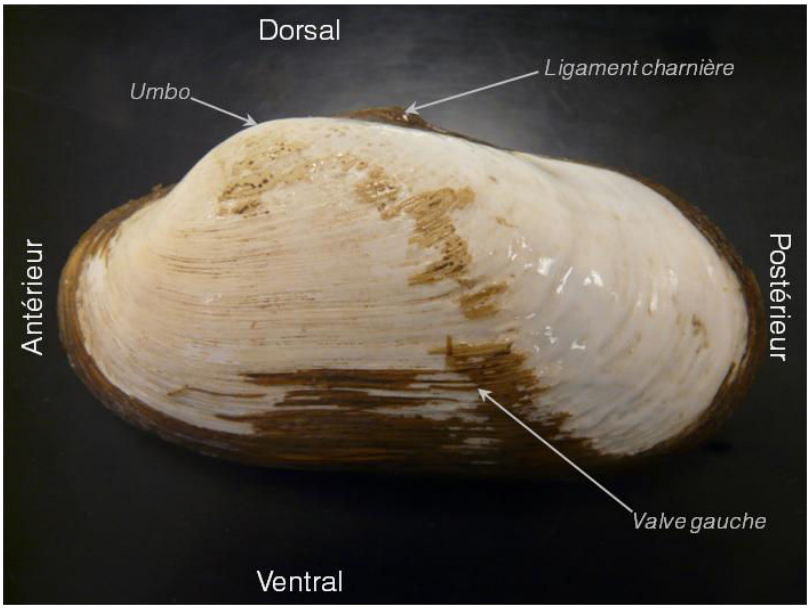


Figure 48 : Orientation d'un vésicomyidé avant dissection

Il nous faut à présent ouvrir le bivalve. Il peut se montrer récalcitrant, de puissants muscles adducteurs retiennent en effet fortement les deux valves fermées. Il est possible d'utiliser un petit couteau que l'on glissera entre les deux valves, du côté ventral, comme pour ouvrir une huître. Tourner le couteau pour séparer les deux valves par 1 cm au moins. Localiser les muscles adducteurs (un au pôle postérieur et un au niveau antérieur). Il faut les couper au plus près de la coquille pour pouvoir ouvrir le bivalve en entier sans abîmer le reste de tissus.

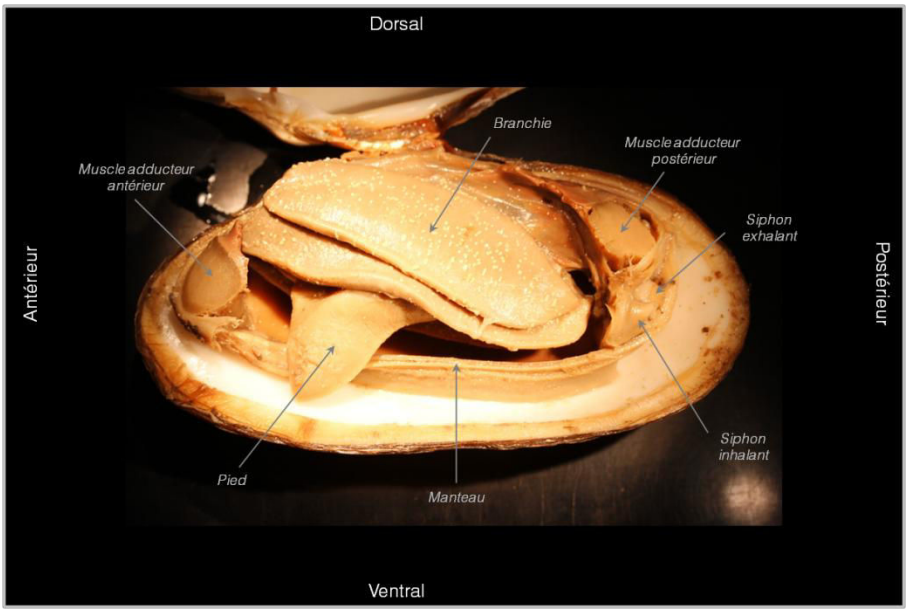


Figure 49 : Vésicomyidé ouvert, identification des organes

Nous voilà enfin face au vésicomyidé ouvert (Figure 49). Il nous reste maintenant à identifier les différentes parties qui nous intéressent et à les échantillonner selon les besoins à l'aide de pinces et de ciseaux à dissection préalablement stérilisés.

C/ LES BIVALVES VESICOMYIDES – *IDENTIFICATION DES VESICOMYIDES*

L'identification des vésicomyidés a été réalisée par l'équipe de biologistes du laboratoire : Sophie Arnaud-Haond ainsi que sa stagiaire Claire Papot, Karine Olu et Carole Decker. Présentes sur la campagne BIG, excepté Claire Papot, elles ont pu récupérer les vésicomyidés prélevés, les identifier grâce à des critères morphologiques appropriés, les disséquer et les conditionner. Les vésicomyidés ont également été identifiés grâce à des analyses moléculaires portant sur le gène mitochondrial codant la *cytochrome c oxidase* sous-unité I (COI) (Hebert et al., 2003a; Hebert et al., 2003b). Ces études ont été réalisées sur les muscles adducteurs des bivalves, ne contenant pas de symbiontes, donc pas d'ADN bactérien, par Sophie Arnaud-Haond et sa stagiaire Claire Papot. Ces différents résultats ont ensuite été compilés afin de déterminer quelles espèces étaient présentes et en quelles proportions sur les différents sites étudiés.

D/ LES BIVALVES VESICOMYIDES – *CARACTERISATION DES SYMBIONTES*

La caractérisation des symbiontes s'est déroulée en quatre temps : (1) Identification moléculaire par étude du gène codant l'ARNr 16S, (2) identification des gènes fonctionnels présents chez les symbiontes, (3) localisation des symbiontes grâce à des observations réalisées à la loupe binoculaire, en microscopie à épifluorescence par hybridation fluorescente *in situ*, ainsi que par microscopie électronique et enfin (4) dosage des composés soufrés présents dans la branchie et possiblement associés à une forme de stockage d'énergie par les symbiontes.

(1) Identification moléculaire par l'étude du gène codant l'ARNr 16S

Dans les études d'écologie microbienne, c'est principalement le gène de l'ARNr 16S qui est utilisé pour les identifications taxonomiques (Woese and Fox, 1977; Chakravorty et al., 2007). Du fait de son caractère fonctionnel essentiel à la vie (structure des ribosomes), son ubiquité et ses propriétés évolutives, le gène de l'ARNr 16S, au travers de sa séquence nucléique, peut être utilisé pour identifier l'organisme d'origine, (Hebert et al., 2003a; Case et al., 2007). En effet, les séquences de ce gène peuvent être comparées à des bases de données internationales qui regroupent de nombreuses séquences d'ARNr 16S provenant de nombreux organismes différents. Par similarité de séquences, on peut ainsi théoriquement attribuer une affiliation à un microorganisme inconnu. D'autres gènes, comme par exemple celui codant l'ARNr 23S (Bavykin et al., 2004), peuvent être utilisés dans ce but mais les banques de données étant beaucoup plus fournies pour le gène de l'ARNr 16S, il est aujourd'hui plus aisé de travailler sur ce dernier (NCBI, SILVA database).

La première étape de la caractérisation des symbiontes associés au vésicomyidés a donc été de séquencer les gènes codant l'ARNr 16S au niveau des branchies des vésicomyidés, lieu habituel de vie des symbiontes. Après avoir extrait l'ADN (Decker, 2011), réalisé des PCR avec des amorces spécifiques ciblant les bactéries et cloné les fragments amplifiés, nous avons séquencé ces fragments grâce à la technique de Sanger.

Arrêtons-nous quelques instants sur cette technique de séquençage. La technique de Sanger est la technique classique utilisée depuis les débuts du séquençage d'ADN dans les années 80 (Figure 50) (Sanger et al., 1977). Elle est aujourd'hui peu à peu détrônée par les techniques de séquençage haut-débit dont nous parlerons un peu plus loin. Le séquençage de Sanger est une méthode par synthèse enzymatique sélective (Sanger et al., 1977). Elle est basée sur la synthèse d'ADN par une ADN polymérase qui va recopier un ADN matrice, notre ADN inconnu, à partir de nos amorces spécifiques. Classiquement, au cours de la synthèse de l'ADN, l'ADN polymérase va permettre l'élongation du nouveau brin en incorporant un des quatre nucléotides (dNTP, N=A, T, C ou G) présents dans le milieu réactionnel, à la suite du dernier nucléotide présent sur le brin en cours de synthèse et en fonction de la matrice copiée, par complémentarité (Figure 51). Pour le séquençage de Sanger, des nucléotides modifiés, les ddNTP (dd = didésoxy), vont être ajoutés au milieu réactionnel (Figure 51). Ces ddNTP vont être incorporés à toutes les positions possibles dans la chaîne nucléotidique, en fonction du brin matrice, comme les dNTP classiques. En revanche, aucun autre dNTP ne pourra être ajouté à la suite, en l'absence de groupement hydroxyle libre en 3' des ddNTP (Figure 51). Ainsi, l'incorporation d'un ddNTP stoppera la synthèse de l'ADN. Quatre solutions différentes vont être utilisées (Tube 1) tous les dNTP avec des ddATP uniquement, (Tube 2) tous les dNTP avec des ddCTP uniquement, (Tube 3) tous les dNTP avec des ddGTP uniquement et enfin (Tube 4) tous les dNTP avec des ddTTP uniquement. Les résultats de ces réactions vont ensuite être visualisés par migration sur un gel très résolutif qui va permettre de séparer tous les fragments présents en fonction de leur taille à une paire de base près. On va ainsi pouvoir voir à quelles positions se trouvent les dATP, dCTP, dGTP ou dTTP (Figure 50). Cette technique a été optimisée et automatisée depuis, notamment grâce à l'utilisation de l'électrophorèse capillaire pour la séparation et l'analyse (Swerdlow et al., 1991; Zhang, 2011) et l'utilisation de fluorochromes. Cette technique de séquençage est aujourd'hui utilisée pour obtenir un petit nombre de séquences d'ADN.

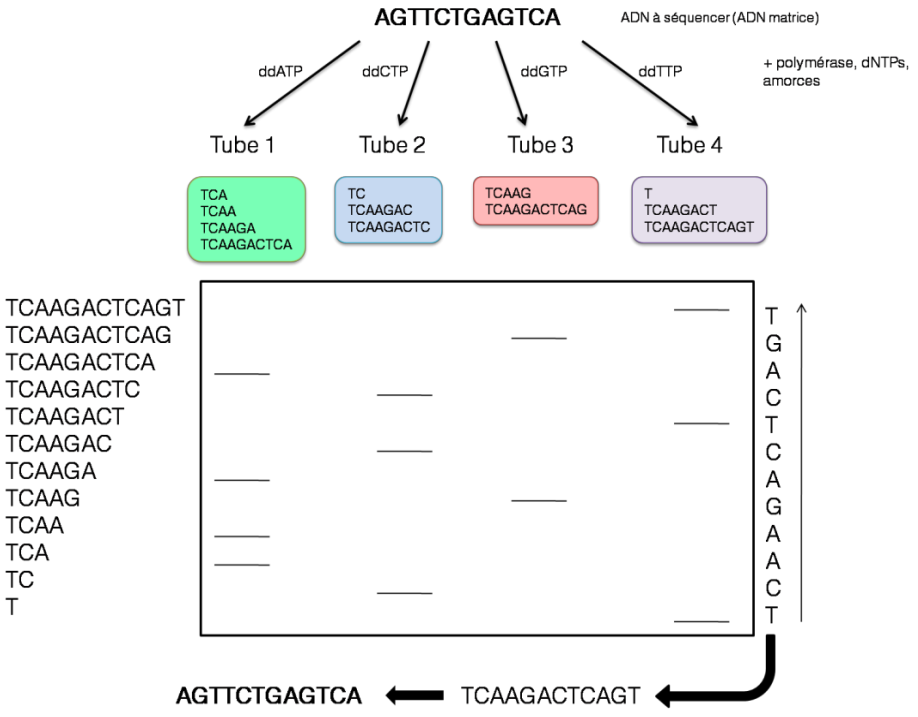


Figure 50 : Principe schématisé du séquençage de Sanger

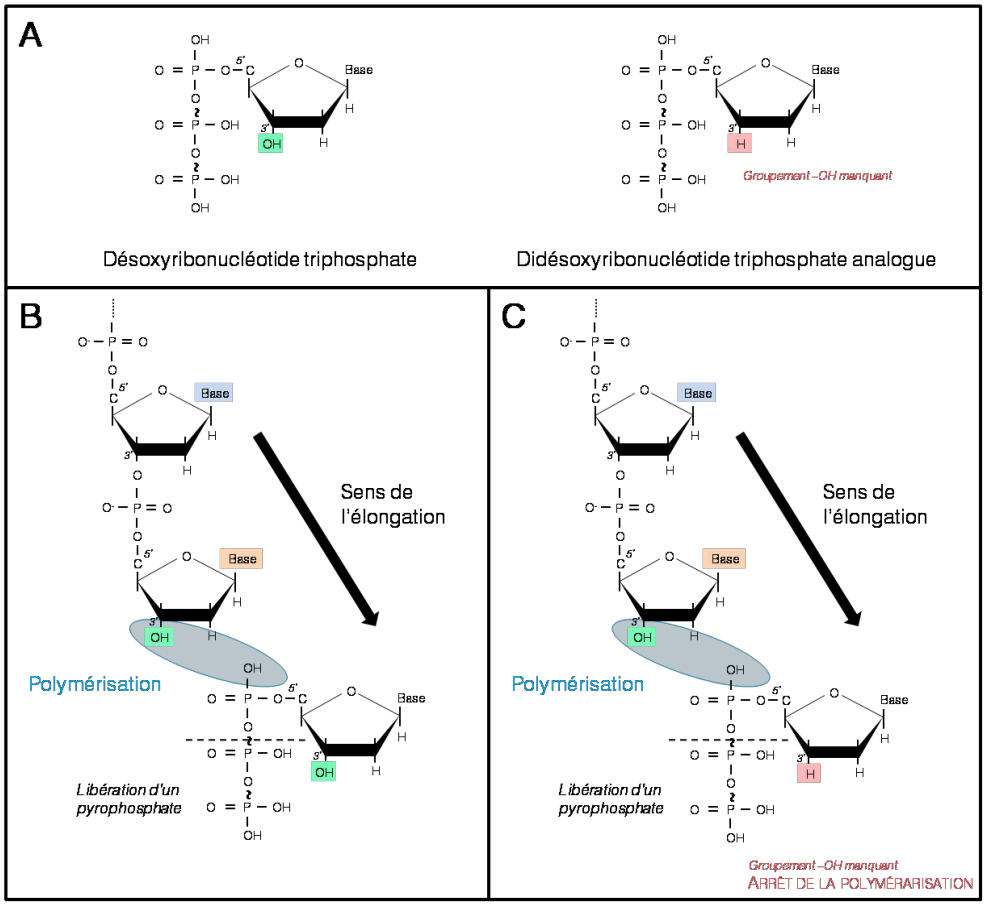


Figure 51 : Polymérisation de l'ADN, désoxyribonucléotide triphosphate et séquençage de Sanger. (A) Un désoxyribonucléotide normal (dNTP) possède un groupement hydroxyle sur le carbone de l'extrémité 3', ce qui n'est pas le cas d'un didésoxyribonucléotide (ddNTP) (B) L'élongation de l'ADN se réalise de l'extrémité 5' vers celle en 3' et l'ADN polymérase catalyse cette réaction. L'addition d'un nouveau nucléotide requiert la présence d'un groupement hydroxyle libre, seulement disponible à l'extrémité 3' de la molécule d'ADN. Lors de l'insertion d'un nucléotide, deux des trois phosphates sont éliminés pour former un pyrophosphate (PPi). (C) L'élongation de la chaîne s'arrêtera après l'incorporation d'un didésoxynucléotide.

Calyptogena soyoae symbiont gene for 16S rRNA, partial sequence

GenBank: AB479077.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       AB479077               1508 bp    DNA     linear   BCT 02-JUN-2009
DEFINITION  Calyptogena soyoae symbiont gene for 16S rRNA, partial sequence.
ACCESSION   AB479077
VERSION     AB479077.1  GI:238768539
KEYWORDS    .
SOURCE      Calyptogena soyoae symbiont
  ORGANISM  Calyptogena soyoae symbiont
            Bacteria.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Okutani,T., Koshi-ichi,T., Sato,T., Imai,T. and Kato,C.
  TITLE     Vesicomyid Fauna in the Chishima (Kurile) Trench: Occurrences of
            Calyptogena extenta and a New Taxon
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1508)
  AUTHORS   Kato,C.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (28-JAN-2009) Contact:Chiaki Kato Japan Agency for
            Marine-Earth Science and Technology, Extremobiosphere Research
            Center; Natsushima-cho 2-15, Yokosuka, Kanagawa 237-0061, Japan URL
            :http://www.jamstec.go.jp/ E-mail :kato_chi@jamstec.go.jp Phone
            :81-46-867-9550 Fax :81-46-867-9525
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1508
                     /organism="Calyptogena soyoae symbiont"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /host="Calyptogena soyoae"
                     /db_xref="taxon:596090"
                     /country="Japan:Sagami Bay, Okinawa Trough at depths of
                     750-1200 m"
```

Figure 52 : Fiche de renseignement sur la séquence d'ARNr 16S enregistrée sur le portail du NCBI au numéro d'accession AB479077. On retrouve ici, l'organisme d'origine, la publication associée, ainsi que d'autres informations sur la séquence

Dans le cadre de notre étude sur les symbiontes, nous avons par exemple travaillé sur une trentaine de séquences par vésicomyidé étudié soit environ 250 séquences. A cette échelle, les résultats vont pouvoir être traités manuellement, tout du moins, partiellement. Voici les grandes étapes de l'analyse en partant des séquences en sortie de séquenceur jusqu'à l'arbre phylogénétique : (1) les séquences sont d'abord nettoyées, c'est-à-dire que les séquences d'amorces et de vecteurs sont éliminées, (2) les séquences vont être alignées puis comparées entre elles, les séquences identiques (ou ayant un certain pourcentage de similitude définis selon l'étude et l'auteur) sont regroupées et une séquence par groupe est choisie pour les analyses suivantes, (3) les séquences choisies sont ensuite comparées aux banques de données, par exemple, aux grandes banques de données internationales, l'américaine GenBank, l'européenne EMBL et la japonaise DDBJ, sur le portail du NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Cette étape va nous permettre d'obtenir les séquences présentes en banque les plus similaires à nos séquences, (4) des informations vont pouvoir être récupérées sur les séquences de banque grâce à leur numéro d'identification ou « numéro d'accession », telles que l'affiliation du microorganisme, l'hôte éventuel, le lieu de prélèvement et la publication associée dans laquelle on peut trouver de plus amples informations au sujet de cette séquence (Figure 52), (5) les séquences de banques les plus informatives sont récupérées et couplées avec nos séquences dans un fichier unique (fichier multiséquences), (6) toutes ces séquences sont alignées ensemble selon différents algorithmes possibles, puis le fichier d'alignement va nous permettre de construire des arbres taxonomiques qui nous indiqueront, par exemple, la position de nos microorganismes d'études par rapport à d'autres. C'est de cette façon que nous avons pu identifier et comparer entre elles nos séquences extraites des branchies de vésicomyidés.

(2) Identification des gènes fonctionnels présents chez les symbiontes

Après avoir identifié nos symbiontes grâce à l'analyse de leur séquences d'ARNr 16S, nous nous sommes intéressés à leurs propriétés fonctionnelles : comment assimilent-ils le carbone ? (*ils sont autotrophes*) et comment produisent-ils l'énergie qui leur est nécessaire ?

Pour répondre à ces questions, nous avons recherché certains gènes présents dans l'ADN de nos symbiontes.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique, les réactions associées aux différents métabolismes sont rendues possibles grâce à la présence de certaines enzymes. Ces enzymes, qui sont des protéines, sont codées par des gènes spécifiques, les *gènes fonctionnels*, contenus dans l'ADN de l'organisme concerné. Par conséquent, si une voie métabolique existe chez un microorganisme, les gènes codant les enzymes nécessaires à cette voie métabolique, seront présents dans le génome du microorganisme. L'inverse n'est pas forcément vrai car un gène présent dans un

génome n'est pas forcément traduit puis transcrit en protéine (mais il est, dans ce cas, la plupart du temps éliminé au cours de l'évolution s'il ne code pas une protéine fonctionnelle (Mira et al., 2001)). Par ailleurs, nous avons aussi vu que certaines enzymes étaient des enzymes clefs de certaines voies métaboliques, utilisées comme marqueur fonctionnel dans les études de microbiologie.

Dans notre étude, nous avons recherché différents gènes par amplification grâce à des amorces spécifiques. Tout d'abord, les symbiontes des vésicomyidés connus pour être thiotrophes, nous avons recherché des gènes fonctionnels codant des enzymes clefs associées à cette voie : *l'APS reductase* et la *sulfite oxidase*. En ce qui concerne l'assimilation du carbone, nous avons recherché le gène codant la RuBisCO, enzyme clef du cycle de Calvin-Benson. En parallèle, nous avons recherché d'autres gènes fonctionnels (1) concernant l'assimilation du carbone (cycle inverse de l'acide citrique [*ATP-citrate lyase β subunit*, *2-oxoglutarate ferredoxin oxidoreductase*, *pyruvate:ferredoxin oxidoreductase 1* et *pyruvate:ferredoxin oxidoreductase 2*]), (2) concernant le métabolisme énergétique (l'oxydation du méthane [*methane monooxygenase* particulaire et membranaire] et l'oxydation du fer [*Rusticyanine*]) (plus d'informations sur ces voies métaboliques sont exposées dans la partie « *Introduction bibliographique* ») de ce manuscrit – *La nutrition microbienne*). La recherche de ces autres gènes s'étant révélée infructueuse, nous avons séquencé uniquement le gène codant l'*APS reductase*, pour le métabolisme thiotrophe et le gène codant la RuBisCO pour l'autotrophie.

Le séquençage de ces gènes a permis d'une part de mettre en évidence l'existence de gènes codant des protéines fonctionnelles intervenant dans l'oxydation des sulfures et dans l'assimilation du carbone et d'autre part de comparer entre eux les symbiontes des différentes espèces de vésicomyidés mises en évidence dans notre étude.

(3) Localisation des symbiontes

En parallèle de cette identification moléculaire, une étude « visuelle » des vésicomyidés et de leurs symbiontes a été entreprise.

La première étape fût de comprendre l'organisation d'un vésicomyidé au travers des dissections et des observations réalisées à la loupe binoculaire et au microscope. Ces observations avaient pour but de localiser les symbiontes dans le bivalve et de comprendre les mécanismes de bases autour du fonctionnement des vésicomyidés.

Figure 53 : Observations au microscope électronique à balayage (MEB). Photo C. Lamy

Après cette première approche, les symbiontes ont été localisés de façon plus précise au sein des branchies grâce à une approche d'hybridation fluorescente *in situ* ou FISH. Cette technique utilise des sondes oligonucléotidiques générales ou spécifiques d'un groupe microbien particulier. Ces sondes, fragments d'ADN monobrin d'une vingtaine de bases reliés à un fluorochrome, vont venir s'hybrider, par complémentarité, à l'ARN des ribosomes des cellules appartenant au groupe microbien ciblé. En éclairant l'échantillon avec les longueurs d'onde appropriées, la fluorescence sera émise par excitation du fluorochrome et les cellules marquées pourront ainsi être localisées dans l'échantillon. Le protocole utilisé au cours de cette thèse était le protocole classiquement mise en œuvre au laboratoire sur les tissus animaux (Durand et al., 2009).

Figure 54 : Appareil utilisé pour les mesures de soufre. CS125 Carbon/Sulfur Determinator (LEICO Corporation). Photo P. Cruaud

Pour aller voir d'un peu plus près à quoi ressemblaient les branchies, les bactériocytes et les symbiontes, nous avons utilisé la microscopie électronique à balayage. Aucun échantillon n'avait à la base été conservé pour ce type de microscopie et les structures observées pouvaient être le résultat d'un conditionnement inadapté. Toutes les observations ont été réalisées au sein du laboratoire avec l'aide de Nicolas Gayet, responsable technique du microscope électronique (Figure 53).

(4) Dosage des composés soufrés

Suite aux différentes observations visuelles, la présence de grandes quantités de soufre a été détectée au niveau des branchies. Grâce à l'aide d'Alexis Khripounoff, du laboratoire Environnement Profond, nous avons pu évaluer la quantité de soufre non volatil contenue dans les individus entiers (sans la coquille) et dans les branchies (Figure 54).

Toute cette étude a fait l'objet d'un article intitulé « *Comparative study of vesicomyid-symbiont communities at cold seeps and hydrothermal vents of the Guaymas Basin* », présenté dans la partie « *Résultats* » de ce manuscrit et soumis récemment à la revue *Deep-sea Research – Part I*.

2) Les vers tubicoles siboglinidés

Les siboglinidés et les symbiontes associés ont été beaucoup moins étudiés que les vésicomyidés. En effet, ces invertébrés n'ont malheureusement pas été conservés pour l'étude de la symbiose au cours de la campagne BIG. Néanmoins, quelques individus conservés dans l'alcool ont pu être utilisés pour une identification moléculaire et fonctionnelle partielle de l'hôte et des symbiontes (même principe que celui exposé pour les vésicomyidés). L'hybridation fluorescente *in situ* n'a quant à elle pas donné de bons résultats du fait de fixations inadaptées et ne sera pas présentée dans ce manuscrit.

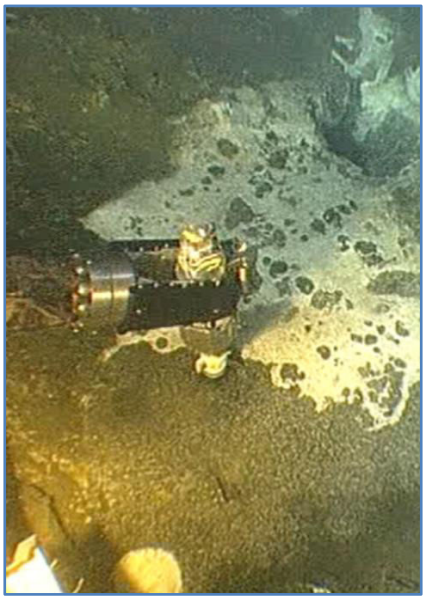


Figure 55 : Zone grise autour des tapis microbiens. Site Vasconcelos BIG18. Ifremer – BIG 2010

3) Les tapis microbiens

Les microorganismes qui forment les tapis microbiens de surface ont été identifiés par clonage-séquençage de l'ARNr 16S et visualisés par FISH.

4) La faune colonisant le pourtour des tapis (« tapis gris »)

L'étude de la faune périphérique aux tapis microbiens des suintements froids (Figure 55) a révélé des résultats intéressants qui mériteraient une étude plus approfondie. Malheureusement, cette étude n'a pas pu être suffisamment avancée dans l'intervalle de temps imparti et ne fera donc pas l'objet d'une publication scientifique dédiée.

La zone grise en périphérie des tapis microbiens avait tout d'abord été identifiée visuellement comme étant un tapis

microbien gris lors de l'exploration des sites du Bassin de Guaymas, durant la campagne BIG (Figure 55). Par la suite, en y regardant de plus près et en collaboration avec l'équipe de biologistes, il s'est avéré que c'était la présence de nombreux petits gastéropodes et de petits vers polychètes qui donnait cet aspect grumeleux et gris aux sédiments (Figure 55 et Figure 56). Cette étude n'avait initialement pour but que l'identification des espèces animales présentes sur ce qui était à l'origine appelé « tapis gris », dans le cadre des inventaires de la faune de surface. Cependant, des observations à la loupe binoculaire complétées par quelques photos ont révélé une particularité qui a suscité notre intérêt : des structures en forme de « poils » étaient présentes à la surface des petits gastéropodes… Nous avions donc affaire à des gastéropodes poilus. Après avoir émis les hypothèses les plus abracadabrantesques possibles à ce sujet, nous avons décidé de creuser un petit peu plus l'affaire. Nous avons donc tout d'abord été voir de plus près à quoi ressemblait ces « poils », en microscopie électronique. C'est ainsi que nous avons pu constater que de nombreuses structures diverses et variées étaient présentes à la surface des coquilles… Certains des éléments observés ressemblant fortement à des bactéries, nous avons entrepris d'isoler la coquille des tissus mous du gastéropode, d'en extraire l'ADN et de le séquencer. Malheureusement, cette expérience s'est révélée infructueuse puisqu'aucune amplification n'a été obtenue par PCR sur les extraits d'ADN, aussi bien par PCR classique que par PCR nichée. En parallèle, nous avons également observé la surface de nos petits gastéropodes grâce à la technique FISH, avec différents types de microscopes.

Figure 56 : Surface d'une carotte prélevée dans la zone "*tapis gris*". Ifremer – BIG 2010

Les résultats de cette étude seront exposés dans le chapitre « *Résultats* », entre les publications.

III. L'étude des communautés microbiennes sédimentaires

Après l'étude et la caractérisation des organismes de surface, nous nous sommes donc intéressés aux sédiments sous-jacents. Deux points principaux ont été étudiés. (1) La composition chimique des fluides interstitiels a été analysée par l'équipe de chimistes du département. (2) La diversité microbienne présente dans les sédiments a été analysée par des approches combinées de pyroséquençage, de Q-PCR et de microscopie.

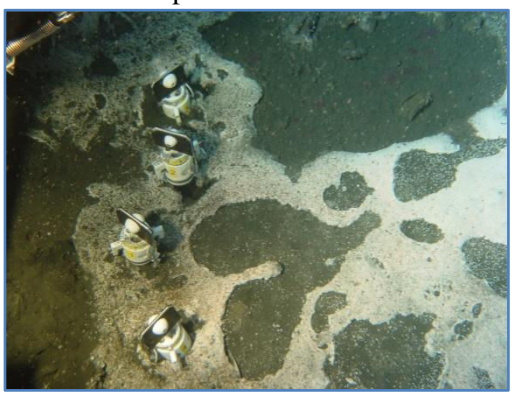


Figure 57 : Carottiers tubes plantés dans du sédiment colonisé par un tapis microbien. Site Vasconcelos BIG18. Ifremer – BIG 2010

Dans cette troisième partie, nous allons donc explorer les techniques utilisées pour l'étude des communautés microbiennes sédimentaires. Nous allons tout d'abord reprendre l'échantillonnage des sédiments et leur conditionnement, puis le choix des échantillons, l'extraction de l'ADN, le séquençage des différentes communautés (pyroséquençage 454), la quantification des principaux groupes mis en évidence (Q-PCR) puis la visualisation par microscopie des principaux groupes microbiens ainsi que leurs interactions possibles avec d'autres microorganismes (FISH).

1) Échantillonnage et conditionnement

Les sédiments ont été prélevés grâce à des carottiers tubes d'environ 25 cm de long sur 5 cm de large. Ces carottiers ont été plantés dans le sédiment au niveau des différents habitats explorés (Figure 42, Figure 43 et Figure 57). Pour chacun des habitats échantillonnés, un minimum de deux carottes a été prélevé pour la microbiologie et deux carottes pour les analyses de chimie. Ces carottes remplies de sédiments ont été ramenées à bord du bateau par le Nautile. Dès leur arrivée à bord, elles ont été transférées en chambre froide (~8°C) puis conditionnés. En ce qui concerne les carottes destinées à la microbiologie (Figure 58), elles ont été divisées en sections de 2 cm. Chaque section était conditionnée d'une part pour les analyses moléculaires (conservées à -80°C) et d'autre part pour la microscopie FISH (sédiments fixés dans un mélange eau de mer/formaldéhyde 3% puis rinçage et stockage à -20°C dans un mélange de PBS/Éthanol). Pour certaines carottes, les eaux interstitielles ont été récupérées par centrifugation pour les analyses de concentrations en sulfate. Les eaux interstitielles des carottes destinées uniquement à l'analyse de la composition géochimique (sulfure et méthane) des sédiments ont été prélevées non pas par centrifugation mais grâce à un système de Rhyzon, par les équipes de chimistes du département (Figure 59).

Figure 58 : Conditionnement des sédiments pour la microbiologie Ifremer – WACS 2011. Photo Julia Boutorh

Figure 59 : Jean-Claude Caprais, chimiste au Laboratoire Environnements Profonds (LEP) préparant une carotte pour analyses dans la chambre froide du NO *Pourquoi pas ?* Ifremer – WACS 2011. Photo Julia Boutorh

2) Choix des Échantillons

Quelques mois après la fin de la campagne BIG, je suis arrivée en thèse au laboratoire, en octobre 2010. Après avoir réalisé les plans détaillés d'échantillonnage sur chacun des sites, exposés dans le chapitre « *Résultats* » de ce manuscrit, nous avons dû établir un plan de travail. Nous avions, en tout, huit sites d'échantillonnages (cinq sites froids, un site de référence et deux sites hydrothermaux) (Tableau 1) qui comprenaient, chacun, deux carottes réservées à la microbiologie. Chaque carotte était divisée en plusieurs sections et le tout représentait 83 échantillons. Dans le cadre de cette thèse et du fait des budgets disponibles, il n'était pas possible de tout séquencer. Nous avons

donc dû sélectionner un certain nombre d'échantillons pour l'étude de la diversité par pyroséquençage. Nous avons décidé de tester en premier lieu les duplicats de carottes par empreinte moléculaire (ARISA) et d'utiliser une seule carotte par site pour le pyroséquençage. L'étude des profils de concentration de sulfate, méthane, sulfure ainsi que les changements de couleur et d'odeur du sédiment notés sur le cahier de laboratoire pendant la campagne nous ont ensuite aidé à réunir certaines sections afin de réduire le nombre d'échantillons à extraire et à analyser. Après cela, nous avions 70 échantillons de sédiments à extraire et 45 échantillons à pyroséquencer (19 pour la zone de suintements froids, 22 pour la zone de sources hydrothermales et 4 pour la référence).

3) Extraction de l'ADN

Après avoir sélectionné les échantillons sur lesquels nous allions travailler, il a fallu choisir une méthode d'extraction d'ADN appropriée.

Figure 60 : Tube et billes utilisés pour l'extraction kit. Lysing Matrix E. Source : MP Biomedicals

La méthode habituelle utilisée au laboratoire pour réaliser des extractions sur les sédiments (Lazar, 2009; Vigneron, 2012) était une méthode modifiée de J. Zhou et son équipe (Zhou et al., 1996). Cette méthode est basée sur une lyse chimique (SDS, proteinase K et tampon hypersalin) et thermique (chocs thermiques azote liquide / +65°C) des cellules, puis une élimination des protéines et autres débris cellulaires par utilisation de chloroforme/alcool isoamylique et, finalement, une précipitation de l'ADN par utilisation d'isopropanol. Le tampon hypersalin utilisé pour cette technique contenait également du CTAB (Hexadecylmethylammonium bromide) qui permet d'éliminer des contaminants comme les acides humiques potentiellement présents et pouvant inhiber par la suite les PCR (Tebbe and Vahjen, 1993; Juniper et al., 2001; Sørensen et al., 2002). Une autre méthode utilisant un kit d'extraction commercial était également utilisée au sein du laboratoire et montrait de bons résultats (Roussel et al., 2008) (FastDNA® SPIN Kit for soil [MP Biomedicals]). Cette technique d'extraction est basée sur une lyse mécanique des cellules, grâce à l'utilisation de petites billes de céramique et de silice (Figure 60).

Dans le but d'extraire un maximum de diversité microbienne des sédiments, nous avons décidé d'utiliser les deux méthodes et de comparer les résultats obtenus au cours d'une étude pilote dont nous parlerons un peu plus loin dans le manuscrit. La méthode de Zhou a été modifiée pour tenter d'extraire une plus large diversité de microorganismes. Nous avons en effet décidé d'augmenter le nombre de cycles de congélation / décongélation, tout en récupérant une fraction des échantillons tous les deux ou trois cycles afin de préserver les ADN déjà extraits des cellules les plus fragiles. La qualité des extraits d'ADN et les rendements d'extraction ont été analysés par migration sur gel et quantification au Nanodrop.

Après extraction, les ADN ont été purifiés grâce au kit Wizard de chez Promega (Vigneron, 2012).

4) ARISA

L'ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) est une technique d'empreinte moléculaire qui permet d'étudier la diversité moléculaire grâce à la variabilité observée au niveau de l'espace intergénique situé entre les gènes de l'ARNr 16S et 23S (Fisher and Triplett, 1999). Cette région, non codante, présente des variations en termes de séquence et de longueur selon les espèces

microbiennes (Figure 61). Cette technique, rapide et peu coûteuse, avait pour but de (1) comparer les duplicats de carottes réalisés au niveau des mêmes habitats et (2) de mettre en évidence les changements éventuels de diversité en fonction de la profondeur des sédiments. Cette méthode n'a été utilisée que sur les archées car les résultats sur les bactéries étaient difficilement exploitables statistiquement parlant, les profils de migration étant recouverts de bandes de différentes tailles non réellement discernables les unes des autres.

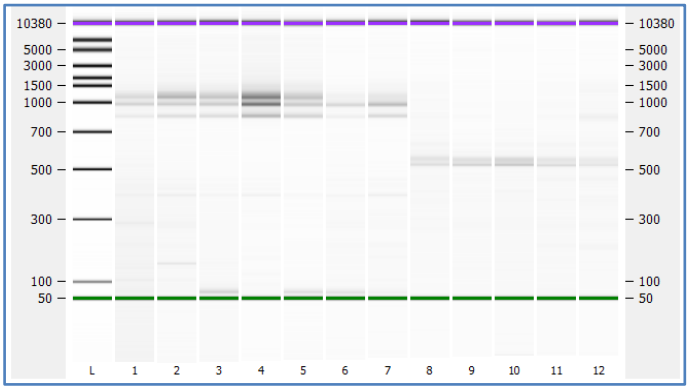


Figure 61 : Exemple de résultats ARISA. Obtenus après séparation des fragments d'ADN par électrophorèse microfluidique sur un Bioanalyzeur 2100 (Agilent) pour douze échantillons de sédiments

Il est important de garder en tête que l'étude de cet espace intergénique, ou dans le cas d'autres études par empreinte génétique, ne reflète pas forcément une diversité réelle ou un changement réel de diversité (Crosby and Criddle, 2003). En effet, l'existence de plusieurs copies de ces gènes codant les ARN ribosomaux et donc de plusieurs copies de cet espace intergénique non-codant, peut entraîner une diversité de séquences au sein d'un même organisme. Par ailleurs, cette région, non-codante, ne subit pas ou peu de pression de sélection. Certains organismes éloignés évolutivement parlant peuvent donc avoir des régions intergéniques proches alors que deux organismes proches évolutivement parlant, associé à un seul et même groupe microbien, peuvent avoir des régions intergéniques très différentes (Crosby and Criddle, 2003).

La technique ARISA et l'analyse des résultats ont été réalisées sous la tutelle d'Adrien Vigneron (doctorant, LMEE) qui a introduit cette technique au LMEE (Vigneron, 2012).

5) Pyroséquencage 454

Le séquençage haut-débit, notamment par pyroséquençage 454 (Figure 62), est aujourd'hui devenu quasiment incontournable dans les études de diversité microbienne, quel que soit l'environnement étudié (Sogin et al., 2006; Roesch et al., 2007; Lauber et al., 2009; Lee et al., 2010; Biddle et al., 2012; Adler et al., 2013; Pantoja-Feliciano et al., 2013). La possibilité de séquencer plusieurs dizaines voire plusieurs centaines d'échantillons à moindre coût et l'obtention de milliers de séquences pour chacun sont en effet des perspectives très alléchantes (Sogin et al., 2006; Roesch et al., 2007; Buée et al., 2009; Acosta-Martinez et al., 2010; Lee et al., 2010). Pour ces raisons, le pyroséquençage 454 a été choisi comme technique d'étude pour cette thèse. Nous cherchions en effet à étudier de nombreux échantillons : plusieurs habitats différents avec plusieurs horizons sédimentaires chacun, soit une cinquantaine d'échantillons étudiés à la fois sur la diversité bactérienne mais aussi la diversité archéenne. La technique de pyroséquençage 454 paraissait donc, à l'époque, particulièrement adaptée. Cependant, si, à termes, le séquençage haut-débit devient rapide et moins coûteux par séquence obtenue que les techniques de séquençage plus classiques, il faut tout d'abord passer par des étapes de

Figure 62 : Séquenceur 454. Système GS FLX. Roche

mises au point laborieuses et prendre conscience des biais inhérents à ces méthodes (Huse et al., 2007; Kunin et al., 2010; Tedersoo et al., 2010; Brodin et al., 2013).

A/ PYROSEQUENÇAGE 454 – *UN PEU D'HISTOIRE*

Avant l'apparition des méthodes de séquençage haut-débit, la méthode classique de séquençage utilisée pour les études de diversité microbienne était la méthode de Sanger (Sanger et al., 1977), décrite un peu plus haut dans le cadre de l'étude des symbioses associées aux vésicomyidés (Figure 50). La technique du pyroséquençage a été introduite par Edward David Hyman dans un article intitulé « A new method of sequencing DNA » (Hyman, 1988). Cette nouvelle méthode proposait alors, sans utiliser d'électrophorèse, ni de radioactivité ou de fluorescence, de séquencer de l'ADN. Elle était en fait basée sur la mesure des pyrophosphates libérés lors de la réaction de polymérisation de l'ADN (Figure 51) (Ronaghi et al., 1998). Comme nous l'avons vu plus haut, la synthèse d'ADN dans les cellules, comme celle produite lors de la réplication de l'ADN, est basée sur l'ajout de desoxyribonucléotides triphosphate (dNTPs) à la chaîne préexistante d'acides nucléiques, en prenant modèle sur un brin matrice préexistant (principe de complémentarité) (Meselson and Stahl, 1958). Cette polymérisation génère d'une part la création d'une liaison covalente entre le dernier nucléotide de la chaîne et le nouveau desoxyribonucléotide triphosphate et, d'autre part, la libération des deux derniers phosphates sous forme d'un pyrophosphate (Figure 51, Figure 63) (PPi) (Patel et al., 2001). Si un seul type de dNTP est ajouté dans le milieu réactionnel et s'il y a libération de pyrophosphate, cela signifie que c'est ce nucléotide qui a été ajouté. Le nucléotide présent à cette position sur le brin matrice (celui que l'on cherche à séquencer) sera le complémentaire de celui qui aura été ajouté (Figure 63).

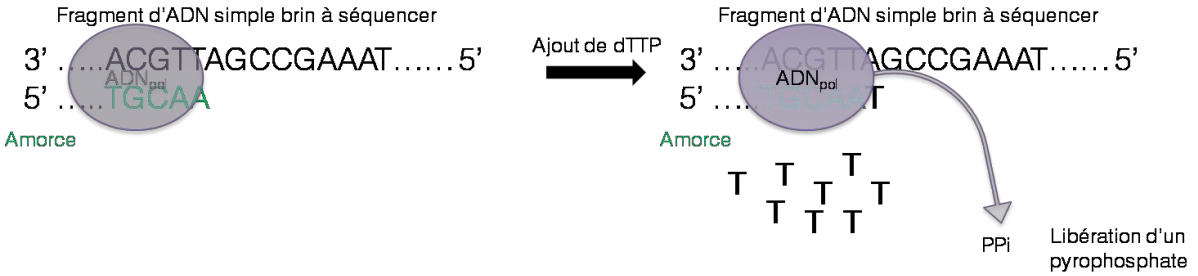


Figure 63 : Polymérisation de l'ADN et libération d'un pyrophosphate

La méthode de Hyman est donc une technique de séquençage par synthèse d'ADN, basée à la fois sur la libération d'un pyrophosphate et le principe de complémentarité des bases lors de la polymérisation de l'ADN. La technique actuelle de « *pyroséquençage* » n'utilise pas uniquement cette technique de séquençage de l'ADN mais aussi de nombreuses avancées technologiques issues de l'évolution des connaissances en physique, informatique, chimie, biotechnologie et nanotechnologie. La technologie 454 est en fait fondée sur l'intégration de différentes techniques : le pyroséquençage, bien entendu, mais aussi l'utilisation de plaques en fibres optiques picotitrées (PicoTiterPlate) (Rothberg and Leamon, 2008), la PCR en émulsion (Baret et al., 2009) ou encore des technologies de pointe pour l'acquisition, le traitement et l'analyse des images. Cette technique 454 (Ronaghi et al., 1998; Margulies et al., 2005) a vu le jour au début du XXI^{ème} siècle et a été développée par la compagnie 454 Life Science, basée à Brandford (Connecticut) aux États-Unis. Aujourd'hui, c'est cette technique qui est utilisée lorsque l'on parle de « *pyroséquençage* ». C'est la société 454 Life Science appartenant à Roche, qui a le monopole de cette technologie. Toutes les machines et les kits nécessaires au pyroséquençage 454 ne sont pour l'instant commercialisés que par cette entreprise.

B/ PYROSEQUENÇAGE 454 – *PRINCIPE*

Commençons tout d'abord par nous intéresser à la technique de pyroséquençage utilisée dans la technologie 454 avant de détailler un peu plus les autres éléments de cette technologie (Margulies et al., 2005).

Le pyroséquençage en lui-même est donc basé sur la reproduction par synthèse d'ADN d'un brin matrice dont on cherche à connaître la séquence, ou ADN cible (Figure 63). Le principe de base est le suivant (Lamoril et al., 2008). Une amorce est tout d'abord hybridée à l'ADN cible. Les différents dNTPs sont ensuite ajoutés séquentiellement dans un ordre connu. S'il y complémentarité avec l'ADN cible, chaque ajout d'un nucléotide va entraîner la formation d'un pyrophosphate (PPi) (Figure 63). Ce dernier va engendrer une cascade de réactions faisant intervenir différents enzymes (en gras ci-dessous), qui aboutiront à la création d'un signal bioluminescent capté par une caméra CCD (Figure 64). Le milieu réactionnel contient, par ailleurs, les différents substrats correspondants aux enzymes (en italique ci-dessous). La séquence de l'ADN cible est déduite en fonction de l'ordre d'incorporation des nucléotides sur le brin néosynthétisé. Par conséquent, chronologiquement, (1) on ajoute un *nucléotide* connu dans le milieu réactionnel, (2) si le nucléotide ajouté correspond à celui attendu par l'**ADN polymérase**, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse (Figure 63), (3) par cette réaction de polymérisation, un pyrophosphate est libéré dans le milieu, (4) le pyrophosphate réagit avec *l'adénosine phosphosulphate (APS)*, substrat de l'enzyme **ATP sulfurylase**, ce qui va conduire à la production d'ATP (adénosine triphosphate). (5) Cet ATP va réagir avec la *D-luciférine*, substrat de l'enzyme **luciférase**, ce qui va conduire à la production de la luciférine-AMP. (6) Cette dernière va être transformée grâce à la luciférase, en oxyluciférine, en CO_2, en AMP et en un signal lumineux mesuré par la caméra CCD. Le signal lumineux va être retranscrit sous forme d'un pic sur un pyrogramme (Figure 65). La hauteur de ce pic est fonction de l'intensité du signal lumineux, elle-même proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés en même temps en cas d'homopolymères (succession d'un même nucléotide sur l'ADN). A partir de la taille des pics obtenus et de la base ajoutée dans le milieu au début de la réaction, il est donc possible d'en déduire la séquence de l'ADN. Il faut noter qu'au cours de ces réactions en chaîne, le substrat de la luciférase qui va permettre la création du signal lumineux, l'ATP, fait partie des nucléotides ajoutés séquentiellement dans le milieu réactionnel. Afin que la création du signal lumineux soit spécifique de l'incorporation des nucléotides, ce nucléotide est remplacé par un nucléotide modifié, le dATP- αS, qui n'entraînera pas de réaction parasite avec la luciférase (Ronaghi et al., 1998; Lamoril et al., 2008). (7) Les nucléotides ajoutés en excès vont ensuite être dégradés par une quatrième enzyme, l'**apyrase**. L'addition du nucléotide suivant peut ensuite avoir lieu. Lorsqu'un nucléotide non

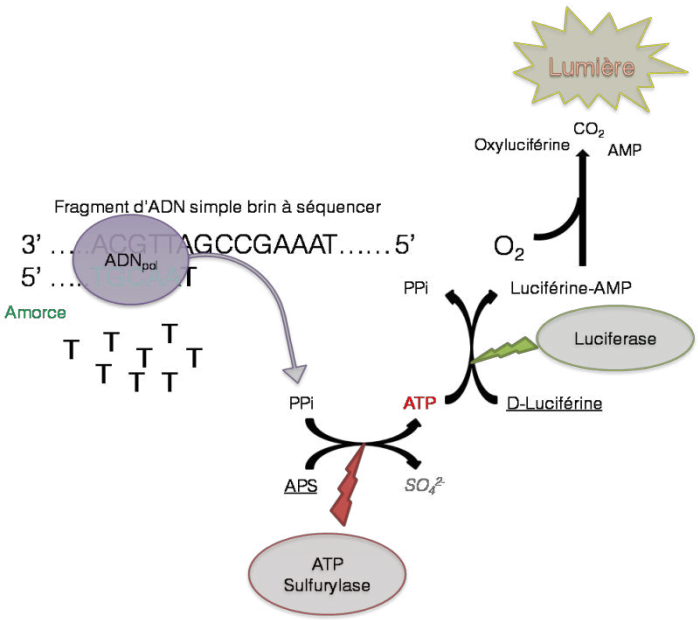


Figure 64 : Principe du pyroséquençage. Génération d'un signal lumineux par une cascade de réactions après ajout de nucléotides dTTP (correspondant à la base à incorporer par l'ADN polymérase – ADN pol sur le schéma)

complémentaire est ajouté dans le milieu réactionnel, celui-ci ne sera pas incorporé par l'ADN polymérase et sera directement dégradé par l'apyrase. Il ne génèrera donc pas de signal lumineux. La longueur des séquences obtenues par pyroséquençage reste limitée à cause de l'inhibition progressive de l'apyrase par l'accumulation des produits de dégradation des nucléotides en excès (Lamoril et al., 2008). Cependant, les nouvelles technologies qui arrivent sur le marché promettent des séquences de plus en plus longues de plus de 1 000 bases (Roche).

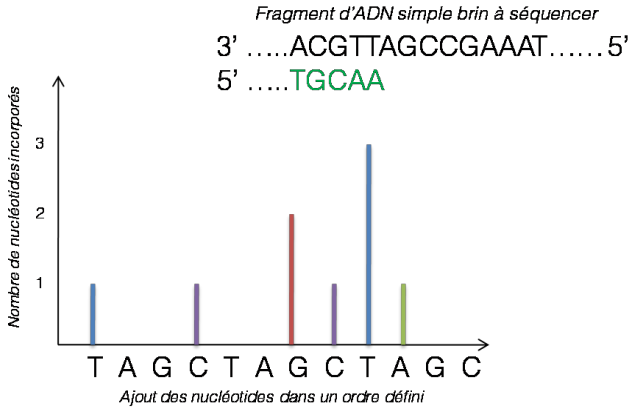


Figure 65 : Schéma d'un pyrogramme obtenu pour la séquence d'ADN ACGTTAGCCGAAAT à séquencer. Ici, la séquence lue sur le pyrogramme est TCGGCTTTA, ce qui correspond, par complémentarité, à notre séquence d'origine à séquencer après l'amorce : AGCCGAAAT.

Le pyroséquençage à présent décrit, reprenons depuis le début. (1) Nous avons notre échantillon (de sédiments par exemple pour rester dans notre sujet).

(2) Il faut tout d'abord en extraire l'ADN. Il faut alors se rappeler qu'un brin d'ADN est spécifique de la cellule dont il provient. Identifier une séquence parmi les ADNs extraits revient donc théoriquement à révéler la présence d'un microorganisme dans l'échantillon de départ.

(3) A partir de l'ADN isolé, il faut réaliser des PCR permettant d'obtenir uniquement les fragments de séquences d'intérêt, c'est-à-dire ceux qui vont nous permettre d'identifier le microorganisme d'origine (ici, l'ARNr 16S, comme décrit pour l'étude des vésicomyidés), en de nombreuses copies identiques, pour que la quantité d'ADN soit suffisante pour les étapes qui suivent. Nous préparons ici une banque d'ADN simple brin. Les amplicons issus de ces PCR classiques vont ensuite être utilisés pour réaliser une PCR un peu particulière, la PCR en émulsion.

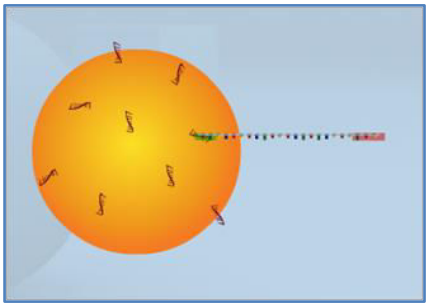


Figure 66 : Isolement d'un fragment d'ADN par bille. Roche

(4) Pour cela, les amplicons de la première PCR vont d'abord être isolés sur des petites billes à raison d'un fragment par bille, donc une séquence spécifique par bille (Figure 66). Cette isolement est rendue possible grâce à (i) des oligonucléotides complémentaires présents d'un côté sur les billes et de l'autre côté sur nos séquences présentes dans nos amplicons et (ii) à une proportion de billes beaucoup plus importante que la quantité de séquences d'ADN qui permettra l'hybridation d'une seule séquence par bille. Les oligonucléotides présents sur nos séquences sont appelés « *adaptateurs* » (A et B). Ils sont fusionnés avec les amorces que nous avons utilisées pour la première PCR, la PCR classique. Les amorces utilisées pour cette PCR sont en fait des « *amorces de fusion* » qui seront décrites plus en détail plus loin dans le manuscrit. A cette étape, nous avons donc des billes portant chacune à leur surface un brin d'ADN simple brin dont nous voulons connaître la séquence.

(5) L'étape suivante consiste en la mise en émulsion de ces billes. Les billes sont mises dans un mélange d'eau et d'huile, et l'émulsion est créée par agitation. Cela aboutit à la présence d'une bille par gouttelette d'eau, séparée à la fois des parois de l'appareillage et des autres gouttes, par un fluide porteur, une huile organique, minérale ou perfluorée (Figure 67) (Baret et al., 2009).

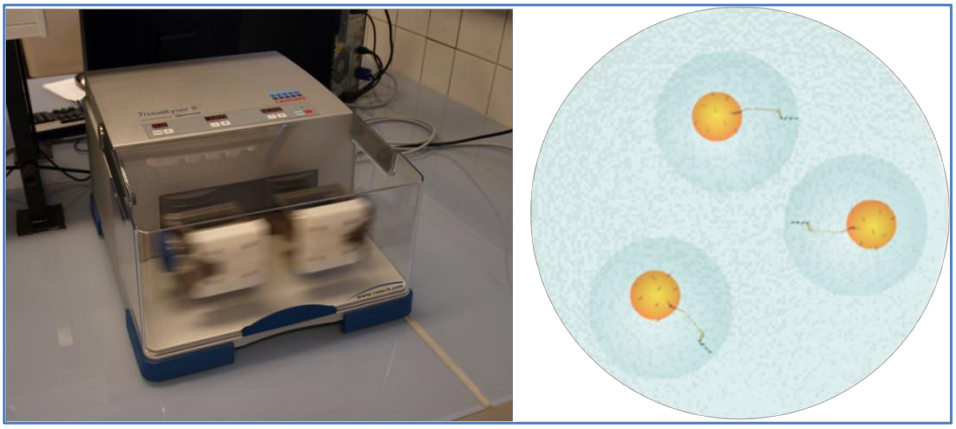


Figure 67 : Mise en émulsion des billes. A droite, appareil de mise en émulsion conseillé par Roche (Plateforme génomique de Rennes). A gauche, schéma de l'émulsion, une séquence d'ADN par bille et une bille par gouttelette (Roche)

(6) Une autre PCR est alors réalisée sur ces émulsions, c'est la PCR en émulsion (emPCR). Les gouttelettes qui contiennent une bille portant une séquence d'ADN vont constituer des microréacteurs (Figure 68). Les fragments d'ADN vont ainsi être amplifiés par PCR mais ils vont rester, après synthèse, dans la gouttelette et s'hybrider à leur tour sur la bille, grâce à leur adaptateur et les oligonucléotides complémentaires présents en nombre à la surface de la bille. Cela permet une amplification clonale de chaque fragment.

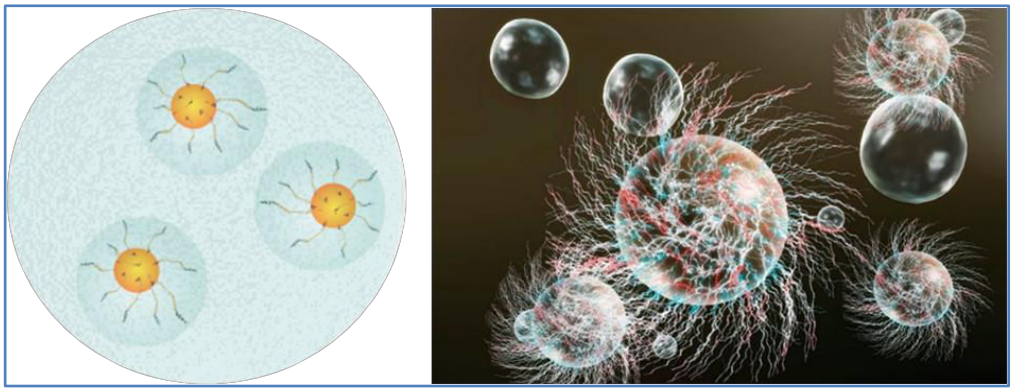


Figure 68 : PCR en émulsion. A droite, multiplication des fragments d'ADN au sein des gouttelettes. A gauche, résultats de la PCR en émulsion. Certaines billes sont recouvertes de fragments d'ADN identiques et d'autres non. (Roche)

(7) Après cette PCR, l'émulsion va être cassée et des milliers de billes portant à leur surface des milliers de copies d'une même séquence seront ainsi obtenues (Figure 68).

(8) Les billes possédant de l'ADN sur leur surface sont ensuite séparées de celles qui ne contiennent aucun brin d'ADN (Figure 69).

(9) Les billes porteuses d'ADN vont ensuite être chargées sur une plaque en fibres optiques. Cette plaque contient environ 1,6 millions de puits de 75 pL et chaque puits possède un diamètre assurant le dépôt d'une unique bille. En parallèle, les réactifs nécessaires au pyroséquençage vont être, eux aussi, déposés sur la plaque (Figure 70).

Figure 69 : Récupération des billes portant de l'ADN à leur surface. Les billes porteuses d'ADN sont couplées avec des billes magnétiques (en marron sur la photographie) et sont attirées par un aimant. Les billes non porteuses sont éliminées avec le surnageant (en blanc sur la photographie). (Plateforme génomique de Rennes).

(10) Cette plaque ainsi chargée va être disposée dans une chambre à flux au niveau du séquenceur et le pyroséquençage tel qu'il a été décrit au-dessus va pouvoir avoir lieu. Chaque nucléotide va être ajouté séquentiellement et les signaux bioluminescents générés par l'incorporation de ceux-ci vont être enregistrés grâce à une caméra CCD, présente au-dessus de la plaque, dans le séquenceur (Figure 71). Le séquenceur enregistrera, pour chaque puits, les nucléotides incorporés au cours du temps. Connaissant l'ordre dans lequel les quatre nucléotides sont ajoutés, l'analyse des différentes images capturées permettra de reconstituer la séquence des différents fragments d'ADN (illustrée par un pyrogramme). Pour chaque puits, on obtiendra donc théoriquement une séquence spécifique d'un microorganisme. Plusieurs générations de séquenceurs existent, le GS20 permettant de synthétiser 100 bases, le GS FLX séquençant de 220 à 240 bases et le GS FLX Titanium qui atteint 350 à 450 bases séquencées. C'est le GS FLX Titanium qui a été utilisé pour séquencer nos échantillons.

Cette nouvelle méthode de séquençage est génératrice d'erreurs, parfois différentes de celles engendrées par le séquençage classique (méthode de Sanger). Étant donné que les nucléotides sont apportés un à un, les substitutions sont moins fréquentes que dans le cas des méthodes traditionnelles. En revanche, il est parfois difficile de faire correspondre l'intensité de la luminescence avec le nombre de nucléotides incorporés. Il en résulte une ambiguïté sur la longueur des homopolymères, particulièrement pour les plus longs (plus de huit bases identiques) (Huse et al., 2007; Kunin et al., 2010).

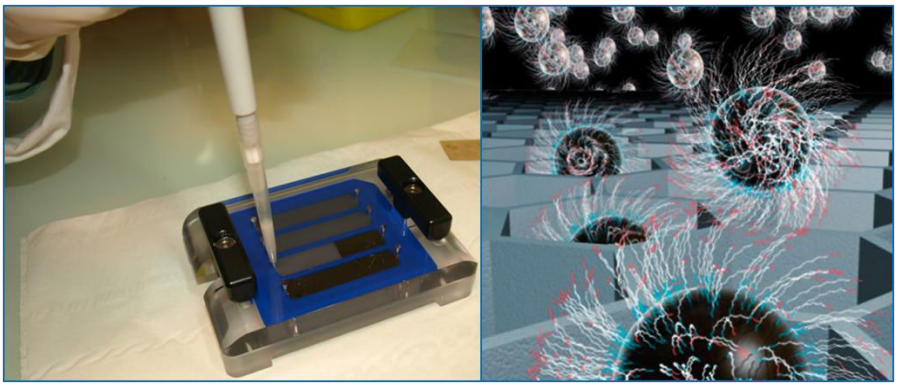


Figure 70 : Dépôt des réactifs et des billes porteuses d'ADN sur la plaque en fibres optiques. A gauche, dépôt sur une plaque divisée en 4 régions distinctes (Plateforme génomique de Rennes). A droite, dépôt d'une bille par puit. (Roche)

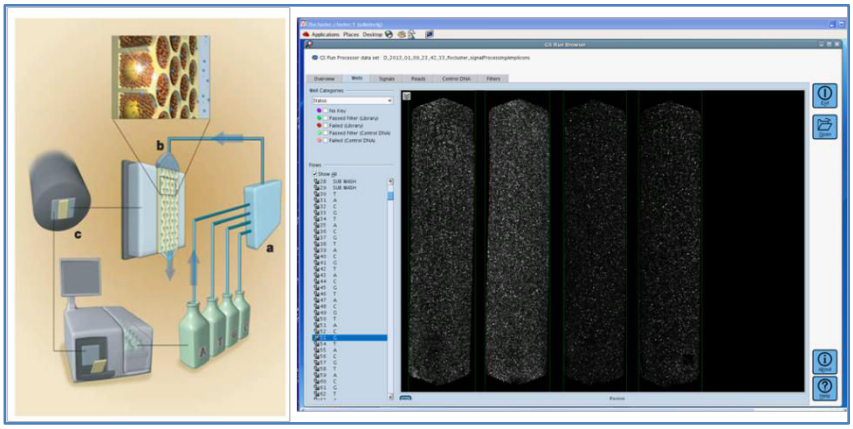
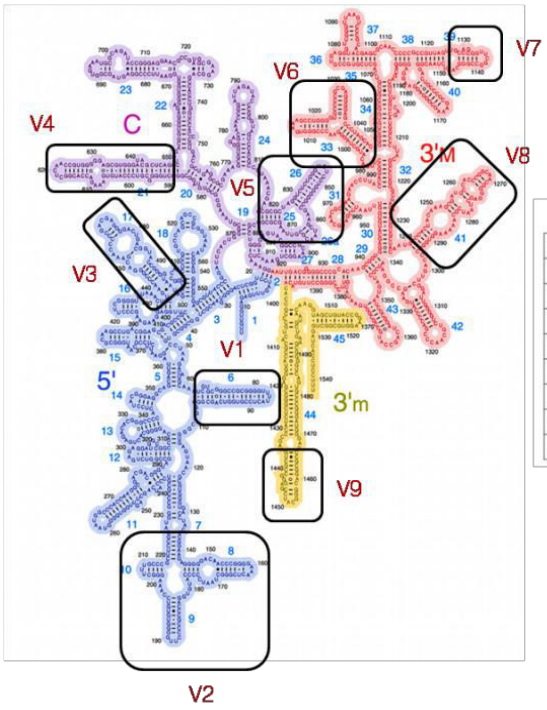


Figure 71 : Séquençage 454. A gauche, principe du séquençage (a) ajout des nucléotides séquentiellement, (b) plaque picotitrée portant billes et réactifs, (c) caméra CCD. (Margulies et al., 2005). A droite, lumière enregistrée par la caméra lors de l'accrochage d'un nucléotide (copie d'écran du séquenceur) (Plateforme génomique de Rennes).

C/ PYROSEQUENÇAGE 454 – *FRAGMENT DE L'ADN UTILISE ET AMORCES*

Comme nous l'avons vu précédemment pour l'étude des symbioses associées aux vésicomyidés et pour les mêmes raisons, c'est la séquence du gène codant l'ARNr 16S qui est classiquement utilisée pour les études de diversité microbienne (Woese et al., 1990; Baker et al., 2003; Schloss and Handelsman, 2004; Chakravorty et al., 2007). En plus des biais engendrés par la spécificité des amorces qui se veulent universelles utilisées pour le séquençage classique (Van de Peer et al., 1996; Marchesi et al., 1998; Baker et al., 2003; Wang and Qian, 2009), la technique de pyroséquençage 454 amène un biais supplémentaire lié à la longueur limitée des séquences obtenues (Tamaki et al., 2011). Le séquençage classique donne accès à de longs fragments et donc à des séquences d'ARNr 16S qui couvrent une grande partie du gène (environ 1500 bp (Neefs et al., 1993)). La comparaison de ces séquences avec les banques de données correspondantes permet d'affilier les séquences à des groupes de microorganismes voir à des espèces microbiennes. De son côté, le pyroséquençage ne donne accès qu'à une partie beaucoup plus restreinte de ce gène (classiquement autour de 300 bases pour le moment), ce qui rend l'identification plus délicate.

L'identification des microorganismes est en fait basée sur la comparaison des séquences au niveau de « *régions hypervariables* ». Ces régions hypervariables, comme leur nom l'indique, peuvent évoluer très vite au cours du temps et les microorganismes ayant des séquences hypervariables proches, sont théoriquement phylogénétiquement proches. Les gènes bactériens codant l'ARNr 16S contiennent généralement 9 régions hypervariables (V1 jusqu'à V9) (Figure 72) (Chakravorty et al., 2007). Ces différentes régions hypervariables n'évoluent pas de la même façon et à la même vitesse (Schmalenberger et al., 2001). Elles possèdent donc différents degrés de diversité de séquences et une seule région hypervariable ne permettrait pas de distinguer tous les microorganismes (Choi et al., 1996; Marchesi et al., 1998; Becker et al., 2004; Chakravorty et al., 2007; Vahjen et al., 2010). Il est donc préférable d'étudier plusieurs régions hypervariables adjacentes, ce qui n'est pas forcément possible avec le pyroséquençage. Le pouvoir discriminant des différentes régions hypervariables dépend aussi des groupes microbiens étudiés (Schmalenberger et al., 2001; Yu and Morrison, 2004). Le choix de la région séquencée est donc primordial pour ce type d'études et il nous faut garder en tête que certains des groupes microbiens contenus dans nos échantillons pourront ne pas être mis en évidence. D'autant plus que nous ne connaissons pas l'étendue de la diversité microbienne contenue dans nos échantillons.



	Positions (*nucléotides*)	Longueur (*nbr de bases*)
Région V1	69 -99	30
Région V2	137 - 242	105
Région V3	433 - 497	64
Région V4	576 - 682	106
Région V5	822 - 879	57
Région V6	986 - 1043	57
Région V7	1117 - 1173	56
Région V8	1243 - 1294	51
Région V9	1435 - 1465	30

Figure 72 : Positions des neuf régions hypervariables sur l'ARNr 16S. A gauche, structure secondaire de l'ARNr 16S de *T. thermophilus* (Yusupov et al., 2001). Les positions des régions hypervariables sont basées sur le système de nomenclature de *E. coli* (Brosius et al., 1978; Chakravorty et al., 2007)

D/ PYROSEQUENÇAGE 454 – *MULTIPLEXAGE DES ECHANTILLONS*

La technique de pyroséquençage 454 telle que nous venons de la décrire concerne le séquençage d'un unique échantillon. A l'origine d'ailleurs, le pyroséquençage n'était pas adapté à l'étude de multiples échantillons. Cependant, il est aujourd'hui possible, et c'est une des raisons qui rend la technique si attractive, de séquencer des dizaines voire des centaines d'échantillons en parallèle sur une même plaque de 454 (Binladen et al., 2007; Galan et al., 2010). Cela est rendu possible grâce à l'étiquetage des séquences provenant d'un échantillon donné (Figure 73) (Binladen et al., 2007). Pour cela, des amorces particulières sont utilisées lors de la PCR classique qui précède l'émulsion. Ces amorces, qui sont des amorces universelles bactéries ou archées dans notre cas, sont couplées à des séquences particulières appelées « *bar-code* » ou « *MID* ». Ce sont des oligonucléotides de quelques bases (Roche en préconise dix mais certains n'en utilisent que trois (Galan et al., 2010)) qui, après séquençage, vont permettre de réassigner les séquences à leur échantillon d'origine. Pour résumer, si dix échantillons différents sont étudiés, pour chaque échantillon, une PCR va être réalisée avec un couple d'amorces spécifiques fusionnées avec un MID particulier (par exemple TACACACACT). Il faudra donc dans ce cas dix PCR avec dix couples d'amorces différents (donc dix MID différents). Les dix amplicons différents vont ensuite être quantifiés puis réunis, la quantification servant à avoir une quantité équimolaire entre les différents échantillons pour ne pas avoir un échantillon sur-représenté lors du séquençage. Ce mélange va ensuite être traité de la même façon qu'un seul échantillon, par PCR en émulsion puis pyroséquençage. C'est lors de l'analyse des données, que nous verrons en détail plus loin, que les différentes séquences obtenues vont être réattribuées à leur échantillon d'origine, grâce aux MID.

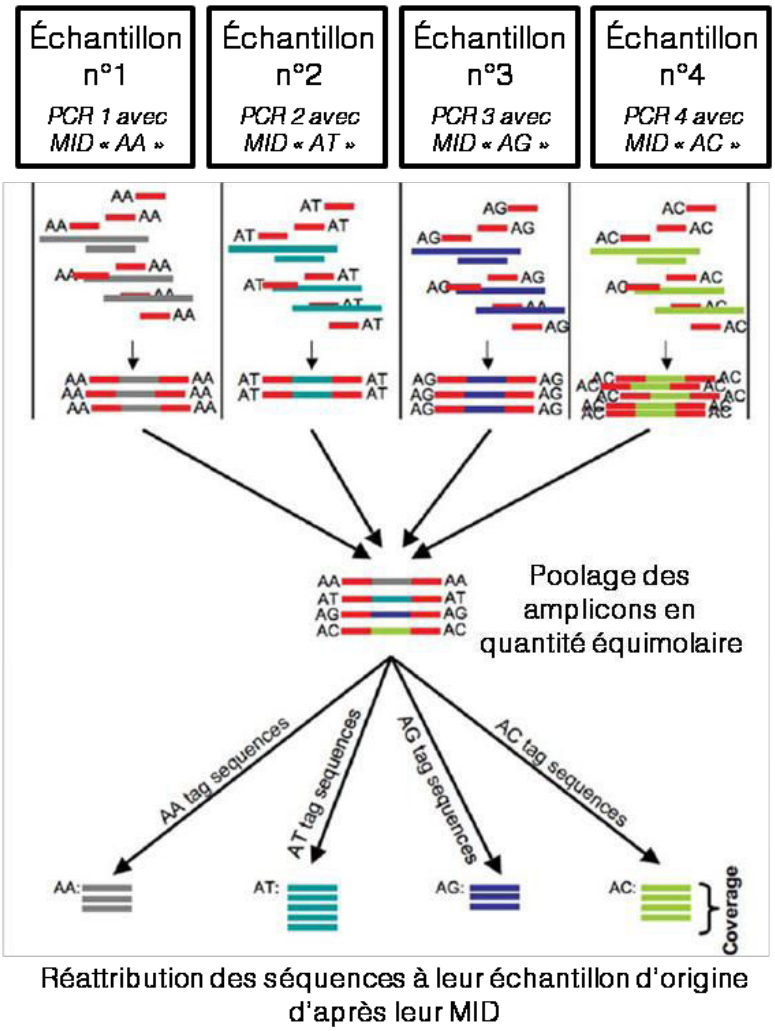


Figure 73 : Principe du multiplexage des échantillons. Ici, le MID ou barcode est symbolisé par seulement deux nucléotides (AA, AT, AG ou AC) pour simplifier le schéma. D'après Binladen et al., 2007.

E/ PYROSEQUENÇAGE 454 – *EXPERIENCE PILOTE*

Nous allons maintenant entrer dans le vif du sujet. Pour rappel, nous avons prélevé tous nos échantillons de sédiments dont nous avons extrait les ADNs. Nous avons approximativement compris le principe du pyroséquençage. Par contre, nous hésitons encore sur le choix des amorces à utiliser en raison des nombreuses études contradictoires sur le sujet, et nous ignorons comment analyser les résultats que nous obtiendrons après pyroséquençage.

Pour commencer, nous avons décidé de réaliser une « expérience pilote » afin d'évaluer certains biais possibles de cette approche. Cette première expérience avait ainsi pour but de (1) mettre en place la technique au laboratoire sur quelques-uns de nos échantillons qui nous semblaient être les plus contrastés, (2) tester l'influence de la technique d'extraction sur la diversité microbienne obtenue et enfin (3) tester s'il existait des différences de diversité en fonction de la région de l'ARNr 16S séquencée et en fonction des couples d'amorces utilisés (deux couples pour les bactéries et deux couples pour les archées). En ce qui concerne les échantillons, deux sites froids, déjà séquencés par séquençage classique en banques de clones lors de la thèse d'Adrien Vigneron (tapis blanc 1758 CT3 et tapis gris 1758 CT8, pour chacun, section de surface 0 – 2 cm et section de profondeur, entre 8 et 12 cm) et deux sites chauds (tapis blanc 1766 CT3, section de surface 0 – 2 cm et de profondeur 10 – 12 cm et cheminée hydrothermale) ont été choisis, soit un total de sept échantillons différents. Ces sept échantillons ont été à la fois extraits par la méthode utilisant le kit commercial (FastDNA® SPIN Kit for soil [MP Biomedicals]) et la méthode Zhou, méthodes décrites plus haut dans le manuscrit, ce qui faisait quatorze échantillons différents. Un des échantillons, la section de surface des tapis blancs du pôle chaud, a été séquencé deux fois sur le même run de pyroséquençage et faisait office de réplicat de séquençage. En comptant quatre couples d'amorces (deux bactéries et deux archées), nous avions donc 64 « échantillons » différents à séquencer.

Après avoir contacté différentes entreprises et plateformes publiques proposant la réalisation de runs de 454 (un *run* est en fait une plaque picotitrée de pyroséquençage), nous nous sommes tournés vers Genoscreen. Cette société de biotechnologies basée à Lille depuis 2001 nous proposait de réaliser tous les traitements en partant des extraits d'ADN bruts jusqu'aux résultats analysés, tout cela complété par une formation sur l'analyse de nos résultats et la comparaison statistique des échantillons.

Les seize « échantillons pilotes » ont donc été envoyés à Lille en janvier 2011.

Les amorces bactéries utilisées pour ce pilote ont été laissées à l'expertise de Genoscreen, qui avait l'habitude de travailler avec certains couples d'amorces. En ce qui concerne les bactéries, deux couples d'amorces différents ont donc été utilisés. Ils avaient été préalablement testés par la société sur toutes sortes d'échantillons (sols, fonds des lacs, produits alimentaires…) et donnaient de bons résultats (région 1 : amplification de la région hypervariable V4 et région 2 : amplification des régions hypervariables V5 - V6). La société Genoscreen n'ayant aucune expertise sur les archées, nous avons dû choisir deux couples d'amorces que nous avons recherchés dans la littérature (Vetriani et al., 1999; Coolen et al., 2002; Reed et al., 2002; Teske et al., 2002; Inagaki et al., 2003; Newberry et al., 2004; Sorensen et al., 2004; Parkes et al., 2005; Biddle et al., 2006; Inagaki et al., 2006; Sorensen and Teske, 2006; Roesch et al., 2007; Teske et al., 2009; Hollister et al., 2010; Nunoura et al., 2010; Roh et al., 2010). Un total de quatorze amorces forward et treize amorces reverse spécifiques des archées et couvrant différentes régions hypervariables ont été testées sur le critère de leur universalité sur le domaine des archées grâce au logiciel *OligoCheck* (Version 1.0, Dr K.E. Ashelford, Cardiff University). Les séquences utilisées pour ces tests étaient des séquences trouvées dans les bases de

données internationales, issues de différents articles portant sur des environnements proches de ceux étudiés dans cette thèse (Hinrichs et al., 1999; Teske et al., 2002; Sorensen et al., 2004; Dhillon et al., 2005; Cambon-Bonavita et al., 2009; Teske et al., 2009; Maugeri et al., 2010; Nunoura et al., 2010). Les quatre couples donnant les « universalités théoriques » les plus élevées ont ensuite été testés par PCR, directement sur nos échantillons. Les deux couples retenus étaient les suivants : Arch8F (CGG TTG ATC CTG CCG GA) (Teske et al., 2002) et PARCH519R (TTA CCG CGG CKG CTG) (Ovreas et al., 1997) qui couvrait les régions V1-V2-V3 d'un côté et Arc787F (ATT AGA TAC CCS BGT AGT CC) et Arc1059R (GCC ATG CAC CWC CTC T) (Yu et al., 2005) qui couvrait les régions V5 et V6 de l'autre. Ces amorces n'ont finalement pas été utilisées par Genoscreen car incompatibles avec les adaptateurs de Roche qu'ils utilisaient. En remplacement, la société a donc définit d'autres amorces universelles archées. Nous ne l'apprendrons malheureusement qu'après le rendu des résultats, les archées étaient pour eux un sous-groupe des bactéries. Les amorces qu'ils avaient dessinées étaient basées uniquement sur des séquences d'un « *Halobacteriaceae archaeon* » (numéro d'accession Genbank HQ236377) et avaient donc une universalité sur le domaine des archées pouvant être assez restreinte. Les amorces archées utilisées pour le pilote couvraient les régions V2-V3 pour le 1er couple et les régions V5-V6 pour le 2ème couple.

Environ cinq mois plus tard, après de nombreux problèmes de purification, d'amplification et quantification signalés par Genoscreen, nous avons reçu les résultats de séquençage. Notre pilote a été réalisé sur deux runs différents. Un premier run a été réalisé sur quinze des seize échantillons initialement prévus (les PCR sur le 16ème échantillon s'étant révélées infructueuses) pour la région 1 des bactéries. Il consistait en 1/8ème d'une plaque passée sur un séquenceur GS-FLX version Titanium de Roche. Un total de 48 555 séquences a été obtenu après les premiers filtres classiques appliqués sur les résultats (intensité du signal trop faible, aucun nucléotide incorporé pendant plus de trois flux de bases, plusieurs séquences détectées dans un même puits, séquences inférieures à 50 pb). Le second run a été réalisé sur le reste des régions prévues, avec de nombreux échecs au niveau des PCRs (37 échantillons séquencés sur les 48 prévus). Il consistait en 3/8ème d'une plaque de pyroséquençage passée également sur un séquenceur GS-FLX version Titanium. Après l'application des mêmes filtres que pour le 1er run, 29 457 séquences pour la région 1 des archées, 58 342 pour la région 2 des archées et 142 075 pour la région 2 des bactéries, soit, 229 874 séquences, ont été obtenues.

Les filtres *qualité* permettent d'éliminer les séquences de basse qualité. Des études montrent que grâce à ces étapes de filtration, il est possible de surpasser, par pyroséquençage, la précision des méthodes traditionnelles comme la méthode de Sanger (Huse et al., 2007). Ces étapes de filtration de séquences sont très importantes pour obtenir des résultats qui reflètent la diversité microbienne réelle présente dans les échantillons d'origine. En effet, conserver toutes les séquences pour les analyses peut totalement biaiser les résultats en augmentant par exemple considérablement la diversité microbienne présente (Kunin et al., 2010).

La formation sur le traitement bioinformatique des résultats a eu lieu en septembre 2011 et s'est déroulée sur deux jours. Cette formation par la société Genoscreen comportait une présentation de la technique de séquençage, une présentation des fichiers obtenus en sortie de séquençage (séquences, qualité…), une présentation sur BLAST et les banques de données, une introduction à *Perl* et une formation à l'utilisation du logiciel *MEGAN*. Cette partie « analyse des résultats » sera détaillée un peu plus loin dans le manuscrit dans un paragraphe dédié, « *Analyses des données de pyroséquençage* ».

Les résultats de ce pilote sont présentés dans un deuxième article, intitulé « *Influence of DNA extraction methods, 16S rRNA targeted hypervariable regions and sample origins on the microbial*

diversity detected by 454 pyrosequencing in marine chemosynthetic ecosystems ». Cet article a été soumis récemment à la revue *Journal of Microbiological Methods.*

F/ PYROSEQUENÇAGE 454 – *POLE FROID*

Après avoir rencontré un certain nombre de difficultés au cours de l'expérience pilote de ce début de thèse (difficultés de compréhension avec les équipes de Genoscreen, problèmes rencontrés pour l'analyse des données…), nous avons décidé de nous adresser à une autre plateforme pour le séquençage de tous les échantillons issus de la zone de suintements froids. Nous nous sommes cette fois-ci adressés à la plateforme génomique de Rennes du réseau Biogenouest, dont le responsable scientifique est Philippe Vandenkoornhuyse. Ce choix a été motivé par le fait qu'une autre doctorante du département, Maria-Cristina Ciobanu, avait déjà réalisé un run sur cette plateforme, pendant que nous réalisions le nôtre à Lille. Elle avait pour cela réalisé ses propres PCR et nous avions accès aux amorces qu'elle avait utilisées.

Au vu des résultats de l'expérience pilote, nous avons décidé d'extraire tous les échantillons selon les deux méthodes d'extraction puis de réunir ces extraits d'ADN avant les PCR. Pour le projet avec la plateforme de Rennes, nous devions fournir les amplicons issus de la PCR classique avec les amorces incluant les adaptateurs pour le pyroséquençage et les MID permettant de réunir tous nos échantillons. Nous avons cette fois-ci utilisé un seul couple d'amorces universelles bactéries et un autre couple d'amorces universelles archées. Ces couples étaient utilisés par la plateforme génomique de Rennes et donnaient de bons résultats. Le couple d'amorces pour les bactéries étaient BactF = GTG CCA GCM GCC GCG GTA ATA C et 907R = CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT (Yu and Morrison, 2004) et ciblait les régions V4 et V5 de l'ARNr 16S et le couple d'amorces pour les archées étaient Arc21F = TCY GGT TGA TCC TGS CGG (Roh et al., 2007) et Arc519R = GGT DTT ACC GCG GCK GCT G (Teske and Sorensen, 2008) et ciblait les régions V1-V2 et V3 de l'ARNr 16S. Nous avions sélectionné 23 échantillons à séquencer pour la zone des suintements froids, à la fois pour les bactéries et pour les archées. Nous avions donc besoin de 23 couples d'amorces pour les bactéries (23 MID différents donc 23 couples différents) et 23 couples d'amorces pour les archées. A l'issue du run de pyroséquençage de l'autre doctorante, nous avions déjà 15 couples d'amorces pour les bactéries (dont 11 avaient été fournis par Rennes et 3 dessinées par Maria-Cristina Ciobanu) et 8 couples d'amorces pour les archées (dessinés par Maria-Cristina Ciobanu).

Cette fois-ci, nous devions donc dessiner nos propres amorces de fusion et réaliser nos PCR avant de les envoyer à Rennes. Revenons donc avant toutes choses sur les amorces de fusion.

(1) Création des amorces de fusion

Les « *amorces de fusion* » sont particulières au pyroséquençage. Elles sont utilisées pour réaliser les PCR classiques avant la PCR en émulsion prévue dans le séquençage 454. Les amorces de fusion comprennent différents éléments (de 5' vers 3'). Tout d'abord, un *adaptateur* spécifique au pyroséquençage va permettre l'hybridation de nos séquences sur les microbilles, qui vont être utilisées pour la PCR en émulsion (Figure 66, Figure 67 et Figure 68). Ensuite, une séquence clef de quatre oligonucléotides (TCAG), va servir à la calibration du signal bioluminescent du séquenceur (*clef de calibration*). Les séquences *MID* viennent à la suite, ce sont les codes-barres de nos échantillons qui permettent de séquencer plusieurs échantillons sur une même plaque de séquençage. Et enfin, les *amorces* qui vont s'hybrider à nos ADN, spécifiques des archées ou des bactéries (Roche, 454 Life Sciences) (Figure 74). Revenons maintenant plus en détail sur ces différents éléments.

Commençons par les **amorces** de PCR. Ces amorces ciblent une région particulière de l'ARNr 16S ; ce sont des amorces classiques de PCR. Pour le séquençage de nos échantillons de sédiments, nous avons donc utilisé un couple pour les bactéries, BactF et BactR, et un couple pour les archées Arc21F et Arc519R. Comme pour une PCR classique, ce sont ces séquences qui vont venir s'hybrider sur l'ADN et la polymérisation s'effectuera à partir de leur extrémité 3', permettant ainsi une amplification de nos ADN au niveau du fragment compris entre les deux amorces de nos couples.

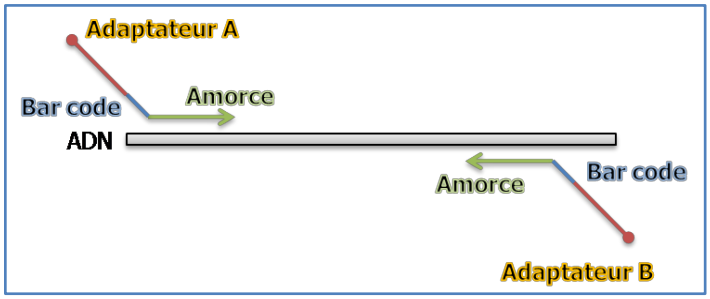


Figure 74 : Principe des amorces de fusion pour le pyroséquençage. Dans ce schéma les clefs de calibration sont comprises dans les « adaptateurs » et la chimie représentée est la Lib-A (Roche).

Poursuivons avec les **adaptateurs A et B** spécifiques au pyroséquençage. Ces adaptateurs vont servir d'une part à la fixation des fragments d'ADN sur les microbilles de l'emPCR, d'autre part à l'amplification lors de l'emPCR, comme amorces de polymérisation, et enfin comme amorces pour la polymérisation de séquençage. Pour la technologie 454 qui utilise le séquenceur GS-FLX version Titanium, il existe deux kits différents, fournis par Roche, pour réaliser le séquençage. Ces deux kits correspondent à deux chimies différentes : Lib-A et Lib-L. Dans le cas de la chimie Lib-L, toutes les billes utilisées portent la séquence complémentaire du même adaptateur. Comme tous les fragments sont séquencés par la même extrémité, la présence du MID est nécessaire uniquement du côté de l'adaptateur correspondant. Dans le cas de l'autre chimie, Lib-A, certaines billes portent le complémentaire de l'adaptateur A et d'autres portent le complémentaire de l'adaptateur B. Ainsi, il est possible de séquencer les fragments d'ADN dans les deux sens, avec une moitié liée aux billes par leur adaptateur A et une autre moitié liée par l'adaptateur B. Les fragments d'ADN pouvant être séquencés du côté de l'adaptateur A ou du B, la présence d'un MID est nécessaire des deux côtés, afin de pouvoir réattribuer les séquences finales à leur échantillon d'origine. Les billes A et B étant fournies séparément par Roche, si les billes A sont maintenues séparées des billes B pendant toute la procédure 454, il est possible d'utiliser uniquement des billes A ou uniquement des billes B dans la chimie Lib-A. Cependant, dans ce cas, la moitié du kit acheté restera inutilisé. Les séquences des adaptateurs A et B diffèrent entre la chimie Lib-A et la chimie Lib-L. Dans le cadre de notre projet, nous avons utilisé la chimie Lib-A car les adaptateurs de la chimie Lib-L couplés aux amorces spécifiques formaient des structures secondaires incompatibles avec les PCR. Pour ne pas laisser une partie du kit inutilisée, les bactéries ont été séquencées par l'adaptateur A, ce sont les billes A qui ont été utilisées, et les archées ont été séquencées par l'adaptateur B, ce sont les billes B qui ont été utilisées.

Terminons avec les **MID**. Les MID, aussi appelés *séquences tag*, sont des petites séquences oligonucléotidiques qui vont permettre, à la manière des codes-barres, d'étiqueter les séquences en fonction de leur échantillon d'origine (Figure 73). Ce sont ces MID qui vont permettre le multiplexage des échantillons comme nous l'avons décrit plus haut. Dans notre projet, nous avons 23 échantillons de sédiments que nous voulons séquencer à la fois pour identifier les bactéries, et pour identifier les archées, avec deux couples d'amorces spécifiques. Nous avons donc besoin de 46 couples d'amorces différents, portant chacun un MID spécifique. Dans la mesure où nous utilisions la chimie Lib-A, nous devions dessiner des couples d'amorces comportant un MID au niveau de l'adaptateur A et un autre au niveau de l'adaptateur B. Comme nous l'avons vu, nous avions déjà les amorces utilisées par Maria-

Cristina Ciobanu lors de sa thèse et il ne nous restait que huit couples d'amorces bactéries et quinze couples d'amorces archées à dessiner.

Pour dessiner les amorces de fusion manquantes, certaines séquences étaient pré-imposées : les séquences des adaptateurs (A et B), de la clef de calibration (TCAG) et des amorces universelles. Il nous restait donc à choisir de bons MID. Pour ce faire, nous avons trouvé quelques conseils sur les très utiles « Technical Bulletin » de Roche. Roche conseille 1) d'utiliser des MID de même taille, pour faciliter le traitement de nettoyage des séquences après séquençage, de 10 paires de bases, pour permettre une réattribution à l'échantillon d'origine sans ambiguïté ; 2) d'avoir au moins 4 différences entre chaque MID ; 3) d'optimiser la séquence pour qu'elle nécessite le moins de flux séquentiels de nucléotides possibles (21 flux au plus), puisque le nombre de flux de nucléotides limite la longueur de la séquence obtenue au final ; 4) d'éviter les répétitions de nucléotides l'un à côté de l'autre et enfin 5) d'éviter de faire commencer le MID par le même nucléotide que celui qui termine la séquence de la clef de calibration (ici G). D'après ces conseils, Roche propose 161 MID dont les séquences sont données dans le « Technical Bulletin » d'avril 2009. En plus de tous ces conseils, comme pour toutes les amorces classiques, il faut minimiser les structures secondaires, maximiser l'énergie de liaison entre ADN et amorce (ΔG le plus négatif possible) et minimiser les dimères potentiels entre les deux amorces d'un même couple. Pour finir, étant donné que tout cela amène à des tailles d'amorces de fusion de plus de 50 pb, il faut vérifier que la séquence résultante ne correspond pas à un microorganisme particulier dans les banques de données.

Pour dessiner les meilleures amorces de fusion possibles, nous avons opté pour une stratégie semi-automatisée. Chaque amorce spécifique de PCR (deux archées et deux bactéries) a été traitée séparément, le protocole qui suit a donc été appliqué pour chacune de ces quatre amorces. (1) Les séquences des MID conseillées par Roche ont été récupérées sur le bulletin technique et recopiées dans

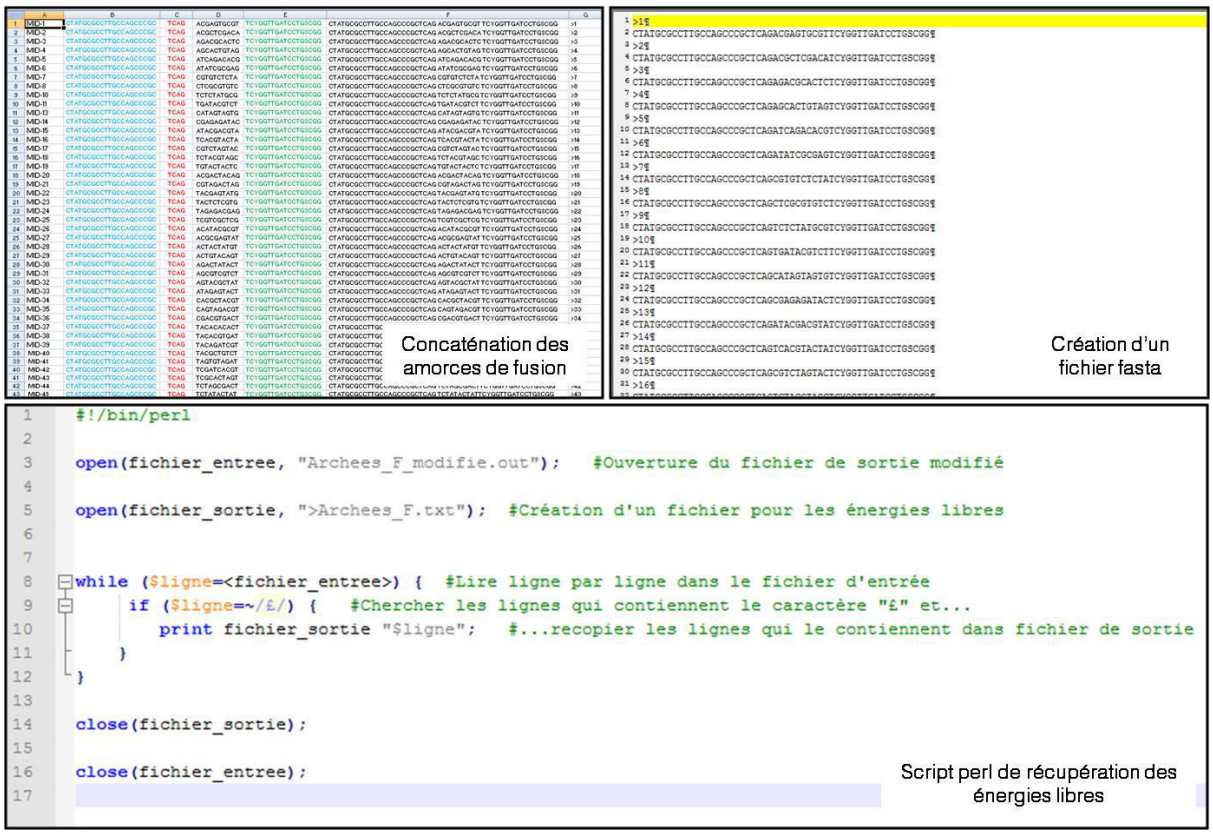


Figure 75 : Stratégie utilisée pour dessiner des amorces de fusion

une colonne d'une feuille Excel (Figure 75 colonne D). Dans les colonnes précédentes figurent le numéro correspondant au MID (colonne A), la séquence de l'adaptateur (colonne B), la séquence clef (colonne C) et l'amorce spécifique (colonne E). Dans une autre colonne Excel, les cellules d'une ligne sont concaténées pour obtenir l'amorce de fusion correspondante (Figure 75, colonne F). A partir de ces 161 séquences différentes, un fichier *fasta* est créé dans un éditeur de texte quelconque (*Exemple.fasta*) (Figure 75). (2) Le fichier exécutable de *RNAfold* est récupéré sur internet et va calculer automatiquement les ΔG pour chacune des 161 amorces. La commande à taper dans le terminal windows est « `RNAfold -p -d2 -noLP <Exemple.fasta> Exemple.out` ». Le fichier de sortie est nommé *Exemple.out*. Les énergies libres apparaissent entre crochets dans le fichier de sortie et il est aisé de récupérer ce chiffre grâce à un petit script *perl* (Figure 75) puis de le copier dans une colonne Excel avec le numéro du MID correspondant, de trier par ordre décroissant et de sélectionner les amorces de fusion pour lesquelles l'énergie libre est la plus négative possible. (3) Pour les meilleures amorces de fusion, il est ensuite possible de sélectionner, grâce par exemple à *OligoAnalyzer* (http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/default.aspx), celles qui forment le moins de structures secondaires possibles et de former les couples d'amorces tout en faisant attention aux dimères d'amorces. De cette façon, nous avons dessiné les amorces de fusion manquantes.

(2) Réalisation des PCR

Après avoir dessiné et commandé toutes ces nouvelles amorces, il a fallu réaliser les amplicons nécessaires pour la suite du pyroséquençage. Sur les conseils de Philippe Vandenkoornhuyse, nous avons adopté une démarche comprenant des duplicats vrais de PCR. Nous avons donc réalisé deux PCR indépendantes pour chacun des échantillons et les deux amplicons produits ont été séquencés de manière indépendante (Figure 76). Cette démarche offre la certitude d'analyser des séquences qui existent vraiment en ne gardant, au moment de l'analyse, que les séquences similaires entre les deux réplicats. De plus, elle évite de se débarrasser des singletons puisqu'il y aura au minimum deux séquences singleton produites indépendamment dans les deux PCR indépendantes. Nous verrons cela plus en détail dans le chapitre dédié aux analyses des données de pyroséquençage.

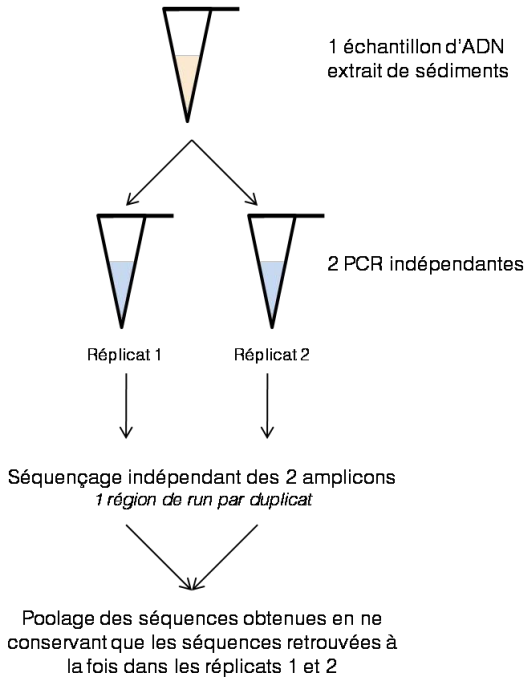


Figure 76 : Stratégie de séquençage de duplicats vrais de PCR

Tous les échantillons ont d'abord été testés en PCR, avec succès, en utilisant des couples d'amorces classiquement utilisés au laboratoire 787F-1059R pour les archées et E338F-U1407R pour les bactéries. Ensuite, la réalisation des amplicons avec les amorces de fusion n'a pas été sans quelques embûches… Les deux principaux problèmes rencontrés furent l'obtention de témoins négatifs positifs et ce uniquement avec les nouvelles amorces dessinées, et des échecs d'amplification sur un nombre important d'échantillons avec le kit PCR habituellement utilisé au laboratoire (GoTaq®Flexi DNA Polymerase de chez Promega). Nous avons donc testé différents autres kits de PCR et de Q-PCR sur nos échantillons : PerfeCTa® SYBR® Green SuperMix, ROX™ de chez Quanta Biosciences, Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix de chez Agilent, *Pfu* DNA Polymerase de chez Promega, FastStart Taq DNA Polymerase de chez Roche et enfin TaKaRa Ex Taq® DNA Polymerase de chez TaKaRa. Le mix Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix de chez Agilent, qui permettait d'obtenir le plus grand nombre d'amplifications positives, a été choisi pour la réalisation de tous les amplicons. Ainsi, tous les échantillons ont pu être amplifiés avec les amorces de fusion et le mix Agilent. Les produits PCR obtenus ont ensuite été purifiés sur gel au laboratoire, sur les conseils de la plateforme génomique de Rennes, puis envoyés en septembre 2012 pour séquençage. J'ai eu la chance d'assister et de participer au séquençage de ces échantillons, réalisé par Alexandra Dheilly, qui s'est déroulé en janvier 2013 sur le campus de Rennes (les photos qui illustrent le principe de pyroséquençage proviennent d'ailleurs de cette expérience). Le run a été séparé en quatre régions : (1) Bactéries réplicat 1, (2) Bactéries réplicat 2, (3) Archées réplicat 1 et enfin (4) Archées réplicat 2 (Figure 70).

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article 3 de ce manuscrit de thèse, intitulé « *Microbial diversity associated with different faunal assemblages in the cold seep sediments of the Sonora Margin, Guaymas Basin*», actuellement en cours d'écriture.

G/ PYROSEQUENÇAGE 454 – *POLE CHAUD*

Après le séquençage des échantillons provenant de la zone de suintements froids du Bassin de Guaymas (la Marge de Sonora), nous avons réalisé un nouveau run de pyroséquençage pour les échantillons provenant de la zone de sources hydrothermales (Southern Trough). A nouveau, nous nous sommes adressés à la plateforme génomique de Rennes pour réaliser ce séquençage. Nous avons ainsi pu utiliser les mêmes amorces de fusion que pour le séquençage du pôle froid. De la même façon que pour les échantillons de la Marge de Sonora, l'ADN de tous les échantillons a été extrait selon les deux méthodes d'extraction (Zhou et Kit) puis réuni avant PCR. Pour des raisons budgétaires, nous avons cette fois-ci opté pour une stratégie de séquençage sans duplicat vrai de PCR. Le run du pôle chaud a donc été réalisé sur une plaque divisée en deux régions uniquement (une région pour les bactéries et une région pour les archées). Les amplicons correspondant au pôle chaud ont été envoyés à la plateforme de Rennes au début du mois d'octobre 2013 et sont actuellement en cours de séquençage.

H/ PYROSEQUENÇAGE 454 – *ANALYSE DES DONNEES*

Nous arrivons maintenant à la partie qui concerne l'analyse des données de pyroséquençage, qui aura été, pour ma part, l'une des plus palpitantes de toute ma thèse ! Les débuts ont été plutôt chaotiques mais chaque étape fut réellement très instructive. L'analyse des données est présentée ici de manière chronologique afin d'essayer de transcrire l'évolution de mes connaissances et de ma pensée au cours de ma thèse puisque c'est précisément cela qui a rendu cette partie si passionnante. Je ne vais pas reprendre ici le fonctionnement détaillé des logiciels utilisés ; des tutoriels, modes d'emploi ou aides facilement accessibles sur internet le font déjà très bien. Cette partie ne reprend pas non plus de manière exhaustive toutes les possibilités qui existent à l'heure actuelle pour traiter des données issues

de séquençage haut-débit. Le but est ici de faire comprendre au lecteur comment j'ai personnellement réussi à traiter des données de pyroséquençage au travers du fonctionnement de base de quelques logiciels, utilisés au cours de ma thèse. Cette partie se voudrait également être une aide potentielle à toute personne dans le besoin, égarée dans les dédales de l'analyse de données des nouvelles générations de séquençage…

Commençons tout d'abord par décrire la démarche que j'avais adoptée à mes premiers balbutiements de taxonomie/phylogénie… Avant le pyroséquençage, je n'avais eu accès qu'à quelques dizaines voire une centaine de séquences d'ADN. Le principe est simple (en simplifiant). Nous partons d'un échantillon (de sédiments par exemple) qui contient des microorganismes. L'ADN est extrait de cet échantillon et un mix de tous les ADN provenant de tous les microorganismes contenus dans notre échantillon est ainsi obtenu (théoriquement). Cet ADN est ensuite séquencé (tout du moins un gène, celui qui code l'ARNr 16S). Un certain nombre de séquences est obtenu, chaque séquence correspond à un microorganisme (ou toutes les séquences correspondent à un seul microorganisme, et l'analyse devient donc encore plus simple). Nous comparons ensuite cette séquence à des bases de données contenant d'autres séquences dont les auteurs ont théoriquement identifié le microorganisme d'origine. Et c'est là que les choses se compliquent... Dans les environnements que nous étudions, et dans beaucoup d'autres d'ailleurs, la majorité des microorganismes présents sont incultivés (Amann et al., 1995). Nous ne connaissons d'eux que leur séquence génétique, plus ou moins complète. Il devient alors difficile de leur donner un nom, de les classer parmi les autres microorganismes et encore plus difficile de connaître leur fonction. Grâce à de nombreuses études et à de nombreuses analyses phylogénétiques, il est possible de classer ces microorganismes selon l'environnement d'origine et, parfois des hypothèses sur leur fonction peuvent être émises. Cependant, lorsque nos séquences sont comparées avec celles des grandes banques de données internationales (EMBL, GenBank, DDBJ), nous obtenons ce genre de résultats (exemple ici avec une séquence d'archée des sédiments de la marge de Sonora) :

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Uncultured archaeon clone 25H-0S-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1701	1701	100%	0.0	100%	EU713867.2
Uncultured archaeon clone 25H-270S-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1694	1694	99%	0.0	99%	FJ403996.1
Uncultured archaeon clone 626-27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1694	1694	99%	0.0	99%	AY345181.1
Uncultured crenarchaeote gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: AJS72-117	1687	1687	100%	0.0	99%	AB239077.1
Uncultured archaeon clone KZNMV-25-A11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1679	1679	100%	0.0	99%	FJ712386.1
Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone GoC_Arc_55_D1_C0_M0	1677	1677	99%	0.0	99%	FN820387.1
Uncultured Methanosarcinales archaeon partial 16S rRNA gene, clone CT1A13	1677	1677	99%	0.0	99%	AM888259.1
Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HydBeg05	1676	1676	99%	0.0	99%	AJ578098.1
Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone GoC_Arc_34_D1_C0_M0	1674	1674	99%	0.0	99%	FN820373.1
Uncultured archaeon clone FeSO4_A_126 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1674	1674	100%	0.0	99%	GQ356863.1
Uncultured euryarchaeote partial 16S rRNA gene, clone GoM_GC232_4463_Arch64	1674	1674	100%	0.0	99%	AM745237.1
uncultured archaeon fos0644c1	1674	1674	100%	0.0	99%	CR937009.1
Uncultured archaeon clone 25H-0S-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1672	1672	99%	0.0	99%	EU713877.2
Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone Hyd24-Arch04	1672	1672	99%	0.0	99%	AJ578111.1
Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HydBeg37	1672	1672	99%	0.0	99%	AJ578094.1
Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HydBeg22	1668	1668	100%	0.0	99%	AJ578118.1
Uncultured archaeon clone AMSMV-10-A15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1666	1666	99%	0.0	99%	HQ588655.1
Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HydBeg41	1666	1666	99%	0.0	99%	AJ578095.1

Figure 77 : Résultats d'un BLAST sur le portail du NCBI d'une séquence d'archée des sédiments de la Marge de Sonora. On peut voir ici les séquences existantes dans les bases de données internationales (EMBL, GenBank et DDBJ) les plus similaires à notre séquence requête. La plus similaire étant la première.

Très intéressant donc puisque nous apprenons ici que notre archée est une archée… Manuellement, il est alors possible d'afficher la description de ces séquences en cliquant sur le numéro d'accession correspondant. Avec de la chance, nous trouverons alors l'article de référence correspondant à la séquence, dans lequel nous trouverons un arbre taxonomique et l'affiliation de la séquence (Figure 78).

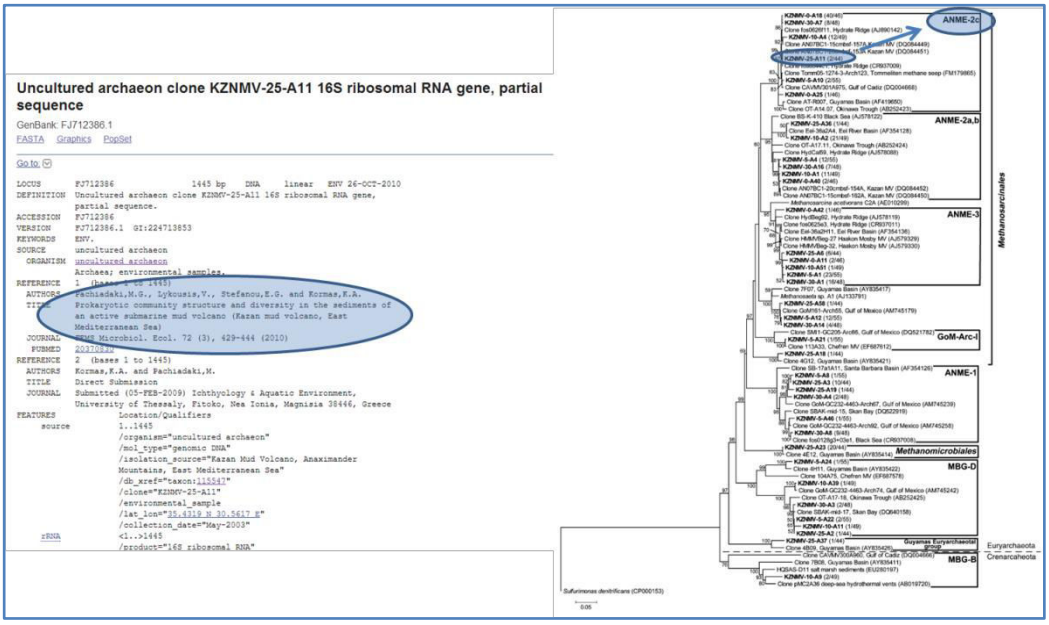


Figure 78 : Affiliation d'une séquence de banque. A gauche, la fiche d'identification de la séquence trouvée sur le portail du NCBI (n° accession : FJ712366). Cette fiche permet de retrouver la publication d'origine, ici Pachiadaki et al., 2010. A droite, l'arbre phylogénétique présenté dans cet article, dans lequel on retrouve la séquence et son affiliation (en bleu)

A partir de là, il est possible de récupérer plusieurs de ces séquences de banques, avec leur affiliation respective, de créer un fichier global avec nos séquences et ces séquences et de construire des arbres taxonomiques pour confirmer ou infirmer cette affiliation.

Lorsque nous travaillons sur une dizaine de séquences, nous pouvons nous permettre ce genre de traitement manuel. En revanche, pour les analyses de pyroséquençage, et plus largement de séquençage haut-débit, ce sont des dizaines de milliers de séquences que nous devons affilier. A cette échelle, l'automatisation du traitement devient nécessaire.

(1) Le logiciel *MEGAN* ou la découverte de l'affiliation automatisée par BLAST

Rappelons-nous maintenant que les premières données que j'ai eu en ma possession avait été obtenues à l'issue de l'expérience pilote que nous avions réalisée chez Genoscreen. Les données avaient été traitées par la société et un formateur était venu nous enseigner l'art de traiter ces données. Nous avons alors appris à nous servir du logiciel *MEGAN* (MEGAN4, MEtaGenome ANalyser).

Comme précisé précédemment, les résultats obtenus avaient déjà été filtrés (élimination des séquences correspondant à une intensité du signal trop faible lors du séquençage, aucun nucléotide incorporé pendant plus de trois flux de bases, plusieurs séquences détectées dans un même puits, séquences inférieures à 50 pb…). Les séquences avaient aussi été triées selon leur échantillon d'origine grâce aux MID présents sur les séquences par l'intermédiaire d'un script *perl*. Nous avions donc pour chaque échantillon, un fichier au format *fasta* contenant une séquence pour chaque *read* (un *read* étant une séquence obtenue dans un puits de la plaque de séquençage), et un fichier qualité (.qual) contenant une valeur de score de qualité pour chaque base de chaque read du fichier *fasta*

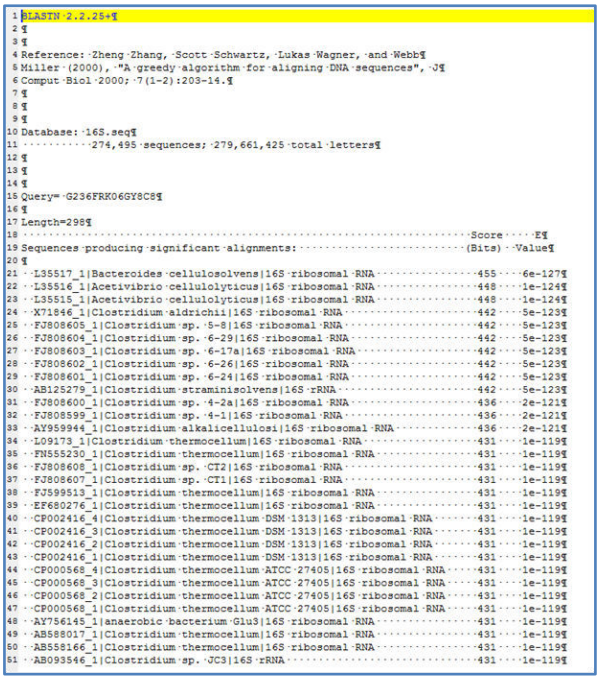
correspondant, ce score indiquant la probabilité qu'une base soit correcte. La société Genoscreen avait également déjà trié les séquences en fonction de ces scores qualités (Altshuler et al., 2000).

Nous sommes donc partis de ces séquences triées et filtrées. Dans le but d'identifier ces séquences inconnues, la première étape était de les comparer à des séquences de référence. Nous avons pour cela utilisé l'algorithme de BLAST (Altschul et al., 1990). BLAST est un algorithme d'alignement local. En simplifiant, il compare notre séquence aux séquences contenues dans les banques en utilisant des suites de 11 nucléotides (paramètre par défaut), ou « mot ». Dès qu'il trouve un mot de 11 lettres strictement identique entre les deux séquences, il étend sa recherche aux 11 lettres voisines. Si elles sont à nouveau identiques, le « score d'alignement » augmente, sinon il diminue. Si le score diminue trop, BLAST arrête la comparaison et passe à une autre séquence (Tagu et al., 2010). Au final, on obtient une liste des séquences de banques ayant obtenu les scores d'alignement les plus élevés, ce qui correspond aux séquences qui ont les séquences nucléotidiques les plus similaires à notre séquence requête. Dans le cadre de cette formation, nous avons travaillé avec BLAST installé en local (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Ftp/), c'est-à-dire sur notre ordinateur. Cela nous permettait de travailler sur toutes nos séquences à la fois (un fichier *fasta* est soumis dans son intégralité et un seul fichier de sortie est obtenu), de travailler sur nos propres banques et de ne pas mettre en ligne toutes nos séquences. La banque de données choisie pour ce projet était la DDBJ (DNA Data Bank of Japan) car elle semblait la plus adaptée pour notre étude, d'après Genoscreen. Deux étapes sont à réaliser en invite de commande (1) formater la banque téléchargée au bon format pour BLAST

```
makeBLASTdb –in banque.fna –out nom_banque –dbtype nucl
```

(2) Lancer le BLAST sur nos séquences requêtes avec la banque formatée

```
BLASTn –query sequences.fna –db nom_banque –out out.txt
```



```
BLASTN 2.2.25+

Reference: Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb
Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J
Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14.

Database: 16S.seq
           274,495 sequences; 279,661,425 total letters

Query= G236FRK06GY8C8

Length=298

                                                                      Score     E
Sequences producing significant alignments:                           (Bits)  Value

 L35517_1|Bacteroides cellulosolvens|16S ribosomal RNA                455    6e-127
 L35516_1|Acetivibrio cellulolyticus|16S ribosomal RNA                448    1e-124
 L35515_1|Acetivibrio cellulolyticus|16S ribosomal RNA                448    1e-124
 X71846_1|Clostridium aldrichii|16S ribosomal RNA                     442    5e-123
 FJ808605_1|Clostridium sp. 5-8|16S ribosomal RNA                     442    5e-123
 FJ808604_1|Clostridium sp. 6-29|16S ribosomal RNA                    442    5e-123
 FJ808603_1|Clostridium sp. 6-17a|16S ribosomal RNA                   442    5e-123
 FJ808602_1|Clostridium sp. 6-26|16S ribosomal RNA                    442    5e-123
 FJ808601_1|Clostridium sp. 6-24|16S ribosomal RNA                    442    5e-123
 AB125279_1|Clostridium straminisolvens|16S rRNA                      442    5e-123
 FJ808600_1|Clostridium sp. 4-2a|16S ribosomal RNA                    436    2e-121
 FJ808599_1|Clostridium sp. 4-1|16S ribosomal RNA                     436    2e-121
 AY959944_1|Clostridium alkalicellulosi|16S ribosomal RNA             436    2e-121
 L09173_1|Clostridium thermocellum|16S ribosomal RNA                  431    1e-119
 FN555230_1|Clostridium thermocellum|16S ribosomal RNA                431    1e-119
 FJ808608_1|Clostridium sp. CT2|16S ribosomal RNA                     431    1e-119
 FJ808607_1|Clostridium sp. CT1|16S ribosomal RNA                     431    1e-119
 FJ599513_1|Clostridium thermocellum|16S ribosomal RNA                431    1e-119
 EF680276_1|Clostridium thermocellum|16S ribosomal RNA                431    1e-119
 CP002416_4|Clostridium thermocellum DSM 1313|16S ribosomal RNA       431    1e-119
 CP002416_3|Clostridium thermocellum DSM 1313|16S ribosomal RNA       431    1e-119
 CP002416_2|Clostridium thermocellum DSM 1313|16S ribosomal RNA       431    1e-119
 CP002416_1|Clostridium thermocellum DSM 1313|16S ribosomal RNA       431    1e-119
 CP000568_4|Clostridium thermocellum ATCC 27405|16S ribosomal RNA     431    1e-119
 CP000568_3|Clostridium thermocellum ATCC 27405|16S ribosomal RNA     431    1e-119
 CP000568_2|Clostridium thermocellum ATCC 27405|16S ribosomal RNA     431    1e-119
 CP000568_1|Clostridium thermocellum ATCC 27405|16S ribosomal RNA     431    1e-119
 AY756145_1|anaerobic bacterium Glu3|16S ribosomal RNA                431    1e-119
 AB588017_1|Clostridium thermocellum|16S ribosomal RNA                431    1e-119
 AB558166_1|Clostridium thermocellum|16S ribosomal RNA                431    1e-119
 AB093546_1|Clostridium sp. JC3|16S rRNA                              431    1e-119
```

Figure 79 : Extrait du fichier de sortie obtenu après un BLAST en local sur les séquences de l'expérience pilote. Ici la séquence « QUERY » est une de nos séquences requête. En dessous, les « hits de BLAST » sont listés avec, à gauche, les numéros d'accession correspondants.

Le fichier de sortie de BLAST ressemble à la fenêtre habituelle obtenue en ligne sur le site du NCBI. Chacune de nos séquences requêtes, ou « *Query* » est présentée, suivie par les séquences de banques les plus similaires trouvées (Figure 79). Dans un même fichier, nous avons donc toutes nos « *Query* » accompagnées de leurs « *hits de BLAST* ».

C'est ce fichier multi-résultats qui peut être importé dans le logiciel *MEGAN*. Le logiciel va assigner une affiliation à notre séquence « *Query* » en considérant les affiliations des hits de BLAST obtenus. Le nombre de hits de BLAST pris en compte pour cette affiliation dépend des scores d'alignement. Il est possible de modifier les paramètres de sélection en fonction du nombre de hits de BLAST que nous voulons prendre en compte. Ensuite, le logiciel *MEGAN* analyse l'affiliation des hits de BLAST pris en compte et définit l'affiliation de notre séquence comme étant le plus proche groupe taxonomique commun à tous ces hits de BLAST (Claesson et al., 2009).

Prenons un exemple. Si les cinq premiers hits de BLAST d'une séquence sont pris en compte et que ces hits de BLAST sont affiliés comme étant (1) *Methanosarcina* (2) *Methanomicrobia* (3) *Methanosarcinaceae* (4) *Methanomicrobia* et (5) *Archaea*, notre séquence sera affiliée au groupe « *Archaea* » puisque c'est le seul groupe commun entre ces cinq affiliations. Avec *MEGAN*, nous obtenons alors ce type d'arbre, qui résume l'affiliation de toutes nos séquences pour un des échantillons archées de l'expérience pilote :

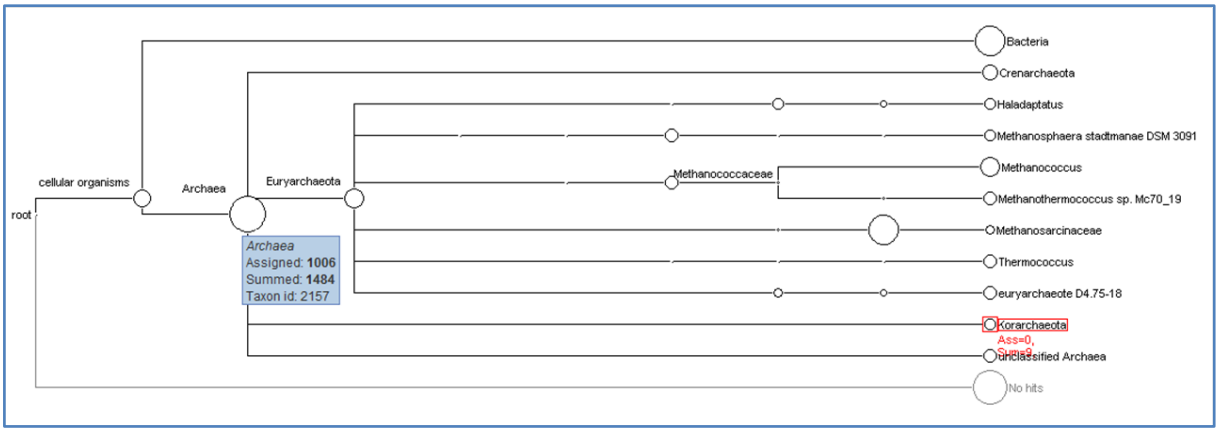


Figure 80 : Exemple d'arbre obtenu avec le logiciel *MEGAN*. Ces résultats correspondent à ceux obtenus pour un des échantillons de l'expérience pilote, pour le séquençage des archées.

Plusieurs problèmes se sont alors présentés. (1) Les taxons que nous nous attendons à trouver dans nos environnements ne sont pas retrouvés (voir les paragraphes sur les groupes microbiens associés aux sédiments marins profonds de l'introduction) et (2) énormément de séquences sont affiliées au groupe « *Archaea* » et il est impossible d'en dire plus. En effet, comme on peut le voir sur la figure précédente (Figure 80) le nombre affiché après « Assigned » correspond au nombre de séquences affiliées au groupe « *Archaea* » et le nombre affiché après « Summed » correspond au nombre de séquences affiliées à des sous-groupes des *Archaea.* Ce qui nous amène, en ne considérant que les séquences affiliées aux archées, à 67,8% de séquences d'archées affiliées aux archées et seulement 32,2% de séquences affiliées un peu plus finement… Pour comprendre l'origine du problème, il faut aller regarder d'un peu plus près comment fonctionne *MEGAN*.

Le logiciel *MEGAN* est basé par défaut sur la taxonomie du NCBI. Les banques de données correspondantes sont les grandes banques de données internationales, la banque américaine Genbank, la banque japonaise DDBJ ou encore la banque européenne EMBL. Lorsqu'une séquence est entrée en banque, elle reçoit un numéro d'identification correspondant à sa classification, c'est le « *Taxonomy ID* » ou ID Taxon. Les groupes taxonomiques définis dans la taxonomie du NCBI ne reflètent pas toujours des groupes phylogénétiques réels, comme la figure 81 de la page suivante le montre. La taxonomie du NCBI est donc codée par des imbrications d'ID Taxon et c'est sur cela que *MEGAN* va s'appuyer pour définir les affiliations correspondantes aux séquences requêtes.

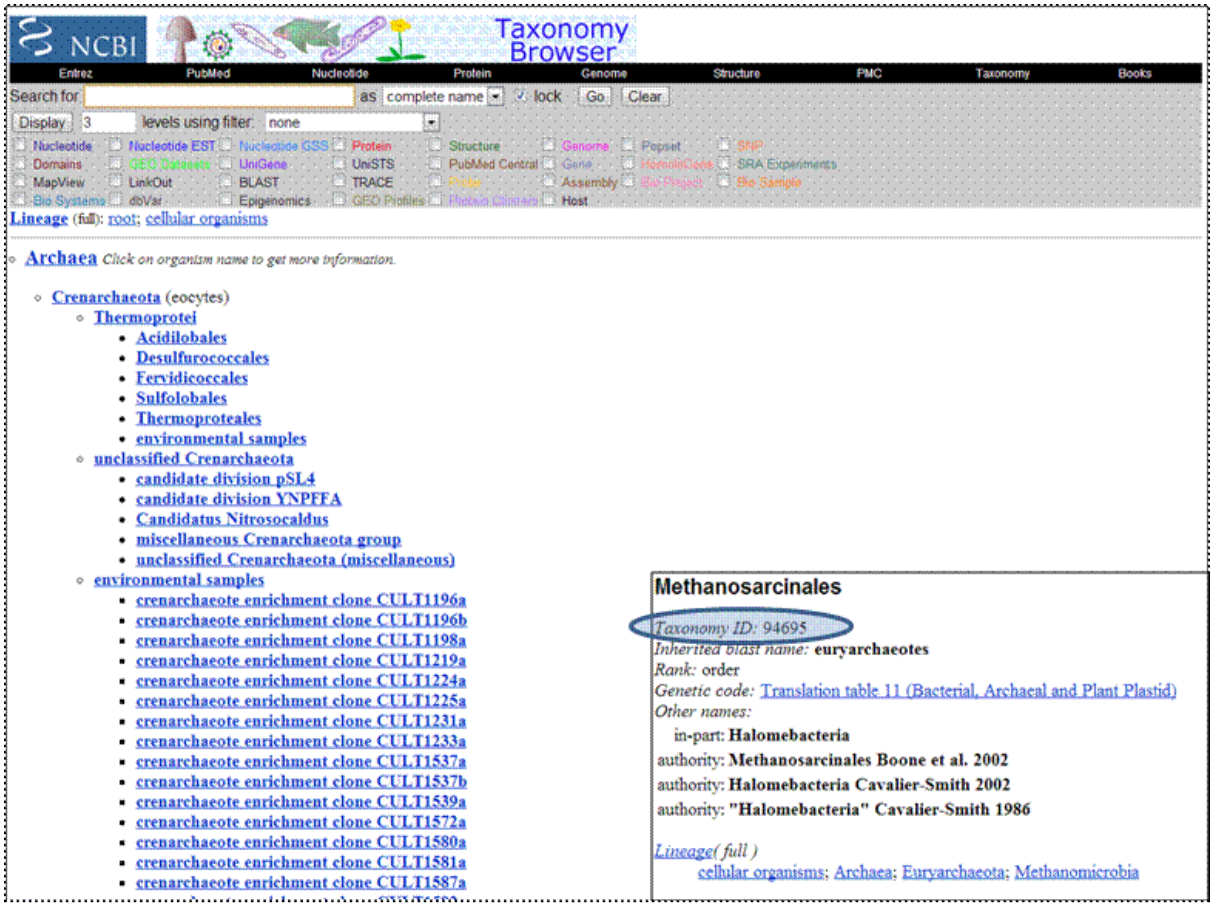


Figure 81 : Classifications et nomenclatures trouvées sur le "*Taxonomy Browser*" du NCBI. Sur ce portail, on peut trouver les « ID Taxon » des différents groupes de microorganismes considérés par le NCBI. Ici, on peut voir que le groupe microbien des *Methanosarcinales* a pour ID Taxon 94695. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy

En effet, en considérant les hits de BLAST pris en compte grâce à des paramètres préalablement définis, le logiciel va remonter la taxonomie de tous ces hits jusqu'à trouver un ID Taxon commun à tous.

Revenons sur le BLAST qui avait été fait manuellement sur le serveur du NCBI (Figure 77). Notre séquence était une séquence affiliée au groupe des ANME-2c. Pourtant tous les hits de BLAST qui étaient obtenus étaient affiliés au groupe « *Uncultured archaeon* » du NCBI (Figure 77 et Figure 82). Dans une telle situation, *MEGAN* ne peut bien entendu pas affilier précisemment notre séquence.

Figure 82 : Classification et ID Taxon donnés aux "*Uncultured archaeon*" sur le portail du NCBI.

Avec ce logiciel, nous avons donc rencontré deux problèmes majeurs. (1) Le problème de la banque à utiliser. Les séquences des banques n'étant pas forcemment correctement ou suffisament renseignées pour réussir à obtenir des résultats satisfaisants. Pour régler ce problème, il suffirait à priori de trouver ou créer une banque dans laquelle les séquences ont des affiliations suffisantes et correctes puis de s'en servir pour réaliser les BLAST. Cependant, il restait un second problème, beaucoup plus embêtant. (2) La taxonomie du NCBI ne correspond pas à la taxonomie couramment utilisée notamment au niveau des sédiments profonds. Certains groupes ne figurent pas dans le registre, comme par exemple les MBG-D ou la division candidate JS-1 qui ne possèdent pas d'ID Taxon spécifiques à ce jour.

Le logiciel *MEGAN* ne semblait donc pas adapté à nos données puisqu'il était paramétré sur la taxonomie du NCBI pour les affiliations taxonomiques. Toujours un peu perdus dans le monde du traitement des données issues des séquençages haut-débit, nous nous sommes rapprochés de la société Genostar, avec qui le laboratoire avait déjà des contacts.

La société Genostar est une société basée à Grenoble qui propose des solutions bioinformatiques à l'usage des biologistes. Après différentes discussions avec eux, ils nous ont conseillés d'utiliser le logiciel KoriBLAST, qui nous avait été également conseillé par Philippe Vandenkoornhuyse de Rennes. En ce qui concerne les banques, ils nous ont conseillés d'utiliser la banque RFAM, banque spécialisée en ARN non-codant, comme l'ARNr 16S (http://www.sanger.ac.uk/resources/databases/rfam.html). Alors qu'ils tentaient d'analyser les données de notre expérience pilote de leur côté, nous avons décidé de créer une banque de données personnalisée, adaptée aux environnements étudiés.

(2) Création d'une banque de données personnalisée

Face aux nombreuses séquences non ou mal affiliées rencontrées dans les banques de données, nous avons décidé de créer notre propre banque à partir des données de la littérature. L'idée était de sélectionner un certain nombre de publications de référence sur les communautés microbiennes des sédiments marins, associées ou non aux suintements froids et aux sources hydrothermales. Dans ces publications, nous récupérions les séquences présentées dans des arbres taxonomiques et leurs affiliations, définies par les auteurs. Après avoir récupéré toutes ces séquences, nous vérifions par des analyses phylogénétiques appropriées, les affiliations données. Si besoin, nous les corrigions.

(1) La première étape fut donc de récupérer des séquences d'ARNr 16S issues de publications de référence dans notre domaine. Il nous fallait d'une part une base de données de séquences *Archaea* et d'autre part une de séquences *Bacteria*. Nous avons traité les deux séparément

pour plus de simplicité. Pour les *Archaea*, nous avons récupéré les séquences provenant de quinze publications (Teske et al., 2002; Dhillon et al., 2005; Biddle et al., 2006; Lloyd et al., 2006; Sorensen and Teske, 2006; Teske, 2006; Teske and Sorensen, 2008; Cambon-Bonavita et al., 2009; Dang et al., 2010; Lloyd et al., 2010; Pachiadaki et al., 2010; Pachiadaki et al., 2011; Biddle et al., 2012; Kubo et al., 2012; Vigneron et al., 2013). Pour les *Bacteria*, nous avons récupéré les séquences provenant de vingt publications (Dojka et al., 1998; Hugenholtz et al., 1998; Teske et al., 2002; Dhillon et al., 2003; Inagaki et al., 2003; Knittel et al., 2003; Rappé and Giovannoni, 2003; Harris et al., 2004; Webster et al., 2004; Lloyd et al., 2006; Webster et al., 2006; Emerson et al., 2007; Cambon-Bonavita et al., 2009; Ettwig et al., 2009; Harrison et al., 2009; Lloyd et al., 2010; Pachiadaki et al., 2010; Schreiber et al., 2010; Vigneron et al., 2014; Durand et al., *in prep*). Le principe était simple, récupérer les arbres, faire la liste des numéros d'accession, récupérer les séquences dans un fichier *fasta* sur le serveur du NCBI. Renommer ensuite chaque séquence avec un numéro d'identification, la publication correspondante et l'affiliation associée dans la publication (Figure 83), tout en conservant dans un fichier Excel tous les renseignements correspondant à chaque séquence (avec le numéro d'accession correspondant).

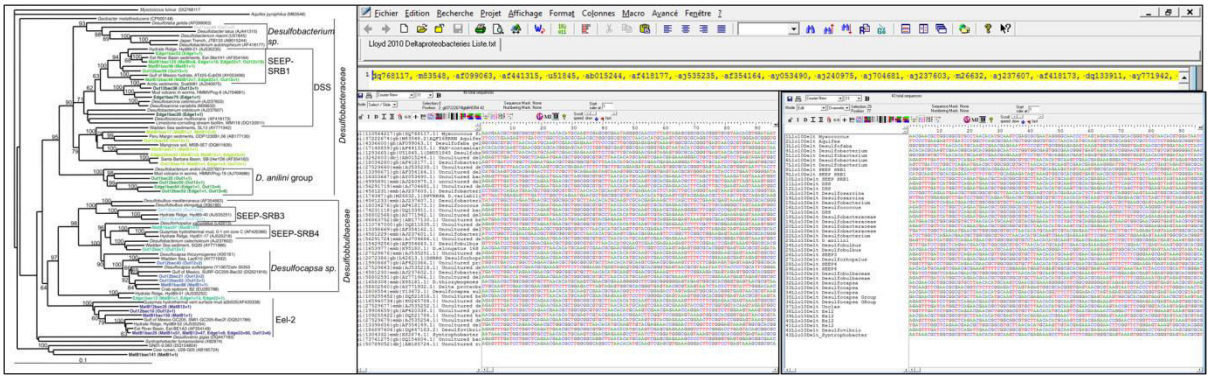


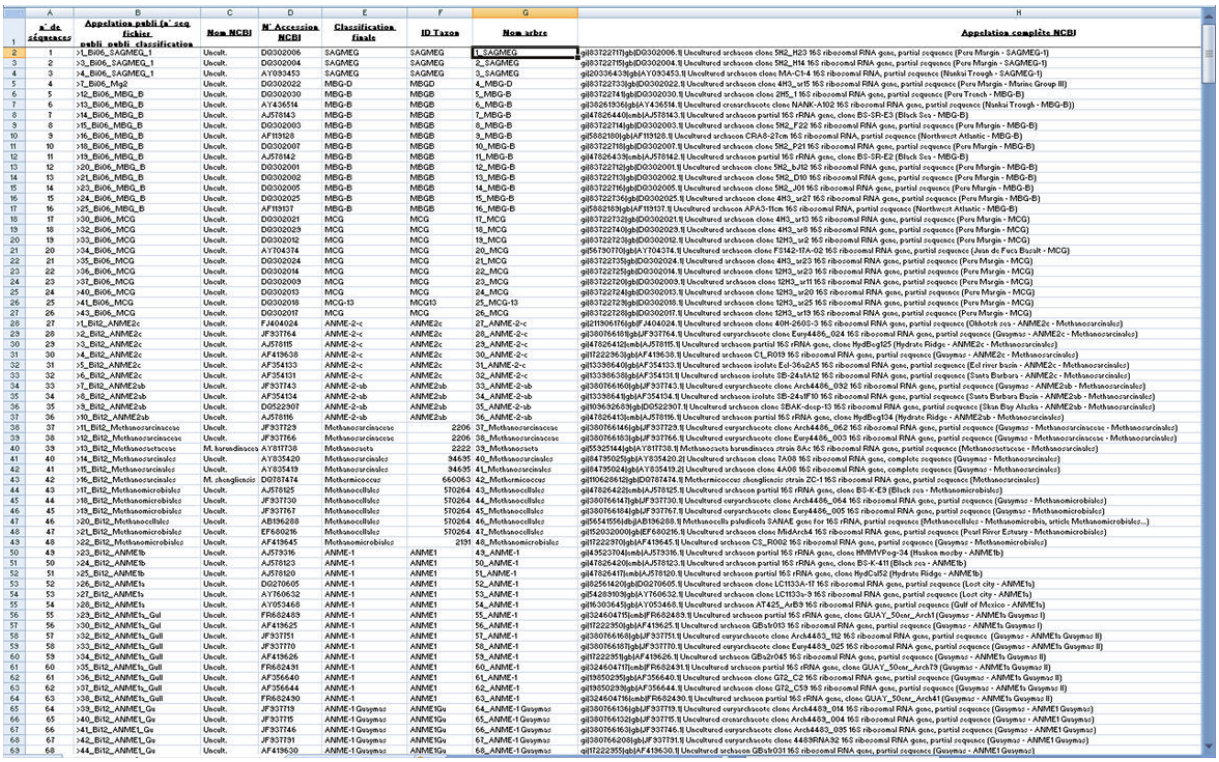
Figure 83 : Extrait du travail effectué sur l'article de Lloyd et al., 2010. A gauche, l'arbre taxonomique disponible dans l'article. En haut à droite, les numéros d'accessions correspondant aux séquences de cet arbre, soumis sur le portail du NCBI. En bas à droite, fichier *fasta* brut, résultat de notre requête sur le portail du NCBI et fichier *fasta* modifié avec les affiliations données dans l'article Lloyd et al., 2010

(2) Une fois toutes les séquences de toutes les publications récupérées, un nouveau fichier *fasta* dans lequel tous les doublons avaient été éliminés a été créé.

(3) Ces séquences ont ensuite été alignées grâce au logiciel MAFFT 6.903 (Katoh et al., 2005).

(4) Les séquences alignées ont permis de construire des arbres phylogénétiques et de vérifier les affiliations proposées dans l'article d'où était issu la séquence. Pour cela, deux méthodes différentes ont été utilisées, une basée sur les matrices de distance (Neighbourg-Joining, correction Kimura 2 Parameter (Kimura, 1980; Saitou and Nei, 1987)) et une méthode de maximum de vraisemblance (RAxML (Stamatakis, 2006)).

A l'issue de ce travail, seuls les groupes retrouvés avec les deux méthodes et supportés par des bootstraps suffisamment significatifs ont été conservés. D'autres séquences de banques ont parfois été ajoutées pour confirmer ou infirmer la validité d'un groupe. Ainsi, nous avons obtenu un fichier *fasta* contenant toutes les séquences numérotées de 1 à n suivi de leur affiliation finale (la base de données), un fichier Excel regroupant toutes les informations sur les séquences (publication d'origine, affiliation d'origine, numéro d'accession, nom sur NCBI…) (Figure 84) et un fichier Excel explicitant les différents groupes et sous-groupes définis (la taxonomie).



n° de séquences	Appelation publi (n° seq fichier publi_publi_classification	Nom NCBI	N° Accession NCBI	Classification finale	ID Taxon	Nom arbre	Appelation complète NCBI
1	>1_Bi06_SAGMEG_1	Uncult.	D0302006	SAGMEG	SAGMEG	1_SAGMEG	gi|837222171|gb|D0302006.1| Uncultured archaeon clone 5H2_H23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Peru Margin - SAGMEG-1)
2	>3_Bi06_SAGMEG_1	Uncult.	D0302004	SAGMEG	SAGMEG	2_SAGMEG	gi|837222115|gb|D0302004.1| Uncultured archaeon clone 5H2_H14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Peru Margin - SAGMEG-1)
3	>4_Bi06_SAGMEG_1	Uncult.	AY093453	SAGMEG	SAGMEG	3_SAGMEG	gi|20033643|gb|AY093453.1| Uncultured archaeon clone MA-C14 16S ribosomal RNA, partial sequence (Nankai Trough - SAGMEG-1)
4	>7_Bi06_Mg2	Uncult.	D0302022	MBG-D	MBGD	4_MBG-D	gi|837222733|gb|D0302022.1| Uncultured archaeon clone 4H3_ar15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Peru Margin - Marine Group III)
5	>12_Bi06_MBG_B	Uncult.	D0302030	MBG-B	MBGB	5_MBG-B	gi|837222741|gb|D0302030.1| Uncultured archaeon clone 2H5_1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Peru Trench - MBG-B)
6	>13_Bi06_MBG_B	Uncult.	AY436514	MBG-B	MBGB	6_MBG-B	gi|38261936|gb|AY436514.1| Uncultured crenarchaeote clone NANK-A102 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Nankai Trough - MBG-B))
7	>14_Bi06_MBG_B	Uncult.	AJ578143	MBG-B	MBGB	7_MBG-B	gi|47826440|emb|AJ578143.1| Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone BS-SR-E3 (Black Sea - MBG-B)
8	>15_Bi06_MBG_B	Uncult.	D0302003	MBG-B	MBGB	8_MBG-B	gi|837222714|gb|D0302003.1| Uncultured archaeon clone 5H2_F22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Peru Margin - MBG-B)
9	>16_Bi06_MBG_B	Uncult.	AF119128	MBG-B	MBGB	9_MBG-B	gi|5082160|gb|AF119128.1| Uncultured archaeon CRA6-27cm 16S ribosomal RNA, partial sequence (Northwest Atlantic - MBG-B)
10	>18_Bi06_MBG_B	Uncult.	D0302007	MBG-B	MBGB	10_MBG-B	gi|837222769|gb|D0302007.1| Uncultured archaeon clone 5H2_P21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Peru Margin - MBG-B)
11	>19_Bi06_MBG_B	Uncult.	AJ578142	MBG-B	MBGB	11_MBG-B	gi|47826433|emb|AJ578142.1| Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone BS-SR-E2 (Black Sea - MBG-B)
12	>20_Bi06_MBG_B	Uncult.	D0302001	MBG-B	MBGB	12_MBG-B	gi|837222712|gb|D0302001.1| Uncultured archaeon clone 5H2_bJ12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Peru Margin - MBG-B)
13	>21_Bi06_MBG_B	Uncult.	D0302002	MBG-B	MBGB	13_MBG-B	gi|837222713|gb|D0302002.1| Uncultured archaeon clone 5H2_D10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Peru Margin - MBG-B)
14	>23_Bi06_MBG_B	Uncult.	D0302005	MBG-B	MBGB	14_MBG-B	gi|837222716|gb|D0302005.1| Uncultured archaeon clone 5H2_J01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Peru Margin - MBG-B)
15	>24_Bi06_MBG_B	Uncult.	D0302025	MBG-B	MBGB	15_MBG-B	gi|837222736|gb|D0302025.1| Uncultured archaeon clone 4H3_ar27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Peru Margin - MBG-B)
16	>25_Bi06_MBG_B	Uncult.	AF119137	MBG-B	MBGB	16_MBG-B	gi|5082163|gb|AF119137.1| Uncultured archaeon APA3-11cm 16S ribosomal RNA, partial sequence (Northwest Atlantic - MBG-B)
17	>30_Bi06_MCG	Uncult.	D0302021	MCG	MCG	17_MCG	gi|837222732|gb|D0302021.1| Uncultured archaeon clone 4H3_ar13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Peru Margin - MCG)
18	>32_Bi06_MCG	Uncult.	D0302023	MCG	MCG	18_MCG	gi|837222740|gb|D0302023.1| Uncultured archaeon clone 4H3_ar6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Peru Margin - MCG)
19	>33_Bi06_MCG	Uncult.	D0302012	MCG	MCG	19_MCG	gi|837222723|gb|D0302012.1| Uncultured archaeon clone 5H3_ar2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Peru Margin - MCG)
20	>34_Bi06_MCG	Uncult.	AY704374	MCG	MCG	20_MCG	gi|56790170|gb|AY704374.1| Uncultured archaeon clone FS142-17A-02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Jean de Fuca Basalt - MCG)
21	>35_Bi06_MCG	Uncult.	D0302024	MCG	MCG	21_MCG	gi|837222735|gb|D0302024.1| Uncultured archaeon clone 4H3_ar23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Peru Margin - MCG)
22	>36_Bi06_MCG	Uncult.	D0302014	MCG	MCG	22_MCG	gi|837222725|gb|D0302014.1| Uncultured archaeon clone 12H3_ar23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Peru Margin - MCG)
23	>37_Bi06_MCG	Uncult.	D0302009	MCG	MCG	23_MCG	gi|837222709|gb|D0302009.1| Uncultured archaeon clone 5H2_ar11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Peru Margin - MCG)
24	>40_Bi06_MCG	Uncult.	D0302013	MCG	MCG	24_MCG	gi|837222724|gb|D0302013.1| Uncultured archaeon clone 12H3_ar20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Peru Margin - MCG)
25	>41_Bi06_MCG	Uncult.	D0302018	MCG-13	MCG13	25_MCG-13	gi|837222729|gb|D0302018.1| Uncultured archaeon clone 12H3_ar25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Peru Margin - MCG)
26	>43_Bi06_MCG	Uncult.	D0302017	MCG	MCG	26_MCG	gi|837222728|gb|D0302017.1| Uncultured archaeon clone 12H3_ar13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Peru Margin - MCG)
27	>1_Bi12_ANME2c	Uncult.	FJ404024	ANME-2-c	ANME2c	27_ANME-2-c	gi|211906176|gb|FJ404024.1| Uncultured archaeon clone 40H-2600-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Okhotsk sea - ANME2c - Methanosarcinales)
28	>2_Bi12_ANME2c	Uncult.	JF337764	ANME-2-c	ANME2c	28_ANME-2-c	gi|380766181|gb|JF337764.1| Uncultured euryarchaeote clone Eury4486_024 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Guaymas - ANME2c - Methanosarcinales)
29	>3_Bi12_ANME2c	Uncult.	AJ578115	ANME-2-c	ANME2c	29_ANME-2-c	gi|47826412|emb|AJ578115.1| Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HydBog125 (Hydrate Ridge - ANME2c - Methanosarcinales)
30	>4_Bi12_ANME2c	Uncult.	AF419638	ANME-2-c	ANME2c	30_ANME-2-c	gi|11222363|gb|AF419638.1| Uncultured archaeon C1_R019 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Guaymas - ANME2c - Methanosarcinales)
31	>5_Bi12_ANME2c	Uncult.	AF354133	ANME-2-c	ANME2c	31_ANME-2-c	gi|33396640|gb|AF354133.1| Uncultured archaeon isolate Eel-36a2A5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Eel river basin - ANME2c - Methanosarcinales)
32	>6_Bi12_ANME2c	Uncult.	AF354131	ANME-2-c	ANME2c	32_ANME-2-c	gi|33396638|gb|AF354131.1| Uncultured archaeon isolate SB-24sM12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Santa Barbara - ANME2c - Methanosarcinales)
33	>7_Bi12_ANME2ab	Uncult.	JF337743	ANME-2-ab	ANME2ab	33_ANME-2-ab	gi|380766146|gb|JF337743.1| Uncultured euryarchaeote clone Arch4486_032 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Guaymas - ANME2ab - Methanosarcinales)
34	>8_Bi12_ANME2ab	Uncult.	AF354134	ANME-2-ab	ANME2ab	34_ANME-2-ab	gi|33396641|gb|AF354134.1| Uncultured archaeon isolate SB-24sW10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Santa Barbara Basin - ANME2ab - Methanosarcinales)
35	>9_Bi12_ANME2ab	Uncult.	D0522907	ANME-2-ab	ANME2ab	35_ANME-2-ab	gi|10636268|gb|D0522907.1| Uncultured archaeon clone SBAK-deep-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Skan Bay Alaska - ANME2ab - Methanosarcinales)
36	>10_Bi12_ANME2ab	Uncult.	AJ578116	ANME-2-ab	ANME2ab	36_ANME-2-ab	gi|47826413|emb|AJ578116.1| Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HydBog134 (Hydrate Ridge - ANME2ab - Methanosarcinales)
37	>11_Bi12_Methanosarcinaceae	Uncult.	JF337729	Methanosarcinaceae	2206	37_Methanosarcinaceae	gi|380766146|gb|JF337729.1| Uncultured euryarchaeote clone Arch4486_062 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Guaymas - Methanosarcinaceae - Methanosarcinales)
38	>12_Bi12_Methanosarcinaceae	Uncult.	JF337766	Methanosarcinaceae	2206	38_Methanosarcinaceae	gi|380766183|gb|JF337766.1| Uncultured euryarchaeote clone Eury4486_003 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Guaymas - Methanosarcinaceae - Methanosarcinales)
39	>13_Bi12_Methanosetsecae	M. barundiascus	AY811738	Methanosets	2222	39_Methanosets	gi|55925144|gb|AY811738.1| Methanosets barundiascus strain 8Ac 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Methanosetsecae - Methanosarcinales)
40	>14_Bi12_Methanosarcinales	Uncult.	AY835420	Methanosarcinales	94635	40_Methanosarcinales	gi|84795025|gb|AY835420.2| Uncultured archaeon clone TA06 16S ribosomal RNA gene, complete sequence (Guaymas - Methanosarcinales)
41	>15_Bi12_Methanosarcinales	Uncult.	AY835419	Methanosarcinales	94635	41_Methanosarcinales	gi|84795024|gb|AY835419.2| Uncultured archaeon clone AA08 16S ribosomal RNA gene, complete sequence (Guaymas - Methanosarcinales)
42	>16_Bi12_Methanosarcinales	M. cheoglenicus	D0787474	Methanococcaceae	660063	42_Methanococcaceae	gi|11062861|gb|D0787474.1| Methermicoccus shengliensis strain ZC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Methanosarcinales)
43	>17_Bi12_Methanomicrobiales	Uncult.	AJ578125	Methanocallales	570264	43_Methanocallales	gi|47826422|emb|AJ578125.1| Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone BS-K-E9 (Black Sea - Methanomicrobiales)
44	>18_Bi12_Methanomicrobiales	Uncult.	JF337730	Methanocallales	570264	44_Methanocallales	gi|380766141|gb|JF337730.1| Uncultured euryarchaeote clone Arch4486_064 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Guaymas - Methanomicrobiales)
45	>19_Bi12_Methanomicrobiales	Uncult.	JF337767	Methanocallales	570264	45_Methanocallales	gi|380766184|gb|JF337767.1| Uncultured euryarchaeote clone Eury4486_005 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Guaymas - Methanomicrobiales)
46	>20_Bi12_Methanocallales	Uncult.	AB196288	Methanocallales	570264	46_Methanocallales	gi|56451556|dbj|AB196288.1| Methanocalli pyludiscalis SANAE gene for 16S rRNA, partial sequence (Methanocallales - Methanomicrobia, article Methanomicrobiales...)
47	>21_Bi12_Methanomicrobiales	Uncult.	EF660216	Methanocallales	570264	47_Methanocallales	gi|152032000|gb|EF660216.1| Uncultured archaeon clone MidArch4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Pearl River Estuary - Methanomicrobiales)
48	>22_Bi12_Methanomicrobiales	Uncult.	AF419645	Methanomicrobiales	2191	48_Methanomicrobiales	gi|11222370|gb|AF419645.1| Uncultured archaeon CS_R002 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Guaymas - Methanomicrobiales)
49	>23_Bi12_ANME1b	Uncult.	AJ578316	ANME-1	ANME1	49_ANME-1	gi|14523704|emb|AJ578316.1| Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HMMVP-ea-34 (Hudson mosby - ANME1b)
50	>24_Bi12_ANME1b	Uncult.	AJ578123	ANME-1	ANME1	50_ANME-1	gi|47826420|emb|AJ578123.1| Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone BS-K-411 (Black sea - ANME1b)
51	>25_Bi12_ANME1b	Uncult.	AJ578120	ANME-1	ANME1	51_ANME-1	gi|47826417|emb|AJ578120.1| Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HydCul52 (Hydrate Ridge - ANME1b)
52	>26_Bi12_ANME1a	Uncult.	DQ270605	ANME-1	ANME1	52_ANME-1	gi|82561420|gb|DQ270605.1| Uncultured archaeon clone LC1133A-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Lost city - ANME1a)
53	>27_Bi12_ANME1a	Uncult.	AY760532	ANME-1	ANME1	53_ANME-1	gi|54269103|gb|AY760532.1| Uncultured archaeon clone LC1133a-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Lost city - ANME1a)
54	>28_Bi12_ANME1a	Uncult.	AY053466	ANME-1	ANME1	54_ANME-1	gi|16300345|gb|AY053466.1| Uncultured archaeon AT425_Arc9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Gulf of Mexico - ANME1a)
55	>29_Bi12_ANME1a_Gul	Uncult.	FR682489	ANME-1	ANME1	55_ANME-1	gi|324604715|emb|FR682489.1| Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone GUAY_50cm_Arch1 (Guaymas - ANME1a Guaymas I)
56	>30_Bi12_ANME1a_Gul	Uncult.	AF419625	ANME-1	ANME1	56_ANME-1	gi|11222350|gb|AF419625.1| Uncultured archaeon GBsr013 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Guaymas - ANME1a Guaymas I)
57	>32_Bi12_ANME1a_Gull	Uncult.	JF337751	ANME-1	ANME1	57_ANME-1	gi|380766146|gb|JF337751.1| Uncultured euryarchaeote clone Arch4483_152 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Guaymas - ANME1a Guaymas II)
58	>33_Bi12_ANME1a_Gull	Uncult.	JF337770	ANME-1	ANME1	58_ANME-1	gi|380766183|gb|JF337770.1| Uncultured euryarchaeote clone Eury4483_025 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Guaymas - ANME1a Guaymas II)
59	>34_Bi12_ANME1a_Gull	Uncult.	AF419626	ANME-1	ANME1	59_ANME-1	gi|11222351|gb|AF419626.1| Uncultured archaeon GBs2r045 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Guaymas - ANME1a Guaymas II)
60	>35_Bi12_ANME1a_Gull	Uncult.	FR682491	ANME-1	ANME1	60_ANME-1	gi|324604711|emb|FR682491.1| Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone GUAY_50cm_Arch79 (Guaymas - ANME1a Guaymas II)
61	>36_Bi12_ANME1a_Gull	Uncult.	AF356440	ANME-1	ANME1	61_ANME-1	gi|19350295|gb|AF356440.1| Uncultured archaeon clone GI72_C2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Guaymas - ANME1a Guaymas II)
62	>37_Bi12_ANME1a_Gull	Uncult.	AF356444	ANME-1	ANME1	62_ANME-1	gi|19350239|gb|AF356444.1| Uncultured archaeon clone GI72_C59 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Guaymas - ANME1a Guaymas II)
63	>38_Bi12_ANME1a_Gull	Uncult.	FR682490	ANME-1	ANME1	63_ANME-1	gi|324604716|emb|FR682490.1| Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone GUAY_50cm_Arch41 (Guaymas - ANME1a Guaymas II)
64	>39_Bi12_ANME1_Gu	Uncult.	JF337719	ANME-1 Guaymas	ANME1Gu	64_ANME-1 Guaymas	gi|380766136|gb|JF337719.1| Uncultured euryarchaeote clone Arch4483_014 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Guaymas - ANME1 Guaymas)
65	>40_Bi12_ANME1_Gu	Uncult.	JF337715	ANME-1 Guaymas	ANME1Gu	65_ANME-1 Guaymas	gi|380766132|gb|JF337715.1| Uncultured crenarchaeote clone Arch4483_004 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Guaymas - ANME1 Guaymas)
66	>41_Bi12_ANME1_Gu	Uncult.	JF337746	ANME-1 Guaymas	ANME1Gu	66_ANME-1 Guaymas	gi|380766163|gb|JF337746.1| Uncultured euryarchaeote clone Arch4483_035 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Guaymas - ANME1 Guaymas)
67	>42_Bi12_ANME1_Gu	Uncult.	JF337731	ANME-1 Guaymas	ANME1Gu	67_ANME-1 Guaymas	gi|380766208|gb|JF337731.1| Uncultured euryarchaeote clone 4483RNA32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Guaymas - ANME1 Guaymas)
68	>44_Bi12_ANME1_Gu	Uncult.	AF419630	ANME-1 Guaymas	ANME1Gu	68_ANME-1 Guaymas	gi|11222355|gb|AF419630.1| Uncultured archaeon GBsr031 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Guaymas - ANME1 Guaymas)

Figure 84 : Extrait du fichier Excel regroupant toutes les séquences retenues pour la banque personnalisée des *Archaea*.

Les banques ainsi créées comportaient 791 séquences uniques pour les *Archaea* et 1684 séquences uniques pour les *Bacteria*.

Ces banques ont été envoyées à la société Genostar qui rencontrait alors de nombreuses séquences non-affiliées avec les banques classiques qu'ils utilisaient sur nos échantillons. Les analyses ont été à nouveau réalisées, avec nos banques personnalisées et notre taxonomie sur le logiciel *KoriBLAST*. Une formation sur l'analyse de nos données avec ce logiciel en utilisant nos banques et notre taxonomie a été réalisée en novembre 2012 à Grenoble.

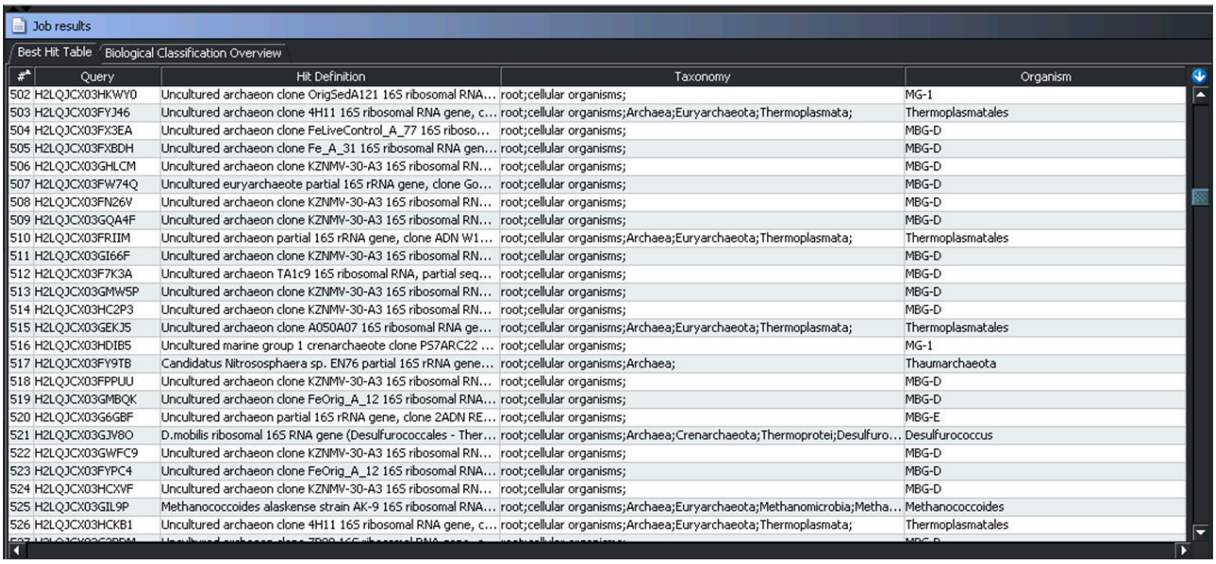
(3) Le logiciel *KoriBLAST* ou l'histoire de la réussite controversée…

Le logiciel *KoriBLAST* fonctionne un peu de la même façon que le logiciel *MEGAN*. Un fichier de séquences est chargé dans le logiciel, le logiciel se sert de l'algorithme de BLAST pour trouver les séquences de banque les plus similaires à nos séquences requêtes. Puis, grâce au système déjà décrit des ID Taxon, le logiciel attribue une affiliation à nos séquences. Pour cela, il est possible de lui fournir une base de données spécifique et de modifier la taxonomie sur laquelle il se base (classiquement, la taxonomie du NCBI). C'est grâce à ces propriétés que nous avons pu obtenir, pour la première fois, des affiliations qui semblaient potentiellement correctes, en partenariat avec Genostar.

Le travail de Genostar a été de modifier la taxonomie du NCBI en y ajoutant des ID Taxon pour les groupes microbiens que nous avions défini lors de la création de nos banques. Ainsi, en blastant nos séquences requêtes sur nos banques, nous pouvions obtenir des affiliations informatives et fines, correspondantes à nos séquences et permettant ensuite d'inférer des hypothèses sur nos échantillons.

Regardons maintenant d'un peu plus près comment tout cela fonctionne (les images présentées ci-dessous correspondent au logiciel *ngKlast*, nouvelle version du logiciel *KoriBLAST,* mais le principe est le même).

Le logiciel compare donc nos séquences avec la base de données. Un tableau, facilement exportable sous excel, est obtenu, avec le numéro de notre séquence (« Query »), sa description donnée dans la banque (« Hit Definition »), l'affiliation donnée à la séquence (« Organism ») et la taxonomie du groupe concerné (« Taxonomy ») (Figure 85).

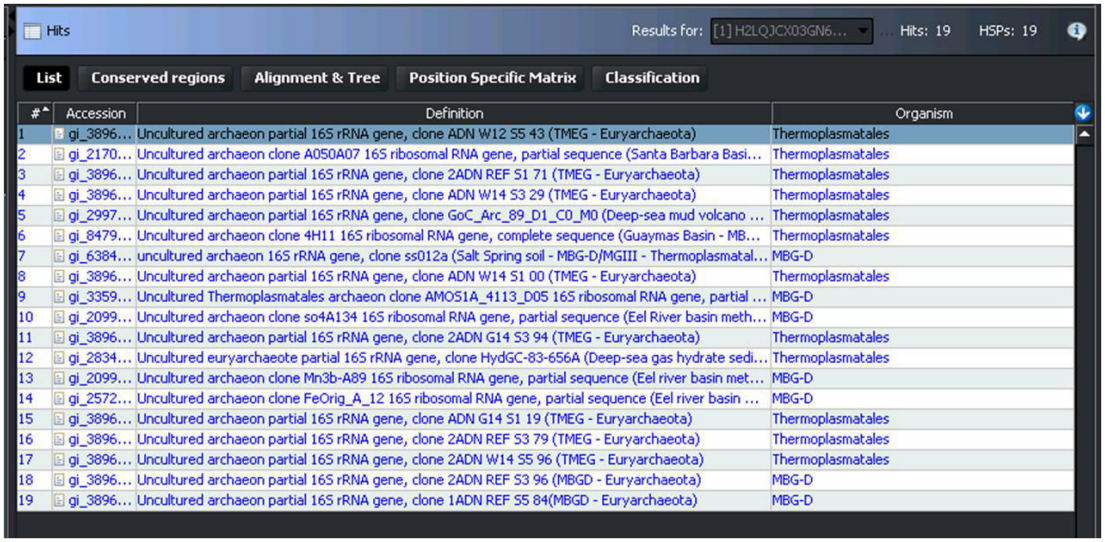

Job results

Best Hit Table | Biological Classification Overview

#	Query	Hit Definition	Taxonomy	Organism
502	H2LQJCX03HKWY0	Uncultured archaeon clone OrigSedA121 16S ribosomal RNA...	root;cellular organisms;	MG-1
503	H2LQJCX03FYJ46	Uncultured archaeon clone 4H11 16S ribosomal RNA gene, c...	root;cellular organisms;Archaea;Euryarchaeota;Thermoplasmata;	Thermoplasmatales
504	H2LQJCX03FX3EA	Uncultured archaeon clone FeLiveControl_A_77 16S riboso...	root;cellular organisms;	MBG-D
505	H2LQJCX03FXBDH	Uncultured archaeon clone Fe_A_31 16S ribosomal RNA gen...	root;cellular organisms;	MBG-D
506	H2LQJCX03GHLCM	Uncultured archaeon clone KZNMV-30-A3 16S ribosomal RN...	root;cellular organisms;	MBG-D
507	H2LQJCX03FW74Q	Uncultured euryarchaeote partial 16S rRNA gene, clone Go...	root;cellular organisms;	MBG-D
508	H2LQJCX03FN26V	Uncultured archaeon clone KZNMV-30-A3 16S ribosomal RN...	root;cellular organisms;	MBG-D
509	H2LQJCX03GQA4F	Uncultured archaeon clone KZNMV-30-A3 16S ribosomal RN...	root;cellular organisms;	MBG-D
510	H2LQJCX03FRIIM	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ADN W1...	root;cellular organisms;Archaea;Euryarchaeota;Thermoplasmata;	Thermoplasmatales
511	H2LQJCX03GI66F	Uncultured archaeon clone KZNMV-30-A3 16S ribosomal RN...	root;cellular organisms;	MBG-D
512	H2LQJCX03F7K3A	Uncultured archaeon TA1c9 16S ribosomal RNA, partial seq...	root;cellular organisms;	MBG-D
513	H2LQJCX03GMW5P	Uncultured archaeon clone KZNMV-30-A3 16S ribosomal RN...	root;cellular organisms;	MBG-D
514	H2LQJCX03HC2P3	Uncultured archaeon clone KZNMV-30-A3 16S ribosomal RN...	root;cellular organisms;	MBG-D
515	H2LQJCX03GEKJ5	Uncultured archaeon clone A050A07 16S ribosomal RNA ge...	root;cellular organisms;Archaea;Euryarchaeota;Thermoplasmata;	Thermoplasmatales
516	H2LQJCX03HDIB5	Uncultured marine group 1 crenarchaeote clone P57ARC22 ...	root;cellular organisms;	MG-1
517	H2LQJCX03FY9TB	Candidatus Nitrososphaera sp. EN76 partial 16S rRNA gene...	root;cellular organisms;Archaea;	Thaumarchaeota
518	H2LQJCX03FPPUU	Uncultured archaeon clone KZNMV-30-A3 16S ribosomal RN...	root;cellular organisms;	MBG-D
519	H2LQJCX03GMBQK	Uncultured archaeon clone FeOrig_A_12 16S ribosomal RNA...	root;cellular organisms;	MBG-D
520	H2LQJCX03G6GBF	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone 2ADN RE...	root;cellular organisms;	MBG-E
521	H2LQJCX03GJV8O	D.mobilis ribosomal 16S RNA gene (Desulfurococcales - Ther...	root;cellular organisms;Archaea;Crenarchaeota;Thermoprotei;Desulfuro...	Desulfurococcus
522	H2LQJCX03GWFC9	Uncultured archaeon clone KZNMV-30-A3 16S ribosomal RN...	root;cellular organisms;	MBG-D
523	H2LQJCX03FYPC4	Uncultured archaeon clone FeOrig_A_12 16S ribosomal RNA...	root;cellular organisms;	MBG-D
524	H2LQJCX03HCXVF	Uncultured archaeon clone KZNMV-30-A3 16S ribosomal RN...	root;cellular organisms;	MBG-D
525	H2LQJCX03GIL9P	Methanococcoides alaskense strain AK-9 16S ribosomal RNA...	root;cellular organisms;Archaea;Euryarchaeota;Methanomicrobia;Metha...	Methanococcoides
526	H2LQJCX03HCKB1	Uncultured archaeon clone 4H11 16S ribosomal RNA gene, c...	root;cellular organisms;Archaea;Euryarchaeota;Thermoplasmata;	Thermoplasmatales

Figure 85 : Extrait des résultats obtenus pour un des échantillons de l'expérience pilote après analyse avec le logiciel *ngKlast* en utilisant la base de données créée et la taxonomie modifiée.

A la différence du logiciel *MEGAN*, le logiciel *KoriBLAST* ne prend pas en compte plusieurs hits de BLAST pour donner l'affiliation de la séquence mais uniquement le premier. Ce que nous pouvons voir ici est donc l'affiliation de la séquence de banque la plus similaire à notre séquence requête. C'est ce que nous obtiendrons lorsque les données seront exportées au format Excel. Pour pouvoir connaître les hits de BLAST suivants, il faut cliquer sur la séquence correspondante. On peut alors découvrir ce genre de choses…


Hits — Results for: [1] H2LQJCX03GN6... — Hits: 19 — HSPs: 19

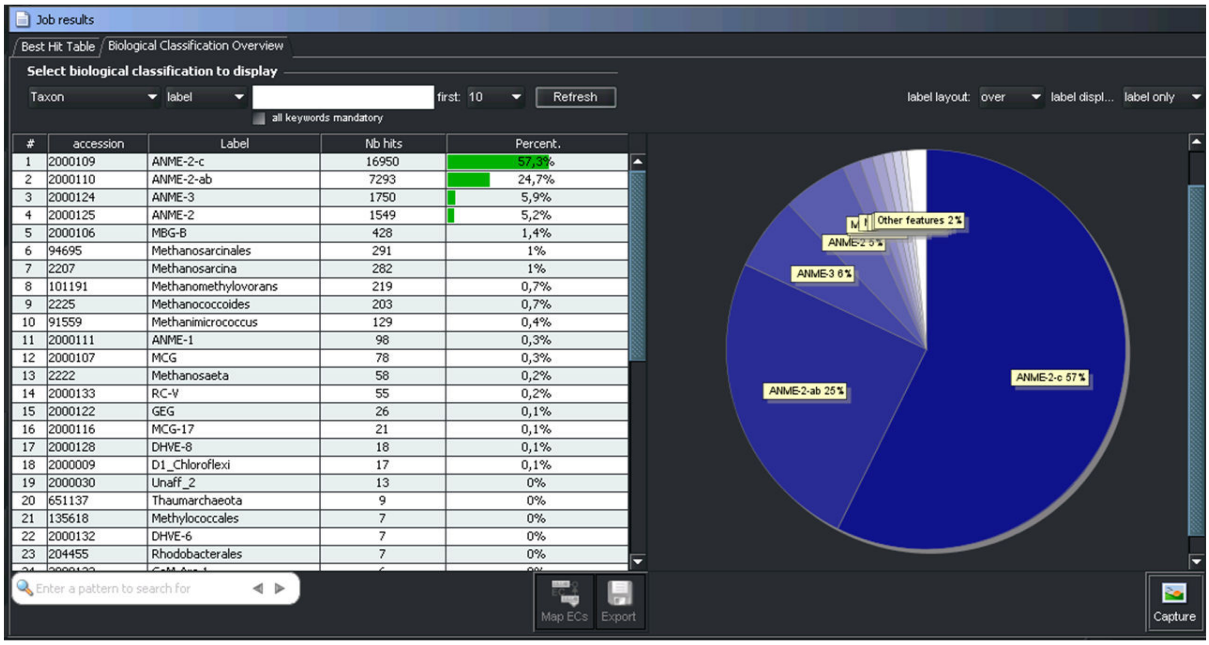
List | Conserved regions | Alignment & Tree | Position Specific Matrix | Classification

#	Accession	Definition	Organism
1	gi_3896...	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ADN W12 S5 43 (TMEG - Euryarchaeota)	Thermoplasmatales
2	gi_2170...	Uncultured archaeon clone A050A07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Santa Barbara Basi...	Thermoplasmatales
3	gi_3896...	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone 2ADN REF S1 71 (TMEG - Euryarchaeota)	Thermoplasmatales
4	gi_3896...	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ADN W14 S3 29 (TMEG - Euryarchaeota)	Thermoplasmatales
5	gi_2997...	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone GoC_Arc_89_D1_C0_M0 (Deep-sea mud volcano ...	Thermoplasmatales
6	gi_8479...	Uncultured archaeon clone 4H11 16S ribosomal RNA gene, complete sequence (Guaymas Basin - MB...	Thermoplasmatales
7	gi_6384...	uncultured archaeon 16S rRNA gene, clone ss012a (Salt Spring soil - MBG-D/MGIII - Thermoplasmatal...	MBG-D
8	gi_3896...	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ADN W14 S1 00 (TMEG - Euryarchaeota)	Thermoplasmatales
9	gi_3359...	Uncultured Thermoplasmatales archaeon clone AMOS1A_4113_D05 16S ribosomal RNA gene, partial ...	MBG-D
10	gi_2099...	Uncultured archaeon clone so4A134 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Eel River basin meth...	MBG-D
11	gi_3896...	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone 2ADN G14 S3 94 (TMEG - Euryarchaeota)	Thermoplasmatales
12	gi_2834...	Uncultured euryarchaeote partial 16S rRNA gene, clone HydGC-83-656A (Deep-sea gas hydrate sedi...	Thermoplasmatales
13	gi_2099...	Uncultured archaeon clone Mn3b-A89 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Eel river basin met...	MBG-D
14	gi_2572...	Uncultured archaeon clone FeOrig_A_12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Eel river basin ...	MBG-D
15	gi_3896...	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ADN G14 S1 19 (TMEG - Euryarchaeota)	Thermoplasmatales
16	gi_3896...	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone 2ADN REF S3 79 (TMEG - Euryarchaeota)	Thermoplasmatales
17	gi_3896...	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone 2ADN W14 S5 96 (TMEG - Euryarchaeota)	Thermoplasmatales
18	gi_3896...	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone 2ADN REF S3 96 (MBGD - Euryarchaeota)	MBG-D
19	gi_3896...	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone 1ADN REF S5 84(MBGD - Euryarchaeota)	MBG-D

Figure 86 : 19 premiers hits de BLAST obtenus pour une séquence requête affiliée aux *Thermoplasmatales* par *ngKlast*. Analyse réalisée en utilisant la base de données créée et la taxonomie modifiée

Ici, l'affiliation de notre séquence requête sera « *Thermoplasmatales* », puisque c'est le 1er hit de BLAST. Pourtant, le 7ème hit de BLAST donne une affiliation différente, « *MBG-D* ». Dans le logiciel *MEGAN,* l'affiliation donnée à la séquence requête était une affiliation consensus entre les 1er hits de BLAST trouvés, tandis qu'ici, l'affiliation ne dépend que du 1er hit de BLAST même si celle-ci est différente de toutes les autres. Dans l'exemple ci-dessus, *MEGAN* aurait donné le même résultat puisque les *MBG-D* sont un sous-groupe des *Thermoplasmatales* (Lloyd et al., 2013). Cependant, le cas contraire pourrait très bien arriver. Après plusieurs vérifications, ce genre de situation ne semblait exister que si la séquence requête était trop courte pour obtenir une affiliation correcte. Une simple filtration des séquences sur leur longueur ou sur la longueur de l'alignement avec les séquences de banque semblait suffire pour régler le problème. Cependant, tous les résultats ne pouvant pas être vérifiés à la main, cette constatation restait dérangeante.

Il faut aussi noter qu'avec le logiciel *KoriBLAST*, il est possible d'obtenir une représentation graphique en camembert présentant les différentes affiliations données à nos séquences. Pour obtenir cette représentation graphique, le logiciel peut prendre en compte les 5, les 10 ou les 20 premiers hits de BLAST (Figure 87).



#	accession	Label	Nb hits	Percent.
1	2000109	ANME-2-c	16950	57,3%
2	2000110	ANME-2-ab	7293	24,7%
3	2000124	ANME-3	1750	5,9%
4	2000125	ANME-2	1549	5,2%
5	2000106	MBG-B	428	1,4%
6	94695	Methanosarcinales	291	1%
7	2207	Methanosarcina	282	1%
8	101191	Methanomethylovorans	219	0,7%
9	2225	Methanococcoides	203	0,7%
10	91559	Methanimicrococcus	129	0,4%
11	2000111	ANME-1	98	0,3%
12	2000107	MCG	78	0,3%
13	2222	Methanosaeta	58	0,2%
14	2000133	RC-V	55	0,2%
15	2000122	GEG	26	0,1%
16	2000116	MCG-17	21	0,1%
17	2000128	DHVE-8	18	0,1%
18	2000009	D1_Chloroflexi	17	0,1%
19	2000030	Unaff_2	13	0%
20	651137	Thaumarchaeota	9	0%
21	135618	Methylococcales	7	0%
22	2000132	DHVE-6	7	0%
23	204455	Rhodobacterales	7	0%

Figure 87 : Exemple de représentation en camembert obtenue avec le logiciel *ngKlast* pour un des échantillons de l'expérience pilote en utilisant la base de données créée et la taxonomie modifiée. Ici, *ngKlast* a pris en considération les 10 premiers hits de BLAST pour produire ce camembert.

Il faut bien noter cependant que ce ne sont pas des consensus comme pour *MEGAN* mais bien que tous les hits de BLAST sont comptés comme un résultat à part entière. Si nous prenons comme exemple les résultats obtenus pour notre séquence affiliée aux « *Thermoplamatales* » (Figure 86), *KoriBLAST* comptera pour son camembert (si nous choisissons de prendre en compte les 10 premiers hits de BLAST) qu'il y a trois « *MBG-D* » et sept « Thermoplasmatales » dans notre échantillon, ce qui n'est pas exactement ce que nous cherchons.

Pour résumer, l'utilisation du logiciel *KoriBLAST* présente donc aussi quelques problèmes pour l'analyse de nos séquences. (1) L'affiliation des séquences ne se fait que sur le premier hit de BLAST, ce qui peut nous donner des résultats biaisés. (2) Les banques que nous utilisons sont des banques très restreintes et leur utilisation sous-tend quelque part de connaître préalablement la diversité microbienne sans l'avoir analysée, puisque nous avons choisi les groupes microbiens mis

dans ces banques. Ces banques limitées peuvent donc aussi fausser les résultats. (3) Enfin, la taxonomie mise en place par Genostar ne prenait pas en compte les imbrications taxonomiques groupes et sous-groupes puisque tous les nouveaux ID Taxon définis étaient imbriqués à la racine de la taxonomie (« *root ;cellular organisms* » comme on peut le voir sur la figure ci-dessus). Par exemple, les *MBG-D* ont, dans notre cas, la phylogénie « *root ;cellular organisms ;MBG-D* » alors que la réalité est la suivante (jusqu'à aujourd'hui en tous cas) « *root ; cellular organisms ; Archaea ; Euryarchaota ; Thermoplasmata ; Thermoplasmatales ;MBG-D* » (Lloyd et al., 2013).

Cette technique ne paraissait donc pas satisfaisante non plus pour l'analyse de nos résultats. Cependant, grâce à toutes ces approches, nous commencions à comprendre pas mal de choses sur l'automatisation des traitements de séquences. Tout cela nous permettait d'aller un peu plus loin et de prendre un peu plus d'indépendance….

(4) Les systèmes automatisés d'affiliation des séquences

Comme nous l'avons vu plus haut, l'énorme quantité de données obtenue à l'issue de séquençages haut-débit rend le traitement manuel impossible. Nous ne pouvons plus affilier nos séquences simplement en sélectionnant quelques séquences de banques issues d'un BLAST et faire un arbre pour vérifier, contrôler. Il faut avoir recours, et donc faire confiance, à des systèmes automatiques d'affiliation. Jusqu'à maintenant, nous n'avons vu que le « système BLAST » pour affilier nos séquences. Cependant, d'autres systèmes peuvent être utilisés.

Le « système BLAST » est un algorithme d'alignement local (Tagu et al., 2010). En simplifiant, il va aligner notre séquence requête sur les séquences d'une banque et va tirer de cela un « *score d'alignement* ». La liste des séquences de la banque ayant obtenu les meilleurs scores d'alignement sera ainsi obtenu, c'est-à-dire une liste des séquences de la banque les plus similaires à notre séquence requête. Le score d'alignement n'est pas uniquement un calcul identique/différent base à base. En effet, il existe des « types » de différences variés, et des pénalités différentes vont être imputées au score d'alignement selon ces « types ». Par exemple, la présence d'un « gap », c'est-à-dire une ou plusieurs bases manquantes dans la séquence nucléotidique ne pèsera pas le même poids qu'une transition (remplacement d'une base purique par une autre base purique ou d'une base pyrimidique par une autre base pyrimidique) ou encore qu'une transversion (remplacement d'une base pyrimidique par une base purique et inversement). Les résultats peuvent être modulés en modifiant les paramètres de comparaison entre séquences (Tagu et al., 2010). Après cela, lorsqu'on obtient les séquences de banque les plus similaires à nos séquences requêtes, l'affiliation de notre séquence requête peut être définie soit par consensus entre les premiers hits de BLAST (c'est le cas de *MEGAN*), soit en ne prenant en compte que le premier hit de BLAST (c'est le cas de *KoriBLAST*).

Une autre possibilité pour affilier nos séquences est la méthode utilisée par *RDP Classifier* (Wang et al., 2007). Cette méthode est une méthode basée sur des probabilités (Tagu et al., 2010). Elle va fonctionner en deux temps. (1) Elle va tout d'abord travailler uniquement sur la banque. Les séquences vont être regroupées en fonction des groupes taxonomiques auxquels elles appartiennent puis, des probabilités d'enchaînements de bases sur les séquences spécifiques de chaque groupe vont être définies. Par analogie, il est beaucoup plus probable d'avoir un « h » après un « t » dans la langue anglaise que dans la langue française. Nous pouvons ainsi reconnaître la langue dans laquelle est écrite un texte en ne prenant en considération que la probabilité d'enchaînement des lettres. C'est le principe des chaînes de Markov (Tagu et al., 2010). (2) Au regard de l'enchaînement des bases dans une séquence inconnue, il va ensuite être possible d'affilier cette séquence à un groupe taxonomique. C'est cette méthode qui est utilisée par défaut dans les pipelines tels que *Mothur* ou *QIIME*.

Enfin, une autre possibilité est d'utiliser directement la phylogénie. Cette méthode utilise des outils phylogénétiques pour replacer nos séquences requêtes dans des arbres phylogénétiques à structure fixe. Ces arbres phylogénétiques sont à la base calculés classiquement par des méthodes de phylogénie (matrice de distances, maximum de vraisemblance) à partir de base de données puis, des algorithmes de placement vont, sans recalculer l'arbre entier, placer nos séquences dans cet arbre. Cette méthode est par exemple utilisée dans *ARB* (http://www.arb-home.de/).

Poursuivant ainsi mon chemin dans les analyses de données de pyroséquençage, je me suis finalement décidée à tester les pipelines d'analyses comme *QIIME* et *Mothur* que l'on trouve en accès libre sur internet.

(5) *QIIME* et *Mothur* ou la découverte de l'indépendance…

Au commencement, j'étais d'abord très méfiante… des tutoriels qui expliquent pas à pas tout ce qu'il faut faire de la sortie du séquenceur jusqu'à la réalisation de magnifiques graphiques…des lignes de commandes toutes plus incompréhensibles les unes que les autres…des filtres qui retirent de notre jeu de séquences celles qui nous dérangent… Bref, une sorte de boîte noire peu propice à la prise de recul nécessaire à ce type d'étude. Après une prise en main somme toute très rapide, je fus finalement conquise par l'indépendance que ces très chères petites lignes de commande voulaient bien m'offrir. Tant de choses à tester, à essayer, à comprendre ne pouvaient être laissées de côté…

Je ne vais pas décrire ici toutes les lignes de commandes de *QIIME* et de *Mothur*, de nombreux tutoriels et aides très bien faits sont disponibles pour cela, à foison sur internet. Je voudrais juste ici soulever quelques points intéressants et notamement sur celui qui aura gagné ma préférence, c'est-à-dire *Mothur*.

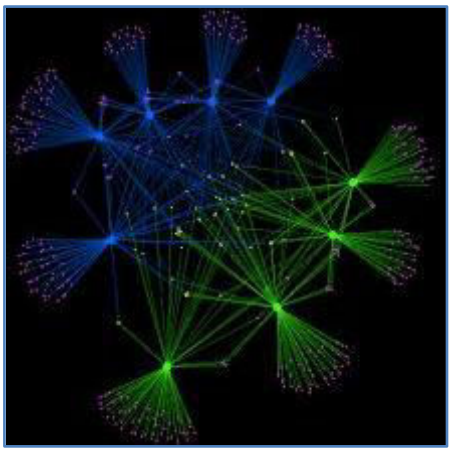


Figure 88 : Réseau représentant les OTUs trouvées dans une étude d'écologie microbienne. (QIIME – Making Cytoscape Network)

Gardons donc le meilleur pour la fin et commençons par *QIIME* (http://*QIIME*.org/). *QIIME* a une qualité essentielle selon moi, il produit de magnifiques graphiques toujours très impressionnants pour mettre sur les diapositives d'une présentation (Figure 88). Cependant, avant d'obtenir ce genre de choses, il faut déjà réussir à l'installer. N'étant pas informaticienne et n'ayant pas de plateforme linux, ce fût tout d'abord assez compliqué. La première chose que j'ai dû faire fut donc d'installer une « *VirtualBox* » sur mon ordinateur, qui offre la possibilité de travailler sous linux sans partitionner complètement l'ordinateur. Il a ensuite fallu installer et compiler tout ce qui était nécessaire au bon fonctionnement de *QIIME*. Mais *QIIME* n'est pas très communicatif et nous avons eu beaucoup de mal à nous comprendre à nos débuts…. Une fois installé, nous pouvons enfin commencer à suivre les pipelines *tout faits* pour une première prise en main rapide (454 Overview Tutorial : http://*QIIME*.org/tutorials/tutorial.html). Il nous reste de nombreuses embûches à contourner mais nous arrivons finalement à aller jusqu'à la fin de ce premier tutoriel (et à obtenir des représentations graphiques impressionantes), qui ne comporte au final que trois ou quatre lignes de commandes. Ce genre de pipeline est très intéressant car il permet de traiter les fichiers directement en sortie de séquenceur (les « *.sff* »). La première étape consiste en l'extraction des fichiers *fasta*, *qualité* et *flow* à partir de ces fichiers *sff*. Ensuite, toute une partie permet de filtrer les séquences utilisées pour l'analyse. Il est ainsi possible de retirer du pool de séquences initial, les

séquences très courtes, celles comportant de trop longs homopolymères (problématiques, comme nous l'avons vu, en pyroséquençage), les chimères ou d'éventuels contaminants. Après cela, il est possible de clusteriser les séquences, c'est-à-dire de regrouper les séquences en fonction de leur degré de similarité. Il est ensuite possible d'affilier ces groupes de séquences à des groupes taxonomiques et de représenter les résultats grâce à différents types de représentations graphiques. L'intérêt est aussi d'aller voir un peu plus loin pour détailler chaque étape et modifier un peu tous les paramètres pour vraiment comprendre ce que nous sommes en train de faire (http://*QIIME*.org/tutorials/index.html). Nous pouvons alors découvrir la grande flexibilité de l'outil. En fouillant un peu dans les possibilités offertes par *QIIME* et étant donné mes antécédents dans le domaine de l'analyse des séquences, je me suis bien entendu précipitée vers le tutoriel intitulé « Re-training the RDP Classifier » (http://*QIIME*.org/tutorials/retraining_rdp.html). J'ai alors soudain réalisé que devant mes yeux se dressait la possibilité de paramétrer le *Classifier* avec n'importe quelle banque de données et n'importe quelle taxonomie si je parvenais à les mettre au bon format. Il ne s'agissait plus alors que de comprendre la mise en forme des fichiers utilisés classiquement, mis à disposition sur le site de *QIIME*. Le *Classifier*, dont le fonctionnement a été brièvement décrit plus haut, est en général le mode d'affiliation par défaut de ces pipelines. *QIIME* requiert deux fichiers différents pour l'étape de classification. Un fichier de taxonomie et un fichier *fasta* comportant les séquences de banque (Figure 89).

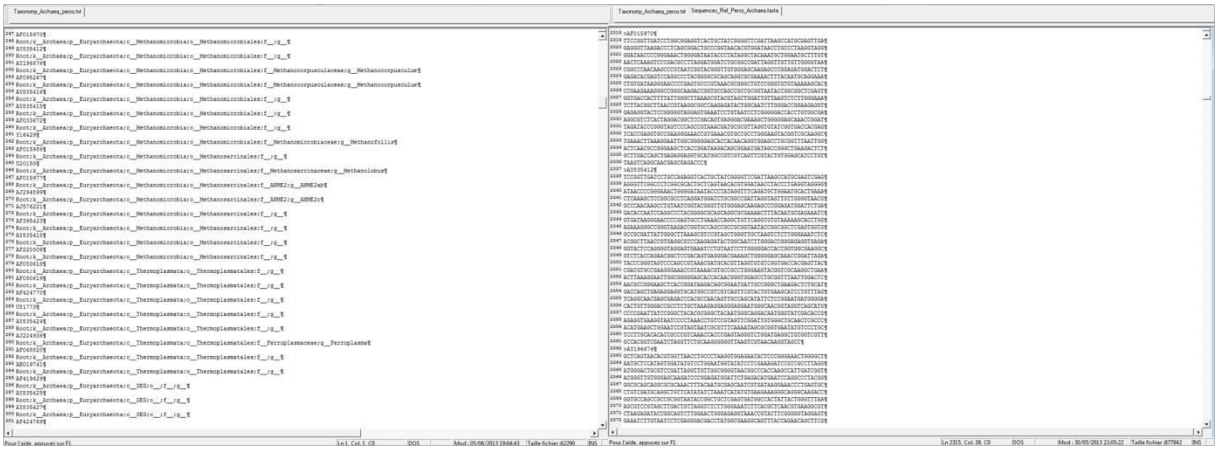


Figure 89 : Extrait des deux fichiers nécessaires à l'étape de classification pour *QIIME*. A gauche, le fichier taxonomie avec un identifiant (ex : AY196676) et une classification (ex : *Methanocorpusculus*) par séquence de banque. A droite, le fichier *fasta* donnant les séquences de nucléotides correspondant à tous les identifiants du fichier taxonomie.

Il suffit donc de fournir à *QIIME* ces deux fichiers, qui peuvent provenir de n'importe quelle banque, tant que la mise en forme est reconnue. Nous avons donc pu utiliser ce pipeline pour traiter nos séquences avec notre propre banque et notre propre taxonomie, que ce soit en BLAST ou en Classifier.

Dans le cas de *Mothur*, le principe est le même. C'est une compilation d'algorithmes qui vont nous permettre de traiter nos données de la sortie du séquenceur jusqu'aux analyses statistiques de bases (http://www.*Mothur*.org/). Je trouve, pour ma part, que *Mothur* est plus simple et plus agréable à l'utilisation que *QIIME*. Installé directement sous Mac OS, il n'y a pas eu besoin de *VirtualBox* et le traitement était plus rapide. Les fichiers d'installation pré-compilés disponibles en ligne sont complets et directement utilisables. Par conséquent, aucune difficulté n'entrave l'installation et la prise en main est beaucoup plus rapide. Le tutoriel classique d'analyse des données de pyroséquençage (http://www.*Mothur*.org/wiki/454_SOP) est beaucoup plus long et détaillé que celui de *QIIME* ce qui permet de mieux comprendre son fonctionnement de base et d'avancer plus vite par la suite. Un des avantages, à mon goût, est aussi que *Mothur* est beaucoup plus communicatif que

QIIME. Je veux dire par là que si *Mothur* affiche sur l'invite de commande l'état d'avancement tout au long du traitement, *QIIME* n'affiche, la plupart du temps, rien. Cela permet de ne pas rester de longues heures devant un écran immobile en se demandant si l'ordinateur réfléchit ou s'il a planté… C'est entre autres pour ces raisons que *Mothur* a été choisi pour traiter nos données. Les principaux points d'avancement de l'analyse des données sont exposés et expliqués brièvement ci-dessous.

A la sortie du séquenceur, nous avons accès au fichier sff. La première étape des pipelines de traitement de données de pyroséquençage *sffinfo()* consiste à extraire de ce fichier (un fichier sff par régions délimitées sur une plaque de pyroséquençage) : un fichier *fasta*, contenant les séquences déduites à partir des flowgrams (c'est-à-dire le résultat des analyses d'images prises par la caméra CCD du pyroséquenceur), un fichier indiquant la qualité de chacune des bases des séquences (.qual) et un fichier indiquant les flowgrams par séquences (.flow), c'est-à-dire l'étape précédant l'obtention des séquences *fasta*.

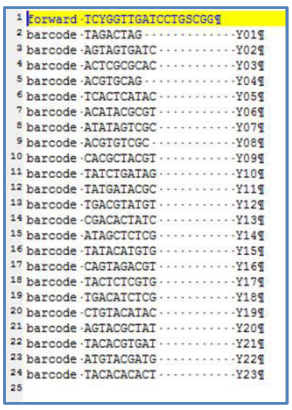


Figure 90 : Le fichier ".oligos". En première ligne, l'amorce forward puis les MIDs (barcode) et les échantillons correspondants (ex : Y01)

La seconde étape consiste à réduire les erreurs de séquençage et à attribuer à chaque séquence, son échantillon d'origine. Dans un premier temps, les séquences sont donc triées par échantillon grâce à un fichier .oligos indiquant l'amorce forward, le MID et l'échantillon correspondant *trim.flows()* (Figure 90). Il faut noter ici que l'amorce et les MIDs à indiquer dans ce fichier sont dépendants du sens de séquençage (séquençage à partir de l'adaptateur A ou séquençage à partir de l'adaptateur B). Parallèlement à ce tri, il est possible d'appliquer un premier filtre sur nos séquences en ne gardant que celles pour lesquelles il n'y a pas plus d'un certain nombre d'erreurs dans la séquence nucléotidique de l'amorce et dans la séquence nucléotidique du MID. A la sortie de cette commande, un fichier est obtenu par échantillon indiquant les flowgrams des séquences lui correspondant. Après cela, les différents flowgrams peuvent être corrigés grâce à *PyroNoise* qui est un des composants de la suite de programmes *AmpliconNoise*. C'est un algorithme qui va permettre de corriger les flowgrams et de les traduire ensuite en séquences nucléotidiques. Nous obtiendrons donc un fichier *fasta* contenant toutes nos séquences d'ADN, corrigées. Enfin, ces séquences vont pouvoir être à nouveau filtrées *trim.seqs()* et nous allons pouvoir éliminer les séquences trop courtes (par exemple moins de 200 bases) ou encore les séquences contenant de trop longs homopolymères. Les séquences des amorces et des MIDs vont être également éliminées grâce à cette commande.

La troisième étape va permettre d'améliorer le jeu de données. Ce jeu de données va tout d'abord être simplifié *unique.seqs()* pour permettre d'accélérer les traitements suivants. Ne vont alors être conservé que les séquences uniques dans notre fichier *fasta*. Les autres séquences ne sont pas éliminées du jeu de données puisqu'un fichier conserve en mémoire le nombre de séquences identiques à une séquence donnée. Nos séquences uniques vont ensuite être alignées sur une base de données de référence *align.seqs()*. Cet alignement va nous permettre d'éliminer de notre jeu de données les séquences qui ne s'alignent pas du tout avec les autres et qui correspondent probablement à des erreurs de séquençage. Toutes nos séquences doivent en effet commencer au même endroit puisqu'elles ont été séquencées grâce à la même amorce. Pour procéder à cet alignement, un alignement de référence doit être fourni. Nous avons utilisé ici l'alignement de Silva release 115 comme référence (dont nous reparlerons dans un paragraphe dédié, un peu plus bas). Pour chacune de nos séquences requêtes, la séquence la plus proche dans la banque de référence est recherchée. Chacune de nos séquences requêtes est alors alignée avec la séquence de référence la plus proche.

```
mothur > summary.seqs(fasta=Ech_M.shhh.trim.unique.align, name=Ech_M.shhh.trim.unique.names)
Using 2 processors.
                Start   End     NBases  Ambigs  Polymer NumSeqs
Minimum:        9222    19162   235     0       3       1
2.5%-tile:      12876   22966   258     0       3       1813
25%-tile:       12876   24320   271     0       4       18127
Median:         12876   24438   275     0       4       36254
75%-tile:       12876   24498   284     0       5       54380
97.5%-tile:     12876   25161   297     0       6       70694
Maximum:        14635   25833   330     0       8       72506
Mean:   12876   24419.1 277.22   0       4.34419
# of unique seqs:      30800
total # of seqs:       72506
Output File Names:
Ech_M.shhh.trim.unique.summary
```

Figure 91 : Exemple de tableau généré par la commande *summary.seqs()* de *Mothur.*

Enfin, les « gaps » de l'alignement initial de la banque de référence sont réinsérés dans les nouveaux alignements pour que nos séquences requêtes s'alignent avec toute la base de référence. Ensuite, il est possible de visualiser les résultats grâce à la commande *summary.seqs()*. Cette commande génère un tableau qui nous indique différentes statistiques correspondantes à notre jeu de données (Figure 91). Ce tableau indique notamment la position de départ de la majorité de nos séquences (*Start*) et la position de fin de la majorité de nos séquences (*End*). Ici, nos séquences semblent commencer à la position 12 876 mais la position de fin est variable. Les séquences ont été séquencées par le côté *Start* (c'est la position, fixe, de l'amorce) vers le côté *End* et la taille des séquences n'est pas homogène. La commande *screen.seqs()* va nous permettre de filtrer nos séquences au vu des résultats de l'alignement. Dans l'exemple ci-dessus (Figure 91), les données peuvent être filtrées à une position *Start* fixe de 12 876 et une position *End* variable (enlever toutes les séquences qui finissent avant ou après la position à laquelle 95% des séquences finissent, si critère de 95%). La commande *filter.seqs()* permet ensuite de retirer de notre fichier séquences toutes les colonnes de l'alignement qui ne sont pas informatives, c'est-à-dire celles contenant uniquement des gaps. Afin de réduire encore davantage les erreurs dues au séquençage, il est ensuite possible d'utiliser la commande *pre.cluster()*. Cette commande va permettre de considérer les séquences similaires à plus de 99% avec un groupe de séquences abondantes, comme 100% identiques à ce groupe de séquences abondantes, la différence de 1% étant admise comme étant vraisemblablement due à des erreurs de pyroséquençage. Cette commande pourrait éventuellement masquer une certaine part de diversité mais notre analyse taxonomique se faisant sur approximativement 200 bases, nous ne pouvons pas nous permettre d'être trop précis sur l'affiliation, surtout au niveau des groupes microbiens présents dans nos environnements. Cette pré-clusterisation ne modifie donc pas le résultat final obtenu mais permet d'alléger le jeu de données pour les traitements suivants.

Nous avons maintenant des séquences propres (amorces et MIDs éliminés) et filtrées (séquences trop courtes, trop d'homopolymères, diminution des erreurs dues au séquençage, élimination des séquences aberrantes par alignement…). La quatrième étape va nous servir à éliminer les chimères de notre jeu de données. Mais tout d'abord, qu'est-ce qu'une chimère ? Les chimères sont des séquences d'ADN composées de fragments de séquences appartenant au moins à deux microorganismes différents. Ces sont des séquences artefacts formées lors de l'étape de PCR (Haas et al., 2011). Durant cette amplification, il arrive parfois qu'une séquence A ne soit pas totalement recopiée et que l'amplicon créé se termine prématurément. Au cycle suivant, un autre brin d'ADN B peut venir s'hybrider sur l'amplicon avorté si deux régions assez

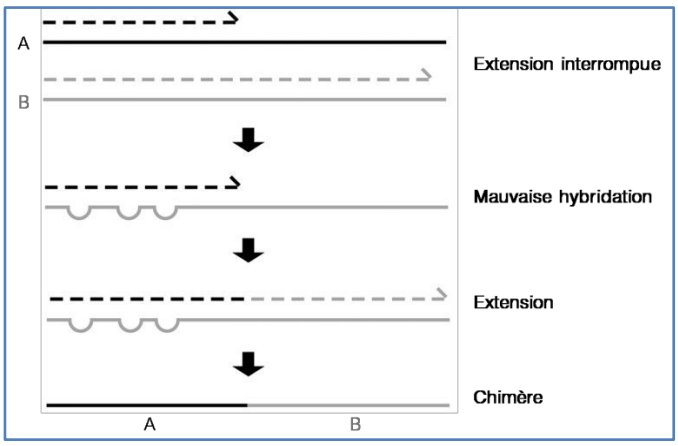


Figure 92 : Formation d'une séquence chimérique durant une PCR. Un amplicon dont l'amplification a été interrompue lors d'un cycle de PCR peut servir d'amorce dans un cycle ultérieur de PCR. S'il y a extension à partir de là, une séquence chimère est formée et peut être amplifiée à son tour lors des cycles de PCR suivants. D'après Haas et al., 2011

similaires sont rencontrées sur l'un comme sur l'autre. L'amplification peut alors continuer sur le brin avorté mais en recopiant cette fois la séquence du nouveau brin d'ADN B. Un amplicon formé d'un bout de la séquence A et d'un bout de la séquence B sera alors généré (Figure 92). Lors de l'analyse des données, l'affiliation de ce genre de séquences peut s'avérer compliquée si les séquences A et B appartiennent à des groupes phylogénétiques distincts. Dans ce cas, cela peut biaiser les résultats en créant de nouveaux groupes microbiens qui n'existent pas en réalité. La quatrième étape de ce pipeline est donc de soustraire les chimères de notre jeu de séquences. En premier lieu, il faut détecter quelles sont les séquences chimères parmi nos séquences. Plusieurs méthodes d'identification de chimères sont implémentées dans *Mothur* mais nous avons choisi l'algorithme conseillé, *UCHIME*, *chimera.uchime()*. Cet algorithme cherche à aligner notre séquence requête (Q) avec deux séquences de parents différents (A et B) de telle sorte que l'un des parents est plus semblable à un segment de la séquence requête et l'autre parent est similaire à un autre segment de cette séquence requête (Figure 93). Un score est calculé à partir de l'alignement. Des scores élevés indiquent un signal chimérique fort. Un seuil de coupure détermine si la séquence est considérée comme une chimère ou non. Dans le cadre du traitement de nos données, nous avons utilisé comme référence notre propre jeu de données. Dans ce cas, les séquences parents sont aussi des séquences requêtes et les séquences requêtes peuvent être des séquences parents. La commande *chimera.uchime()* crée donc un fichier indiquant les séquences ayant été identifiées comme étant des chimères. La commande *remove.seqs()* va ensuite permettre d'éliminer de notre jeu de données, ces séquences identifiées comme étant des chimères.

Figure 93 : Principe de détection des chimères par *UCHIME*. Détection par alignement. La ligne « Model » indique les trois segments de l'alignement qui sont respectivement plus proches de la séquence A, le recoupement (x) et plus proches de B. Les différences sont notées sur la ligne « Diffs ». Si la séquence Q est plus proche de A dans le segment A, la différence est notée 'A', en revanche si la séquence Q est plus proche de A dans le segment B, la différence est notée 'a', et même chose pour 'B' et 'b'. Une différence 'p' indique que les séquences parentes A et B sont identiques mais différentes de Q. Les votes sont '+' (oui), ' !' (non) et '0' (abstention) et indiquent si la différence correspondante supporte ou contredit le modèle (Edgar et al., 2011).

La cinquième étape consiste à éliminer les éventuels « *contaminants* » de notre jeu de données. Les contaminants peuvent être des séquences d'archées, de chloroplastes ou encore des séquences mitochondriales lorsque ce sont des bactéries qui sont séquencées. Il est également possible d'éliminer certaines lignées grâce à ces commandes. Les séquences « *inconnues* » peuvent aussi être éliminées du jeu de données. Ces séquences sont des séquences pour lesquelles aucune affiliation n'a été trouvée. La première étape consiste donc à classifier toutes nos séquences grâce à une base de données de référence *classify.seqs()*. Cette classification peut être faite par Classifier (méthode des probabilités, paramètre par défaut) mais aussi par des méthodes d'alignement comme BLAST puis détermination d'une taxonomie consensus (comme pour *MEGAN* ou *KoriBLAST*). Cette classification nécessite, comme dans le cas de *QIIME*, un fichier de séquences *fasta* de référence et un fichier indiquant la taxonomie pour chacune des séquences du fichier *fasta*. En inspectant les deux fichiers fournis sur le site (*Mothur*-formatted version of the RDP training set (v.9)), il est possible de paramétrer n'importe quel fichier, dont notre banque personnelle, afin de l'utiliser comme référence pour la classification (Figure 94).

Figure 94 : Format des deux fichiers nécessaires à la fonction *classify.seqs()* utilisés comme base de référence pour *Mothur*. A gauche, le fichier *fasta* avec les séquences nucléotidiques et à droite le fichier taxonomie. Le format de ces deux fichiers ne correspond pas exactement à celui requis pour *QIIME* (Figure 89)

Une fois les séquences classifiées, il est possible d'éliminer du jeu de données les lignées voulues, grâce à la commande *remove.lineage()*.

Après cette dernière étape « *filtre* », nous allons pouvoir passer aux étapes d'analyses de données à proprement parlé. La façon la plus classique d'analyser et de visualiser ces données consiste à regrouper des séquences plus ou moins similaires en *OTUs* ou *Operational Taxonomic Unit*. Pour ce faire, il faut établir une matrice de distance indiquant le pourcentage de différences entre toutes les séquences prises deux à deux, grâce à la commande *dist.seqs()*. Cette matrice de distance va permettre de regrouper les séquences selon leur pourcentage de similarité grâce à la commande *cluster()*. Cette commande va servir à définir les OTUs. Elle va définir différents groupes de séquences en fonction de différents seuils de coupure de définition d'OTUs. La commande suivante, *make.shared()*, va permettre de connaître le nombre de fois qu'une OTU apparaît par échantillon. Il faut pour cela définir un seuil de coupure de définition d'OTUs, classiquement, 0,03 (97% de similitude *i.e.* le niveau théorique de l'espèce). Afin de pouvoir comparer les résultats entre les différents échantillons, si différents échantillons il y a, il faut ensuite égaliser le nombre de séquences entre ces échantillons. En effet, nous ne pouvons pas nous permettre de dire par exemple qu'un groupe microbien est absent d'un échantillon pour lequel nous avons moitié moins de séquences disponibles pour l'analyse… Cette étape peut réduire drastiquement le nombre de séquences pour certains échantillons, ce qui peut être relativement exaspérant. Cependant, l'étape reste obligatoire si nous voulons obtenir une comparaison statistiquement fiable. Deux commandes pour réaliser cela, la première *count.groups(),* indique le nombre de séquences que nous avons par échantillon et la seconde, *sub.sample()*, permet de réduire le nombre de séquences par échantillon à une taille donnée. Enfin, il est possible de classifier les OTUs définis grâce à la commande *classify.otu()*. Suivent ensuite d'éventuelles analyses statistiques.

L'analyse de nos séquences de pyroséquençage s'est finalement fait en grande partie grâce au pipeline de *Mothur*. Après un grand nombre de tests sur les différents paramètres de tous les algorithmes utilisés et les résultats engendrés, certaines parties ont été optimisées pour obtenir les meilleurs résultats possibles. (1) Une attention toute particulière a été portée sur l'affiliation des séquences à leur groupe taxonomique. L'utilisation des bases de données formatées pour *Mothur* et téléchargeables sur le site donnaient un grand nombre de séquences non classifiées parmi nos séquences requêtes. L'utilisation de nos banques de données personnelles donnait de bien meilleurs résultats, avec beaucoup plus de séquences classifiées. Certains échantillons ayant été séquencés classiquement par clonage-séquençage puis traitement manuel (Vigneron et al., 2013; Vigneron et al.,

2014), nous pouvions comparer nos résultats de haut-débit avec ceux-ci. Les résultats obtenus avec nos banques de données personnelles sur nos séquences issues du haut-débit étaient congruents avec les résultats obtenus avec la technique de clonage-séquençage classique. Cependant, les problèmes exposés plus haut dans le paragraphe consacré à l'utilisation du logiciel *KoriBLAST* existent toujours dans le cadre de ce traitement. La banque personnelle possède un nombre de séquences réduit, un nombre de groupes taxonomiques réduit et implique en quelque sorte de connaître l'échantillon avant l'analyse. Tout cela peut biaiser les résultats. Afin d'éliminer les biais engendrés par cette banque, une autre banque a été utilisée en parallèle, la base de données de *Silva* (http://www.arb-silva.de/). Silva est une banque spécialisée dans les ARN ribosomaux, développée et entretenue par le groupe de génomique microbienne du Max Planck Institute (MPI) situé à Brême en Allemagne avec la coopération du département de Microbiologie de l'Université de Munich et la société Ribocon. Silva est alimentée avec les séquences existant sur les bases de données internationales, et ne conserve que les séquences atteignant un seuil de qualité défini (sur un critère de taille par exemple). En plus de cela, Silva fournit une taxonomie corrigée par rapport à celle du NCBI, en incluant de nombreux groupes d'incultivés nouvellement définis présents dans nos environnements. Alors que la version release 111 de Silva, publiée en Juillet 2012, donnait des résultats moins bons que notre banque personnelle, la dernière version release 115, publiée en Août 2013, réduit encore le nombre de séquences non affiliées. Nous avons donc choisi d'utiliser cette banque pour l'analyse de nos données, en fin de thèse. Elle a été paramétrée pour être utilisable dans le pipeline de *Mothur* (Figure 94). En parallèle, les résultats obtenus avec cette banque ont été comparés avec les résultats obtenus avec notre banque pour augmenter la fiabilité des groupes microbiens définis. Les séquences appartenant à un groupe différent dans les deux banques ont été isolées grâce à un petit script perl et de nouvelles analyses phylogénétiques (Neighbour-Joining, correction K-2-P) ont été réalisées afin de visualiser leur placement sur l'arbre phylogénétique obtenu à partir de notre banque personnelle. (2) Les résultats obtenus après classification par Classifier ou alignement ont été comparés et se sont avérés différents (notamment l'absence d'ANME-2c avec la banque Silva dans le cas de la classification par alignement). Le contenu de la banque pourrait expliquer ce biais. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, le principe de l'affiliation par alignement implique la sélection d'un certain nombre de séquences proches de notre séquence requête qui permettra de générer une affiliation consensus. Si une séquence n'a pas la même affiliation parmi ces hits, elle peut changer d'affiliation finale. Par exemple, si neuf séquences sur diz sont affiliées aux ANME-2c et si une séquence est affiliée aux Methanosarcinales, notre séquence requête sera affiliée aux Methanosarcinales. Par conséquent, la qualité de la banque est très importante. Nous avons choisi d'utiliser la classification par Classifier pour nos données. (3) Un autre point important dans cette analyse est l'élimination des contaminants. En effet, le pipeline classique de *Mothur* indique de supprimer les séquences « Unknown » de notre jeu de données, c'est-à-dire les séquences que l'algorithme ne parvient pas à classifier. Selon les banques utilisées, cela peut représenter une proportion importante de séquences. Pour limiter cela, toutes les séquences identifiées comme « *Unknown* » sont récupérées et re-traitées en analyses phylogénétiques classiques (Neighbourg-Joining). Elles sont aussi éventuellement blastées sur le serveur du NCBI pour récupérer les séquences les plus proches. Selon leur position sur les arbres, notre banque personnelle peut être complétée pour parvenir à affilier ces séquences « *Unknown* ». (4) Enfin, le dernier point à souligner est le fait de travailler en OTUs. Les OTUs ou Operational Taxonomic Units cherchent à définir un certain concept « *d'espèces* » chez les microorganismes, concept qui reste très flou et très discuté en microbiologie. Les OTUs sont conventionnellement définies avec un seuil de similarité de séquences (0,03 pour les espèces, 0,05 pour le genre, 0,10 pour la famille) en se basant sur la séquence complète de l'ARNr 16S (Schloss and Handelsman, 2004). Cependant, des séquences partielles sont utilisées dans la plupart des études actuelles et d'autant plus avec les approches haut-débit. Cette confusion peut affecter la diversité et la richesse en espèces car la

divergence des séquences n'est pas distribuée de façon équivalente le long du gène de l'ARNr 16S (Kim et al., 2011). Le seuil des 97% communément admis en microbiologie pour délimiter les OTUs, déjà très discuté selon les groupes microbiens, l'est encore plus lorsque nous travaillons sur une petite région du gène codant l'ARNr 16S. Selon la région hypervariable considérée, ce seuil est différent pour les différents groupes microbiens (Kim et al., 2011). Le concept d'OTUs en pyroséquençage reste donc un sujet délicat. Nous l'avons tout de même utilisé pour certaines analyses statistiques dont nous discuterons la significativité plus loin dans ce manuscrit. (5) Enfin, les représentations graphiques disponibles sur *QIIME* étant intéressantes, les fichiers de sortie de *Mothur* ont été paramétrés à la sortie du pipeline pour être visualisées sur *QIIME*. Ainsi, les fichiers « .taxonomy » en sortie de la commande *classify.otu()* ont été transformés pour suivre le même format que le fichier de référence « seqs_rep_sed_tax_assignments.txt » de *QIIME* et les fichiers « .an.shared » en sortie de la commande *make.shared()* ont été transformés pour être au même format que le fichier d'entrée « seqs_otus.txt » de *QIIME*.

6) Microscopie

Sortons maintenant de tout ce séquençage haut-débit, outils informatiques, lignes de commande ou autres algorithmes barbares qui nous aurons tenu en haleine ces trente quatre dernières pages… Nous allons à présent nous intéresser à l'observation de tous ces organismes microscopiques contenus dans nos sédiments. Pour cela, nous avons utilisé deux techniques bien particulières : le *FISH* ou Hybridation Fluorescente *in situ* en français et le *MEB* ou Microscopie Électronique à Balayage (SEM en anglais pour Scanning Electron Microscopy). Nous allons voir dans les paragraphes suivants en quoi consistent ces techniques et de quelles façons nous les avons mises en œuvre sur nos échantillons.

Toutes les mises au point expérimentales, observations, photographies et réflexions autour de la microscopie ont été réalisées en collaboration avec un autre doctorant du laboratoire, Adrien Vigneron. Ce travail d'équipe m'a d'ailleurs permis d'être co-auteur sur deux de ses publications, présentées en annexe de ce manuscrit (Vigneron et al., 2013; Vigneron et al., 2014).

A/ Microscopie – *FISH*

Le FISH est une méthode de microscopie permettant la visualisation dans un échantillon de microorganismes dont la position phylogénétique est connue (DeLong et al., 1989). Les cellules intactes, préalablement fixées au formaldéhyde, sont hybridées avec des sondes oligonucléotidiques marquées à l'aide d'un fluorochrome, visualisables au microscope à épifluorescence (Figure 95). L'identification phylogénétique est permise grâce à l'utilisation d'oligonucléotides, d'une longueur de 17 à 34 nucléotides qui sont complémentaires et spécifiques de la séquence de l'ARNr 16S d'un groupe phylogénétique cible (DeLong et al., 1989). Les sondes peuvent cibler des groupes larges (domaine, ordre) et doivent alors être complémentaires des régions conservées de l'ARNr 16S ou des groupes plus réduits (genre, espèce) en ciblant les régions plus variables de l'ARNr 16S (Amann et al., 1995). Cette technique permet non seulement de détecter la présence d'un microorganisme dans un échantillon mais aussi d'observer sa morphologie. Si celle-ci est préservée, il est aussi possible de visualiser l'organisation spatiale des microorganismes présents dans l'échantillon. Ainsi, par exemple, si des microorganismes sont toujours observés l'un à côté de l'autre, cela veut vraisemblablement dire qu'ils interagissent.

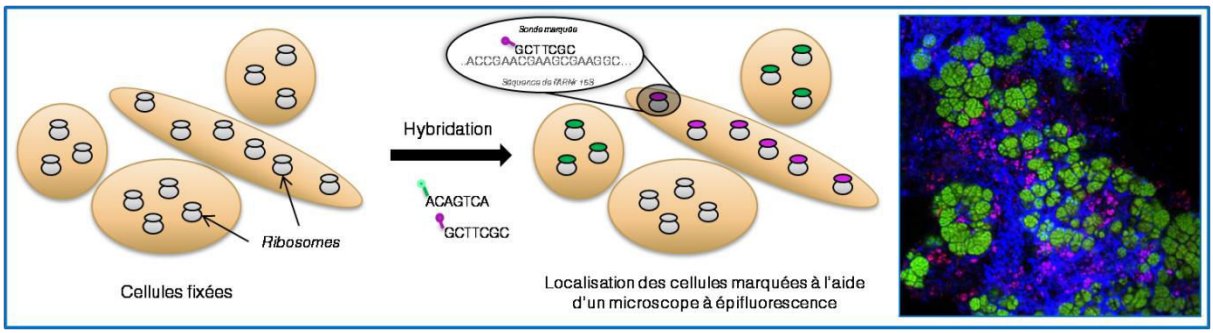


Figure 95 : Principe du FISH sur l'ARNr 16S. A droite, photographie FISH de communautés microbiennes présentes dans un bioréacteur alimenté par du nitrate, de l'ammonium et du méthane. En vert, *Candidatus 'Methanoperedens nitroreducens'* (ANME-2d), en rose *Kuenenia* (Planctomycetes) et en bleu, les autres bactéries (Haroon et al., 2013).

L'approche FISH peut venir compléter les approches basées sur le séquençage des gènes codant l'ARNr 16S que nous avons vu jusqu'à maintenant. En effet, après séquençage et affiliation, il est possible de dessiner des sondes oligonucléotidiques ciblant certains groupes microbiens d'intérêt et de revenir sur les échantillons pour réaliser des hybridations avec ces sondes. Combiner cette approche avec l'approche de séquençage peut aider à confirmer ou infirmer les conclusions tirées après séquençage. Comme nous l'avons vu plus haut, les analyses basées sur des PCRs peuvent effectivement être fortement biaisées, notamment à cause des différences au niveau de l'extraction, du nombre de copies du gène codant l'ARNr 16S dans le génome et de la spécificité/universalité des amorces utilisées.

L'intérêt de cibler l'ARNr 16S en FISH réside dans le fait que c'est une molécule amplifiée naturellement dans les cellules puisque composant des ribosomes. Le FISH sur ARNr a également été utilisé pour estimer l'activité des microorganismes dans l'environnement (Poulsen et al., 1995). L'intensité du signal par cellule, qui reflète en partie la concentration cellulaire en ribosomes, peut être interprétée comme une indication de l'activité physiologique puisqu'une corrélation entre contenu en ribosomes et activité physiologique a été observée pour de nombreuses bactéries en culture pure (Schaechter et al., 1958). Cependant, de nombreux facteurs peuvent influencer la stabilité des ARNr procaryotiques chez les microorganismes environnementaux (Binder and Liu, 1998; Oda et al., 2000), contestant l'hypothèse selon laquelle les cellules procaryotiques détectables en FISH standard sont actives. Par exemple, certaines bactéries chimiolithoautotrophiques à la croissance lente peuvent conserver d'importantes concentrations en ARNr même après des périodes d'inactivité prolongées (Wagner et al., 1995; Morgenroth et al., 2000; Schmid et al., 2001). Il faut donc bien garder en mémoire que la présence de ribosomes n'est pas forcément liée de façon stricte et linéaire à l'activité des microorganismes.

Par ailleurs, si des signaux FISH positifs pour une cellule procaryote peuvent être utilisés pour identifier l'organisme et montrer sa présence dans l'échantillon, l'absence de signal ne signifie pas nécessairement que l'organisme ciblé n'est pas présent dans celui-ci. Il peut y avoir des faux-négatifs et plusieurs raisons peuvent l'expliquer. (1) La limite de détection du FISH est relativement haute avec une nécessité d'avoir au moins 10^3 - 10^4 cellules ciblées par millilitre d'échantillon. Il est dans certains cas possible de réduire cette limite de détection par pré-filtration (cellules planctoniques dans un échantillon d'eau) (Pernthaler et al., 2002b) ou en incluant une étape d'enrichissement pour induire la croissance des organismes cibles (Fang et al., 2003). (2) Certaines cellules cibles peuvent avoir une enveloppe cellulaire qui, après l'étape de fixation, reste imperméable à la sonde oligonucléotidique marquée. Dans le cas de ces cellules, d'autres procédés de fixation, et dans certains cas des pré-traitements enzymatiques, peuvent être requis (Burggraf et al., 1994; Roller et al., 1994). (3) La concentration en ARNr dans les cellules cibles peut être trop basse pour qu'elles soient

détectées grâce à la technique FISH standard. Plus d'un millier de molécules d'ARNr cibles étant nécessaires pour obtenir un signal avec des sondes marquées avec un unique fluorochrome (Amann et al., 1995; Hoshino et al., 2008), certaines cellules peuvent être significativement en-dessous de cette valeur seuil (cellules en dormance ou avec une activité physiologique basse). Dans de tels cas, la détection peut être rendue possible grâce à l'utilisation de sondes plurimarquées (Pernthaler et al., 2002b), ou grâce à d'autres techniques d'amplification du signal (Pernthaler et al., 2002a). (4) Enfin, le site ciblé par la sonde sur le ribosome peut ne pas être accessible à cette dernière à cause des structures secondaires et tertiaires de l'ARNr et/ou des liaisons avec des protéines ribosomales (Fuchs et al., 1998; Behrens et al., 2003a). Étant donné que ces facteurs peuvent varier entre les différentes lignées de procaryotes (Behrens et al., 2003b), il est recommandé de sélectionner des régions cibles qui ont déjà été démontrées comme accessibles pour des sondes FISH chez des organismes proches, pour dessiner de nouvelles sondes. Alternativement, des sondes « *helper* » non marquées peuvent aussi servir à augmenter l'accessibilité des sites ciblés par les sondes en modifiant la conformation de l'ARNr au niveau du site d'intérêt (Fuchs et al., 2000).

Les premiers essais de FISH sur nos échantillons de sédiments ont été réalisés en mai 2011 avec l'aide de Françoise Lesongeur, technicienne au laboratoire. Pour commencer, nous nous sommes basé sur le protocole décrit par Thierry Nadalig et Marie-Anne Cambon-Bonavita (Cambon-Bonavita et al., 2009). Puis, au fur et à mesure de nos expérimentations, nous avons pu adapter et optimiser ce protocole sur nos échantillons.

Le protocole FISH adopté peut se diviser en cinq grandes étapes.

La FIXATION et la PERMEABILISATION des échantillons a été réalisée à bord, dès la récupération des carottes de sédiments. Cette étape permet de préserver la morphologie des cellules après leur mort. Différentes méthodes de fixation/perméabilisation existent et c'est la fixation au formaldéhyde qui a été utilisée dans notre cas. Les échantillons fixés ont ensuite été conservés à -20°C dans un mélange d'éthanol et de tampon PBS (tampon phosphate salin).

L'IMMOBILISATION des échantillons est l'étape suivante. Pour cela, nous avons utilisé deux techniques différentes. Après dilution, les sédiments ont été soit immobilisés sur un filtre en polycarbonate, soit déposés directement sur une lame. Dans le premier cas, les particules de sédiments et les microorganismes sont plus dispersés et cela permet de réaliser de meilleures images. Dans le second cas, les particules de sédiments et les microorganismes sont beaucoup plus regroupés et cela permet d'avoir une vision d'ensemble. Les échantillons immobilisés peuvent être séchés à l'air ou déshydratés dans des bains d'éthanol, l'éthanol permettant alors de rendre plus perméables les membranes cytoplasmiques aux sondes oligonucléotidiques.

Vient ensuite l'étape d'HYBRIDATION. Les échantillons sont incubés durant 3 heures à 46°C dans un tampon d'hybridation contenant les sondes marquées choisies. Le tampon d'hybridation contient du NaCl, qui va permettre la formation d'hétéroduplex ADN/ARN, de l'HCl qui tamponne le système, du SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) qui réduit la tension de surface et du formamide qui agit sur la stringence de la solution. La spécificité de la sonde peut être ajustée grâce à la concentration en formamide, 1% de formamide correspondant environ à une augmentation de température d'hybridation de 0,5°C, un tampon d'hybridation contenant 35% de fomamide correspond à environ 63,5°C pour une hybridation à 46°C. A noter qu'on utilise généralement entre 30 et 50% de formamide avec un maximum à 80% (Schramm et al., 2002).

Après l'hybridation, nous passons au LAVAGE. Les filtres ou les lames sont alors transvasés dans un tampon de lavage pendant 15 à 20 minutes à 48°C. Une hybridation très stringente, c'est-à-

dire contenant beaucoup de formamide, nécessite un tampon de lavage très stringent, c'est-à-dire avec peu de NaCl. L'eau correspond à un tampon de lavage fortement stringent (aucun sel) et risque de tout déshybrider. Le NaCl permet d'éviter la répulsion ARNr/sonde. Le tampon de lavage contient aussi de l'HCl, qui tamponne le système et de l'EDTA qui supprime les cations divalents qui déstabilisent les duplex ADN/ARN. Après ce lavage à 48°C, il est possible de rincer rapidement les lames ou les filtres à l'eau froide pour prévenir la formation de cristaux de sel qui peuvent générer une fluorescence parasite. L'utilisation d'eau froide minimise le risque de dissociation des sondes. Le filtre ou la lame sont ensuite séchés à l'air.

L'observation nécessite une étape de MONTAGE des lames pour le microscope. Entre lame et lamelles, il est possible d'utiliser un antifading qui va permettre d'éviter le photobleaching. En d'autres termes, un agent qui va permettre d'éviter la perte des propriétés fluorescentes de nos marqueurs peut être utilisé. Il est également possible d'ajouter du DAPI, agent intercalant de l'ADN, qui va permettre de visualiser toutes les cellules contenant de l'ADN (l'ADN apparaitra alors en bleu lors des observations en épifluorescence).

Les observations et les photographies ont toutes été réalisées avec un microscope Zeiss Imager Z.2 équipé de la source HXP 120C et des modules Colibri et la technologie Apotome. Ce microscope nous a permis de réaliser de très bons clichés, la qualité que nous avons pu obtenir équivalait celle obtenue avec un microscope confocal (tests réalisés au cours des journées Zeiss à Roscoff en juin 2013).

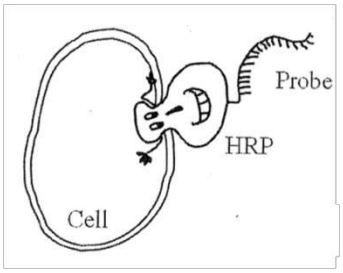


Figure 96 : Le CARD-FISH par Annelie Pernthaler, 2002

Lors d'une formation à Vienne (International FISH course, DOME) à laquelle j'ai eu la chance de participer, j'ai aussi eu l'occasion de tester le CARD-FISH sur nos sédiments. Le CARD-FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization and Catalysed Reporter Deposition) est une technique permettant d'amplifier le signal par rapport au FISH standard (Bobrow et al., 1989; Pernthaler et al., 2002a). Cette technique utilise des oligonucléotides couplés à une enzyme HRP (Peroxydase de raifort ou Horseradish peroxydase) (Figure 96). La fluorescence est obtenue grâce à une seconde incubation en présence de tyramide marquée par fluorescence. La peroxydase HRP réagit avec le peroxyde d'hydrogène et la tyramide marquée. La tyramide ainsi « activée » va alors se lier de manière covalente aux résidus tyrosines

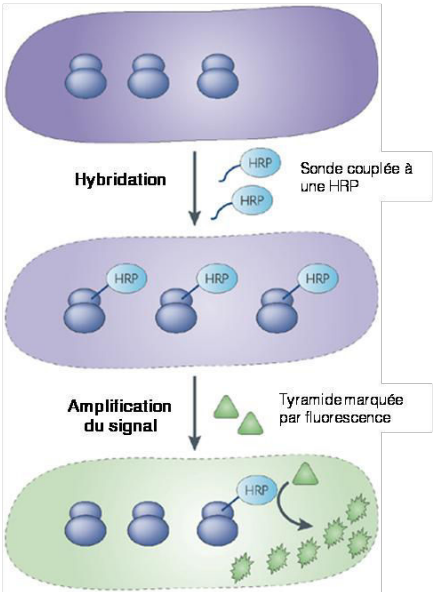


Figure 97 : Principe du CARD-FISH. (Amann and Fuchs, 2008)

présents dans la cellule cible. Chaque HRP portée par une sonde oligonucléotidique catalyse la fixation de nombreuses tyramides marquées, ce qui amplifie considérablement le signal par rapport à la technique FISH standard (Figure 97). Ainsi, seulement 36 à 54 copies d'ARNr 16S par cellule suffisent à la visualisation avec la technique du CARD-FISH (Hoshino et al., 2008).

L'utilisation du CARD-FISH sur nos sédiments générait énormément d'autofluorescence et des mises au point sur le protocole utilisé étaient nécessaires. Malheureusement, la durée de la formation, une petite semaine, ne nous aura pas permis d'obtenir des résultats concluants.

B/ MICROSCOPIE – *MEB*

Pour comprendre l'utilisation de la microscopie électronique à balayage dans nos études des communautés microbiennes sédimentaires, il faut remonter à un élément présenté un peu plus haut dans le manuscrit… Tout a commencé avec la découverte des gastéropodes poilus. Lors de l'observation de la surface de leur coquille, nous avions repéré des amas potentiellement cellulaires formant des sortes de boules à l'avant des gastéropodes (Figure 98). Nous pouvions distinguer des formes de bâtonnets en périphérie et des formes de coques, au centre. Cette organisation nous a tout de suite fait penser aux agrégats associés à l'AOM dont nous avons parlé un peu plus tôt (Figure 17). Nous avons donc tenté de trouver à quoi pouvait bien ressembler, en microscopie électronique les agrégats d'ANME repérés en FISH dans nos échantillons de sédiments. Nous nous sommes donc lancés dans une approche de microscopie corrélative en cherchant à coupler observations en FISH et observations au MEB.

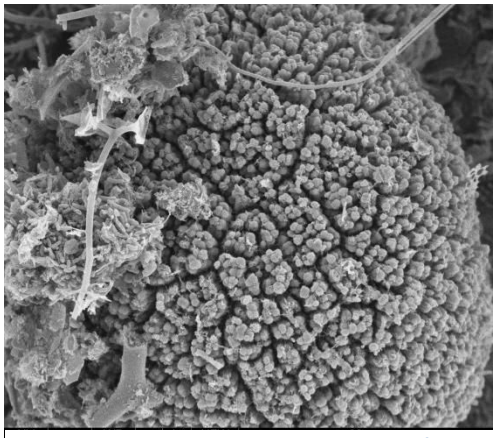


Figure 98 : Photographie au MEB de l'avant de la coquille d'un gastéropode. Le gastéropode provient du site Vasconcelos BIG18 « Tapis gris » de la Marge de Sonora (BIG 2010)

Le principe du microscope électronique est comparable à celui du microscope photonique, à la différence près que le faisceau de photons est remplacé par un faisceau d'électrons. En microscopie à balayage, l'échantillon a observé est recouvert d'une fine couche d'un métal lourd tel que l'or. Un faisceau d'électrons est dirigé vers l'échantillon. Les électrons dispersés par le métal sont collectés et activent un écran où l'image est produite. En MEB, seule la surface de l'échantillon est visualisée, ce sont les reliefs qui sont observés (Callen and Perasso, 2005; Madigan and Martinko, 2007).

Nous avons tout d'abord commencé par essayer de mettre au point la préparation de nos échantillons de sédiments pour le MEB. Les sédiments n'ayant pas été fixés spécifiquement à bord pour la microscopie électronique, les expérimentations ont été réalisées sur des sédiments fixés au formaldéhyde, destinés aux observations FISH. Les sédiments ainsi fixés ont été traités aux ultra-sons puis immobilisés sur un filtre polycarbonate 0,2 µm à l'aide de seringues et d'unités de filtration. Les filtres ont ensuite été métallisés après un séchage de 24h sur du papier Whatman, sans étape de point critique. La préparation des échantillons sur filtres ainsi que la mise en œuvre du microscope ont été réalisées avec l'aide de Nicolas Gayet (Figure 53) (Laboratoire Environnements Profonds, Ifremer). Les résultats obtenus de cette façon étant concluants, nous avons voulus voir à quoi ressemblaient en MEB nos agrégats d'ANME, repérés en FISH grâce à des sondes spécifiques. Pour cela, nous disposions d'un MEB et d'un microscope à épifluorescence non inversé. Après avoir testé observations MEB puis FISH et l'inverse, les résultats les meilleurs ont été obtenus en réalisant les observations FISH avant les observations au microscope électronique. Ainsi, de la même façon que celle décrite dans la partie « Microscopie – *FISH »,* nous avons réalisé le protocole du FISH sur nos

filtres. Immédiatement après les observations FISH, les filtres étaient complètement séchés à température ambiante puis métallisés. Les observations au MEB faisaient suite à cela. Afin de repérer les agrégats à la fois en FISH et en MEB, nous avons annoté les filtres avant filtration à l'aide d'un stylo à encre non liquide et à pointe fine pour que les traits soient visibles au microscope à épifluorescence (couleur nécessaire) et au MEB (reliefs).

Les observations en « microscopie corrélative » n'ont pas permis de visualiser des structures ressemblant à celles observées sur les gastéropodes et ces dernières restent donc non identifiées. En revanche, les résultats obtenus en microscopie corrélative couplant FISH et MEB ont pu être valorisés dans un article dont je suis co-auteur (Vigneron et al., 2014).

7) PCR Quantitative

La technique de PCR quantitative avait pour but de quantifier les principaux groupes microbiens mis en évidence dans les résultats de pyroséquençage. Des sondes spécifiques de ces différents groupes microbiens ont donc été utilisées. Elles ont été soit récupérées dans la littérature soit dessinées par Adrien Vigneron (Doctorant, LMEE) (Vigneron, 2012). Cette technique a été implantée et optimisée au laboratoire par Adrien Vigneron qui me l'a par la suite enseignée. Des explications très claires et très utiles aidant à la réalisation d'une Q-PCR sont d'ailleurs disponibles dans son manuscrit de thèse (Vigneron, 2012) et ne seront donc pas détaillées ici.

La technique de Q-PCR présente certains biais dont il faut avoir conscience afin de ne pas interpréter de façon incorrecte les résultats qu'elle peut nous apporter. Tout d'abord, comme nous l'avons vu plus haut et comme nous le verrons dans l'article présenté plus loin, la technique d'extraction utilisée peut faire varier la diversité microbienne extraite. Certains groupes peuvent ne pas être extraits et donc non détectés par Q-PCR. Ensuite, de la même façon que pour une PCR classique, la spécificité plus ou moins bonne des amorces peut aboutir à des résultats biaisés par rapport à la réalité.

Résultats et Discussions

Le troisième chapitre de ce manuscrit de thèse est consacré, comme son nom l'indique, aux résultats obtenus tout au long de ces trois années et aux discussions, réflexions et perspectives qu'ils auront permis de générer.

Ce chapitre sera divisé en trois parties, à l'image du chapitre consacré aux méthodes utilisées. Une première partie sera consacrée à la campagne BIG et à la présentation des plans détaillés des sites d'étude. La deuxième partie concernera l'étude des différents habitats en surface des sédiments. Ces résultats nous permettront d'arriver à la troisième partie, l'étude des communautés microbiennes sédimentaires et leur influence éventuelle sur la répartition des différents assemblages de surface.

I. La campagne BIG

La première étape de ce travail de thèse fut donc de découvrir la campagne BIG, de prendre connaissance des échantillons disponibles, et de définir les sites et échantillons qui seront analysés.

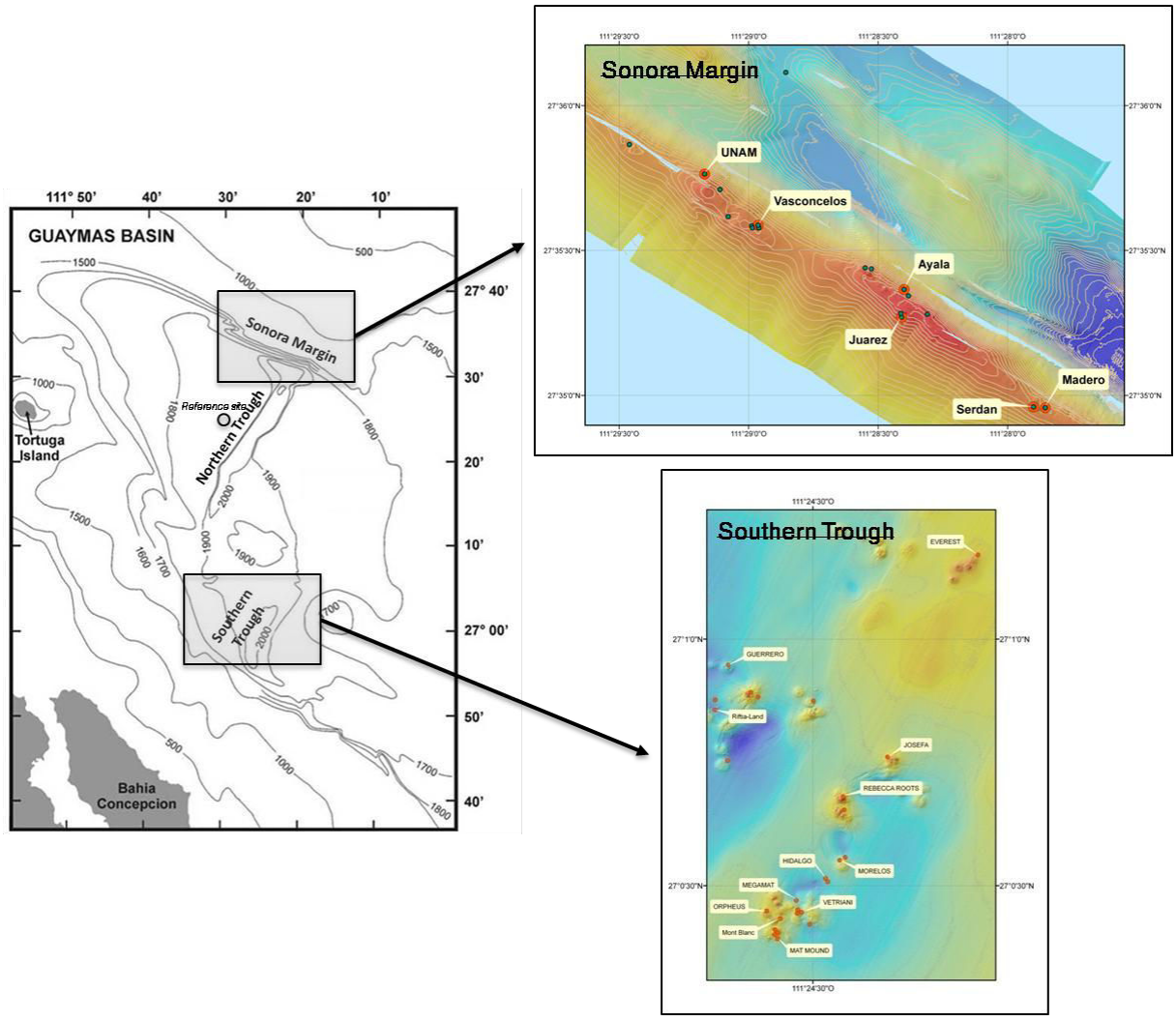


Figure 99 : Localisation de la zone hydrothermale (Southern Trough) et de la zone de suintements froids (Marge de Sonora) du Bassin de Guaymas. Sur la Marge de Sonora, trois grands sites étudiés, Vasconcelos, Ayala et Juarez. Au niveau de Southern Trough, deux grands sites étudiés, Morelos et Mega Mat. Carte de gauche d'après Otero et al., 2003 et cartes de droite issues de levées de bathymétrie réalisées avec l'AUV Aster X lors de la campagne BIG 2010 - Ifremer

Lors de la campagne BIG 28 plongées brièvement décrites dans le Tableau 2 ont été réalisées. Deux grandes zones ont été explorées en plus d'une zone de référence située en dehors de toutes zones actives : une zone de sources hydrothermales, Southern Trough, et une zone de suintements froids, la Marge de Sonora (Figure 99). En ce qui concerne notre étude, plusieurs sites ont été choisis au sein de ces zones, lors des plongées exploratoires du début de campagne. Au niveau des suintements froids, trois sites principaux sont étudiés : le site Vasconcelos, le site Ayala et le site Juarez. Au niveau des sources hydrothermales, ce sont les sites Morelos et Mega Mat qui ont été choisis (Figure 99).

1) La Marge de Sonora – *zone de suintements froids*

A/ Le site Ayala

Figure 100 : Le site Ayala. Ifremer – BIG 2010

Le site Ayala, caractérisé par la présence de vésicomyidés (Figure 100), a été exploré au cours de quatre plongées lors de la campagne BIG : 1748-4, 1749-5, 1759-15 et 1760-16 (Tableau 2, les plongées sont identifiées à l'aide de deux nombres. Le premier correspondant au numéro de plongée absolu du Nautile et le second, le numéro de plongée durant la campagne. La plongée 1748-4 correspond par exemple à la 4ème plongée de la campagne BIG, qui correspond à la 1748ème plongée du Nautile). Les deux premières plongées étaient des plongées d'exploration pendant lesquelles seuls quelques bivalves ont été prélevés. Les deux autres plongées (1759-15 et 1760-16) sont les plongées d'échantillonnage proprement dit.

Le site Ayala (marqueurs BIG11 et BIG14) est un champ de bivalves vésicomyidés d'environ 15 m sur 20 m situé le long d'une pente douce sur le flanc nord-est de la ride. Il est bordé au sud-ouest par des concrétions massives de plus d'un mètre de haut. Pendant les plongées, le site est globalement décrit par les scientifiques (Tableau 2) comme étant une sorte de cuvette, les bivalves étant situés plutôt sur la pente douce que dans la cuvette proprement dite, alors que de nombreuses coquilles vides ont été observées au niveau de cette dernière. Le sédiment est meuble mais granuleux. Les vésicomyidés forment de petits agrégats denses. Visuellement, *Phreagena soyoae* (syn. *Phreagena kilmeri*) semble largement dominer mais *Calytpogena pacifica* a également été observé dans un agrégat où les deux espèces cohabiteraient. De très nombreux filaments rouges (probablement des polychètes) sont visibles en surface du sédiment. Des coquilles d'*Acharax* dans les sédiments, de nombreuses ophiures, des araignées, des éponges et des petits gastéropodes recouvrant les concrétions ont également été observés. Un plan détaillé de l'échantillonnage sur ce site est donné sur la Figure 108.

B/ Le site Juarez

Le site Juarez est caractérisé par la présence de buissons de siboglinidés (Figure 101). Ce site a été exploré au cours de cinq plongées : 1749-5, 1751-7, 1759-15, 1761-17 et 1762-18 (Tableau 2). Les deux premières plongées étant plutôt des plongées d'exploration et les autres, consacrées à l'échantillonnage de la zone. Deux buissons ont été échantillonnés, le premier localisé près du marqueur BIG7 et le second, près du marqueur BIG12.

Le site Juarez (marqueurs BIG7 et BIG12) est un site colonisé notamment par des polychètes tubicoles siboglinidés, qui forment d'imposants buissons à la surface du sédiment. Les concrétions sont abondantes mais localisées, laissant des plages de sédiments meubles accessibles pour le carottage. Des voiles blancs légers, pouvant être des tapis microbiens peu épais, ainsi que des vésicomyidés épars ont également été observés sur le sédiment. A nouveau, comme sur le site Ayala, des filaments rouges ont été observés. Les buissons de vestimentifères semblent être au pied des concrétions. Ils sont composés de deux espèces différentes de siboglinidés, l'un annelé et l'autre plus lisse (Figure 101). Des polychètes serpulidés sont fixés sur les tubes des siboglinidés, et les galathées sont très abondantes dans les buissons (Figure 101). Les plans détaillés de l'échantillonnage sur ce site sont donnés sur les Figure 109 et Figure 110.

Figure 101 : Le site Juarez. Ifremer – BIG 2010

C/ LE SITE VASCONCELOS

Figure 102 : Le marqueur BIG13 en place. Les différents sites d'étude sont repérés à l'aide de marqueurs déposés sur le sédiment. Ifremer – BIG 2010

Le site Vasconcelos, caractérisé par la présence de tapis microbiens, regroupe plusieurs zones d'étude. La première, repérée par le marqueur BIG5, est une zone recouverte d'un tapis microbien blanc peu étendu mais épais, entouré de quelques vésicomyidés. La deuxième, repérée par les marqueurs BIG13 et BIG15 (Figure 102), présente un tapis microbien blanc beaucoup plus étendu mais fragmenté, ainsi que des vésicomyidés colonisant le pourtour de ce tapis. La troisième zone, repérée par le marqueur BIG19, est, comme dans le cas de la zone BIG13/BIG15, un tapis microbien blanc fragmenté. La quatrième zone, repérée par le marqueur BIG18, est un tapis microbien blanc peu fragmenté, dont le pourtour est colonisé par des gastéropodes et des polychètes. Enfin, la cinquième zone, non repérée par un marqueur mais nommée W12 dans la suite du manuscrit, est une zone de tapis microbiens fragmentés. Les zones BIG18, BIG19 et W12 se situent environ à 10 mètres les unes des autres. La zone de BIG13/BIG15 est, quant à elle, à environ une vingtaine de mètres de BIG19. Enfin, le tapis BIG5 se situe à une quinzaine de mètres de la zone BIG13/BIG15. Ces sites ont été explorés et échantillonnés au cours de neuf plongées : 1748-4, 1749-5, 1750-6, 1751-7, 1754-10, 1755-11, 1756-12, 1757-13, 1758-14 (Tableau 2). Pour plus de clarté, la description du site Vasconcelos et l'échantillonnage est divisé en sous-zones, la zone BIG5, la zone BIG13-BIG15, la zone BIG18, la zone BIG19 et enfin la zone W12.

Figure 103 : Le site Vasconcelos BIG5. Ifremer – BIG 2010

(1) La zone BIG5

La zone BIG5 est caractérisée par la présence d'un tapis microbien blanc circulaire épais (Figure 103). Le tapis microbien est présent sur un petit mont et la présence d'encroûtements à proximité a été notée. Autour de ce tapis, quelques vésicomyidés et solemyidés sont enfouis dans le sédiment. De très nombreuses ophiures ont également été observées tout autour du tapis. Le tapis microbien n'a pas été échantillonné sur cette zone. En revanche, des vésicomyidés ont

été prélevés au filet et une carotte destinée à la chimie a également été réalisée en périphérie du tapis. Les sédiments n'ont pas été prélevés pour les études de microbiologie et ce site ne sera présenté que dans l'étude des organismes de surface, ici, les vésicomyidés. Un plan détaillé de l'échantillonnage est présenté à la Figure 111.

(2) La zone BIG13/BIG15

Figure 104 : Le site Vasconcelos BIG13/BIG15. Ifremer – BIG 2010

La zone BIG13/BIG15 est caractérisée par la présence d'un tapis microbien très étendu mais fragmenté (Figure 104). Ce tapis se situe à environ 10 mètres du tapis BIG5 et des concrétions massives séparent ces deux zones. Des vésicomyidés ainsi que de nombreuses traces de déplacements de ces derniers ont été observés en périphérie de ces tapis. De nombreuses ophiures étaient présentes autour du tapis. C'est l'habitat colonisé par les vésicomyidés qui a été échantillonné pour notre étude. Les bivalves et les sédiments sous-jacents ont ainsi pu être analysés. Un plan détaillé de l'échantillonnage de cette zone est présenté à la Figure 112.

(3) La zone BIG18

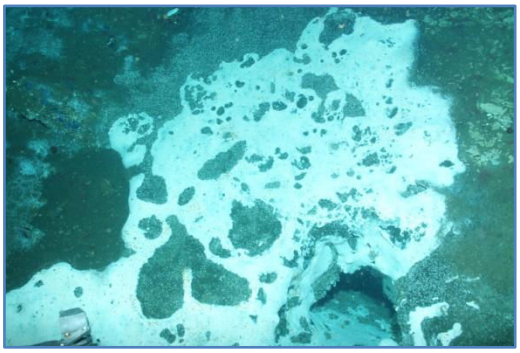


Figure 105 : Le site Vasconcelos BIG18. Ifremer – BIG 2010

La zone BIG18 est caractérisée par un tapis microbien blanc étendu dont tout le pourtour est grisâtre et semble être colonisé par des gastéropodes (Figure 105). Cette zone se situe à une vingtaine de mètres de la zone BIG13/BIG15. Des vésicomyidés et des coquilles de solemyidés ont également pu être observés à proximité de ce tapis. Deux zones différentes de ce site ont été échantillonnées : la zone de tapis microbien blanche et la zone périphérique grise, colonisée par de petits polychètes et des gastéropodes. Un plan détaillé de l'échantillonnage est présenté sur la Figure 113.

(4) La zone BIG19

La zone BIG19 est caractérisée par la présence d'un tapis microbien fragmenté. Cette zone se situe à une dizaine de mètres de la zone BIG18 et n'a pas été échantillonnée pour cette étude (Figure 113).

(5) La zone W12

La zone W12 est caractérisée par la présence de plusieurs tapis microbiens de taille réduite. Cette zone n'est pas marquée par un marqueur physique. Les tapis sont entourés d'une zone grise où de petits gastéropodes et des petits vers peuvent être observés. De nombreuses anémones et quelques vésicomyidés sont également observés autour des tapis. La zone W12 est située à une dizaine de mètres de BIG18 et se situe à la même distance de BIG19. Ces tapis ont été échantillonnés pour la microbiologie mais n'ont pas été utilisés pour notre étude. En revanche, des carottes prélevées sur cette zone ont fait l'objet d'observations FISH réalisées avec Adrien Vigneron dans le cadre de son doctorat (Vigneron et al., 2013; Vigneron et al., 2014) (Figure 113).

2) Southern Trough – *zone de sources hydrothermales*

A/ Le site Morelos

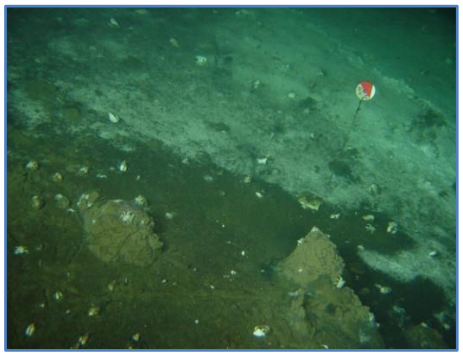


Figure 106 : Le site Morelos BIG6. Ifremer – BIG 2010

Le site Morelos est caractérisé par la présence de vésicomyidés. Ce site a été exploré au cours de quatre plongées durant la campagne BIG : 1747-3, 1763-19, 1768-24 et 1770-26 (Tableau 2).

Ce site est caractérisé par la présence d'un large voile blanchâtre recouvrant les sédiments, un peu granuleux et moins épais que les tapis microbiens observés jusque là (Figure 106). Au centre de cette zone blanche, une petite fissure d'où diffusait du fluide hydrothermal ainsi que d'autres zones de diffusions inactives ont été observées. Des vésicomyidés vivants et de coquilles vides ont également été observés à la périphérie de la zone blanche. Des petits monticules de couleur plus pâle sont visibles et sont colonisés par un des vers polychètes amphinomides et des galathées (Figure 106). Le marqueur BIG10 a été posé en périphérie de la zone de sédiments blancs, à l'endroit où la quasi-totalité des échantillons ont été prélevés, à quelques mètres du marqueur BIG6. Un plan détaillé de l'échantillonnage est présenté à la Figure 114.

B/ Le site Mega Mat

Figure 107 : Le site Mega Mat. Ifremer – BIG 2010

Le site MegaMat est caractérisé par des tapis microbiens blancs et orange. Ce site a été exploré et échantillonné au cours de cinq plongées lors de la campagne BIG : 1745-1, 1763-19, 1765-21, 1766-22 et 1767-23 (Tableau 2). Ce site a également été exploré lors d'une campagne océanographique américaine qui a eu lieu aux mois de novembre et décembre 2009 (A. Teske, communication personnelle).

Des bouquets de très gros *Riftia* et des *Alvinella* sont observés sur des monts d'où diffuse un fluide moiré. Les *Riftia* sont englués dans des tapis microbiens épais blancs et orange. Des tapis microbiens sont également présents sur le sédiment, à la base des monts (Figure 107). Le marqueur M27 est situé sur le sédiment, entre deux tapis. Des coquilles de bivalves sont également observés à la surface des sédiments. Cette la zone de tapis microbiens sédimentaires a été échantillonnée pour cette étude. Un plan détaillé de l'échantillonnage de la zone est présenté à la Figure 115.

3) Le site de référence

Une zone de référence a aussi été échantillonnée. Le site choisi est situé en dehors des zones actives et les sédiments échantillonnés étaient visuellement nus. Deux plongées ont été consacrées à l'échantillonnage de la zone de référence : la plongée 1753-9 et la 1771-27 (Tableau 2). Une carotte, prélevée à la plongée 1753-9, a été conditionnée pour la microbiologie. Un plan d'échantillonnage de la zone est présenté à la Figure 116.

Bilan des plongées de la campagne BIG			
Plongées	Zone explorée	Sites explorés et marqueurs correspondants	Observateurs
Pl. 1745 - 1	Southern Trough	BIG1 Mat Mound, M27 Mega Mat et hors zones étudiées - *Exploration et prélèvements*	Yves Fouquet
Pl. 1746 - 2	Southern Trough	Hors zones étudiées	Anne Godfroy
Pl. 1747 - 3	Southern Trough	BIG6 Morelos et hors zones étudiées - *Exploration et carottiers*	Jozée Sarrazin
Pl. 1748 - 4	Marge de Sonora	BIG11 Ayala, BIG5 Vasconcelos - *Exploration et prélèvements*	Hélène Ondreas
Pl. 1749 - 5	Marge de Sonora	BIG11 et BIG14 Ayala, BIG5 et BIG13 Vasconcelos, BIG12 Juarez - *Exploration et prélèvements*	Karine Olu
Pl. 1750 - 6	Marge de Sonora	BIG5 et BIG13 Vasconcelos - *Exploration et prélèvements*	Laurent Toffin
Pl. 1751 - 7	Marge de Sonora	BIG5 et BIG13 Vasconcelos, BIG7 et BIG12 Juarez - *Exploration et prélèvements*	Jean-Claude Caprais
Pl. 1752 - 8	Southern Trough	*Plongée annulée*	Patrick Briand
Pl. 1753 - 9	Hors zone	Référence - *Prélèvements*	Christian Le Gall
Pl. 1754 - 10	Marge de Sonora	BIG13, Vue de BIG18 et BIG19 Vasconcelos - *Prélèvements*	Pierre-Marie Sarradin
Pl. 1755 - 11	Marge de Sonora	BIG19 et BIG13 Vasconcelos - *Prélèvements*	Philippe Noel
Pl. 1756 - 12	Marge de Sonora	BIG13, BIG15 et BIG19 Vasconcelos - *Prélèvements*	Sophie Arnaud
Pl. 1757 - 13	Marge de Sonora	BIG13, BIG5 et BIG19 Vasconcelos - *Prélèvements*	Carole Decker
Pl. 1758 - 14	Marge de Sonora	BIG18 et BIG5 Vasconcelos - *Prélèvements*	Raggi Luciana
Pl. 1759 - 15	Marge de Sonora	BIG14 Ayala, BIG7 et BIG12 Juarez - *Prélèvements*	Richard Cosson
Pl. 1760 - 16	Marge de Sonora	BIG11 et BIG14 Ayala - *Prélèvements*	Adrien Vigneron
Pl. 1761 - 17	Marge de Sonora	BIG7 et BIG12 Juarez - *Prélèvements*	Anne Godfroy
Pl. 1762 - 18	Marge de Sonora	BIG12 Juarez - *Prélèvements*	Nathalie Pradel
Pl. 1763 - 19	Southern Trough	BIG1 Mat Mound, M27 Mega Mat, BIG6 Morelos, hors zones étudiées - *Exploration et prélèvements*	Patrick Briand
Pl. 1764 - 20	Southern Trough	BIG1 Mat Mound et hors zones étudiées - *Exploration et prélèvements*	Françoise Lesongeur
Pl. 1765 - 21	Southern Trough	M27 Mega Mat et hors zones étudiées - *Exploration et prélèvements*	Pierre-Marie Sarradin
Pl. 1766 - 22	Southern Trough	M27 Mega Mat et hors zones étudiées - *Exploration et prélèvements*	Elva Escobar-Briones
Pl. 1767 - 23	Southern Trough	M27 Mega Mat, BIG1 et BIG17 Mat Mound et hors zones étudiées - *Exploration et prélèvements*	Claire Geslin
Pl. 1768 - 24	Southern Trough	BIG6 et BIG10 Morelos, BIG1 Mat Mound, hors zones étudiées - *Exploration et prélèvements*	Agnes Hirschler-Rea
Pl. 1769 - 25	Southern Trough	BIG6 Morelos - *Plongée écourtée*	Tatiana Sokolova
Pl. 1770 - 26	Southern Trough	BIG6 et BIG10 Morelos, BIG1 Mat Mound - *Prélèvements*	Olivier Rouxel
Pl. 1771 - 27	Hors zone	Référence - *Prélèvements*	Philippe Rodier
Pl. 1772 - 28	Southern Trough	Hors zones étudiées- *Exploration et prélèvements*	Jozée Sarrazin

Tableau 2: Bilan des plongées de la campagne BIG 2010. Détails des zones et sites explorés et échantillonnés lors des plongées. L'observateur scientifique embarqué à bord du Nautile y est également indiqué

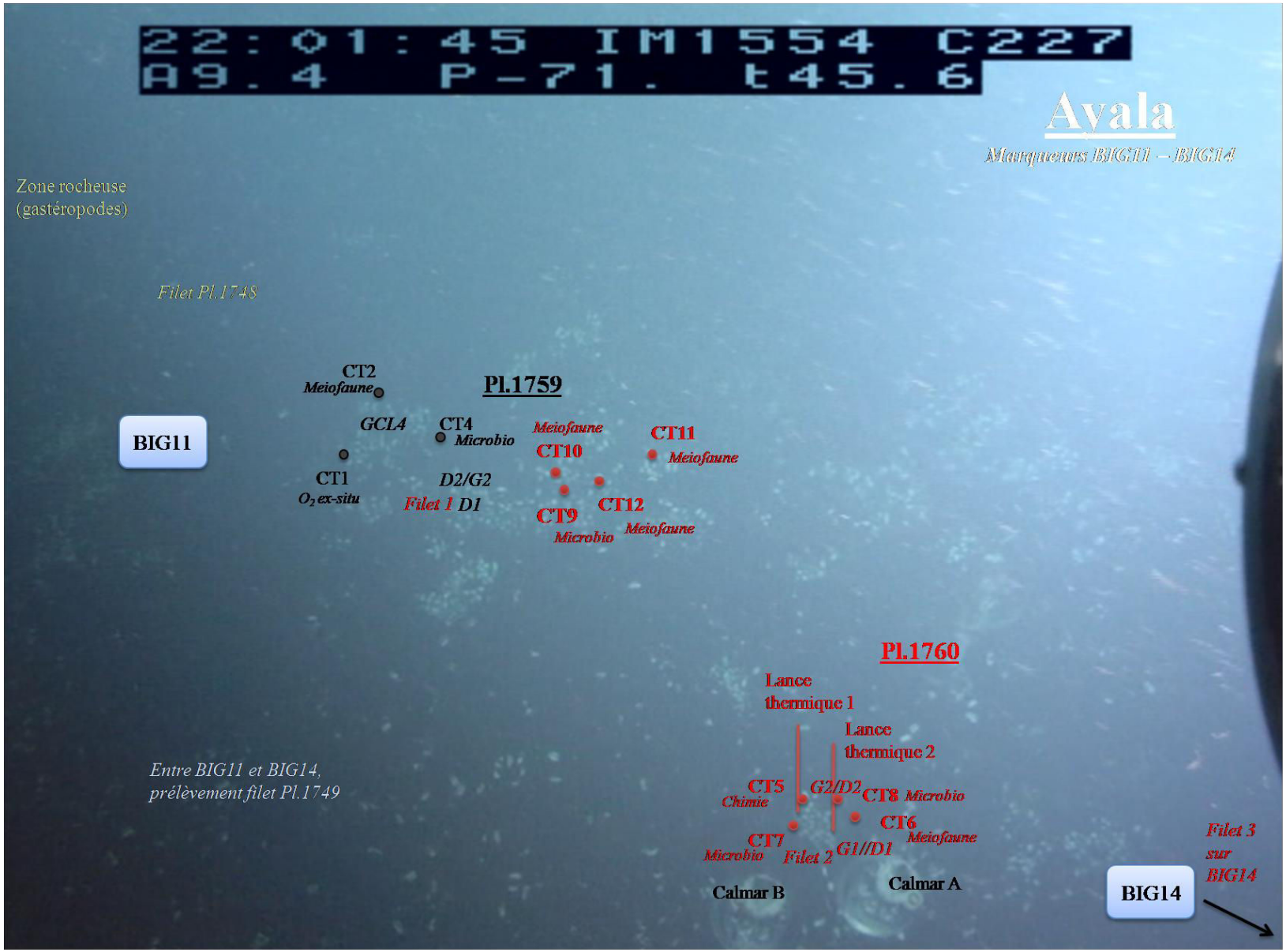


Figure 108 : Plan détaillé de l'échantillonnage sur le site Ayala. En rouge, l'échantillonnage réalisé à la plongée 1760-16 et en noir celui de la plongée 1759-15. Abréviations : CT *Carottier Tube*, GCL *Grand Carottier Lame*, D/G *Prélèvements d'eau*. Le type d'études réalisées sur les carottiers tubes est indiqué en italique sous leurs labels

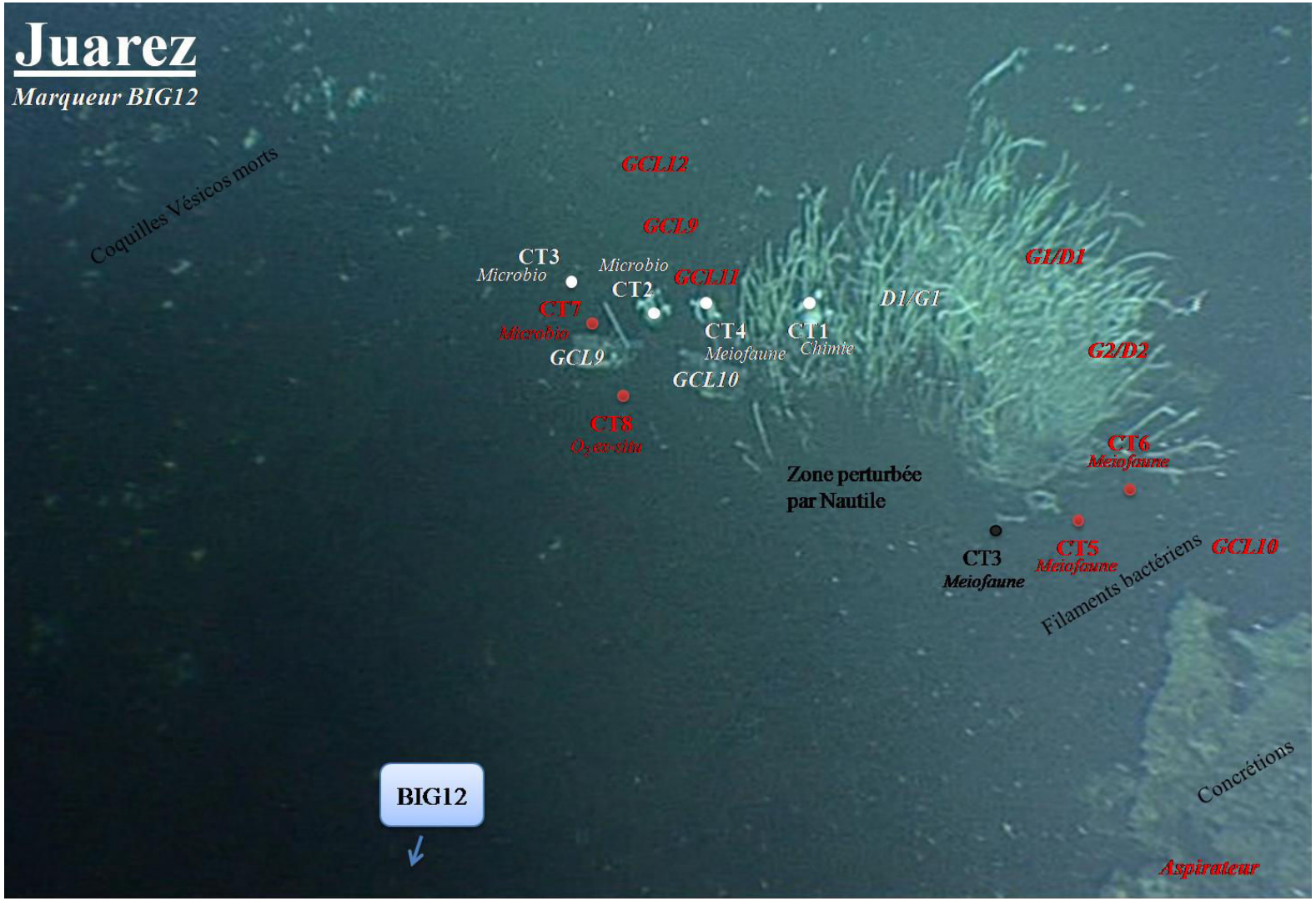


Figure 109 : Plan détaillé de l'échantillonnage sur le site Juarez BIG12. En noir, l'échantillonnage réalisé à la plongée 1759-15, en blanc celui de la plongée 1761-17 et en rouge celui de la plongée 1762-18. Abréviations : CT *Carottier Tube*, GCL *Grand Carottier Lame*, D/G *prélèvements d'eau*. Le type d'études réalisées sur les carottiers tubes est indiqué en italique sous leurs labels.

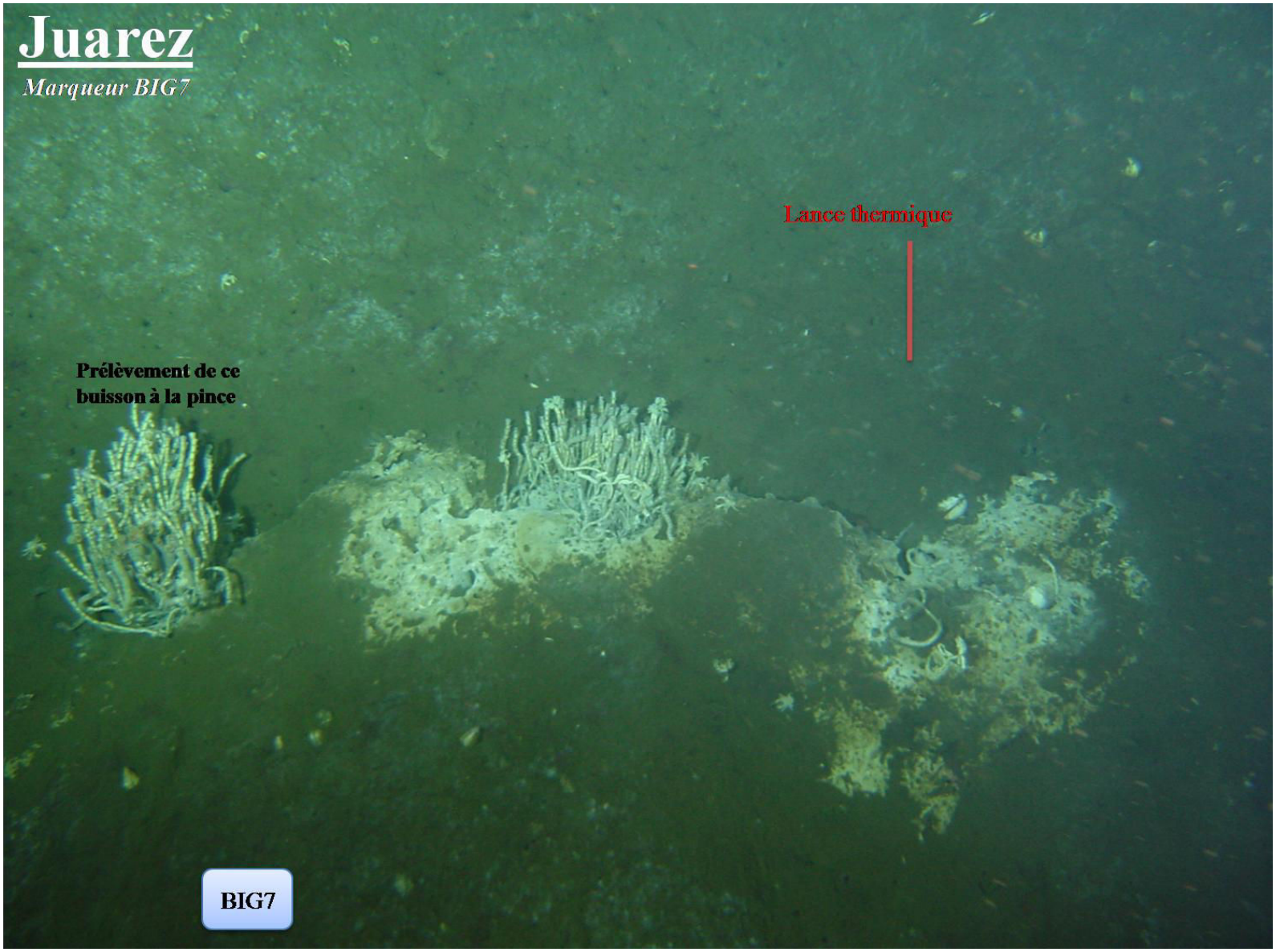


Figure 110 : Plan détaillé de l'échantillonnage sur le site Juarez BIG7.

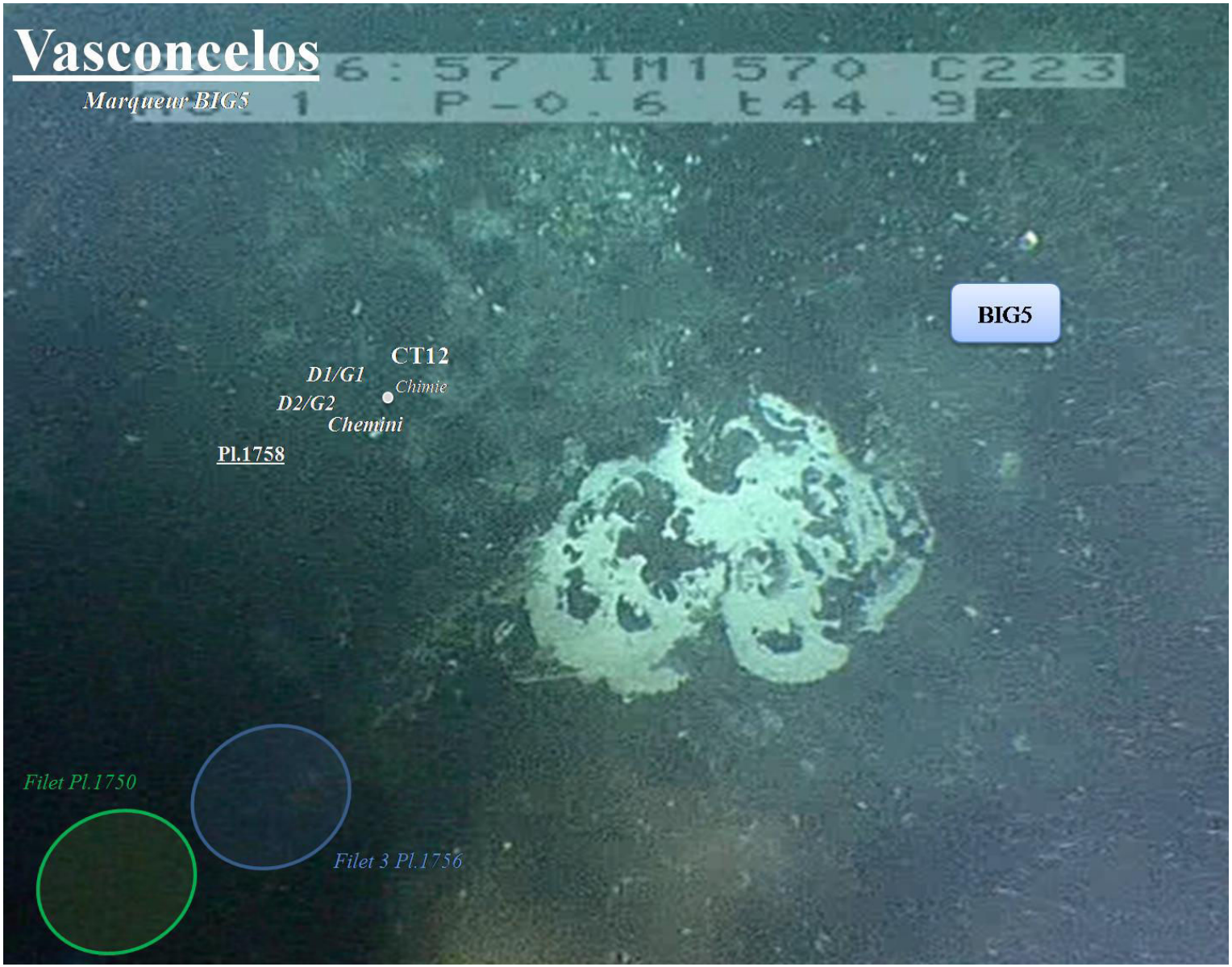


Figure 111 : Plan détaillé de l'échantillonnage sur le site Vasconcelos BIG5. Abréviations : CT *Carottier Tube*, D/G *prélèvements d'eau*. Le type d'études réalisées sur les carottiers tubes est indiqué en italique sous leurs labels.

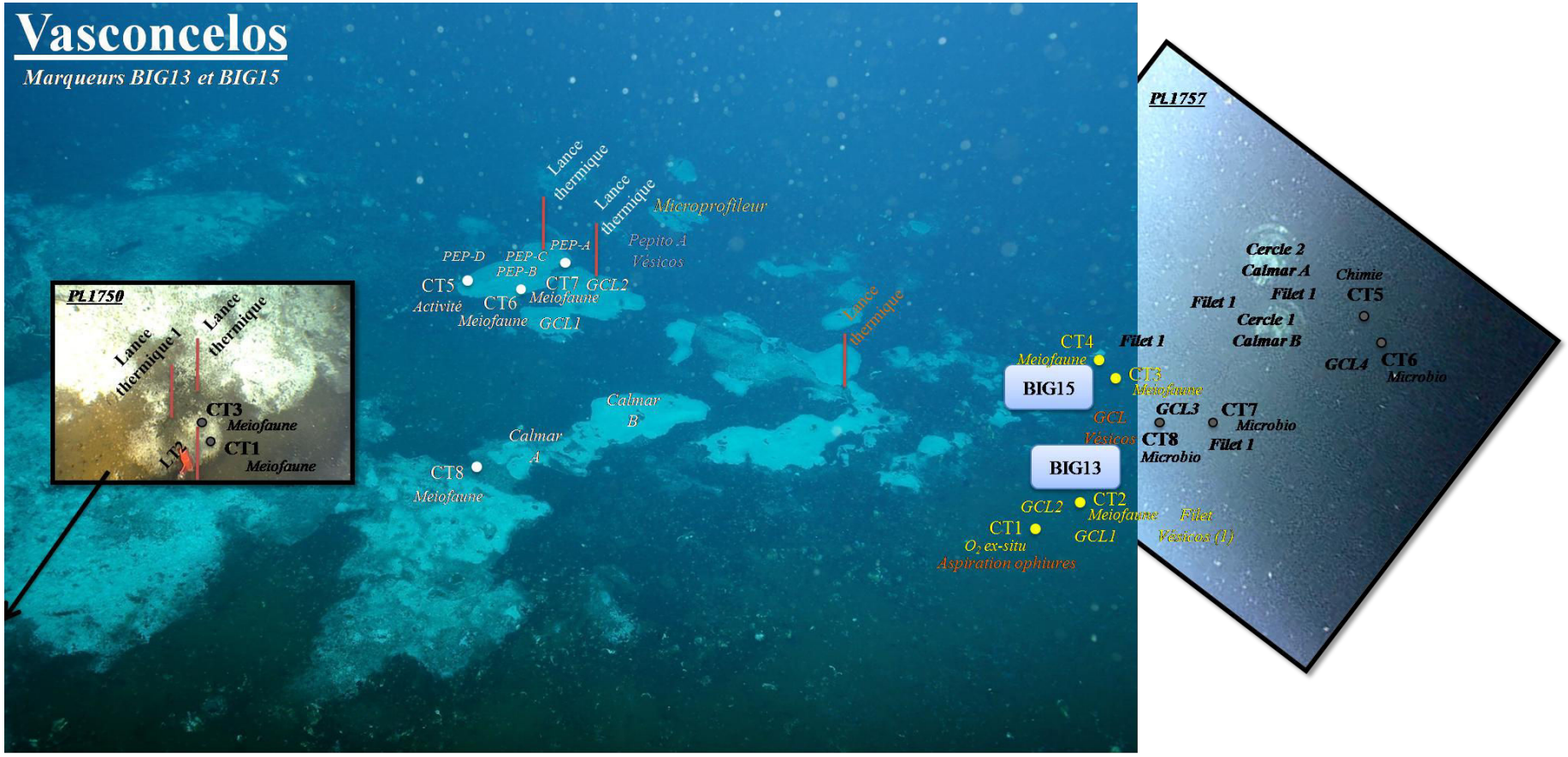


Figure 112 : Plan détaillé de l'échantillonnage sur le site Vasconcelos BIG13/BIG15. En orange, l'échantillonnage réalisé à la plongée 1749-5, en noir celui réalisé à la plongée 1750-6, en vert celui réalisé à la plongée 1751-7, en blanc la 1754-10, en bleu la 1755-11 et en jaune la 1756-12. Abréviations : CT *Carottier Tube*, GCL *Grand Carottier Lame*, PEP *prélèvements d'eau*. Le type d'études réalisées sur les carottiers tubes est indiqué en italique sous leurs labels.

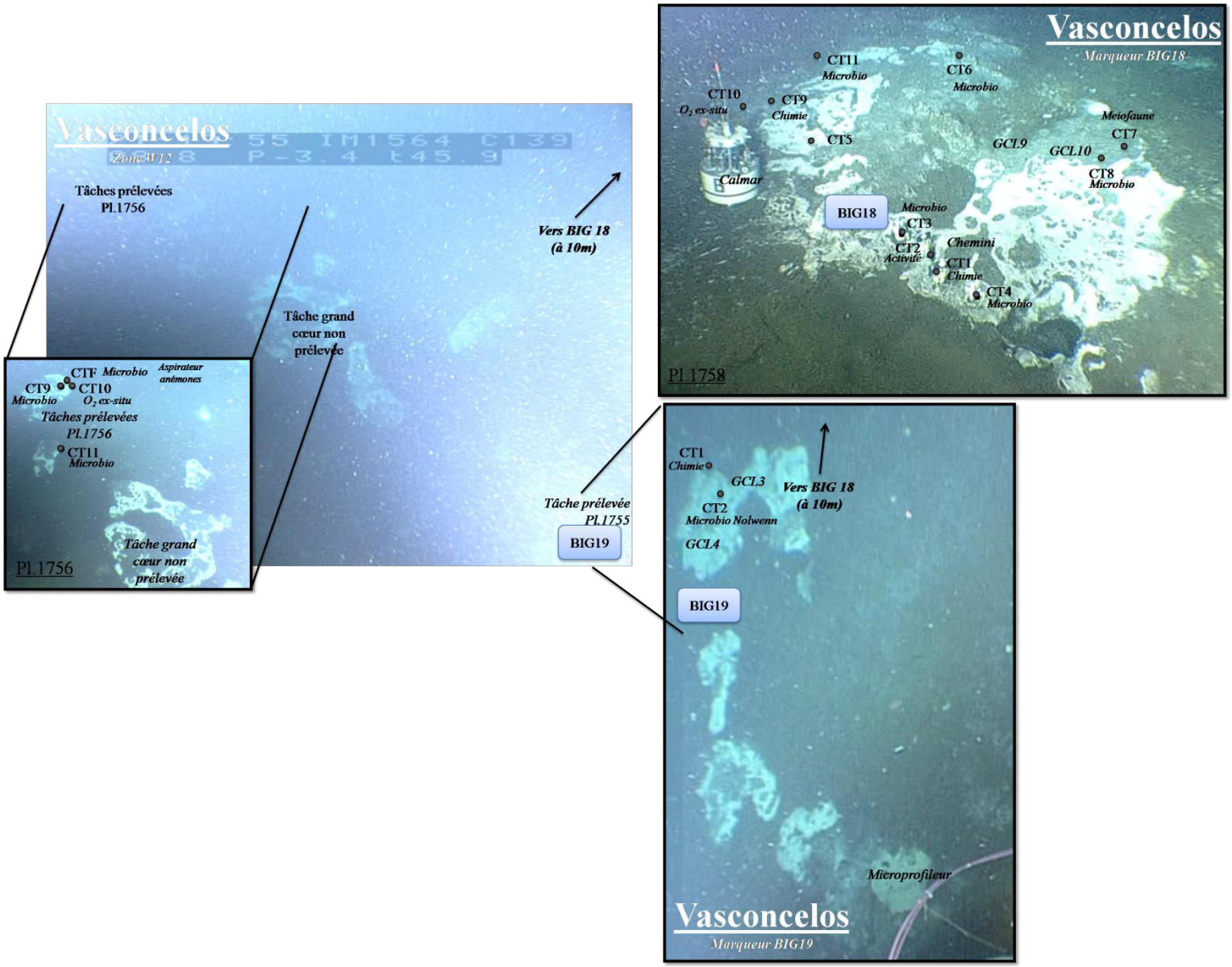


Figure 113 : Plans détaillés de l'échantillonnage sur les sites Vasconcelos BIG18 – BIG19 – W12. Abréviations : CT *Carottier Tube*, GCL *Grand Carottier Lame*. Le type d'études réalisées sur les carottiers tubes est indiqué en italique sous leurs labels.

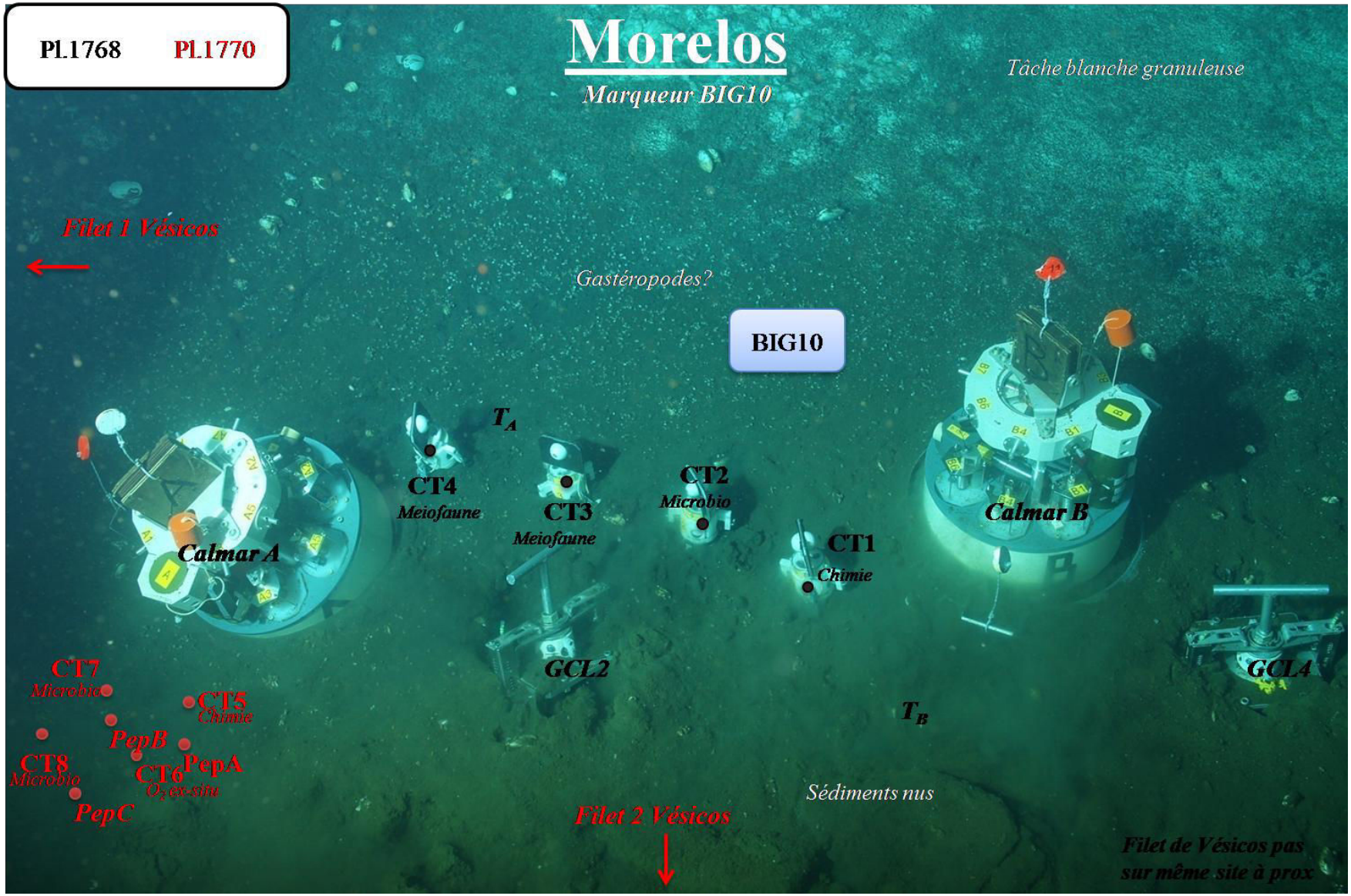


Figure 114 : Plan détaillé de l'échantillonnage sur le site Morelos BIG10. En noir, l'échantillonnage réalisé à la plongée 1768, en rouge celui réalisé à la plongée 1770. Abréviations : CT *Carottier Tube*, GCL *Grand Carottier Lame*, T *Sonde de température*, Pep *Prélèvements d'eau*. Le type d'études réalisées sur les carottiers tubes est indiqué en italique sous leurs labels.

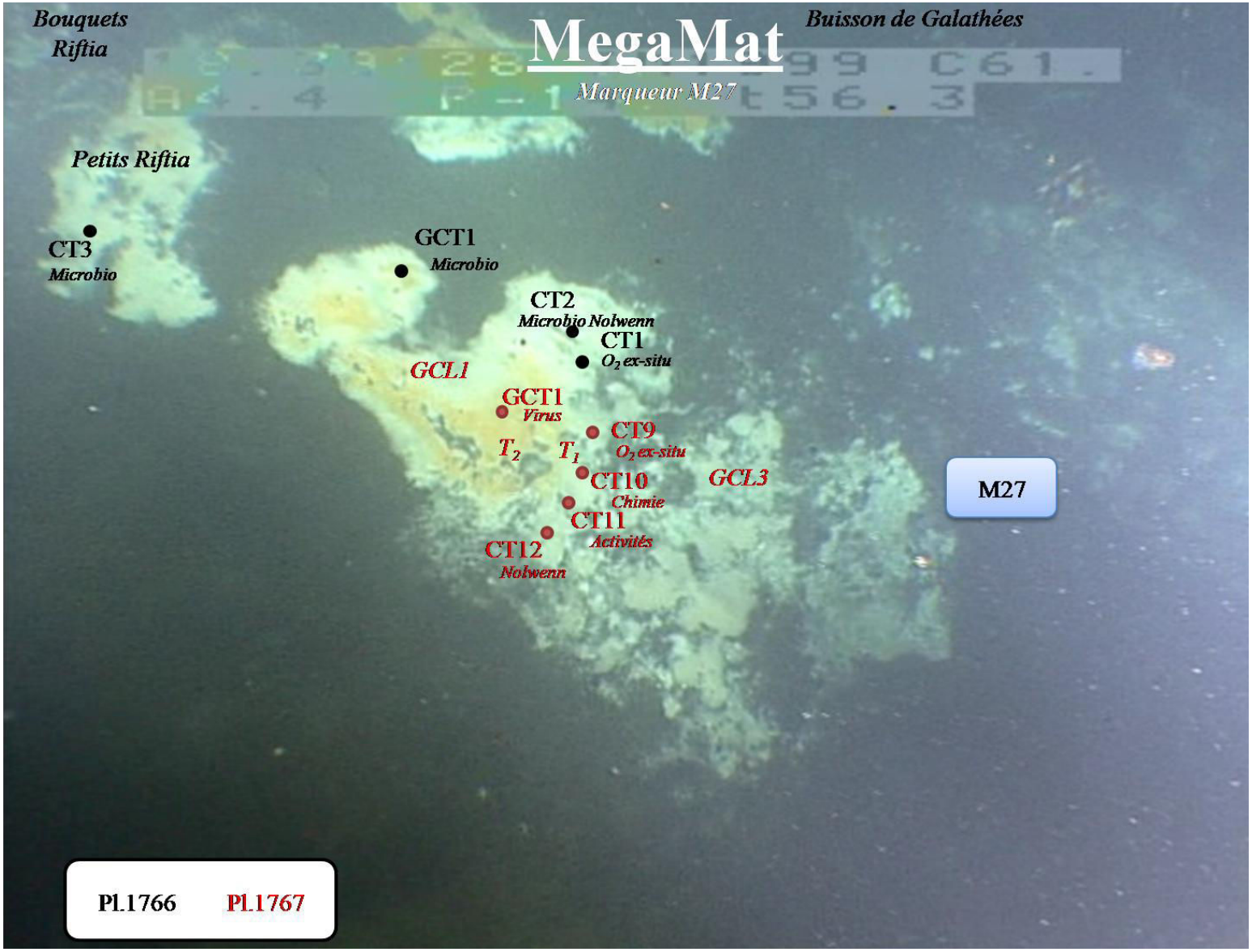


Figure 115 : Plan détaillé de l'échantillonnage sur le site Mega Mat M27. En noir, l'échantillonnage réalisé à la plongée 1766, en rouge celui réalisé à la plongée 1767. Abréviations : CT *Carottier Tube*, GCT *Grand Carottier* Tube, GCL *Grand Carottier Lame*, T *Sonde de température*. Le type d'études réalisées sur les carottiers tubes est indiqué en italique sous leurs labels.

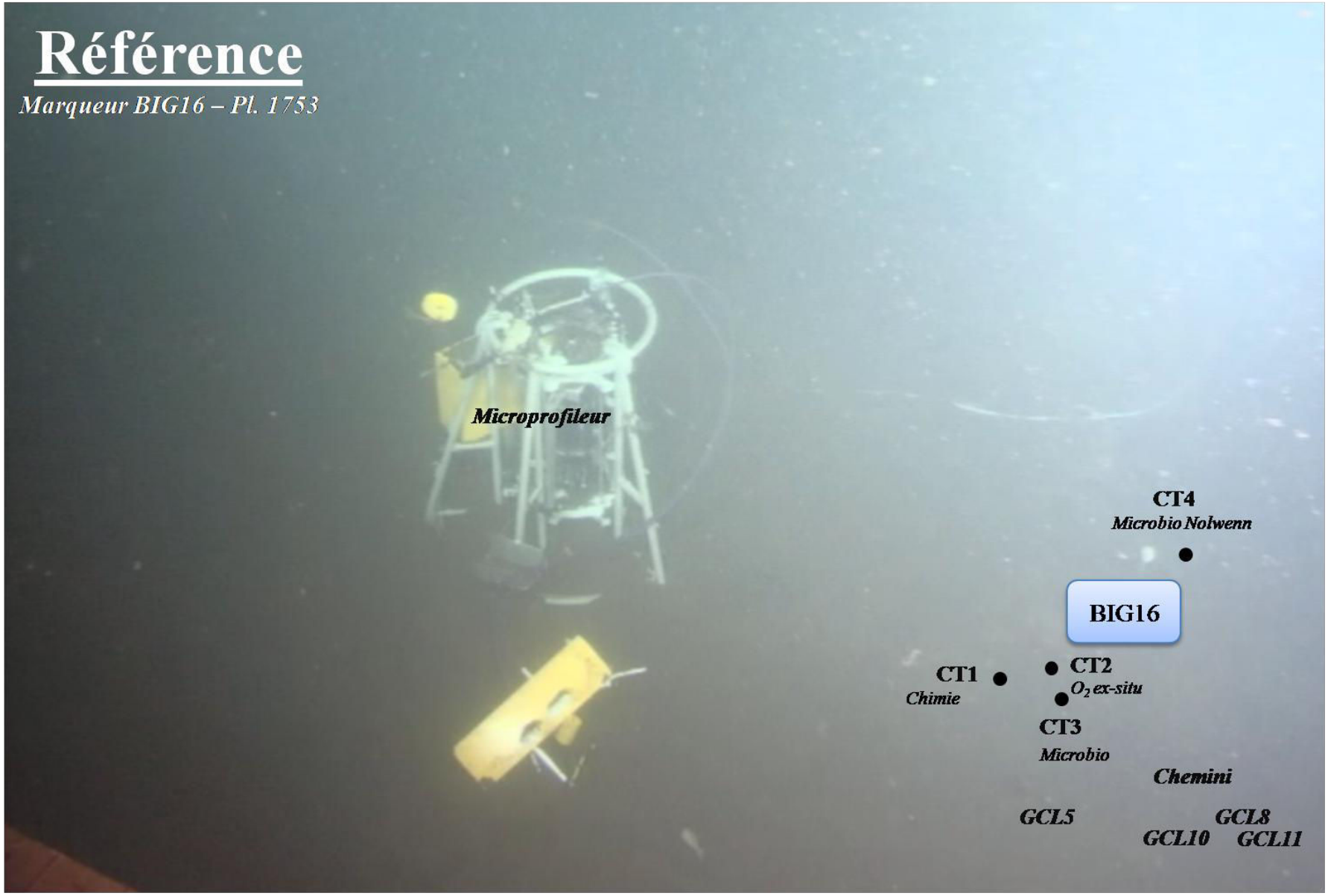


Figure 116 : Plan détaillé de l'échantillonnage sur le site de référence BIG16. Abréviations : CT *Carottier Tube*. Le type d'études réalisées sur les carottiers tubes est indiqué en italique sous leurs labels.

II. L'étude des différents habitats en surface des sédiments

Le but de cette thèse était d'étudier la composition et le rôle éventuel des communautés microbiennes sédimentaires en fonction des assemblages de surface. La première étape était donc de caractériser ces assemblages. Quatre grands habitats caractérisés par la présence d'une faune dominante ou de tapis microbiens ont été mis en évidence : l'habitat *bivalves vésicomyidés*, l'habitat *vers tubicoles siboglinidés*, l'habitat « *tapis gris* » et l'habitat *tapis microbiens*. Le but de cette étude était de caractériser ces colonisateurs dominants, les identifier, analyser leur distribution dans le bassin de Guaymas, connaître leur métabolisme et leur comportement de base et, dans le cas des vésicomyidés et des siboglinidés, étudier leurs symbiontes afin de rechercher leur présence éventuelle au niveau des sédiments. En raison des échantillons disponibles au laboratoire, l'étude des différents habitats de surface a principalement porté sur l'étude des vésicomyidés et de la symbiose associée. Cette étude a fait l'objet d'un article écrit en collaboration avec les biologistes du département.

1) Les bivalves vésicomyidés

Les bivalves vésicomyidés constituaient la macrofaune dominante de deux sites de la Marge de Sonora (Ayala et Vasconcelos) (Figure 100, Figure 103, Figure 104) et au niveau d'un site de Southern Trough (Morelos) (Figure 106). Les vésicomyidés ont ainsi été identifiés selon des critères morphologiques (Karine Olu, Carole Decker) puis cette identification a été complétée au laboratoire par une identification moléculaire basée sur la séquence du gène de la cytochrome oxidase I (Sophie Arnaud-Haond et Claire Papot). La répartition des différentes espèces de vésicomyidés a été analysée. Ainsi, chaque individu a été resitué *in situ* grâce aux plans détaillés réalisés notamment à partir des vidéos de plongées (Figure 108, Figure 111, Figure 112 et Figure 114). Les vidéos de plongées ont également permis de mettre en évidence certains points caractéristiques des sites comme par exemple, l'aspect du sédiment, la position des bivalves dans ce sédiment et la présence de traces de déplacement de vésicomyidés. En parallèle, la symbiose associée à ces bivalves a également été étudiée. Ainsi, les symbiontes ont été identifiés grâce au séquençage du gène codant l'ARNr 16S. Des gènes fonctionnels ont également été séquencés afin d'étudier leur métabolisme de base. L'hypothèse d'un stockage d'énergie sous forme de soufre élémentaire par les symbiontes des vésicomyidés a également été abordée. Enfin, ces symbiontes ont été localisés dans les branchies des bivalves à la loupe binoculaire, en microscopie à épifuorescence (FISH) et en microscopie électronique.

Article 1

Comparative study of vesicomyid-symbiont communities at cold seeps and hydrothermal vents of the Guaymas Basin

Perrine Cruaud, Carole Decker, Karine Olu, Sophie Arnaud-Haond, Claire Papot, Adrien Vigneron, Alexis Khripounoff, Nicolas Gayet, Anne Godfroy and Marie-Anne Cambon-Bonavita

Soumis au journal *Deep-Sea Research – Part I*

Comparative study of vesicomyid-symbiont communities at cold seeps and hydrothermal vents of the Guaymas Basin

Perrine Cruaud [1, 2, 3], Carole Decker [4], Karine Olu [4], Sophie Arnaud-Haond [4], Claire Papot [4], Adrien Vigneron[1, 2, 3], Alexis Khripounoff [4], Nicolas Gayet [4], Anne Godfroy[1, 2, 3], Marie-Anne Cambon-Bonavita[1, 2, 3]

[1]IFREMER, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, Technopôle Brest Iroise, Plouzané, France ; [2]Université de Bretagne Occidentale, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, Plouzané, France ; [3]CNRS, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, Technopôle Brest Iroise, Plouzané, France and [4]IFREMER, Laboratoire « Environnements Profonds », EEP-LEP, Technopôle Brest Iroise, Plouzané, France

Corresponding author : M.-A. Cambon-Bonavita (macambon@ifremer.fr)

Submitted to the journal *Deep-sea Research – Part I*

ABSTRACT: This study provides the first comparison of vesicomyid – symbiont communities in distinct but neighboring chemosynthetic-based ecosystems: cold seeps and hydrothermal vents. Such a comparative study was possible in the Guaymas Basin, where these two ecosystems occur few kilometers apart. Using a combination of morphological, molecular, FISH, microscopy and chemistry approaches, the vesicomyid bivalve species and their associated symbionts were characterized, as well as some dominant features of their ecophysiology. The results were analyzed under the light of some geological and chemical characteristics of each ecosystem. Greater diversity was found at cold seep areas, where three different species of vesicomyids *Phreagena soyoae* (syn. *kilmeri*), *Archivesica gigas* and *Calyptogena pacifica* were highlighted. *A. gigas* was the only species retrieved at the hydrothermal vent site. Molecular characterization of the symbiont targeting 16S rRNA, *aprA* and *cbbM* genes, confirmed i) the hypothesis of a predominantly vertical transmission of symbionts, leading to a typical co-evolution pattern, ii) symbiont autotrophic and thiotrophic metabolisms. The diversity of the detected vesicomyid species and the heterogeneity in their distribution among and within the sampled environments might reflect differential niche preferences, linked to various life characteristics for the vesicomyids, their symbionts, or both and possible competition between the different species. Thus, *A. gigas* was observed more buried in sediments than *P. soyoae*, and could access to more deeply buried sulfide. The occurrence of numerous traces of vesicomyid movements on sediments seemed to indicate that *A. gigas* might have a better ability to move. This species could more easily exploit transient and punctual sources of available sulfide than *P. soyoae.* Moreover we observed species variation in sulfur storage capacity, which highlighted a higher plasticity of *A. gigas* symbionts according to environmental conditions. This might allowed the colonization of both hydrothermal and cold seep sites by genetically close individuals of *A. gigas*.

KEY WORDS: Vesicomyid bivalves ; symbioses ; co-evolution ; species competition ; vesicomyid behaviour ; sulfur storage.

1. Introduction

Deep-sea hydrothermal vents and cold seeps are submarine springs, where reduced fluids emanate from the sea floor. Vent and seep ecosystems occur in a variety of geological settings throughout the global ocean and support complex food webs based on microbial chemoautotrophic primary production (Van Dover et al., 2002). Thereby, very large densities of faunal assemblages dominated by Vesicomyidae clams, Mytilidae mussels, Alvinocarididae shrimps and Siboglinidae tubeworms are associated with these emissions (Dubilier et al., 2008, Sibuet and Olu, 1998, Tunnicliffe, 1991).

Vesicomyid bivalves are important components of communities in sulfide-rich ecosystems such as cold seeps, hydrothermal vents and organic remains (Bennett et al., 1994, Krylova and Sahling, 2010, Sibuet and Olu, 1998, Tunnicliffe, 1991). They live partially buried in sediments or in small fissures of the oceanic crust (Arp et al., 1984). While vesicomyids exhibit reduced digestive tracts (Fiala-Médioni and Métivier, 1986), their gills are

hypertrophied and host large numbers of chemoautotroph sulfur-oxidizing symbiotic bacteria enclosed in specific cells, the bacteriocytes (Cavanaugh, 1983, Childress et al., 1991, Fiala-Médioni and Lepennec, 1989, Fisher, 1990). Most of the vesicomyid energy needs, for growth and metabolism, are supplied by these thiotrophic symbionts (Cavanaugh, 1983, Fiala-Médioni and Métivier, 1986). The symbionts can oxidize various sulfur compounds, such as sulfide, thiosulfate and elemental sulfur, to produce the energy used to fuel inorganic carbon reduction *via* Calvin-Benson cycle (Goffredi and Barry, 2002, Newton et al., 2008). In exchange of carbon substrates (Fisher et al., 1988, Stewart et al., 2005), the invertebrate host facilitates access to substrates required for symbiont metabolisms. Indeed, clam vascularized foot sinks in sediments to capture buried sulfide, while siphons bring oxygen from seawater (Arp et al., 1984). There are strong arguments in favor of an obligatory symbiosis for both partners. Symbionts are mainly maternally transmitted *via* eggs (Cary and Giovannoni, 1993, Endow and Ohta, 1990), leading to a typical co-evolution pattern highlighted in several studies (Peek et al., 1998, Stewart, 2008). It should be noted however, that in some instances, multi-locus sequence typing, phylogeny and *in situ* hybridization highlighted several horizontal transfer events during the course of evolution of vesicomyids and their associated symbionts (Decker et al., 2013, Stewart, 2008).

Previous investigations on vesicomyid clams have attempted to explain their distribution by the sediment chemical composition, particularly in terms of hydrogen sulfide, and water depth (Barry et al., 1997, Hashimoto et al., 1995, Krylova and Sahling, 2010, Sahling et al., 2002, Von Cosel and Olu, 2009, Watanabe et al., 2013). However, no attempt was made so far to compare the influence of chemical properties at cold seeps *versus* hydrothermal vents in places where geographical distance between those environments might be a non-influential factor.

The Guaymas Basin is an active seafloor-spreading area, located in the center of the Gulf of California (27°N, 11.5°W) (Otero et al., 2003), where both active hydrothermal vents and hydrocarbon seeps are present nearby each other in the absence of physical barrier (Figure 1) (Otero et al., 2003, Simoneit et al., 1990, Vigneron et al., 2013). Thereby, the Guaymas Basin is an ideal area for a comparative study between these chemosynthetic habitats. This Basin exhibits a very high sedimentary rate (2.7 mm per year) and is overlaid by 400-500 m of sediments (Simoneit et al., 1990). The high-temperature and hydrocarbon-rich hydrothermal vents are located in the Southern Trough (Otero et al., 2003, Simoneit et al., 1990). Close to hydrothermal vent area, cold seeps are located at the transform fault that crops out along the continental slope on the Sonora Margin (Paull et al., 2007, Simoneit et al., 1990). These two types of ecosystems both release hydrocarbon- and sulfide-rich fluids, fueling dense colonies of chemosynthetic organisms. The diffusion of these fluids throughout the Southern Trough and the Sonora Margin sediments leads to different faunal assemblages including microbial mats, vesicomyid clam fields and siboglinid tubeworm bushes (Peek et al., 1997, Ruelas-Inzunza et al., 2003, Simoneit et al., 1990, Soto, 2009, Teske et al., 2002, Vigneron et al., 2013). Previous studies showed that different species of Vesicomyidae occurred in the Guaymas Basin. *Archivesica gigas* Dall, 1895 (Krylova and Sahling, 2010) and the species complex *Calyptogena pacifica* Dall, 1891 / *Calyptogena lepta* Dall 1896 (Audzijonyte et al., 2012, Goffredi et al., 2003, Krylova and Sahling, 2010) were reported from the Southern Trough hydrothermal vent area (Grassle, 1986, Peek et al., 1997, Ruelas-Inzunza et al., 2003, Soto, 2009). *A. gigas, C. pacifica* and *Phreagena soyoae* (syn. *kilmeri*) Bernard, 1974 (Audzijonyte et al., 2012, Krylova and Sahling, 2010) were sampled in the cold seep area (Audzijonyte et al., 2012, Peek et al., 1997, Simoneit et al., 1990). However these studies were based on few discrete samples and no comparative study on symbiont and vesicomyid distribution between cold seeps and hydrothermal vents was conducted.

Here, we propose to compare vesicomyid – associated symbiont communities at cold seeps sites and hydrothermal vents in the Guaymas Basin. We tested the hypotheses of i) a differential colonization of these environments by distinct vesicomyid species, ii) the occurrence of contemporary exchanges among neighboring seeps and vents within the Basin. We also tested some hypotheses that could explain the distribution of vesicomyid species: i) the occurrence or not of various bacterial symbionts according to the colonized site, ii) the existence of several symbiont metabolisms or plasticity and iii) a variability between host behaviour to be adapted to specific environmental niches. To address these questions, morphological and molecular identification of vesicomyids was performed in parallel with molecular characterization of symbiont lineages and microscopic analyses of both host and symbionts. The results were analyzed in relation with the visual and geochemical characterization of habitats and sites.

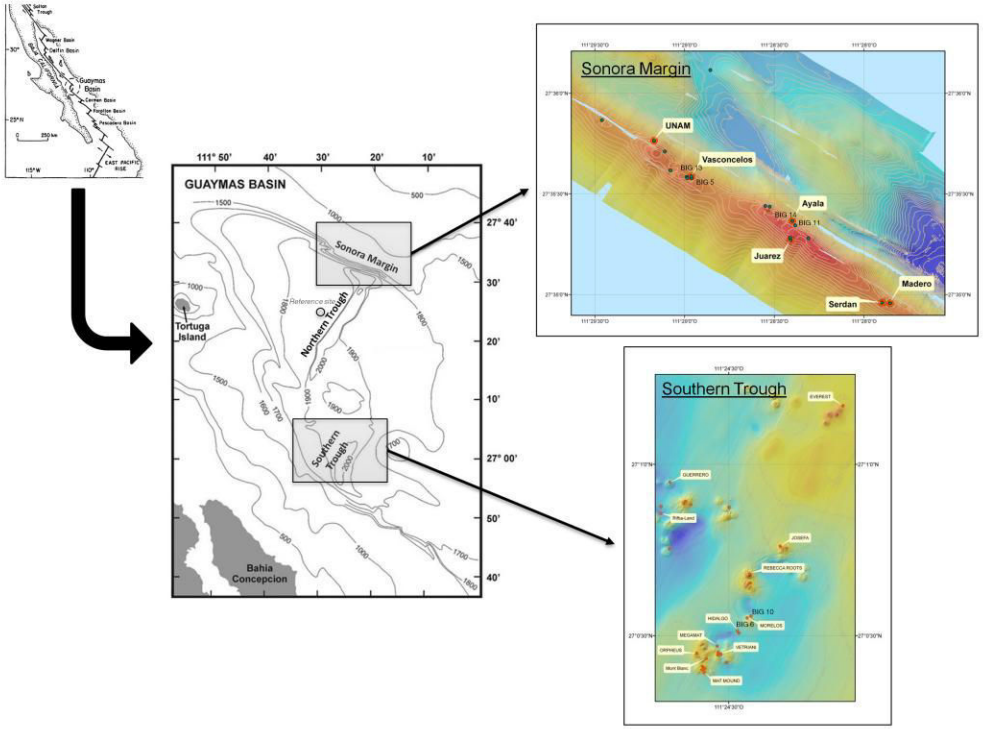


Figure 1 : Map of the Guaymas Basin (adapted from Otero et al., 2003 and Simoneit et al, 1990) and localization of sampling sites

2. Materials and Methods

2.1. Sampling and storage

A total of 208 vesicomyid clams were collected in June 2010 in the Guaymas Basin with the manned submersible Nautile during the "BIG" cruise. Two areas were explored: cold seeps at the Sonora Margin and hydrothermal vents at Southern Trough, located 60 km apart. The sampling sites were selected from an AUV-mounted multibeam survey resulting in an accurate microbathymetry and gas plume record from the RV *l'Atalante* multibeam, followed by visual exploration with the Nautile of potential active sites (Ondreas et al., unp.). Among the surveyed and sampled sites, Ayala (27°35.5796N; 111°28.9879W), Vasconcelos (27°35.5887N; 111°28.9663W) in cold seeps area (1 km apart) and Morelos (27°00.5484N; 111°24.4219W) in hydrothermal vents area, showed the highest populations of vesicomyids, gathering several species, and seemed to be each visually dominated by one species, different according to the cold seep sites. A reference site (27°25.4766N; 111°30.0660W) outside of the active area was also explored in order to compare geochemical features between active and inactive areas (Figure 1 and Table 1).

Site name		Localisation	Depth	Type of environment	Sediment texture	Sulfate	Sulfide	Sampled species		
								P. soyoae (syn. *kilmeri*)	*C. pacifica*	*A. gigas*
Ayala	BIG14	27°35.5796N; 111°28.9879W	1560 m	seep	granular	Constant *(28 mM)*	Not detected	62 / 78 *81%*	10 / 78 *13%*	6 / 78 *6%*
Vasconcelos	BIG13	27°35.5887N; 111°28.9663W	1570 m	seep	soft and liquid	Constant *(28 mM)*	Not detected	1 / 44 *2%*	-	43 / 44 *98%*
	BIG 5	27°35.5780N; 111°28.9555W	1575 m	seep	soft and carbonate rich	Decrease with depth *(11.5 mM at 15 cmbsf)*	Increase with detph after 4 cmbsf *(10.85 mM at 15 cmbsf)*	9 / 12 *75%*	3 / 12 *25%*	-
Morelos	BIG 6	27°00.5484N; 111°24.4219W	2007 m	vent	soft and liquid	Decrease with depth after 5 cmbsf *(18.5 mM at 15 cmbsf)*	Increase with detph after 5 cmbsf *(9.85 mM at 15 cmbsf)*	-	-	74 / 74 *100%*

Table 1 : Overview of some site features: localization, depth, type of environment, main chemical features and sampled species

208 vesicomyid clams were collected using nets or with sediments using blade cores. Upon recovery, clams were washed with 0.2 µm filtered seawater and morphologically identified on board. A total of 130 vesicomyid clams were dissected. Parts of gills and adductor muscles were frozen in liquid nitrogen and stored in the lab at -80°C for molecular identification of bivalves and symbionts, and estimation of sulfur contents. The most anterior part of the gills were fixed for FISH analyses as described in Duperron et al., 2005 (Duperron et al., 2005).

Sediment push core samples were collected on each habitat for porewater analyses (Cathalot et al., unp.) (Table 1). Temperature measurements were also performed in surface sediments using an independent thermal lance T-Rov (NKE, Electronics, France) for cold seep habitats or using the temperature sensor of the submersible for hydrothermal vent.

2.2. DNA extraction

A total of 119 vesicomyid clams were used for molecular species identification (43 from Ayala site, 34 from Vasconcelos site and 42 from Morelos site). For vesicomyid identification, total DNA was extracted from a piece of adductor muscle following the protocol by Doyle (Doyle, 1987). A total of 12 vesicomyid clams were used for symbiont characterization with 2 specimens per site and per identified vesicomyid species. For symbiont characterization, DNA was extracted from gill samples, previously pounded with a sterile mortar for bacterial analyses, using a CTAB extraction method (Zhou et al., 1996). Total DNAs were purified using Wizard® DNA Clean-Up System (Promega, USA). All DNAs were stored at -20°C until use for PCR.

2.3. PCR amplification and sequencing for vesicomyid identification

The mitochondrial cytochrome c oxidase I (*COI*) standard barcode fragment was amplified using universal (LCOI1490 and HCOI2198 (Folmer et al., 1994)) and vesicomyid-specific (VesLCO and VesHCO (Peek et al., 1997)) primers. PCR amplifications were performed using the following reagents in a 50 µl reaction volume: 1X Taq DNA polymerase buffer (Promega, USA), 2.5 mM of $MgCl_2$, 0.20 mM of dNTPs, 0.6 mM of

each primer, 0.5 U of Taq DNA polymerase (Promega, USA) and 5 µl of purified DNA diluted by 10 to 100 depending on the concentration of DNA extract as quantified through a NanoDropTM 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Willington, USA). The PCR program involved an initial denaturation step at 94°C for 90 s, followed by 35 cycles of incubation at 94°C for 30 s, 45°C for 60 s, 72°C for 75 s and a final extension at 72°C for 10 min. PCR products were sent to GATC Biotech (Constance, Germany) for sequencing.

Sequences were processed using Geneious software (v.4.6. created by Biomatters. Available from http://www.geneious.com/). After cleaning of sequences or portions containing too many uncertainties, both strands for each overlapping fragment were assembled. Alignment was performed using MAFFT 6.903 (Katoh et al., 2005) and translated to amino acids to detect frameshift mutations and premature stop codons, which may indicate the presence of pseudogenes or sequencing errors. Divergent haplotypes were deposited in GenBank under accession numbers KF953548-KF953666. BLAST were also performed through the dedicated Geneious plugin in order to ascertain molecular species identity (Altschul et al., 1990). COI sequences from close relatives were uploaded and included in phylogenetic analyses.

2.4. PCR amplification and sequencing for symbiont characterization

According to the results of vesicomyid identifications, 2 specimens per site and per vesicomyid species were used for symbiont characterization. Using a polymorphic strategy, three different genes were amplified: the 16S rRNA gene and two functional genes, the adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase (*aprA*) and the form II of the ribulose-1, 5- biphosphate (RuBP) carboxylase/oxygenase (*cbbM*). As sulfite can be oxidized to sulfate by APS reductase, the presence of this enzyme is considered as an indication for a potential thiotrophic metabolism (Fisher, 1990, Goffredi and Barry, 2002, Peck Jr, 1974, Powell and Somero, 1985). RuBisCO is a key enzyme in Calvin cycle and is generally looked as indicator of autotrophic metabolism in such symbionts (Badger and Bek, 2008, Kato et al., 2012, Tabita et al., 2008).

Amplifications of the 16S rRNA were performed using a bacterial universal primer pair: E338F (5'ACT CCT ACG GGA GGC AGC -3') and 1407R (5'-GAC GGG CGG TGW GTR CAA-3') under the following conditions: 5 min at 95°C, then 30 cycles including 1 min at 95°C, 1 min 30 at 54°C and 2 min at 72°C and a final step of 6 min at 72°C. *AprA* was amplified using AprA-1-FW (5' -TGG CAG ATC ATG ATY MAY GG -3') and AprA-5-RV (5'- GCG CCA ACY GGR CCR TA -3') (Meyer and Kuever, 2007) under the following conditions: 5 min at 95°C, then 30 cycles including 30 s at 95°C, 45 s at 58°C and 45 s at 72°C and a final step of 6 min at 72°C. *CbbM* was amplified using: cbbM343F (5'- GGY AAY AAC CAR GGY ATG GG -3') and cbbM1226R (5'- CGY ARB GCR TTC ATR CCR CC -3') (Kato et al., 2012) under the following conditions: 5 min at 95°C, then 30 cycles including 1 min at 95°C, 2 min at 50°C and 2 min at 72°C and a final step of 6 min at 72°C.

PCR amplifications were performed in triplicate using the following reagents in a 25 µL reaction volume: 1X Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega, USA), 2 mM of $MgCl_2$ (Promega, USA), 0.2 µM of each primer (Eurogentec, Liège, Belgium), 0.4 mM of dNTP mix, 2.5U of GoTaq polymerase (Promega, USA) and 1 µL purified DNA template. The final volume was adjusted to 25 µL with sterile water. PCRs were performed using a GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Forster City, CA). PCR products were pooled and purified on TAE agarose gel (1.2%) and using PCR clean-up Gel extraction Nucleospin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Purified PCR products were cloned using the TOPO®XL PCR Cloning Kit (Invitrogen, Life technologies, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. After plating, positive colonies were screened by PCR amplification of inserts using flanking universal vector primers M13F and M13R.

Amplicons were sequenced using ABI3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using M13 universal primers by GATC Biotech (Constance, Germany). A total of 248 amplicons were obtained for the 16S rRNA gene (120 clones for *P. soyoae*, 64 for *A. gigas* and 64 for *C. pacifica*), 96 for the *cbbM* gene (32 clones for each vesicomyid species) and 66 for the *aprA* gene (22 clones for each vesicomyid species).

Sequences were corrected using Bioedit v.7.1 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA) to remove vector and primer sequences. Alignments were performed using MAFFT 6.903 (Katoh et al., 2005) and protein-coding genes were translated to amino acids to detect frameshift mutations and premature stop codons, which may indicate the presence of pseudogenes or sequencing errors. Divergent sequences for each gene were deposited in European Molecular Biology Laboratory (EMBL) nucleotide sequence database under accession numbers HG513073 - HG513078 for the 16S, HG513079 – HG513084 for the *aprA* and HG513085 – HG513090 for the *cbbM*. Sequences were compared to the GenBank, EMBL and DDBJ databases, using the NCBI Blast search program (Altschul et al., 1990). Several Blast hits from close relatives were uploaded and included in phylogenetic analyses.

2.5. Phylogenetic analyses

Phylogenetic trees from each individual gene were estimated using distance (Neighbor-joining) and maximum likelihood (ML) methods. Pairwise nucleotide sequence divergences were calculated using a Kimura-2-parameter model of substitution (Kimura, 1980) for 16S rRNA and functional genes. Neighbor-Joining trees (Saitou and Nei, 1987) were reconstructed using MEGA 4.0.2 (Tamura et al., 2007). Topological robustness was assessed by bootstrap procedures using 1000 replicates (Felsenstein, 1985). ML analyses were performed with the MPI-parallelized RAxML 7.2.8 (Stamatakis, 2006), using a GTR model with among site rate variation modeled by a discrete gamma approximation with four categories. GTRCAT approximation of models was used for ML bootstrapping (1000 replicates). ML analyses were conducted on the CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010).

2.6. Microscopy

In situ hybridization analyses were performed in order to locate symbiont cells and confirm our molecular results. A total of 18 samples stored for FISH were embedded in polyethylene glycol distearate-1-hexadecanol (9:1) blocks (Sigma, St. Louis, MO) after being dehydrated and soaked (water-ethanol and the ethanol-resin series at 37°C) (Duperron et al., 2007). Different cut thicknesses have been tested between 4 µm and 12 µm. Blocks were cut into 6 µm sections using RM 2165 microtome (Reichert-Jung, Germany). Resin was eliminated in ethanol and rehydrated sections were hybridized in a reaction mix containing 0.5 µM of each probe in a formamide hybridization buffer [0.9M NaCl, 0.02M Tris-HCl, 0.01% sodium dodecyl sulphate (SDS), X% deionized formamide] for 3 h at 46°C. Sections were washed at 48°C for 15 min in a washing buffer (0.102 M NaCl, 0.02 M Tris-HCl, 0.004 M EDTA, 0.01% SDS) and rinsed briefly with sterile water. Sections were covered with Slow Fade® Gold antifading reagent containing 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen, Life technologies, CA, USA), and a cover slip. Universal probe Eub338 (Amann et al., 1990) and newly designed specific probes were used for FISH. Three different 16S rRNA probes were designed according to our 16S rRNA clone sequences, one for each species (*P. soyoae* 5'-GTA CCC CCC CCA ACG GCT-3', *A. gigas* 5'-GTA ACC CCC CCA ACG GCT-3', *C. pacifica* 5'-GTA ACC CCC TCA ACG ACT-3'). A negative control without any probe was used for each condition and host species. Each specific probe was evaluated on each vesicomyid species. The formamide concentrations in hybridization buffer were evaluated with concentrations series at 0, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70 and 80% formamide for each specific probe for best hybridization and specificity. A total of 10 pictures per conditions were taken and analyzed with DAIME software (Daims et al., 2006). A percentage of 35% formamide was chosen for *C. pacifica*. However, none of these formamide concentrations were stringent enough to have specific hybridization between probes and samples *P. soyoae* and *A.gigas* even with the use of other probe as competitor. These probes did not hybridize with *C. pacifica* samples. A concentration of 35% formamide was chosen for these probes. Observations were performed with a Zeiss Imager Z2 microscope (Zeiss, Göttingen, Germany) and with an Axio Zoom V16 (Zeiss, Göttigen, Germany) both equipped with the slider module ApoTome (Zeiss), the Colibri light technology (Zeiss) and using an AxioCam MRm camera (Zeiss). Epifluorescence acquisitions were treated using the AxioVison or ZEN softwares (Zeiss).

The samples fixed for FISH were also used for binocular microscopy observations and for scanning electron microscopy. Samples for binocular microscopy observations were cut with a razor blade into 1 mm slice. Observations were performed using an Olympus SZX16 (Olympus, Japan) and visible light acquisitions

were performed with a high-resolution USB 2.0 Digital Color Camera Model GO-3-CLR-10 (QImaging®, Canada) and treated using QCapture Pro 6.0 software (QImaging®, Canada).

Afterwards, samples for SEM were dehydrated by ethanol series and dessicated with hexamethyldisilazane (Sigma) for 45 min and 1 h 30 in a critical-point dryer CPD 300 (Leica, Germany). Further samples were metalized with gold and palladium (60/40) using a high resolution Sputter Coater (Quorum Technologies, Guelph, Canada). SEM observations and imaging were performed using a FEI Quanta 200 MK2 microscope (FEI, Oregon, USA) and microanalyses of sulfur granules were performed with EDX spectrometer (Oxford instruments, Abingdon, UK).

2.7. Measurement of gill sulfur contents

Sulfur concentrations were measured on five *P. soyaoe* (syn. *kilmeri)* and five *A. gigas* gill samples per site. *C. pacifica* could not be studied due to the lack of sample for this species. Gills were lyophilized and then homogenized by mortar and pestle. Samples were stored at room temperature in a dessicator until analysis. The determinations of sulfur contents in gills were performed using a CS125 Carbon/Sulfur Determinator (LEICO Corporation, Michigan, USA). Sulfur contents between host species were compared and statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis non-parametric test (Kruskal and Wallis, 1952). A Mann-Whitney-Wilcoxon test (Mann and Whitney, 1947, Wilcoxon, 1945) was used to compare specific differences among groups when Kruskal-Wallis indicated a significant difference. Data were analyzed using the R software (R Development Core Team, 2011).

3. Results

3.1. Site description and sample collection

The Ayala seep site is located in a newly explored area at about 1560 m depth and spotted with two permanent markers (labeled BIG14 and BIG11, Figure 1, Table 1). This site between both markers was covered by many small, compact and scattered vesicomyid aggregates distributed on an area of about 15 by 20 meters along a gentle slope on the northeast flank of the ridge (Figure 2A). Massive concretions of more than one meter high were identified along the southwest boarder of the site. Sediments were soft but grainy. Vesicomyids with visible short siphons were slightly buried in the sediments (Figure 2A).

The Vasconcelos seep site is located 1 km northwest from the Ayala site at about 1570 m depth and also labeled in two places (BIG13 and BIG5 about 10 m apart, Figure 1, Table 1). The areas spotted with these two markers exhibited clearly different visual features. The main difference with the Ayala site was that vesicomyid beds were distributed only few meters around microbial mats (Figure 2B and 2C). Sediments were fine and seemed softer than Ayala sediments. Concretions were rarer at BIG13 than at BIG5. While they appeared half-buried and formed compact aggregates at BIG5 area (Figure 2C), vesicomyids were sparsely distributed and almost entirely buried into sediments at BIG13 (Figure 2D), most of them having only their siphons out. Many V-shaped trails were observed at BIG13 area probably indicating clam travels (Figure 2B) (MacDonald et al., 1990, Rosman et al., 1987), while no trails were observed at BIG5 area (Figure 2C). Hereafter BIG5 and BIG13 are treated separately.

Finally, the hydrothermal Morelos site is located 60 km apart at 2007 m depth (BIG6 and BIG10 markers) (Figure 1, Table 1). This site was characterized by a large area of sediments covered by a thin white layer, surrounded by small gastropods. A small crack emitting shimmering water was observed at the center of the patch suggesting hydrothermal fluid percolation. The boundary of white area harbored sparse, dead or alive vesicomyids all surrounding BIG10. Vesicomyids were also buried. Like at Vasconcelos BIG13 site, many trails were observed on sediments suggesting clam movements (Figure 2D).

Measured temperatures were nearly identical (3°C) at the sediment surface around vesicomyids on both environments. They were constant with depth in cold seep sites but showed increase from 3°C to 9.8°C at 30 cmbsf at the hydrothermal Morelos site.

A total of 208 vesicomyids were collected on these sites: 78 from Ayala site, 56 from Vasconcelos site (44 from BIG13 and 12 from BIG5) and 74 from Morelos site.

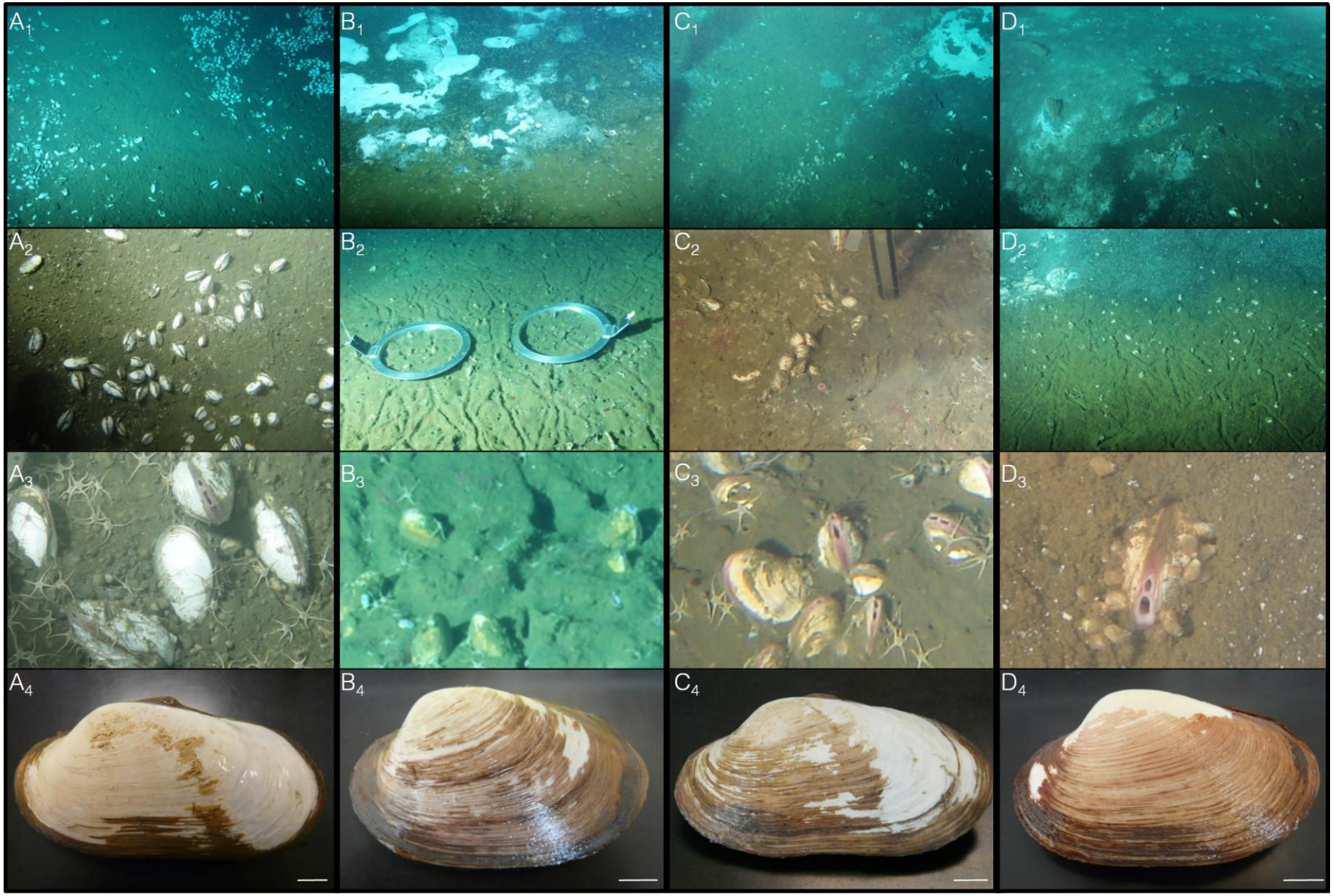


Figure 2 : Pictures of sampling sites : Ayala (A), Vasconcelos BIG13 (B), Vasconcelos BIG5(C) and Morelos (D), and dominant vesicomyid species (A4, B4, C4 and D4). Scale bare = 1 cm

3.2. Vesicomyids species identification

As previously recommended (Audzijonyte et al., 2012, Decker et al., 2012, Goffredi et al., 2003, Peek et al., 1997, Vrijenhoek et al., 1994), both morphological and molecular characterizations of vesicomyid species were performed to ascertain species identity. To the exception of too small specimens (about 5%) that could not be accurately identified through morphology, molecular and morphological approaches delivered congruent taxonomic identifications leading to the recognition of three distinct vesicomyid species (Table 1): *Phreagena soyoae*, *Calyptogena pacifica* and *Archivesica gigas*. At the exception of *C. pacifica* (intra-specific COI divergence = 0.2%), no intraspecific diversity was detected (Figure 3) as all specimens shared the same haplotype on 483 bp. Genetic distances were 8.4% between *P. soyoae* and *A. gigas*, 11.6% / 11.4% between *A. gigas* and *C. pacifica* and 11.8% / 12.2% between *P. soyoae* and *C. pacifica*. Neighbor-joining and maximum likelihood trees obtained for our dataset increasing with sequences previously published in other studies were similar (Figure 3). All our sequences strongly clustered with Genbank sequences obtained from conspecific individuals, which confirmed our identifications.

Species distribution varied among sites. At the Sonora Margin, the three vesicomyid species were sampled with a dominance of *P. soyoae* at Ayala (79%) and Vasconcelos BIG5 seep sites (75%). *A. gigas* was rare at Ayala (8%) whereas it was the dominant species at Vasconcelos BIG13 seep site (98%) (Table 1). Few individuals of *C. pacifica* were sampled at Ayala and Vasconcelos BIG5 seep sites (13% and 25% respectively). *A. gigas* was the only species sampled at Morelos vent site (Southern Trough).

3.3. Symbiont characterization

Symbiont associated with each vesicomyid species were characterized using molecular analyses of i) 16S rRNA gene, ii) *aprA* gene encoding for a key enzyme catalyzing sulfide oxidation (APS reductase), and iii) *cbbM* gene encoding for a key enzyme of the Calvin cycle (RuBisCO).

Topologies of neighbor-joining and maximum likelihood trees obtained for the increased 16S rRNA dataset were similar (Figure 3). Each host species harbored only one specific symbiont belonging to the *Gammaproteobacteria* subdivision (Figure 3). Genetic distances were very low between these three groups of symbionts (0.6% between *P. soyoae* and *A. gigas*, 2.4% between *A. gigas* and *C. pacifica* and 2.2% between *P. soyoae* and *C. pacifica*) (Figure 3).

AprA and *cbbM* partial sequences were translated into amino acids and encoded putative functional proteins (single ORF). Unfortunately, available sequences on Genbank were too scarce to construct larger phylogenetic trees. Phylogenetic analyses (ML and NJ) highlighted three different groups of closely related sequences corresponding to the three previously identified groups for hosts and symbionts (Figure 3). No difference was found between sequences from vents and seeps for *A. gigas*. For the *aprA* and *cbbM* genes respectively, interspecific nucleotide divergences were 3.7% and 3.5 % between *P. soyoae* and *A. gigas*, 9.2% and 13.6% between *A. gigas* and *C. pacifica* and 8.3% and 15.1 % between *P. soyoae* and *C. pacifica.*

3.4. Morphological analysis and microscopy

In order to study symbiont localization in gills and to confirm specificity between symbiont and host, we used combined approaches: binocular microscopy, Scanning Electron Microscopy (SEM) and Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH).

Each observed gill harbored lamella in the periphery, where ciliated cells were detected (Figure 4A, 5A, B, C, and E), and interlamellar septa, where bacteriocytes containing symbionts were observed (Figure 4A, 5A, B, C and D). Binocular microscope observations of dissected gills showed some white minerals at interlamellar septa (Figure 4A, 5A, B, C and D). These minerals were absent from the lamella (Figure 4A, 5A, B, C and E). They were not visible on SEM surface relief views and seemed to be embedded into gill tissue. Minerals were isolated by dissection under a binocular microscope and analyzed with SEM. SEM microanalyses on various backgrounds (aluminium, copper) allowed to identify them as being sulfur (data not shown).

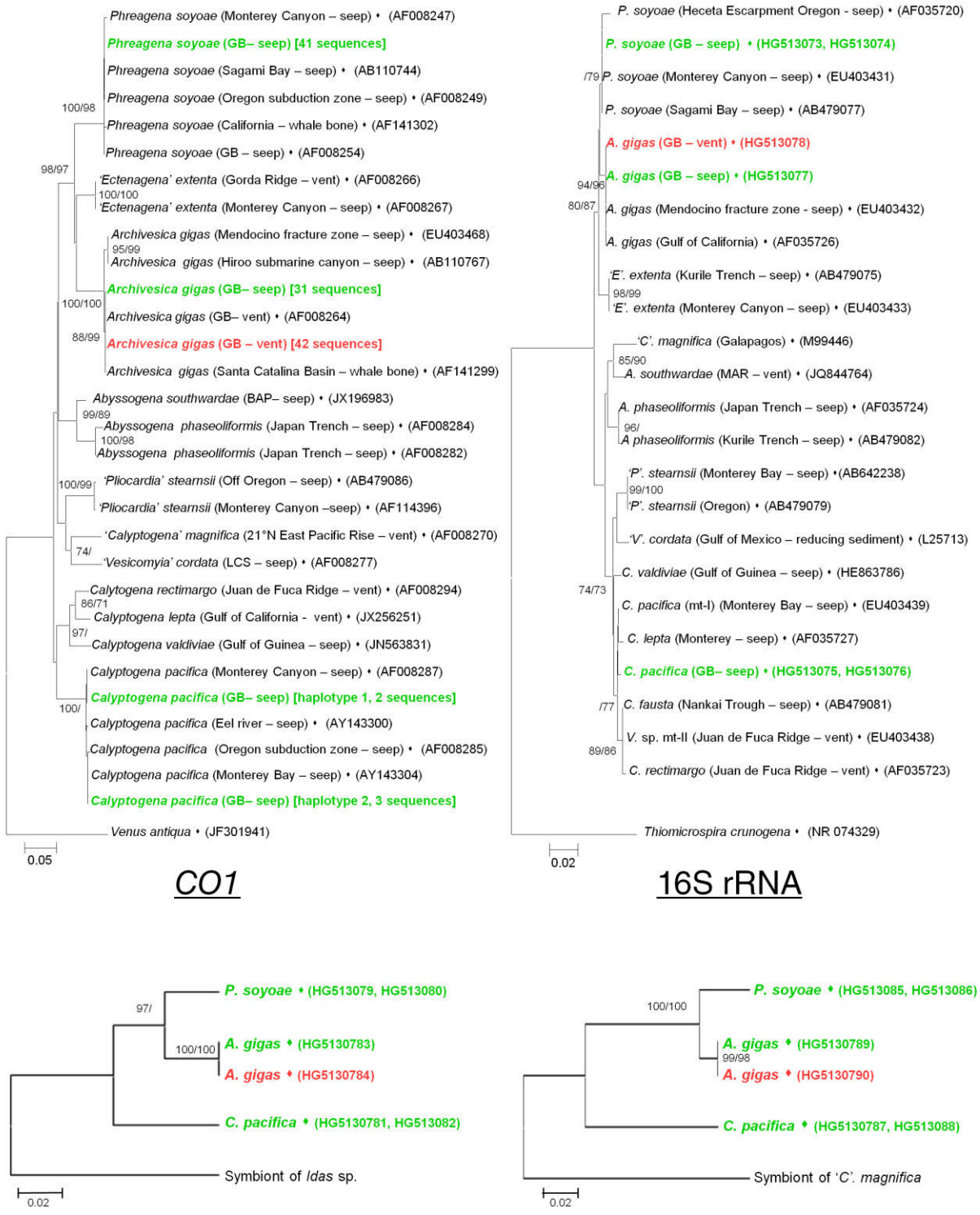


Figure 3 : Neighbor-Joining (NJ) phylogenic trees based on i) mitochondrial cytochrome c oxidase I (COI) from vesicomyids (our + Genbank sequences), ii) 16S rRNA (our + Genbank sequences), iii) aprA and iv) cbbM sequences from symbionts. For each data set, the maximum likelihood (ML) topologies were similar. Bootstrap supports (> 70) obtained for NJ / ML analyses are reported at nodes (1000 replicates). Sequences from this study are highlighted in bold green for cold seep areas and bold red for hydrothermal vent area. Abbreviations : GB Guaymas Basin, BAP Barbados Accretionary Prism, LCS Louisiana Continental Slope, MAR Mid-Atlantic Ridge

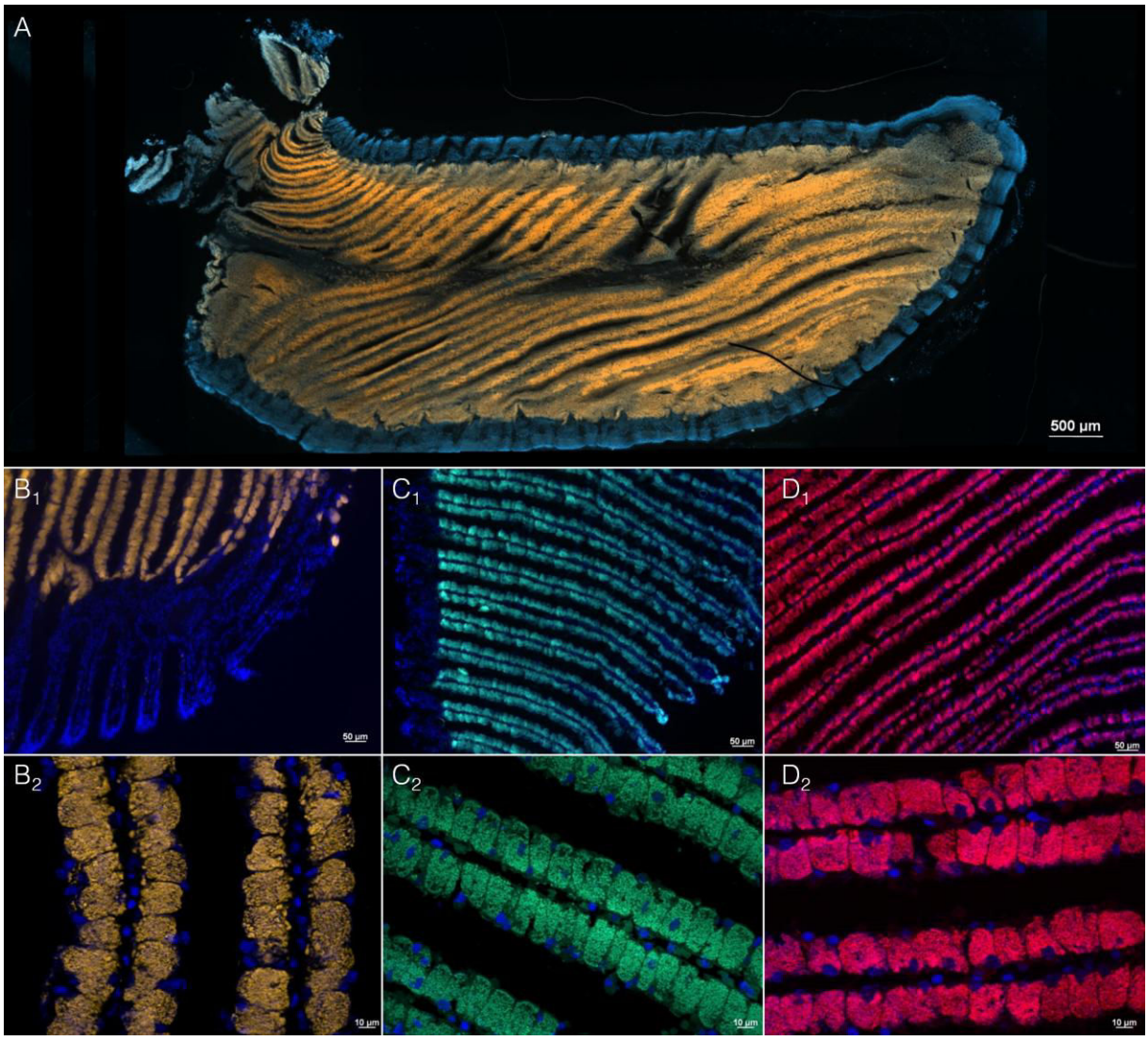


Figure 4 : Fluorescence in situ hybridization (FISH) of symbiotic bacteria on transverse sections of vesicomyid gills at different magnifications. (A) Wide view of vesicomyid gill with symbionts hybridized with universal probe (in orange) in the center and lamella cells DAPI staining (in blue) at the periphery. Scale bare = 500 µm. (B), (C) and (D) Gill sections at larger magnification with symbionts hybridized with specific probe, P. soyoae (A and B), C. pacifica (C) and A. gigas (D). Transitions between lamella area at the periphery (in blue) and septa area (in orange and green) are presented on (B1) and (C1). (B1), (C1) and (D1) Scale bare = 50 µm. (B2), (C2) and (D2) Scale bare = 10 µm.

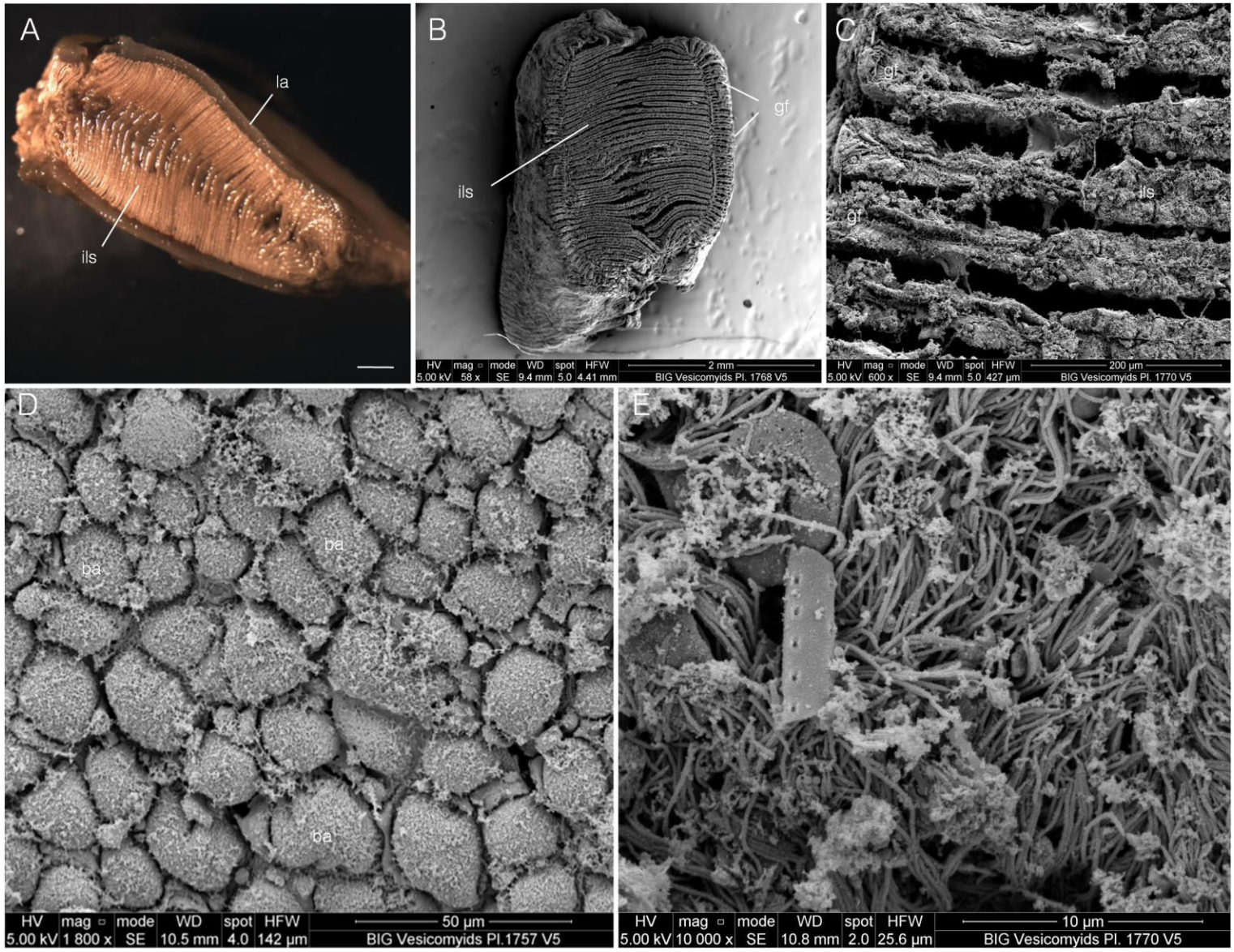


Figure 5 : (A) Picture of gill transverse section fixed for FISH (binocular microscope). Scale bare = 1 mm. (B), (C), (D) and (E) SEM views of gill sections. (B) Wide view of a gill section. (C) View of the lamella zone with ciliated cells on the left and bacteriocytes on the right. (D) View of bacteriocytes on interlamella septum. (E) View of cilia in the lamella area. la, lamella ; ils, interlamellar septum ; gf,gill filament ; ba, bacteriocytes

FISH observations showed that all cells hybridized with the universal probe. Each cell also hybridized with only one specific probe per host, designed for each identified symbiont lineage. Thus, *C. pacifica* symbiont probe hybridized only in *C. pacifica* gill cells but never in gill cells of any other vesicomyid species (Figure 4C). Unfortunately, 16S rRNA sequences from *P. soyoae* and *A. gigas* symbionts were too close to observe specific hybridization.

3.5. Measurement of gill sulfur contents:

Gill sulfur contents were measured in the dominant species for each site. The sulfur contents in the gills include not only elemental sulfur but all the non-volatile sulfur forms (sulfate, sulfite, elemental sulfur…). Previous studies showing a low level of other sulfide oxidation products in most of symbioses (Childress et al., 1991, Goffredi and Barry, 2002), our sulfur measurements probably reflect the elemental sulfur content. At Ayala site, sulfur contents of *P. soyoae* gill averaged 10.1%, while it averaged 12.7% at Vasconcelos BIG5 site. At Vasconcelos BIG13 site, sulfur content of *A. gigas* averaged 19.4%, while it averaged 13.4% at Morelos site with a larger standard deviation (Figure 6). Sulfur contents of *A. gigas* were significantly higher than *P. soyoae* (p-value < 0.05). Detailed results are presented in Figure 6.

Sample	Identification	Site	Sulfur (%)
1A	*P. soyoae*	Ayala	13,5
1B	*P. soyoae*	Ayala	7,0
1C	*P. soyoae*	Ayala	9,4
1D	*P. soyoae*	Ayala	12,0
1E	*P. soyoae*	Ayala	8,6
2A	*A. gigas*	Vasconcelos BIG13	17,3
2B	*A. gigas*	Vasconcelos BIG13	21,4
2C	*A. gigas*	Vasconcelos BIG13	18,1
2D	*A. gigas*	Vasconcelos BIG13	15,8
2E	*A. gigas*	Vasconcelos BIG13	24,6
3A	*P. soyoae*	Vasconcelos BIG5	17,0
3B	*P. soyoae*	Vasconcelos BIG5	10,0
3C	*P. soyoae*	Vasconcelos BIG5	8,7
3D	*P. soyoae*	Vasconcelos BIG5	15,2
4A	*A. gigas*	Morelos	8,5
4B	*A. gigas*	Morelos	21,7
4C	*A. gigas*	Morelos	14,5
4D	*A. gigas*	Morelos	9,6
4E	*A. gigas*	Morelos	11,0
4F	*A. gigas*	Morelos	15,0

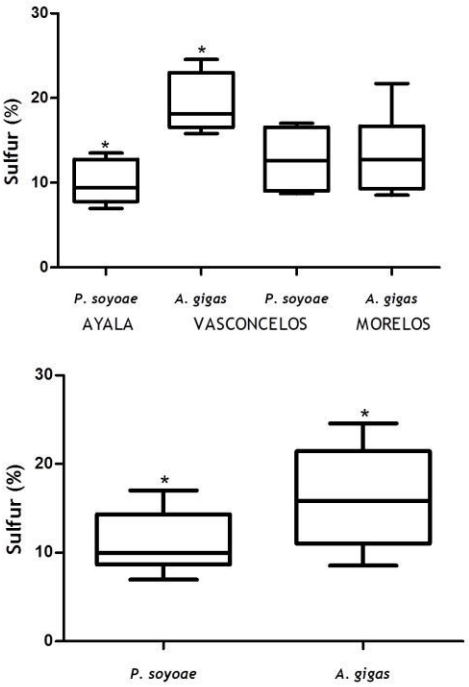


Figure 6 : Sulfur contents of vesicomyid gills

4. Discussion

4.1. Structure of vesicomyid – symbiont communities at cold seeps and hydrothermal vents

Three different vesicomyid species were identified at the studied sites. *Phreagena soyoae* also known as *Phreagena kilmeri* (Audzijonyte et al., 2012, Decker et al., 2012, Kojima et al., 2004, Peek et al., 1997, Watanabe et al., 2013), *Calyptogena pacifica* and *Archivesica gigas* (Table 1). These results agree with taxonomical records from previous sampling cruises in the Guaymas Basin (Peek et al., 1997, Ruelas-Inzunza et al., 2003, Simoneit et al., 1990, Soto, 2009).

P. soyoae (syn. *kilmeri*), previously sampled in various seep and whale fall sites all along the North Pacific between 600 and 1600 mbsf (Audzijonyte et al., 2012, Barry et al., 1997), appeared predominant at both Ayala and Vasconcelos BIG5 sites (cold seep area), rare at Vasconcelos BIG13 site (cold seep area) and absent at the Morelos site (hydrothermal vent area) (Table 1).

C. pacifica, known only from cold seeps and generally at depth shallower than 1000 mbsf (Decker et al., 2012, Goffredi et al., 2003, Krylova and Sahling, 2006, Krylova and Sahling, 2010), occurred exclusively in the cold seep Ayala and Vasconcelos BIG5 sites. Sampling depth might explain the low number of retrieved individuals (Table 1). Specimens occurred associated with *P. soyoae,* as often reported by previous studies (Audzijonyte et al., 2012, Barry and Kochevar, 1998, Barry et al., 1997, Goffredi et al., 2003, Goffredi and Barry, 2002). We did not found any *C. pacifica* individual at the Morelos hydrothermal vent site, though some specimens of the species complex *C. pacifica / C. lepta* have been previously reported from the Southern Trough (Grassle et al., 1985, Simoneit et al., 1990). Nevertheless, these samples were recently assigned to *C. lepta* (Audzijonyte et al., 2012). While no *C. lepta* specimen was found during the "BIG" cruise, this species may be present on unsampled sites.

Finally, *A. gigas*, previously observed at seep, vent and whale fall areas between 1000 and 2000 mbsf (Audzijonyte et al., 2012, Baco et al., 1999, Ruelas-Inzunza et al., 2003) and occurring sometimes associated with *C. pacifica* and *P. soyoae* (Barry et al., 1997), was the only species observed at the Morelos hydrothermal vent site. It was largely dominant at the BIG13 cold seep site (Table 1).

Therefore, species composition varied among sites. The three species of vesicomyids were found at cold seeps, though they were present in different proportions in each area. *A. gigas* was the only species present at hydrothermal vents. Either no (*A. gigas* and *P. soyoae*) or small (*C. pacifica*) *COI* intra-specific variation was detected. Although *A. gigas* is known to present genetic polymorphism (Decker et al., 2012, Osborn, 2001), individuals from hydrothermal vents and cold seeps shared the same haplotype. This suggests a recent common history of the populations of the different species present in all sites, either through present day connectivity or through a recent common pool of ancestors having recently colonized these sites. This low diversity might suggest drastic and potentially recurrent demographic events. Consequently, our results could indicate for the first time a possible exchange between seeps and vent areas, possibly favored by the close proximity and the lack of geographical barrier at the Guaymas Basin.

Three different groups of bacteria, affiliated to the *Gammaproteobacteria* phyla, were systematically detected by our molecular analyses. Their presence and activity were confirmed by FISH observations (Figures 3 and 4). Phylogenetic reconstructions revealed robust reciprocal monophyly for the three symbiont lineages, despite a relatively high similarity between 16S rRNA gene sequences (Figure 3). Each vesicomyid species harbored one single specific symbiont and no difference was detected between the symbiont associated with pool of specimens of the same species inhabiting different sites. Congruent phylogenetic topologies were obtained from the clam *COI* and symbiont 16S rRNA, *aprA* and *cbbM* gene sequences (Figure 3). Even when including samples from other sites characterized in previous studies, symbionts lineages were highly similar among individuals of the same species (e.g. *P. soyoae* from the Monterey Canyon and from the Guaymas Basin on the East Pacific coast and from the Sagami Bay in the West Pacific coast) (Figure 3). All these results support a predominant vertical transmission in line with a co-evolution between one vesicomyid and its associated symbiont lineages confirming the hypothesis from previous studies (e. g. Peek et al., 1998), and this whatever the environment (cold seep or hydrothermal vent).

The diversity of the vesicomyid species and their distribution among and within the four sampled environments, might reflect differential niche preferences linked to various life characteristics for the vesicomyids, their symbionts, or both and possible trophic or spatial competition among the different species.

4.2. Link between community composition and host biology and ecophysiology

Possible ecophysiological differences between *P. soyoae* and *A. gigas* were highlighted by our observations and analyses.

First, *P. soyoae* was observed less buried in sediments than *A. gigas.* It has been shown that vesicomyid shell and foot sizes allow the uptake of sulfide produced at few centimeters below the surface (Barry et al., 1997, Childress and Mickel, 1982, Dubilier et al., 2008, Goffredi and Barry, 2002, Sahling et al., 2002) and affect the transport and the distribution of dissolved chemical compounds in sediment surface layer (Fischer et al., 2012).

No sulfide was detected at the Ayala sediment push core that was only 8 cm length (Cathalot et al., unp), even at the immediate periphery of vesicomyd clams as already observed in other sites (Barry et al., 1997, Hashimoto et al., 1995). Nevertheless, *P. soyoae* were alive and healthy, suggesting they had good access to sulfide (Goffredi and Barry, 2002, Krylova and Cosel, 2011, Sahling et al., 2002). Thanks to its shell and foot sizes, *P. soyoae* could access sulfide present in sediment layers below 8 cm. Sulfide could also occur only at very localized places, not accessible for sampling by a push core diameter smaller than vesicomyid shells. This may highlight a high heterogeneity of fluid seeping within the sediments at very small spatial scales (cm to dm). This is congruent with the patchily distribution of this species, at Ayala (Figure 2A) as well as at BIG5 (Figure 2C). *A. gigas,* almost entirely buried in sediments, could also access to deeply buried sulfide. If we consider that water very closed to the sediment is more depleted in oxygen, these respective positions could also suggest that *A. gigas* might be better adapted against hypoxia, or anoxia, and therefore can access to deeper sulfide layers. Such a difference among vesicomyids has been recently demonstrated for two species co-existing in a cold seep site of the gulf of Guinea (Decker et al., subm.). Thereby vesicomyid positions in sediment might reflect a compromise between sulfide and oxygen access.

Then, traces of vesicomyid indicating movement (MacDonald et al., 1990, Rosman et al., 1987) were visible on the sediments at Vasconcelos BIG13 and Morelos sites, where *A. gigas* was dominant and sparsely distributed. No trace was ever observed at Ayala and Vasconcelos BIG5 sites where *P. soyoae* was dominant. A better ability to move might be a characteristic of *A. gigas*. Movements might be a response of the clam to variable fluid flows. Indeed, high spatial variability in the sediments seemed to occur at Vasconcelos area. While no sulfide was detected (or sulfide concentrations were under technical detection limit) and sulfate concentration remained constant until 20 cmbsf at BIG13 (Cathalot et al., unp), high sulfide concentration were measured at BIG5 area (Cathalot et al., unp) and BIG18 microbial mat area few meters apart (previously investigated in another study (Vigneron et al., 2013)). Such a variability observed in various cold seep areas, allows the development of various faunal and microbial assemblages co-occurring in the same location (Cambon-Bonavita et al., 2009, Olu-Le Roy et al., 2007) and were also documented at very small scale (Barry et al., 1997) explaining for instance the differential distribution of *P. soyoae* (syn. *kilmeri*) and *C. pacifica* in the Monterey Bay Flux variations could eventually explain the lack of sulfide in the BIG13 sample. Indeed, the reversal of the flux directions, switching between inflow and outflow, could be a characteristic of vesicomyid habitats (Levin et al., 2003, Tryon and Brown, 2001). Reversal fluxes have also been recently attributed to clam bioirrigation resulting in a deeper sulfide sink (Fischer et al., 2012). Therefore, thanks to its better ability to move itself, *A. gigas* could meet and exploit the transient and punctual sources of available sulfide, while they might remain unavailable to the less mobile *P. soyoae*. *A. gigas* could also exploit other sulfide-rich areas, such as microbial mats, and would manage to go out of those areas where sulfide could be close to clam toxic level (Barry and Kochevar, 1998, Sahling et al., 2002, Vetter et al., 1991). Proportions of species observed at each site seemed to indicate that as soon as global environmental conditions are suitable for the establishment of *P. soyoae,* it might be more competitive than *A. gigas*.

4.3. Link between community composition and symbiont metabolisms

As already observed in other vesicomyid species (Kuwahara et al., 2007, Newton et al., 2007), *cbbM* and *aprA* genes fragments were detected in all symbionts without premature stop mutation, indicating their autotrophic and thiotrophic metabolism as described before (Cavanaugh, 1983, Fiala-Médioni and Métivier, 1986, Goffredi and Barry, 2002). As previously detected by whole genome sequencing (Kuwahara et al., 2007, Newton et al., 2007) or microarray analyses (Newton et al., 2008) of hydrothermal and cold seep vesicomyid symbionts, all detected *cbbM* sequences encoded for the form II of the Rubisco, involved in CO_2 fixation for carbon assimilation (Kato et al., 2012, Tabita, 1999). Thus, form II of the Rubisco could be the baseline in vesicomyid symbionts.

Symbiont sulfide oxidation pathway includes several steps catalyzed by various enzymes (Suzuki, 1999), such as the APS reductase (encoded by the *aprA* gene), to obtain sulfate as end product, with O_2 or nitrate as electron acceptor (Goffredi and Barry, 2002). As known in other *Bacteria* such as *Thiomicrospira*, vesicomyid symbiont could also store elemental sulfur as energy source (Fiala-Médioni and Lepennec, 1989, Fisher et al., 1988, Goffredi and Barry, 2002, Pasteris et al., 2001, Vetter, 1985). Probably depending on environmental

conditions, the symbionts could use this form of sulfur as electron donor especially in case of sulfide depletion or if vesicomyid are exposed to low O_2 concentrations. Indeed, the oxidation degree of elemental sulfur is higher than the one of hydrogen sulfide and its oxidation uses less oxygen (Goffredi and Barry, 2002). In all gill samples observed, white minerals identified as elemental sulfur were localized at interlamellar septa, corresponding to symbiont cells (Figures 4A, 5A, B, C and D). Nevertheless, this mineral form of sulfur did not look like sulfur granules observed in thiotrophic bacteria like *Thiomicrospira*, and did not seem biologically assimilable. However several studies have documented high reactivity of this elemental sulfur due to abiotic factors and fast recrystallization at room temperature can be observed (Goffredi and Barry, 2002, Hageage et al., 1970, Pasteris et al., 2001, Vetter, 1985). Therefore, the sulfur observed in our study could be the result of abiotic transformations of the elemental sulfur produced by symbionts, that have occurred after sampling. Consequently these sulfur minerals might be an indirect evidence of elemental sulfur production by the symbionts. The systematic localization of these minerals exclusively in bacteriocyte areas (Figure 4A, 5A, B, C and D) supported such a hypothesis. Sulfur contents were comparable to those previously obtained in other studies (Goffredi and Barry, 2002). Sulfur contents of *A. gigas* from Vasconcelos site were significantly higher than those of *P.soyoae* from Ayala site and more generally, sulfur contents of *A. gigas* were significantly higher than those of *P.soyoae* (Figure 6). The difference observed between *A. gigas* and *P.soyoae* could be due to variations in storage ability in each species. *A. gigas*, and therefore its symbionts, may store more sulfur and be better adapted to sulfide or oxygen depletion than *P. soyoae*. This characteristic could allow *A. gigas* to live alternatively in low-sulfide and sulfide-rich areas, using stored sulfur in sulfide-depleted conditions. This hypothesis supports the assumption of clam travel between areas depleted and enriched in sulfide and could explain the predominance of *A. gigas* over *P.soyoae* observed at the Vasconcelos BIG13 site. These results could highlight a higher plasticity of *A. gigas* symbionts according to environmental conditions. Indeed, symbionts could produce and consume more or less elemental sulfur according to the environmental conditions. Therefore vesicomyid symbionts may regulate their metabolism, being adapted in more or less wide spectrum of geochemical environments, probably allowing the colonization of both hydrothermal and cold seep sites by *A. gigas*. Despite an identical or extremely similar genetic background of *A. gigas* and its associated symbiont, they would be able to colonize and persist in both cold seep and hydrothermal sites despite geochemical heterogeneity among those environments. The absence of *A. gigas* at the Vasconcelos BIG5 site could be explained by the small number of samples available for this study.

5. Conclusion

Here and for the first time, we compared vesicomyid distribution patterns between two contrasted environments, which are cold seeps and hydrothermal vents. *A. gigas, P. soyoae* and *C. pacifica* were observed on contrasted sites of the Guaymas Basin. The diversity of the detected vesicomyid species and the heterogeneity in their distribution among and within the sampled environments may be explained by differences between the host physiology and symbiont metabolisms. For example, the difference between sulfur contents of *P. soyoae* and *A. gigas* could mean differences between their symbiont metabolisms. The various sediment textures and absence of travel traces on sediments in some sites could highlight variability in vesicomyid behavior and ability to move. Moreover, symbiont plasticity may allow their host to colonize various environments. As we have shown here, the same lineage of *A. gigas* occurred at both seeps and vents. This species and its associated symbionts could then support contrasted chemical conditions, such as presence of hydrothermal fluid, relatively high and low sulfide concentrations or spatially heterogeneous flows. This wide range of distribution could reflect a high adaptability of this species and its symbionts. Indeed, symbionts could adapt their metabolism to environmental fluctuations while maintaining the host alive. Therefore, these results could reflect metabolism modulation, such as sulfur storage or use of sulfur reserves, depending on environmental conditions. Then, it could be interesting to better understand the regulations of symbiont metabolism, especially in the case of sulfur storage.

Acknowledgements

We are indebted to the crews of the research vessel *L'Atalante* and the submersible *Nautile* of the cruise "BIG" and the scientific team for their work on board. This cruise was funded by IFREMER (France) and has benefited from a work permit in Mexican waters (DAPA/2/281009/3803, 28 Octobre 2009). We thank Lucile Durand, Richard Cosson and Priscilla Decottignies-Cognie for very helpful scientific discussions and Elena Krylova for her helpful comments on the morphological taxonomy. This study was supported by an IFREMER / Brittany region PhD grant for PC.

References

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215, 403-410.

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A., 1990. Combination of 16S ribosomal-RNA-targeted oligonucleotide probes with flow-cytometry for analyzing mixed microbial populations. Applied and Environmental Microbiology 56, 1919-1925.

Arp, A.J., Childress, J.J., Fisher, C.R., 1984. Metabolic and blood-gas transport characteristics of the hydrothermal vent bivalve *Calyptogena magnifica*. Physiological Zoology 57, 648-662.

Audzijonyte, A., Krylova, E.M., Sahling, H., Vrijenhoek, R.C., 2012. Molecular taxonomy reveals broad trans-oceanic distributions and high species diversity of deep-sea clams (Bivalvia: Vesicomyidae: Pliocardiinae) in chemosynthetic environments. Systematics and Biodiversity 10, 403-415.

Baco, A.R., Smith, C.R., Peek, A.S., Roderick, G.K., Vrijenhoek, R.C., 1999. The phylogenetic relationships of whale-fall vesicomyid clams based on mitochondrial COI DNA sequences. Marine Ecology Progress Series 182, 137-147.

Badger, M.R., Bek, E.J., 2008. Multiple Rubisco forms in proteobacteria: their functional significance in relation to CO2 acquisition by the CBB cycle. Journal of Experimental Botany 59, 1525-1541.

Barry, J.P., Kochevar, R.E., 1998. A tale of two clams: differing chemosynthetic life styles among vesicomyids in Monterey Bay cold seeps. Cah. Biol. Mar. 39, 329-331.

Barry, J.P., Kochevar, R.E., Baxter, C.H., 1997. The influence of pore-water chemistry and physiology on the distribution of vesicomyid clams at cold seeps in Monterey Bay: Implications for patterns of chemosynthetic community organization. Limnology and Oceanography 42, 318-328.

Bennett, B.A., Smith, C.R., Glaser, B., Maybaum, H.L., 1994. Faunal community structure of a chemoautotrophic assemblage on whale bones in the deep northeast Pacific Ocean. Marine Ecology-Progress Series 108, 205-205.

Cambon-Bonavita, M.A., Nadalig, T., Roussel, E., Delage, E., Duperron, S., Caprais, J.C., Boetius, A., Sibuet, M., 2009. Diversity and distribution of methane-oxidizing microbial communities associated with different faunal assemblages in a giant pockmark of the Gabon continental margin. Deep-Sea Research Part Ii-Topical Studies in Oceanography 56, 2248-2258.

Cary, S., Giovannoni, S., 1993. Transovarial inheritance of endosymbiotic bacteria in clams inhabiting deep-sea hydrothermal vents and cold seeps. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90, 5695 - 5699.

Cavanaugh, C.M., 1983. Symbiotic chemoautotrophic bacteria in marine-invertebrates from sulphid-rich habitats. Nature 302, 58-61.

Childress, J., Fisher, C., Favuzzi, J., Sanders, N., 1991. Sulfide and carbon dioxide uptake by the hydrothermal vent clam, Calyptogena magnifica and its chemoautotrophic symbionts. Physiol Zool 64, 1444 - 1470.

Childress, J., Mickel, T., 1982. Oxygen and sulfide consumption rates of the vent clam Calyptogena pacifica. Mar. Biol. Lett 3, 73-79.

Daims, H., Lücker, S., Wagner, M., 2006. Daime, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research. Environmental Microbiology 8, 200-213.

Decker, C., Olu, K., Arnaud-Haond, S., Duperron, S., 2013. Physical Proximity May Promote Lateral Acquisition of Bacterial Symbionts in Vesicomyid Clams. Plos One 8, e64830.

Decker, C., Olu, K., Cunha, R.L., Arnaud-Haond, S., 2012. Phylogeny and Diversification Patterns among Vesicomyid Bivalves. Plos One 7.

Doyle, J.J., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull 19, 11-15.

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

Duperron, S., Nadalig, T., Caprais, J.C., Sibuet, M., Fiala-Medioni, A., Amann, R., Dubilier, N., 2005. Dual symbiosis in a Bathymodiolus sp mussel from a methane seep on the gabon continental margin (southeast Atlantic): 16S rRNA phylogeny and distribution of the symbionts in gills. Applied and Environmental Microbiology 71, 1694-1700.

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

Endow, K., Ohta, S., 1990. Occurrence of bacteria in the primary oocytes of vesicomyid clam *Calyptogena soyoae*. Marine Ecology-Progress Series 64, 309-311.

Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies : an approach using the bootstrap. Evolution 39, 783-791.

Fiala-Médioni, A., Lepennec, M., 1989. Adaptative features of the bivalve mollusks associated with fluid venting in the subduction zones off Japan. Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology 71, 161-167.

Fiala-Médioni, A., Métivier, C., 1986. Ultrastructure of the gill of the hydrothermal vent bivalve *Calyptogena magnifica*, with a discussion of its nutrition. Marine Biology 90, 215-222.

Fischer, D., Sahling, H., Nöthen, K., Bohrmann, G., Zabel, M., Kasten, S., 2012. Interaction between hydrocarbon seepage, chemosynthetic communities, and bottom water redox at cold seeps of the Makran accretionary prism: insights from habitat-specific pore water sampling and modeling. Biogeosciences 9, 2013-2031.

Fisher, C., 1990. Chemoautotrophic and methanotrophic symbioses in marine invertebrates. Rev. Aquat. Sci 2, 399-436.

Fisher, C.R., Childress, J.J., Arp, A.J., Brooks, J.M., Distel, D.L., Dugan, J.A., Felbeck, H., Fritz, L.W., Hessler, R.R., Johnson, K.S., Kennicutt Ii, M.C., Lutz, R.A., Macko, S.A., Newton, A., Powell, M.A., Somero, G.N., Soto, T., 1988. Variation in the hydrothermal vent clam, Calyptogen magnifica, at the Rose Garden vent on the Galapagos spreading center. Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers 35, 1811-1831.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3, 294-299.

Goffredi, S., Hurtado, L., Hallam, S., Vrijenhoek, R., 2003. Evolutionary relationships of deep-sea vent and cold seep clams (Mollusca: Vesicomyidae) of the "pacifica/lepta" species complex. Marine Biology 142, 311 - 320.

Goffredi, S.K., Barry, J.P., 2002. Species-specific variation in sulfide physiology between closely related Vesicomyid clams. Marine Ecology-Progress Series 225, 227-238.

Grassle, J., Brown-Leger, L., Morse-Porteous, L., Petrecca, R., Williams, I., 1985. Deep-sea fauna of sediments in the vicinity of hydrothermal vents. Bulletin of the Biological Society of Washington, 443-452.

Grassle, J.F., 1986. The ecology of deep-sea hydrothermal vent communities. Advances in Marine Biology 23, 301-362.

Hageage, G.J., Jr., Eanes, E.D., Gherna, R.L., 1970. X-ray diffraction studies of the sulfur globules accumulated by Chromatium species. J. Bacteriol. 101, 464-469.

Hashimoto, J., Ohta, S., Fujikura, K., Fujiwara, Y., Sukizaki, S., 1995. Life habit of vesicomyid clam,Calyptogena soyoae, and hydrogen sulfide concentration in interstitial waters in Sagami Bay, Japan. J Oceanogr 51, 341-350.

Kato, S., Nakawake, M., Ohkuma, M., Yamagishi, A., 2012. Distribution and phylogenetic diversity of cbbM genes encoding RubisCO form II in a deep-sea hydrothermal field revealed by newly designed PCR primers. Extremophiles 16, 277-283.

Katoh, K., Kuma, K.-i., Toh, H., Miyata, T., 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. Nucleic Acids Research 33, 511-518.

Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionnary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16, 111-120.

Kojima, S., Fujikura, K., Okutani, T., 2004. Multiple trans-Pacific migrations of deep-sea vent/seep-endemic bivalves in the family Vesicomyidae. Molecular Phylogenetics and Evolution 32, 396-406.

Kruskal, W.H., Wallis, W.A., 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. Journal of the American statistical Association 47, 583-621.

Krylova, E.M., Cosel, R.V., 2011. A new genus of large Vesicomyidae (Mollusca, Bivalvia, Vesicomyidae, Pliocardiinae) from the Congo margin, with the first record of the subfamily Pliocardiinae in the Bay of Biscay (northeastern Atlantic). Zoosystema 33, 83-99.

Krylova, E.M., Sahling, H., 2006. Recent bivalve molluscs of the genus Calyptogena (Vesicomyidae). Journal of Molluscan Studies 72, 359-395.

Krylova, E.M., Sahling, H., 2010. Vesicomyidae (Bivalvia): Current Taxonomy and Distribution. Plos One 5.

Kuwahara, H., Yoshida, T., Takaki, Y., Shimamura, S., Nishi, S., Harada, M., Matsuyama, K., Takishita, K., Kawato, M., Uematsu, K., 2007. Reduced genome of the thioautotrophic intracellular symbiont in a deep-sea clam, Calyptogena okutanii. Curr Biol 17, 881 - 886.

Levin, L.A., Ziebis, W., Mendoza, G.F., Growney, V.A., Tryon, M.D., Brown, K.M., Mahn, C., Gieskes, J.M., Rathburn, A.E., 2003. Spatial heterogeneity of macrofauna at northern California methane seeps: influence of sulfide concentration and fluid flow. Marine Ecology Progress Series 265, 123-139.

MacDonald, I.R., Guinasso, N., Jr., Reilly, J., Brooks, J., Callender, W.R., Gabrielle, S., 1990. Gulf of Mexico hydrocarbon seep communities: VI. Patterns in community structure and habitat. Geo-Marine Letters 10, 244-252.

Mann, H.B., Whitney, D.R., 1947. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. The annals of mathematical statistics 18, 50-60.

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

Miller, M., Pfeiffer, W., Schwartz, T., 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. 2010, Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE) New Orleans, LA, USA, pp. 1-8.

Newton, I., Girguis, P., Cavanaugh, C., 2008. Comparative genomics of vesicomyid clam (Bivalvia: Mollusca) chemosynthetic symbionts. Bmc Genomics 9, 585.

Newton, I., Woyke, T., Auchtung, T., Dilly, G., Dutton, R., Fisher, M., Fontanez, K., Lau, E., Stewart, F., Richardson, P., 2007. The Calyptogena magnifica chemoautotrophic symbiont genome. Science 315, 998 - 1000.

Olu-Le Roy, K., Caprais, J.C., Fifis, A., Fabri, M.C., Galéron, J., Budzinsky, H., Le Ménach, K., Khripounoff, A., Ondréas, H., Sibuet, M., 2007. Cold-seep assemblages on a giant pockmark off West Africa: spatial patterns and environmental control. Marine Ecology 28, 115-130.

Osborn, M., 2001. Molecular systematics of the vesicomyid clams: Calyptogena kilmeri and Vesicomya gigas. MBARI report, 7.

Otero, X.L., Huerta-Diaz, M.A., Macías, F., 2003. Influence of a turbidite deposit on the extent of pyritization of iron, manganese and trace metals in sediments from the Guaymas Basin, Gulf of California (Mexico). Applied Geochemistry 18, 1149-1163.

Pasteris, J.D., Freeman, J.J., Goffredi, S.K., Buck, K.R., 2001. Raman spectroscopic and laser scanning confocal microscopic analysis of sulfur in living sulfur-precipitating marine bacteria. Chemical Geology 180, 3-18.

Paull, C.K., Ussler, W., III, Peltzer, E.T., Brewer, P.G., Keaten, R., Mitts, P.J., Nealon, J.W., Greinert, J., Herguera, J.-C., Perez, M.E., 2007. Authigenic carbon entombed in methane-soaked sediments from the northeastern transform margin of the Guaymas Basin, Gulf of California. Deep-Sea Research Part Ii-Topical Studies in Oceanography 54, 1240-1267.

Peck Jr, H.D., 1974. Sulfation Linked to ATP Cleavage. The enzymes 10, 651-669.

Peek, A.S., Feldman, R.A., Lutz, R.A., Vrijenhoek, R.C., 1998. Cospeciation of chemoautotrophic bacteria and deep sea clams. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 9962-9966.

Peek, A.S., Gustafson, R.G., Lutz, R.A., Vrijenhoek, R.C., 1997. Evolutionary relationships of deep-sea hydrothermal vent and cold-water seep clams (Bivalvia: Vesicomyidae): results from the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I. Marine Biology 130, 151-161.

Powell, M., Somero, G., 1985. Sulfide oxidation occurs in the animal tissue of the gutless clam, *Solemya reidi*. The Biological Bulletin 169, 164-181.

Rosman, I., Boland, G.S., Baker, J.S., 1987. Epifaunal aggregations of Vesicomyidae on the continental slope off Louisiana. Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers 34, 1811-1820.

Ruelas-Inzunza, J., Soto, L.A., Páez-Osuna, F., 2003. Heavy-metal accumulation in the hydrothermal vent clam Vesicomya gigas from Guaymas basin, Gulf of California. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers 50, 757-761.

Sahling, H., Rickert, D., Lee, R.W., Linke, P., Suess, E., 2002. Macrofaunal community structure and sulfide flux at gas hydrate deposits from the Cascadia convergent margin, NE Pacific. Marine Ecology-Progress Series 231, 121-138.

Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method - A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4, 406-425.

Sibuet, M., Olu, K., 1998. Biogeography, biodiversity and fluid dependence of deep-sea cold-seep communities at active and passive margins. Deep-Sea Research Part Ii-Topical Studies in Oceanography 45, 517-+.

Simoneit, B.R.T., Lonsdale, P.F., Edmond, J.M., Shanks, W.C., 1990. Deep-water hydrocarbon seeps in Guaymas basin, Gulf of California. Applied Geochemistry 5, 41-49.

Soto, L.A., 2009. Stable carbon and nitrogen isotopic signatures of fauna associated with the deep-sea hydrothermal vent system of Guaymas Basin, Gulf of California. Deep-Sea Research Part Ii-Topical Studies in Oceanography 56, 1675-1682.

Stamatakis, A., 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics 22, 2688-2690.

Stewart, F., 2008. Genetic diversification and evolution of chemosynthetic endosymbionts in deep-sea clams (Vesicomyidae).

Stewart, F., Newton, I., Cavanaugh, C., 2005. Chemosynthetic endosymbioses: adaptations to oxic-anoxic interfaces. Trends Microbiol 13, 439 - 448.

Suzuki, I., 1999. Oxidation of inorganic sulfur compounds: Chemical and enzymatic reactions. Can. J. Microbiol. 45, 97-105.

Tabita, F.R., 1999. Microbial ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: A different perspective. Photosynthesis Research 60, 1-28.

Tabita, F.R., Satagopan, S., Hanson, T.E., Kreel, N.E., Scott, S.S., 2008. Distinct form I, II, III, and IV Rubisco proteins from the three kingdoms of life provide clues about Rubisco evolution and structure/function relationships. Journal of Experimental Botany 59, 1515-1524.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24, 1596-1599.

Teske, A., Hinrichs, K.U., Edgcomb, V., Gomez, A.D., Kysela, D., Sylva, S.P., Sogin, M.L., Jannasch, H.W., 2002. Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: Evidence for anaerobic methanotrophic communities. Applied and Environmental Microbiology 68, 1994-2007.

Tryon, M.D., Brown, K.M., 2001. Complex flow patterns through Hydrate Ridge and their impact on seep biota. Geophysical Research Letters 28, 2863-2866.

Tunnicliffe, V., 1991. The biology of hydrothermal vents - Ecology and Evolution. Oceanography and Marine Biology 29, 319-407.

Van Dover, C.L., German, C.R., Speer, K.G., Parson, L.M., Vrijenhoek, R.C., 2002. Evolution and Biogeography of Deep-Sea Vent and Seep Invertebrates. Science 295, 1253-1257.

Vetter, R.D., 1985. Elemental sulfur in the gills of three species of clams containing chemoautotrophic symbiotic bacteria: a possible inorganic energy storage compound. Marine Biology 88, 33-42.

Vetter, R.D., Powell, M.A., Somero, G.N., 1991. Metazoan adaptations to hydrogen sulphide. Metazoan life without oxygen (Bl)'ant, C.; editor). Chapman and Ha/l, 109-128.

Vigneron, A., Cruaud, P., Pignet, P., Caprais, J.-C., Cambon-Bonavita, M.-A., Godfroy, A., Toffin, L., 2013. Archaeal and anaerobic methane oxidizer communities in the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin (Gulf of California). ISME J.

Von Cosel, R., Olu, K., 2009. Large Vesicomyidae (Mollusca: Bivalvia) from cold seeps in the Gulf of Guinea off the coasts of Gabon, Congo and northern Angola. Deep-Sea Research Part Ii-Topical Studies in Oceanography 56, 2350-2379.

Vrijenhoek, R.C., Schutz, S.J., Gustafson, R.G., Lutz, R.A., 1994. Cryptic species of deep-sea clams (Mollusca: Bivalvia: Vesicomyidae) from hydrothermal vent and cold-water seep environments. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers 41, 1171-1189.

Watanabe, H., Seo, E., Takahashi, Y., Yoshida, T., Kojima, S., Fujikura, K., Miyake, H., 2013. Spatial distribution of sister species of vesicomyid bivalves Calyptogena okutanii and Calyptogena soyoae along an environmental gradient in chemosynthetic biological communities in Japan. J Oceanogr 69, 129-134.

Wilcoxon, F., 1945. Individual comparisons by ranking methods. Biometrics bulletin 1, 80-83.

Zhou, J., Bruns, M., Tiedje, J., 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. Appl. Environ. Microbiol. 62, 316-322.

Cette étude constituait une première comparaison des communautés de vésicomyidés et de leurs symbiontes présentes au niveau de deux écosystèmes chimiosynthétiques, les suintements froids et les sources hydrothermales. Dans le Bassin de Guaymas, la proximité de ces deux écosystèmes et l'absence de barrière géographique permettait en effet ce type d'étude comparative en évitant que ces deux facteurs n'influencent sur la répartition des bivalves.

Une plus grande diversité existait au niveau de la marge de Sonora avec trois espèces de vésicomyidés différentes : *Phreagena soyoae*, *Calyptogena pacifica* et *Archivesica gigas*. Seule l'espèce *A. gigas* a été retrouvée au niveau de la zone de sources hydrothermales. Au niveau des sites Ayala et Vasconcelos BIG5, c'est l'espèce *P. soyoae* qui était dominante. Ces bivalves ont été observés à moitié enfoncés dans un sédiment plutôt granuleux. Ils étaient regroupés en patch sur le sédiment. Au niveau des sites Vasconcelos BIG13 et Morelos, l'espèce *A. gigas* était dominante. Sur ces sites, les bivalves apparaissaient beaucoup plus enfoncés, dans un sédiment dont la consistence apparente était plus molle. Ils étaient très dispersés dans le sédiment et de nombreuses traces de déplacement étaient visibles. Les mesures chimiques n'ont pas réellement permis d'expliquer cette répartition, puisque dans le cas de Ayala et de Vasconcelos BIG13, respectivement dominés par *P. soyoae* et *A. gigas*, les sulfures n'ont pas été détectés et dans le cas de Vasconcelos BIG5 et Morelos, respectivement dominés par *P. soyoae* et *A. gigas*, la présence de sulfures a été mesurée.

La caractérisation des symbiontes (gènes codant l'ARNr 16S, l'APS reductase et la RuBisCO) a quant à elle permis de mettre en évidence la présence d'un unique symbionte spécifique par espèce de vésicomyidés, quel que soit le site d'étude. Cette caractérisation a permis de confirmer l'hypothèse de la transmission verticale des symbiontes conduisant à une co-évolution de l'hôte et de son symbionte. Cette caractérisation a également permis de confirmer les caractères thiotrophe et autotrophe *via* le cycle de Calvin des symbiontes. L'étude portant sur le stockage d'énergie sous forme de soufre élémentaire a ensuite permis de mettre en évidence la présence d'une quantité plus importante de soufre dans le cas de l'espèce *A. gigas.*

La diversité des espèces de vésicomyidés et l'hétérogénéité de leur distribution dans le Bassin de Guaymas pourraient refléter des préférences de niches écologiques, liées aux caractéristiques de vie de chaque espèce de vésicomyidés et de leurs symbiontes. La présence de nombreuses traces probablement liées aux déplacements de vésicomyidés sur les sédiments indiquerait que l'espèce *A. gigas* pourrait plus facilement se déplacer. Cette capacité lui permettrait d'exploiter plus facilement des sources ponctuelles et transitoires de sulfures par rapport à l'espèce *P. soyoae*. La plus grande capacité à stocker l'énergie sous forme de soufre élémentaire des symbiontes d'*A. gigas* pourrait également permettre à cette espèce de tolérer une absence prolongée de sulfures, ce qui lui permettrait de circuler d'une source de sulfures à l'autre. Ces résultats semblent donc mettre en évidence une plus grande plasticité des symbiontes d'*A. gigas* ainsi qu'une plus grande adaptabilité de ce bivalve, lui permettant ainsi de coloniser des zones aux conditions de vie contrastées comme la zone de sources hydrothermales et la zone de suintements froids du Bassin de Guaymas.

2) Les vers tubicoles siboglinidés

L'absence d'échantillons de siboglinidés spécifiquement conservés pour l'étude de la symbiose n'a pas permis d'en réaliser l'étude au même niveau que celle réalisée pour les vésicomydiés. Néanmoins, quelques individus conservés dans l'alcool ont pu être utilisés pour réaliser une identification moléculaire et fonctionnelle préliminaire de l'hôte et des symbiontes. L'hybridation fluorescente *in situ* n'a quant à elle pas donnée de bons résultats et ne sera pas présentée dans ce manuscrit.

Figure 117 : Individu du genre *Lamellibrachia*. Ver fixé au formol et conservé dans l'alcool, avant dissection. Site Juarez BIG12

Figure 118 : Individu du genre *Escarpia*. Ver fixé au formol et conservé dans l'alcool, avant dissection. Site Juarez BIG12

Les vers tubicoles siboglinidés constituaient la macrofaune dominante sur le site de suintements froids Juarez (Figure 101). Les siboglinidés étaient aussi présents dans la zone de sources hydrothermales (*Riftia pachyptila*, Figure 107) mais colonisaient des substrats durs. Cet habitat n'étant pas échantillonnable sous forme de carottes de sédiments, il n'a pas fait partie de l'étude des communautés microbiennes sédimentaires.

Deux genres de siboglinidés ont été identifiés sur la base de critères morphologiques par l'équipe de biologistes du département, *Lamellibrachia* (les vers annelés - Figure 117) et *Escarpia* (les vers lisses - Figure 118). L'espèce *Escarpia spicata* a d'ailleurs déjà été échantillonnée au niveau des suintements froids et des sources hydrothermales du Bassin de Guaymas (Di Meo et al., 2000). Les vers ont été disséqués (un individu par genre) au laboratoire et l'ADN a été extrait du trophosome selon le protocole utilisé pour les vésicomyidés (Zhou et al., 1996). La caractérisation moléculaire (clonage – séquençage sur huit clones) des siboglinidés basée sur le séquençage du gène codant la sous-unité I de la cytochrome oxydase (COI) a confirmé l'affiliation morphologique au niveau du genre (Figure 119). Elle a également permis d'identifier l'espèce *Lamellibrachia barhami*. En revanche, l'espèce du genre *Escarpia* n'a pas pu être déterminée, le gène codant la cytochrome oxydase pourrait être insuffisant en tant que marqueur moléculaire pour permettre de discriminer les différentes espèces d'*Escarpia* entre elles.

Les symbiontes présents dans le trophosome des siboglinidés ont également été caractérisés par séquençage du gène codant l'ARNr 16S (Figure 120). Quarante clones ont été séquencés. L'analyse des séquences obtenues a mis en évidence, chez chacune des espèces de siboglinidés, d'une séquence dominante, affiliée aux *Gammaproteobacteria* (Figure 120). Malheureusement, la présence d'éventuels contaminants a aussi été constatée, notamment avec la détection de groupes microbiens habituellement observés dans l'environnement et non associés à une symbiose. Par ailleurs, une séquence de symbiontes dominants retrouvée chez l'individu *Escarpia* a également été détectée chez *Lamellibrachia*. Cette contamination pourrait s'expliquer par le conditionnement des siboglinidés. En effet, les vers n'ont pas été conservés individuellement et de façon stérile pour des études moléculaires mais tous réunit dans un même bidon d'alcool. La contamination des échantillons par l'environnement et entre vers ne peut donc pas être écartée. Néanmoins, un seul endosymbionte étant habituellement rencontré chez les siboglinidés (Distel et al., 1988; McMullin et al., 2003), la séquence dominante obtenue par séquençage a été admise comme étant le symbionte principal des siboglinidés analysés. Il

aurait été intéressant de travailler sur un plus grand nombre d'individus pour étayer cette conclusion. La non-congruence entre les phylogénies des hôtes et de leurs symbiontes (Figure 119, Figure 120) supporte l'hypothèse d'une transmission horizontale des symbiontes (Di Meo et al., 2000; McMullin et al., 2003). Alors que les siboglinidés étudiés proviennent d'un même buisson, les symbiontes des deux individus analysés sont différents et n'appartiennent pas au même groupe de symbiontes de siboglinidés (Di Meo et al., 2000; Nelson and Fisher, 2000; McMullin et al., 2003). Les symbiontes provenant de l'environnement, ces résultats suggèrent l'existence de mécanismes de reconnaissance et de sélection des symbiontes très importants.

Les gènes codant l'*APS reductase,* enzyme clef de la sulfo-oxydation, la sous-unité β de l'*ATP citrate lyase*, intervenant dans le cycle inverse de l'acide citrique (rTCA) et la RuBisCO de type II ont tous été mis en évidence par PCR chez les deux genres de siboglinidés, mais n'ont pas été séquencés. Cette détection semble confirmer la thiotrophie et l'autotrophie des symbiontes. Deux voies de fixation du carbone ont donc été détectées (cycle inverse de l'acide citrique et cycle de Calvin). Le cycle inverse de l'acide citrique pourrait représenter un mécanisme alternatif de fixation du CO_2, comme cela a déjà été suggéré chez *Riftia pachyptila* (Markert et al., 2007). Cependant, de la même façon que pour l'étude basée sur l'ARNr 16S, la présence des gènes fonctionnels mis en évidence par PCR pourrait aussi très bien être expliquée par la contamination.

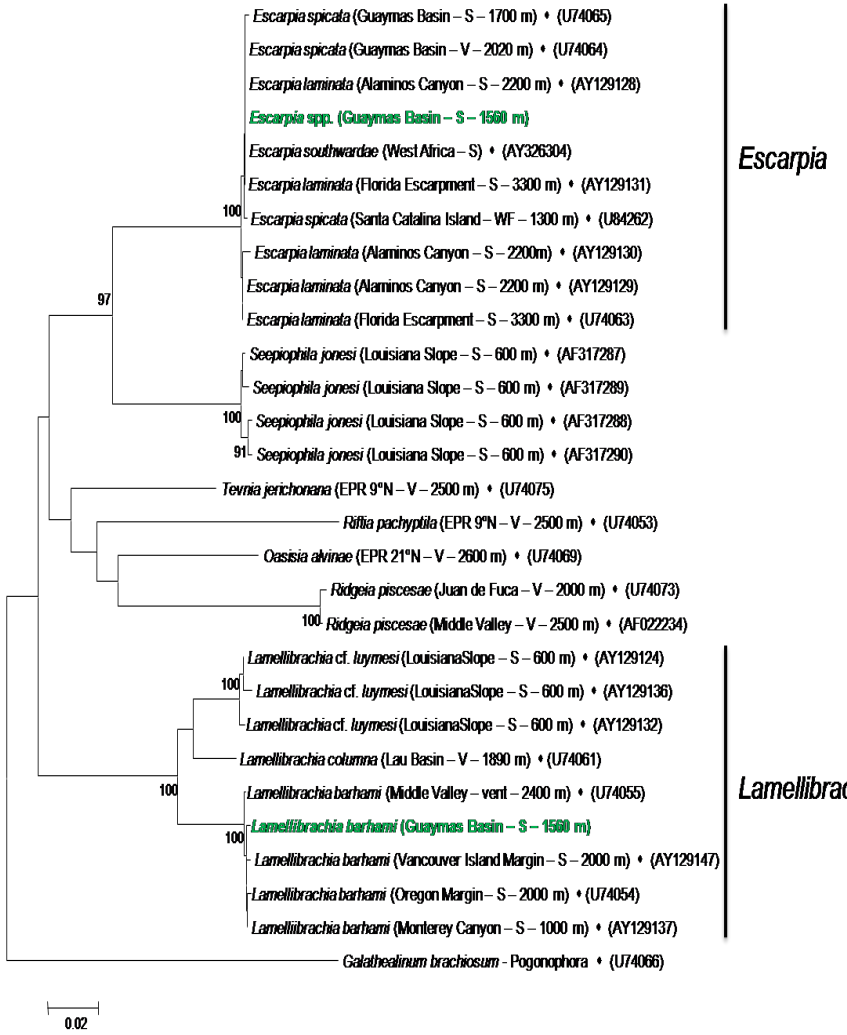


Figure 119 : Arbre phylogénétique des siboglinidés basé sur l'analyse du gène codant la cytochrome oxydase c sous-unité I (COI). Neighbor-Joining, correction Kimura-2-parameter. Uniquement les bootstraps supérieurs à 70% sont indiqués au niveau des nœuds de l'arbre (bootsraps 1000 répétitions). Abréviations : S Seep, V Vent, WF Carcasses de baleines et EPR East Pacific Ridge. Les numéros d'accession sont indiqués entre parenthèses. Les séquences correspondantes à notre étude sont indiquées en vert

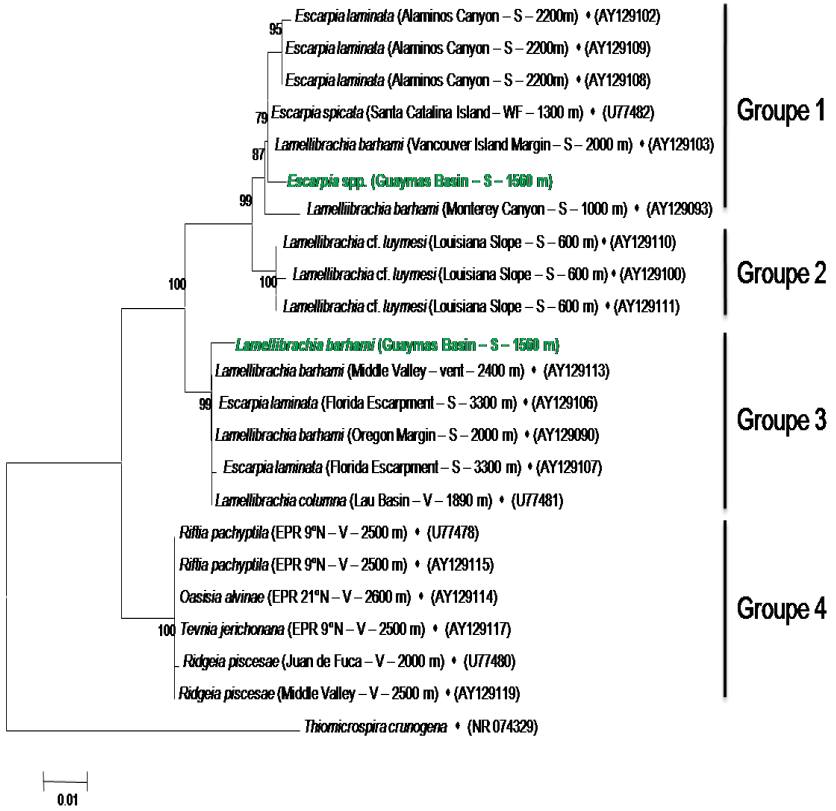


Figure 120 : Arbre phylogénétique des symbiontes des siboglinidés basé sur l'analyse du gène codant l'ARNr 16S. Neighbor-Joining, correction Kimura-2-parameter. Uniquement les bootstraps supérieurs à 70% sont indiqués au niveau des nœuds de l'arbre (bootsraps 1000 répétitions). Abréviations : S Seep, V Vent, WF Carcasses de baleines et EPR East Pacific Ridge. Les numéros d'accession sont indiqués entre parenthèses. Les séquences correspondantes à notre étude sont indiquées en vert

3) La faune colonisant le pourtour des tapis microbiens(« tapis gris »)

Figure 121 : *Ampharetidae*. Photographie réalisée à la loupe binoculaire d'un individu présent sur le site Vasconcelos BIG18. Photo P. Cruaud

Après l'habitat « *vésicomyidés* », et l'habitat « *siboglinidés* », nous arrivons au 3ème type d'habitat étudié dans cette thèse, le pourtour des tapis microbiens. Cet habitat est situé au niveau du site Vasconcelos BIG18 de la marge de Sonora (Figure 105). Il est principalement colonisé par des polychètes et des gastéropodes.

La faune dominante colonisant la surface du sédiment a été identifiée par l'équipe de biologistes du département (Manuella Rabiller, Marie Portail) comme étant dominée par des *Ampharetidae* (Annelida, Polychaeta, Scolecida, Terebellida) (Figure 121) et des gastéropodes. Les gastéropodes ont été identifiés par Anders Waren comme étant des *Hyalogyrina* sp. (Hyalogyrinidae) (Figure 122).

Les *Ampharetidae* sont des polychètes hétérotrophes, connus pour être déposivores et dépendent donc du carbone organique présent dans leur environnement, qu'il soit généré dans les sédiments par chimiosynthèse ou celui présent dans la colonne d'eau, produit de la photosynthèse. Il a récemment été suggéré que les *Ampharetidae* pourraient se nourrir également en partie des bactéries méthanotrophes présentes dans la zone oxique des sédiments (Sommer et al., 2010; Thurber et al., 2010; Ruff et al., 2013).

Figure 122 : *Hyalogyrina*. Photographie réalisée à la loupe binoculaire d'un individu présent sur le site Vasconcelos BIG18. Photo M. Rabiller

Les *Hyalogyrinidae* sont des gastéropodes hétérotrophes. Plusieurs espèces appartenant à cette famille vivent au niveau des sources hydrothermales, des suintements froids ou encore des carcasses de baleines. Ils colonisent aussi bien les surfaces dures comme les roches que les surfaces boueuses comme le sédiment. Les *Hyalogyrinidae* seraient des brouteurs qui se nourriraient notamment des bactéries formant les tapis microbiens (Waren and Bouchet, 2009).

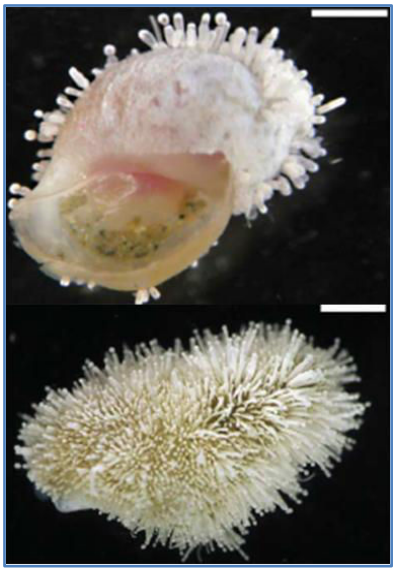


Figure 123 : Gastéropodes *Provanna laevis* de la marge du Costa Rica et d'Hydrate Ridge. La surface de ces gastéropodes est colonisée par des cellules de type *Thiomargarita*. Échelle 1 mm. (Bailey et al., 2011)

Lors des observations à la loupe binoculaire (Figure 122), nous avons constaté la présence de « poils » à la surface des gastéropodes. Ces structures filamenteuses nous ont fait penser à des bactéries qui coloniseraient la surface de ces gastéropodes comme cela a déjà été rapporté chez *Provanna laevis* de la marge du Costa-Rica (Bailey et al., 2011). Afin d'identifier ces filaments, nous avons utilisé trois approches : une approche de microscopie électronique, une approche de séquençage des éventuelles bactéries présentes à la surface des coquilles et une approche de microscopie FISH en utilisant des sondes spécifiques bactéries. Les observations FISH et le séquençage n'ont pour le moment rien donné et les structures n'ont pas été identifiées. En revanche, la microscopie électronique a permis d'observer de nombreuses structures étonnantes à la surface des coquilles, certaines laissant

fortement penser à des microorganismes (Figure 124). L'identification de ces structures pourrait être très intéressante. Elles pourraient être des bactéries symbiotiques épibiontes et pourraient ainsi jouer un rôle dans la nutrition du gastéropode, bien qu'aucune hypothèse de symbiose n'ait été suggérée chez les *Hyalogyrinidae* (Waren and Bouchet, 2009). Ces bactéries pourraient aussi utiliser la coquille du gastéropode comme surface dure de colonisation. Elles pourraient par exemple être des bactéries sulfo-oxydantes à l'image des bactéries qui composent les tapis microbiens et qui colonisent la surface de *Provanna laevis* (Bailey et al., 2011), et consommer des sulfures produits dans le sédiment. L'identification de ces structures serait donc susceptible de modifier les conclusions que nous pourrions tirer de l'étude des communautés microbiennes présentes dans les sédiments colonisés en surface par les gastéropodes.

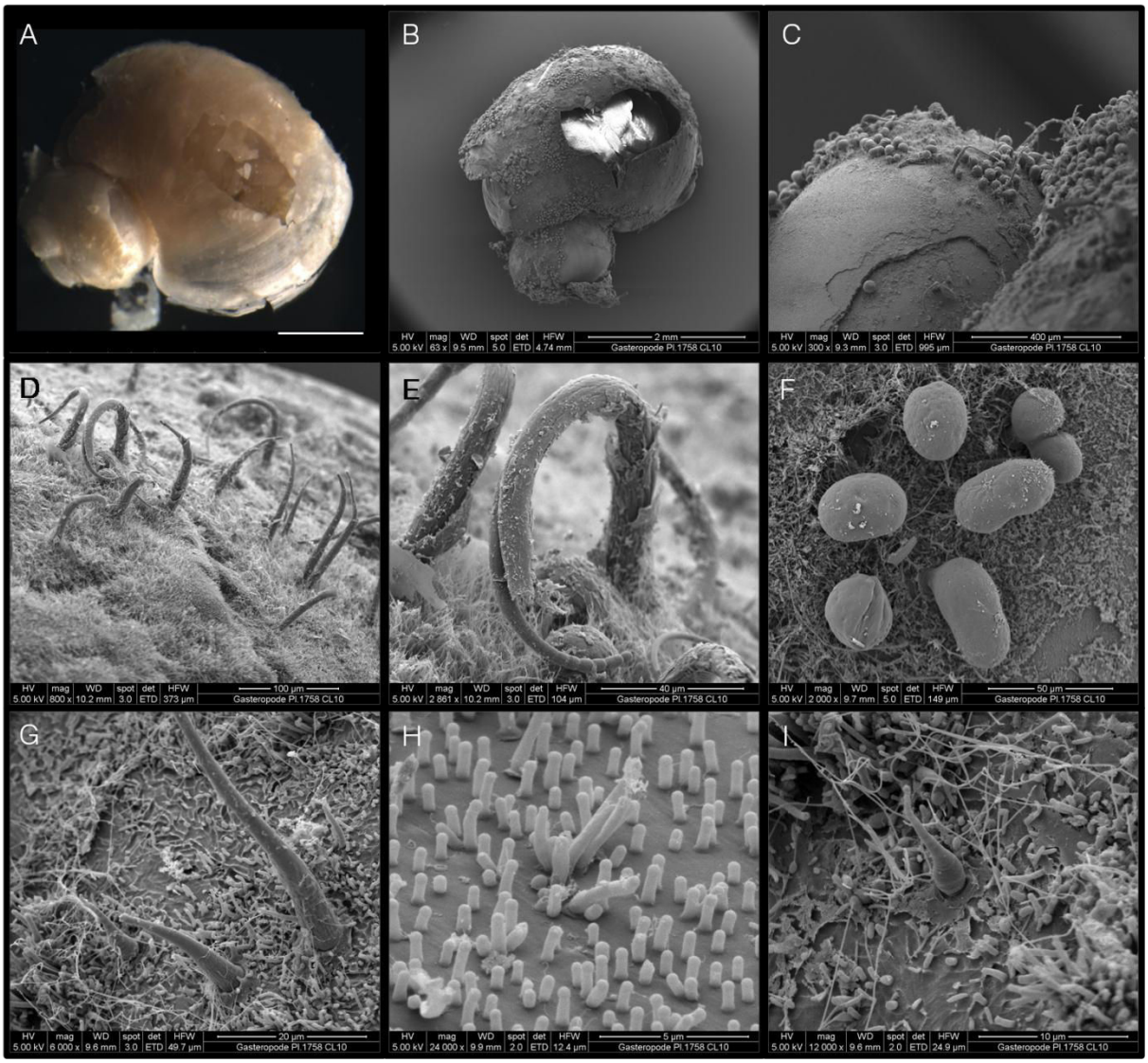


Figure 124 : Surface d'un *Hyalogyrina* sp. du tapis gris de Vasconcelos BIG18. (A) Observation à la loupe binoculaire. La coquille est cassée et laisse apparaître les viscères du gastéropode. Échelle 1 mm. (B) à (I) MEB sur le même gastéropode qu'en photo (A). (B) Vue globale du gastéropode. (C) Vue du sommet de la coquille recouvert de petites boules. (D) Détails de la surface de la coquille, filaments courts et longs. (E) Détails d'un filament long de (D), on remarque la présence d'une septation au bout du filament. (F) Détails de la surface de la coquille, détails des boules observées en (C). (G) Filaments semblant sortir de la coquille. (H) Bâtonnets à la surface de la coquille. (I) Différentes structures observées à la surface de la coquille.

4) Les tapis microbiens

Le quatrième et dernier habitat étudié au cours de cette thèse est l'habitat « *tapis microbiens* ». Ce sont les sites Vasconcelos BIG18 pour les suintements froids et MegaMat pour les sources hydrothermales qui ont été choisis pour mener cette étude. Le site Vasconcelos BIG18 est colonisé par un tapis microbien blanc dont le pourtour constitue l'habitat « *tapis gris* » (Figure 105). Le site MegaMat est quant à lui caractérisé par un tapis microbien blanc et orange (Figure 107). Alors que les bactéries qui composent les tapis du pôle chaud ont déjà été identifiées dans une autre étude comme appartenant aux genre candidats *Maribeggiatoa* et des *Parabeggiatoa* (McKay et al., 2012), nous avons identifié les bactéries composant les tapis microbiens du pôle froid. Pour cela, les tapis microbiens se trouvant à la surface des carottes de sédiments prélevées (Figure 125) ont été récupérés à l'aide d'une pince et conservés à sec à -80°C. Au laboratoire, l'ARN a été extrait de ces tapis grâce à un kit d'extraction (NucleoSpin® RNA II – Macherey-Nagel). Cet extrait a été traité à la DNAse pour éliminer tout l'ADN (kit Turbo DNA free, Ambion). Après avoir contrôlé l'absence d'ADN par PCR, l'ARN a été rétro-transcrit (QScript cDNA Super Mix – Quanta). Une PCR classique a ensuite été réalisée sur cet ADNc avec des amorces spécifiques des bactéries E338F (ACT-CCT-ACG-GGA-GGC-AGC) et U1492R (GTT-ACC-TTG-TTA-CGA-CTT). Les produits de PCR ont ensuite été clonés puis séquencés. Cette étude a permis de mettre en évidence la présence d'une séquence largement dominante de *Candidatus Maribeggiatoa,* proche des séquences obtenues dans l'étude des tapis de la zone hydrothermale (McKay et al., 2012).

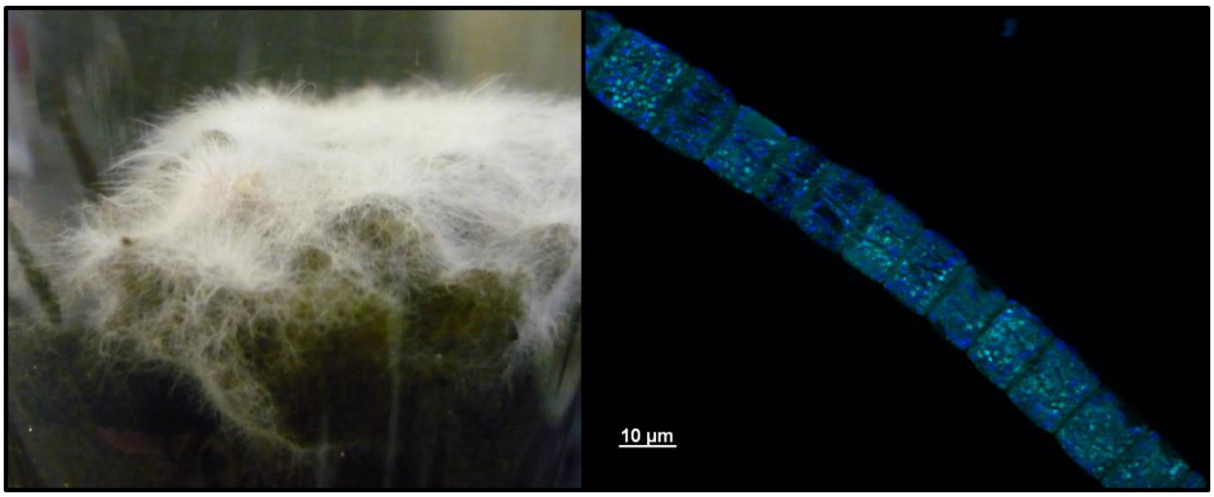


Figure 125 : Tapis microbiens. A gauche, photographie de la surface d'une carotte de sédiments prélevée à l'aide d'un carottier tube. On peut distinguer les limites du carottier qui mesure environ 5 cm de diamètre. A droite, observation en Hybridation fluorescente *in situ* sur un tapis microbien avec une sonde spécifique des *Gammaproteobacteria* et DAPI. On peut voir un filament de *Maribeggiatoa* renfermant des granules de soufre.

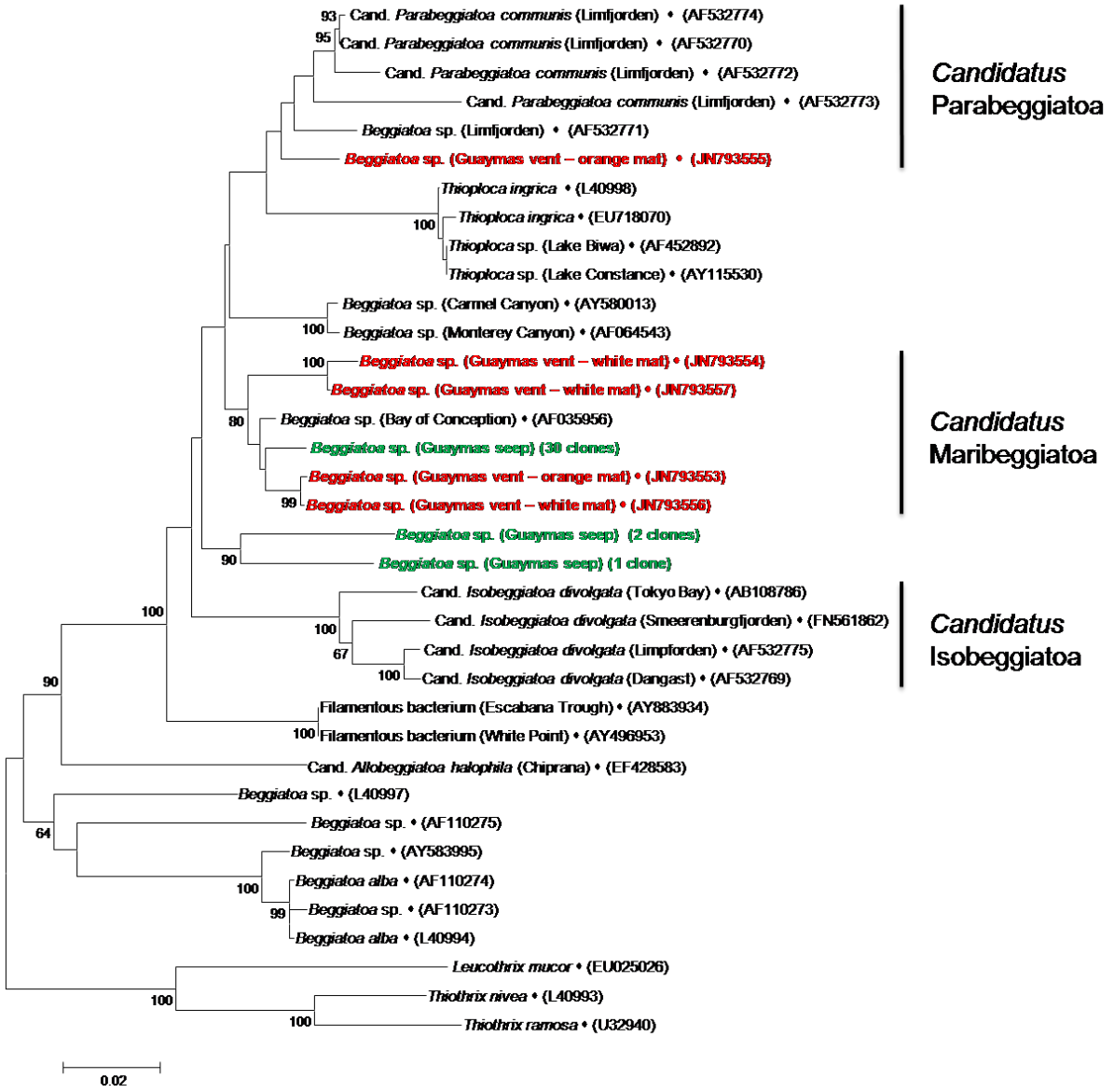


Figure 126 : Arbre phylogénétique des bactéries composant les tapis microbiens basé sur l'analyse du gène codant l'ARNr 16S. Neighbor-Joining, correction Kimura-2-parameter. Uniquement les bootstraps supérieurs à 70% sont indiqués au niveau des nœuds de l'arbre (bootsraps 1000 répétitions). Les numéros d'accession sont indiqués entre parenthèses. Les séquences provenant des zones d'émissions de fluides froids du Bassin de Guaymas sont indiquées en vert (notre étude) et celles provenant de la zone hydrothermale sont indiquées en rouge (McKay et al., 2012)

III. L'étude des communautés microbiennes sédimentaires

Maintenant que nous connaissons un peu mieux les communautés de surface, nous allons pouvoir passer à l'étude des communautés microbiennes présentes au sein des sédiments. Cette étude est divisée en trois parties distinctes. La première partie présente une étude pilote préliminaire qui nous a permis de tester et de mettre en place la technique de pyroséquençage sur nos échantillons. La deuxième partie présente l'étude des communautés microbiennes de la zone de suintements froids du Bassin de Guaymas, la Marge de Sonora. Enfin, la troisième partie présente les premiers résultats obtenus pour la zone de sources hydrothermales du Bassin de Guaymas, Southern Trough.

1) Expérience pilote

La première étape de l'étude des communautés microbiennes sédimentaires était donc la réalisation d'une « *expérience pilote* ». Cette première expérience avait ainsi pour but (1) de tester pour la première fois la technique de pyroséquençage au laboratoire, sur quelques-uns de nos échantillons, (2) de tester l'influence de deux méthodes d'extraction afin de nous permettre de faire un choix pour la suite de l'étude et enfin (3) de tester quatre couples d'amorces différents, deux pour les archées et deux pour les bactéries, et d'analyser les éventuelles différences de diversité ainsi obtenues. Sur les 64 « sous-échantillons » prévus initialement pour ce premier séquençage (7 échantillons, 2 méthodes d'extraction, 4 couples d'amorces et un duplicat), 12 n'ont pas été amplifiés avec succès par Genoscreen (Figure 127).

Références échantillons		Bactéries		Archées	
		Région 1	*Région 2*	*Région 1*	*Région 2*
Tapis blanc froid	1758-14 CT3 S1 Zhou				
	1758-14 CT3 S1 Kit				
	1758-14 CT3 S5 Zhou				
	1758-14 CT3 S5 Kit				
Tapis gris froid	1758-14 CT8 S1 Zhou				
	1758-14 CT8 S1 Kit				
	1758-14 CT8 S6 Zhou				
	1758-14 CT8 S6 Kit				
Tapis blanc chaud	1766-22 CT3 S1 Zhou				
	1766-22 CT3 S1 Kit				
	1766-22 CT3 S6 Zhou				
	1766-22 CT3 S6 Kit				
	1766-22 CT3 S1 Zhou				
	1766-22 CT3 S1 Kit				
Cheminée	Cheminée Zhou				
	Cheminée Kit				

Figure 127 : Résultats du séquençage de l'expérience pilote. Les cellules vertes indiquent une amplification et un séquençage réussit, alors que les cellules rouges indiquent un échec de l'amplification.

Nous avons choisi de ne conserver pour l'article « pilote » que les échantillons pour lesquels les deux méthodes d'extraction et les quatre couples d'amorces avaient donné des résultats (cellules vertes sur la Figure 127), soit trois échantillons différents. Nous avons donc centré notre étude sur l'échantillon « tapis gris » (Vasconcelos BIG18, 1758 CT8, section de surface 0-2 cm et section de profondeur 10-12 cm) et sur l'échantillon « tapis blanc chaud » (MegaMat M27, 1766 CT3, section de surface 0-2 cm), pour lequel nous avions également accès à un duplicat de séquençage. Les autres échantillons, qui ont, pour la plupart, donné de bonnes amplifications dans le cadre de la suite de l'étude, et les résultats correspondant n'ont été que très peu analysés pour le moment et ne seront donc pas présentés dans ce manuscrit mais pourront être utilisés par la suite.

L'étude pilote proposait donc d'analyser l'impact de la méthode d'extraction et des amorces PCR utilisées sur les résultats de diversité obtenus par pyroséquençage sur trois échantillons différents, dont deux provenant de la zone de suintements froids du Bassin de Guaymas (déjà analysés en séquençage classique par banques de clones au cours de la thèse d'Adrien Vigneron) et un échantillon provenant de la zone hydrothermale du Bassin. L'ADN de chaque échantillon a été extrait selon deux méthodes d'extraction, une méthode utilisant le kit FastDNA® SPIN Kit for soil (MP Biomedicals), et une méthode inspirée de Zhou et al., 1996 dans laquelle des chocs thermiques étaient utilisés pour la lyse des cellules. Quatre couples d'amorces ont été utilisés pour l'amplification par PCR, un premier couple ciblait la région V4 de l'ARNr 16S des bactéries, un autre les régions V5-V6 des bactéries, un troisième les régions V2-V3 des archées et enfin le dernier, les régions V5-V6 des archées également. Les résultats de séquençage ont ensuite été analysés grâce au pipeline *Mothur* et l'affiliation taxonomique des séquences a été faite par BLAST grâce au logiciel *Koriblast* en collaboration avec la société Genostar. Pour cela, nous avons utilisé la banque de données que nous avons créée et qui a été décrite dans le chapitre précédent du manuscrit (Réflexions autour des techniques utilisées - *Création d'une banque de données personnalisée*). Des analyses statistiques ont ensuite été réalisées sur l'ensemble des résultats obtenus, de la quantité d'ADN extraite par échantillon, aux proportions des différents groupes microbiens détectés, en passant par le nombre de chimères mises en évidence par *Uchime* ou encore aux indices de diversité β calculés sur *Mothur*.

Article 2

Influence of DNA extraction methods, 16S rRNA targeted hypervariable regions and sample origins on the microbial diversity detected by 454 pyrosequencing in marine chemosynthetic ecosystems

Perrine Cruaud, Adrien Vigneron, Céline Lucchetti-Miganeh, Pierre Emmanuel Ciron, Anne Godfroy and Marie-Anne Cambon-Bonavita

Soumis à *Journal of Microbiological Methods*

Influence of DNA extraction methods, 16S rRNA targeted hypervariable regions and sample origins on the microbial diversity detected by 454 pyrosequencing in marine chemosynthetic ecosystems

Perrine Cruaud [1, 2, 3], Adrien Vigneron[1, 2, 3], Céline Lucchetti-Miganeh[4], Pierre Emmanuel Ciron[4], Anne Godfroy[1, 2, 3], Marie-Anne Cambon-Bonavita[1, 2, 3]

[1]IFREMER, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, Technopôle Brest Iroise, Plouzané, France ; [2]Université de Bretagne Occidentale, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, Plouzané, France ; [3]CNRS, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, Technopôle Brest Iroise, Plouzané, France and [4]GENOSTAR, Montbonnot, France

Corresponding author : P. Cruaud (perrine.cruaud@gmail.com)

Submitted to the *Journal of Microbiological Methods*

ABSTRACT:

Next Generation Sequencing (NGS) opens up exciting possibilities for improving our knowledge of the environmental microbial diversity, allowing rapid and cost-effective identification of both cultivated and uncultivated microorganisms. However, library preparation, sequencing and analysis of the results can provide inaccurate representation of the studied community compositions. Therefore, all these steps need to be taken into account carefully. Here, we evaluated the impacts of DNA extraction methods, targeted 16S rRNA hypervariable regions and sample origins on the microbial diversity detected by 454-pyrosequencing in marine cold seep and hydrothermal vent sediments. To assign the reads with enough taxonomic precision, we built a database with about 2,500 sequences of *Archaea* and *Bacteria* from deep-sea marine sediments collected from and affiliated according to reference publications in the field. Thanks to statistical and diversity analysis as well as inference of OTU networks, we show that: (i) while DNA extraction methods do not seem to affect the results for some samples, they can lead to dramatic changes for others ; (ii) the choice of amplification and sequencing primers also affects considerably the microbial community detected in the samples. Thereby very different proportions of pyrosequencing reads were obtained for microbial lineages such as archaeal ANME-1, ANME-2c, MBG-D and deltaproteobacterial subgroups. This work clearly indicates that the results from sequencing-based analysis, such as pyrosequencing, should be interpreted very carefully. Therefore the combination of NGS with complementary approaches, such as FISH/CARD-FISH or Q-PCR, would be desirable to get a more comprehensive picture of environmental microbial communities.

KEY WORDS: Microbial communities ; representation biases ; NGS; reference database ; cold seeps; hydrothermal vents

1. Introduction

Elucidating how biodiversity is distributed and what are the underlying mechanisms that drive these patterns are central questions in ecology. However, the majority of microorganisms that occurs in natural environments cannot be cultured or isolated using traditional cultivation techniques (Amann et al., 1995, Hugenholtz et al., 1998, Rappé and Giovannoni, 2003), which limits our knowledge of the environmental microbial diversity. Culture-independent studies, such as molecular characterization,

have provided new insights into our understanding of microbial community structures, especially those inhabiting extreme environments, such as marine cold seeps and hydrothermal vents, where growth conditions may be difficult to mimic in laboratory (Baker et al., 2003). Today, high-throughput sequencing allows the characterization of microbial communities with unprecedented levels of coverage (Acosta-Martinez et al., 2010, Buée et al., 2009, Lee et al., 2010, Roesch et al., 2007, Sogin et al., 2006). While molecular analysis provide a less biased picture of environmental microbial communities than culture-based methods, each step of the analysis needs to be taken into account. Indeed, DNA extraction method, PCR amplification, or data analysis, can all lead to distortions in the composition of the analyzed samples (Claesson et al., 2009, Maarit Niemi et al., 2001, Roose-Amsaleg et al., 2001, Sergeant et al., 2012, Webster et al., 2003, Zhou et al., 1996).

Extraction is often pointed out as a key step to obtain DNA from all microorganisms present in one studied environment (Frostegård et al., 1999, Lloyd et al., 2010b, Maarit Niemi et al., 2001, Martin-Laurent et al., 2001, Robe et al., 2003, Roose-Amsaleg et al., 2001, Sergeant et al., 2012, Webster et al., 2003). However, DNA extraction from sediment samples may be difficult. The presence of complex organic matter and enzymatic inhibitors such as humic substances can interfere with enzymatic reactions (Juniper et al., 2001, Sørensen et al., 2002, Tebbe and Vahjen, 1993). Additionally, some microorganism cells might be resistant to lysis (e.g. resting cells, spores, cysts), especially in extreme environments (Valentine, 2007). Indeed, microbial cell envelopes vary in structure between and within microbial lineages and some cells are more easily disrupted than others (Kirk et al., 2004, Kuske et al., 1998, Maarit Niemi et al., 2001). Thus, optimization of DNA extraction methods is often necessary to access a correct representation of the whole microbial communities.

The DNA amplification step required for most sequencing methods is also critical. Sequencing of the 16S ribosomal RNA (rRNA) gene has been widely used to assess the phylogenetic diversity from environmental samples (Baker et al., 2003, Chakravorty et al., 2007, Schloss and Handelsman, 2004, Woese et al., 1990). This gene is composed of alternating conserved and hypervariable regions (Van de Peer et al., 1996). Presence of conserved regions enables PCR amplifications using "universal" primers supposed to bind even to DNA of unknown organisms (Van de Peer et al., 1996). DNA primers can be designed complementary to two distant conserved regions. PCR can then be done using forward and reverse primers, leading to a PCR fragment including both conserved and variable regions. Amplified products are then used to evaluate microbial diversity and to study taxonomic affiliations and evolutionary relationships between organisms (Van de Peer et al., 1996). However, 16S rRNA hypervariable regions exhibit different degrees of variability according to the studied phylogenetic groups; thereby no unique hypervariable region allows distinguishing between all known microbial lineages (Kim et al., 2011, Schmalenberger et al., 2001, Yu and Morrison, 2004). Then, working on partial 16S rRNA sequences may bias analysis of diversity and species richness recovery (Kim et al., 2011, Stackebrandt and Goebel, 1994, Yu and Morrison, 2004). Compared to other high-throughput sequencing technologies, pyrosequencing (Roche 454) is an attractive method for 16S rRNA sequencing as relatively long reads are obtained (Galan et al., 2010, Sergeant et al., 2012), though it does not allow accessing the full-length of the gene (i.e. 1600 bp). Therefore, in pyrosequencing studies, the choice of primers (Sergeant et al., 2012) and sequenced regions may significantly affect the estimates of Operational Taxonomic Unit (OTU) richness and microbial diversity analysis (Claesson et al., 2009, Kim et al., 2011, Vahjen et al., 2010).

In this manuscript, we analyzed the effect of two major steps of microbial diversity characterization using the 16S rRNA gene. On three physicochemically contrasted samples from cold seep and hydrothermal vent environments, two different extraction methods and four primer sets

targeting different hypervariable regions of the 16S rRNA gene were tested. Amplicons were sequenced using 454 pyrosequencing. Impacts of experimental designs were evaluated by comparing DNA extraction yields, OTU richness and taxonomic diversity.

2. Materials and methods

2.1 Sample description and handling

Sediment samples were collected from the Guaymas Basin using push cores operated by the manned submersible *Nautile* during the "BIG" cruise (June 2010). The target sites included the "Vasconcelos" site at cold seeps area from the Sonora Margin (marker BIG18; N 27°35.5770; W 111°28.9840; 1574 m depth, dive 1758-14 core CT8) (Vigneron et al., 2013, Vigneron et al., 2014) and the "MegaMat" site at hydrothermal vents area from the Southern Trough (marker M27; N 27°00.4451; W111°24.5298; 2000 m depth, dive 1766-22 core CT3). At marker BIG18 ("Vasconcelos" site, cold seeps), the sediment surface was colonized by abundant populations of grey polychaetes and gastropods surrounding a large white microbial mat. At marker M27 ("MegaMat" site, hydrothermal vents), the sediment surface was covered with white microbial mats near a hydrothermal mound overgrown with *Riftia* clusters. After recovery on board, sediment cores were immediately transferred in a cold room (4°C). Cores were then sub-sampled aseptically in 2 cm thick layers that were frozen at -80°C until required for molecular analysis.

Two different sections from the cold seep core (surface layer 0-2 cmbsf, called S_{C1} and bottom layer 10-12 cmbsf, called S_{C6}, core CT8 dive 1758-14) and the surface layer from the hydrothermal vent core (0-2 cmbsf, called S_{H1}, core CT3 dive 1766-22) were studied.

2.2 DNA extraction methods

We tested the most commonly used protocols to extract DNA from deep marine sediment samples (Alain et al., 2011) : the method proposed by Zhou et al. (1996) (hereafter referred as "Zhou's method") and a manufactured bead-beating kit. DNA extractions were carried out independently on each sample (S_{C1}, S_{C6} and S_{H1}) as follows:

DNA from three replicates of 2.5 g per sample was extracted using the Zhou's method (Zhou et al., 1996) with some modifications. Cycles of freezing-thawing in a high-salt extraction buffer were followed by chemical lysis at 65°C, in presence of sodium dodecyl sulfate (SDS), hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) and proteinase K. Since lysis efficiency varies between and within microbial groups (Kirk et al., 2004, Maarit Niemi et al., 2001), the freeze-thawing step was repeated ten times in order to increase the diversity of extracted lineages. Two milliliters of this mix were taken off after 3, 5, 7 and 10 freezing-thawing cycles in order to protect DNA released from easily disrupted cells. This method could allow DNA extraction with minimal shearing that could prevent the formation of chimera (Zhou et al., 1996). Moreover, hexadecylmethylammonium bromide (CTAB) has been used in previous studies to complex and remove contaminants from DNA (Zhou et al., 1996)

In parallel, DNA from four replicates of 0.6 g per sample was extracted with a bead-beating method. This method is based on a commercially available kit FastDNA®SPIN for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) that has been modified following Webster et al. (Webster et al., 2003). FastDNA SPIN kit is based on a mechanical lysis with ceramic and silica beads in a bead beater, which theoretically allows a more efficient lysis of all microorganisms including bacterial

spores, endospores and gram positive bacteria (Roose-Amsaleg et al., 2001). Furthermore, this method uses silica columns to retain high-molecular weight DNA while removing inhibitors such as humic acids, salts and proteins.

Quantity and purity of the extracted DNA from all replicates were evaluated by optical density using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Results were statistically compared *via* Student tests and ANOVA using the software R (R Development Core Team (2011)). DNA extract replicates were then pooled per extraction method and purified using the Wizard DNA clean-up kit (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions. Purified DNA extracts were stored at -20°C until PCR amplification.

2.3 PCR amplification and pyrosequencing

The 16S rRNA gene was amplified using four different primer sets, two targeting *Bacteria* and two others for *Archaea* (Table 1).

	Primer set	Target regions	Primer sequences (5'-3')	Sequence length (bp)
Bacteria	Bact1F	V4	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATA	275
	Bact1R		GCGTGGACTACCAGGGTATCT	
	Bact2F	V5-V6	CAAACAGGATTAGATACCCTG	304
	Bact2R		CGTTRCGGGACTTAACCCAACA	
Archaea	Arch1F	V2-V3	CGGRAAACTGGGGATAAT	360
	Arch1R		TRTTACCGCGGCGGCTGBCA	
	Arch2F	V5-V6	GGATTAGATACCCSGGTAGTC	313
	Arch2R		GYGGGTCTCGCTCGTTRCC	

Table 1 : Sets of primers used for PCR amplifications

The primer sets for *Bacteria* targeted V4 (Bact1F/Bact1R) and V5-V6 hypervariable regions (Bact2F/Bact2R) (Table 1) while the primer sets for *Archaea* targeted V2-V3 (Arch1F/Arch1R) and V5-V6 hypervariable regions (Arch2F/Arch2R) (Table 1). To allow multiplexing, forward primers were fused to 6 different tags (10 nt) and the 454 GS-FLX sequencing primer A (5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-***Tag-***PrimerF-3'). The reverse primers were fused to the 454 GS-FLX sequencing primer B (5'-CCTATCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC-PrimerR-3'). Primer design and DNA amplifications were performed by Genoscreen (Lille, France).

Amplicons were purified and their concentrations and sizes were analyzed using DNA 1000 chips on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Amplicon products were mixed equimolarly (10^8 molecules per microliter of each amplicon) then sequenced on a 454 Life Sciences Genome Sequencer GS-FLX (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Quantification, purification and sequencing were performed by Genoscreen (Lille, France). Duplicates of the hydrothermal vent sample, extracted *via* Zhou's and kit methods, were amplified and sequenced independently to check for reproducibility.

2.4 Reads filtering

To minimize the effects of random sequencing errors (Huse et al., 2007, Kunin et al., 2010), pyrosequencing reads were filtered using the Mothur pipeline (Schloss et al., 2009). We removed sequences *(i)* shorter than 200 bp, *(ii)* containing homopolymer longer than 8 bp *(iii)* that aligned to the incorrect region of the 16S rRNA gene, *(iv)* identified as chimera using the Uchime algorithm

(Edgar et al., 2011, Schloss et al., 2011, Schloss et al., 2009) and (*v*) affiliated to *Archaea* when *Bacteria* was targeted and conversely. Results were compared (Student test and ANOVA) according to sample origin, targeted region and extraction method using R.

In order to minimize the impact of higher number of sequences per sample, all the following analyzes were performed on the same number of sequences for the bacterial and the archaeal regions.

2.5 OTU analysis

Numbers of Operational Taxonomic Units (OTUs) and Beta diversity indexes (Yue & Clayton measure of dissimilarity) were determined using the Mothur pipeline (Schloss et al., 2009) at two different levels of dissimilarity (3% and 10%). OTU networks were constructed at 10% dissimilarity using the QIIME pipeline (Caporaso et al., 2010) and Cytoscape software (Shannon et al., 2003). Results were compared using R.

2.6 Taxonomic assignment

Effects of DNA extraction methods and targeted 16S gene regions were also evaluated using taxonomic assignment of sequences using BLAST algorithms. The use of international databases such as EMBL, DDBJ, GenBank or RFAM and their associated taxonomy did not allow assignment at a sufficient level of precision to allow discussion. Indeed, taxonomy used in these databases is sometimes inaccurate, not updated, or levels of classification are often too high to be informative (e.g. "uncultured archaeon"). Therefore, we designed a reference database for the purpose of this study consisting of 786 archaeal and 1677 bacterial sequences from deep-sea marine sediments collected from and affiliated according to reference publications (Biddle et al., 2012, Biddle et al., 2006, Cambon-Bonavita et al., 2009, Dang et al., 2010, Dhillon et al., 2005, Dhillon et al., 2003, Dojka et al., 1998, Durand et al., *in prep*, Emerson et al., 2007, Ettwig et al., 2009, Harris et al., 2004, Harrison et al., 2009, Hugenholtz et al., 1998, Inagaki et al., 2003, Knittel et al., 2003, Kubo et al., 2012, Lloyd et al., 2010a, Lloyd et al., 2006, Pachiadaki et al., 2011, Pachiadaki et al., 2010, Rappé and Giovannoni, 2003, Schreiber et al., 2010, Sorensen and Teske, 2006, Teske et al., 2002, Teske and Sorensen, 2008, Teske, 2006, Vigneron et al., 2013, Vigneron et al., 2014, Webster et al., 2006, Webster et al., 2004). Sequences were downloaded from NCBI and aligned with MAFFT 6.903 (Katoh et al., 2005). The consistency of taxonomic affiliations was checked by phylogenetic reconstructions. Phylogenetic trees were estimated using distance (Neighbor-joining) and maximum likelihood (ML) methods. Pairwise nucleotide sequence divergences were calculated using a Kimura-2-parameter model of substitution (Kimura, 1980) and Neighbor-Joining trees (Saitou and Nei, 1987) were reconstructed using MEGA 4.0.2 (Tamura et al., 2007). Robustness of topologies was assessed by bootstrap procedures using 1000 replicates (Felsenstein, 1985). ML analysis were performed using MPI-parallelized RAxML 7.2.8 (Stamatakis, 2006), using a GTR model with among site rate variation modeled by a discrete gamma approximation with four categories. GTRCAT approximation of models was used for ML bootstrapping (1000 replicates). ML analysis were conducted on the CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010). When groups were recovered on the two phylogenetic trees, corresponding names provided in reference publications were considered valid and kept in our reference database. When names did not yet exist in NCBI, new taxonomy IDs were created. When groups appeared para- or polyphyletic, sequences were affiliated in our database to the first higher level of classification that appeared monophyletic. The full list of sequences and associated details (NCBI accessions, reference publications, associated affiliations and affiliations used in our database) is available in the Appendix S1. The custom database and its associated taxonomy were implemented in the software Koriblast (Korilog, Questembert, France, available at http://www.korilog.com/) and

can be downloaded from a FTP server (http://ftp.genostar.com/ifremer/Bacteries_Archees_genostar.fasta). The pyrosequencing reads were blasted against this reference database for taxonomic assignment (BLAST performed in Koriblast in which sequences are assigned to the first BLAST hit). Since error of taxonomic assignment may be due to the restricted length of sequences, correct taxonomic assignment of short sequences obtained with the pyrosequencing primers used in this study was theoretically validated by a congruent blast of our sequence database cut to the amplified fragment length against the original database with the software Koriblast.

Microbial diversities were then statistically analyzed using the Primer-E software (Clarke and Warwick, 2001). Ordination by multidimensional scaling derived from the Euclidean distance between samples were used to visualize diversity (Clarke, 1993).

3. Results

3.1 Extraction yield and DNA quality

DNA quantity and quality recovered varied according to samples and extraction methods (Table 2). Quantity of DNA obtained with the Zhou's method was significantly different between samples (ANOVA, *p-value* < 0.0001), while the quantity obtained with the commercial kit seemed steadier. Differences between DNA quantity obtained using either Zhou's or kit methods were significant only for samples from the cold seep surface (S_{C1}) (ANOVA, *p-value* < 0.0001). The highest yield of DNA was recovered from cold seep surface samples extracted with the Zhou's method.

	Extraction	µg of DNA / g of sediment	260/280	260/230
1758 CT8 S_{C1} Cold seeps, surface layer Grey mat	Zhou	101.68	1.87	1.36
	Kit	27.42	1.63	0.56
1758 CT8 S_{C6} Cold seeps, bottom layer Grey mat	Zhou	17.67	1.57	0.90
	Kit	20.98	2.31	0.44
1766 CT3 S_{H1} Hydrothermal vents, surface layer White mat	Zhou	39.50	1.90	1.30
	Kit	35.04	2.26	0.50

Table 2 : Quantity and quality of extracted DNA (averaged between extraction replicates) evaluated by optical density using a Nanodrop spectrophotometer

DNA quality revealed by the 260/280 and 260/230 ratios showed significant differences between samples (ANOVA, *p-values* < 0.01) except for the 260/230 ratio obtained with the commercial kit (Table 2). Assuming that pure extracted DNA should have a 260/280 ratio > 1.8 and a 260/230 ratio > 2.0 (Griffiths et al., 1997), DNA from surface samples extracted with the Zhou's method was cleaner than DNA obtained from deep samples. On the other hand, DNA from surface cold seep samples extracted with the commercial kit was less clean than DNA from the other samples. DNA quality was significantly different between extracts for all samples. For 260/280 ratios, the Zhou's method gave better results than commercial kit for samples from the cold seep surface (ANOVA, *p-value* < 0.001). However, the commercial kit performed better than the Zhou's method

for other samples (ANOVA, *p-values* < 0.03 for cold seeps S_{C6} and hydrothermal vents S_{H1}). For 260/230 ratios, the Zhou's method yielded higher 260/230 ratios than the commercial kit for all samples (ANOVA, *p-values* < 0.001).

3.2 Numbers of reads and sequence filtering

Different numbers of reads were obtained according to extraction methods, samples origin and targeted regions (Table 3). When considering sample duplicates from hydrothermal vent sediments, statistical tests showed no significant difference between the numbers of reads obtained whatever the extraction method used or the 16S region targeted. Likewise, no significant difference was observed between the numbers of reads obtained from the different samples whatever the amplified regions, to the exception of the Bact2 region (ANOVA, *p-value* < 0.02). However the numbers of reads obtained for each amplified region were significantly different (ANOVA, *p-values* < 0.0001).

During the filtering step, 17.36% to 48.78% of reads were removed depending on sample origin and amplified region (Table 3). For each amplified region, no significant difference was detected between proportions of remaining sequences obtained with the Zhou's or kit extraction methods. However, significant differences were observed between proportions of remaining sequences from the different samples whatever the amplified region, except for the Arch1 region (ANOVA, *p-values* < 0.03). Likewise, significant differences were identified between proportions of remaining sequences for the different regions whatever the sample, except for the cold seep S_{C6} sample (ANOVA, *p-values* < 0.01).

To determine during which filtering step sequences were removed, we compared (i) the numbers of detected chimera between samples and (ii) the numbers of sequences belonging to kingdoms that were not supposed to be amplified by our kingdom-specific primer sets.

Sequences identified as chimera represented only a small part of the reads (Table 3). No significant difference was observed between proportions of detected chimera obtained with the Zhou's or kit extraction methods whatever the amplified region. However the proportions of chimera were significantly different between samples for the Arch2 region (ANOVA, *p-value* < 0.001). Likewise, significant differences were highlighted depending on the amplified region whatever the sample, except for the cold seep S_{C6} sample (ANOVA, *p-values* < 0.02). The highest proportion of chimera was observed for the Arch2 region, when amplified from the hydrothermal vent samples (average of 4.38%).

Primer sets were designed to amplify specifically *Bacteria* or *Archaea*. However, to the exception of the Bact2 primer set, this specificity did not seem to be perfect (Table 3). No significant difference was pointed out between proportions of removed sequences due to a lack of specificity, when DNA was extracted using Zhou's or kit method whatever the amplified region. In contrast, proportions of removed sequences were significantly different between samples for the Arch1 and Arch2 regions (ANOVA, *p-values* < 0.001). Likewise, significant differences were identified depending on amplified region for cold seep S_{C6} and hydrothermal vent S_{H1} samples (ANOVA, *p-values* < 0.01).

		Number of reads before filtering				% of remaining sequences after filtering				Chimera proportion				Proportion of sequences from other kingdoms			
		Bacteria		*Archaea*		*Bacteria*		*Archaea*		*Bacteria*		*Archaea*		*Bacteria*		*Archaea*	
Sample	Extraction	Bact1	Bact2	Arch1	Arch2	Bact1	Bact2	Arch1	Arch2	Bact1	Bact2	Arch1	Arch2	Bact1	Bact2	Arch1	Arch2
1758 CT8 S_{C1} Cold seeps surface layer *Grey mat*	Zhou	2226	8631	2343	4615	79.38%	66.06%	56.68%	67.93%	0.09%	0.30%	0.17%	1.19%	0.22%	0.00%	3.37%	2.73%
	Kit	3048	7472	2397	4461	82.64%	67.34%	55.86%	66.06%	0.00%	0.12%	0.67%	1.10%	1.05%	0.00%	7.63%	2.82%
1758 CT8 S_{C6} Cold seeps bottom layer *Grey mat*	Zhou	2522	9662	3264	4661	66.26%	73.39%	68.38%	70.29%	0.00%	0.28%	0.61%	0.47%	3.41%	0.00%	3.95%	0.11%
	Kit	2606	10672	2302	4533	58.33%	69.77%	54.69%	68.59%	0.00%	0.38%	0.22%	1.54%	2.88%	0.00%	3.91%	0.13%
1766 CT3 S_{H1} Hydrothermal vents surface layer *White mat*	Zhou	2791	11461	2068	4268	74.88%	67.93%	66.97%	64.81%	0.14%	0.15%	1.02%	4.38%	3.91%	0.00%	0.19%	1.03%
	Kit	3145	10879	2765	3968	69.83%	66.40%	57.07%	60.26%	0.03%	0.20%	0.47%	4.64%	5.47%	0.00%	0.22%	0.66%
	Zhou	2735	10992	2575	4110	65.23%	65.62%	51.22%	62.51%	0.33%	0.19%	0.66%	4.77%	1.10%	0.00%	0.31%	0.97%
	Kit	4143	12572	3771	4302	71.59%	65.13%	51.87%	64.71%	0.17%	0.29%	0.29%	3.72%	4.30%	0.00%	0.29%	1.14%

Table 3 : Numbers of reads before and after filtering for all samples according to primer set and DNA extraction method used. Proportion of detected chimera and sequences amplified from other kingdoms

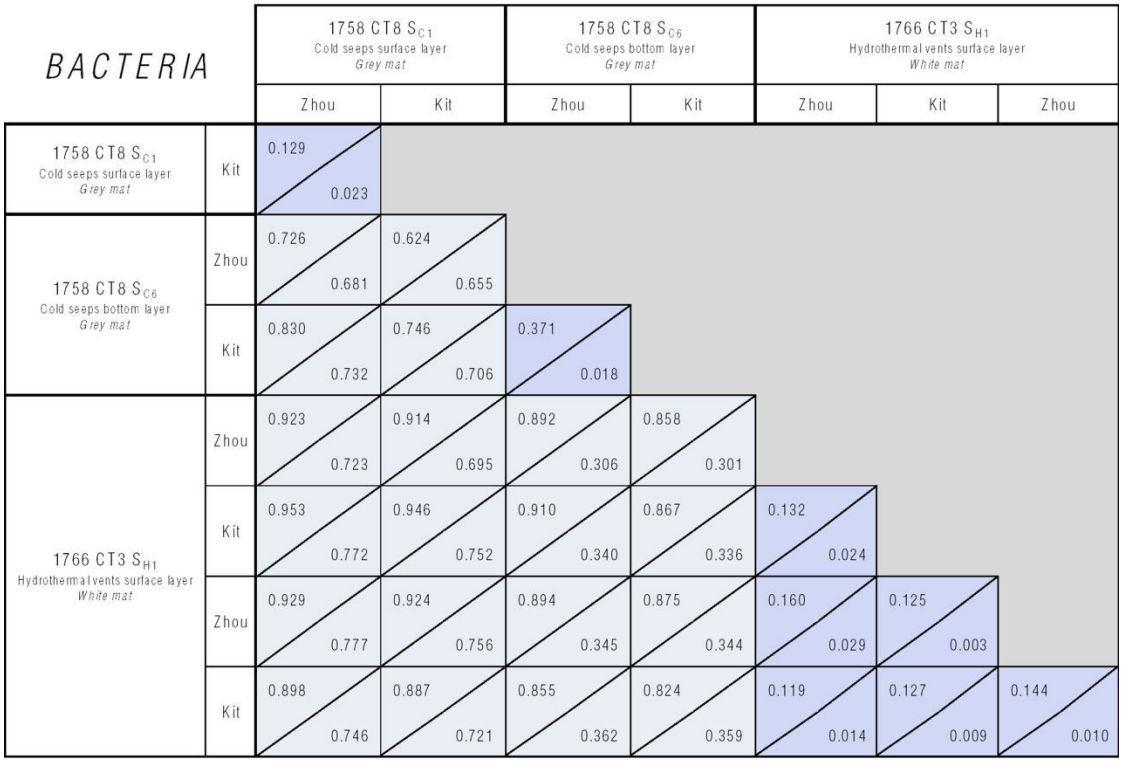
3.3 OTU analysis

The number of operational taxonomic units (OTUs) was calculated for each sample at two different levels of dissimilarity: 3% and 10% (Table 4). Whatever the amplified region, no significant difference was observed between the numbers of OTUs obtained when DNA was extracted using Zhou's or kit methods. However statistical tests showed that the numbers of OTUs were different depending on samples whatever the amplified region, except for the Arch1 and Bact1 regions when we considered a 10% level of dissimilarity (ANOVA, *p-values* < 0.02). Moreover, the numbers of OTUs at both 3% and 10% levels of dissimilarity were significantly different between the sequenced regions for the archaeal dataset, to the exception of the cold seep S_{C1} sample (Student test, *p-values* < 0.03). For the archaeal dataset, less OTUs were obtained for the Arch2 region than for the Arch1 region when considering the cold seep S_{C6} sample (141 and 299 at 3% and 26 and 125 at 10% respectively). For the hydrothermal sample, less OTUs were found for the Arch1 region than the Arch2 region at 3% dissimilarity (183 and 224 respectively) whereas it was the opposite at 10% dissimilarity (95 and 78 respectively). The number of OTUs at 10% dissimilarity were significantly higher for the Bact1 region (86, 131 and 124 for cold seep $S_{C1,}$ cold seep S_{C6} and hydrothermal vent S_{H1} samples respectively) than for the Bact2 region (65, 92, and 100 for cold seep $S_{C1,}$ cold seep S_{C6} and hydrothermal vent S_{H1} samples respectively) (Student test, *p-values* < 0.02).

		Number of OTUs (3%)				Number of OTUs (10%)			
		Bacteria		*Archaea*		*Bacteria*		*Archaea*	
Sample	Extraction	Bact1	Bact2	Arch1	Arch2	Bact1	Bact2	Arch1	Arch2
1758 CT8 S_{C1} Cold seeps surface layer *Grey mat*	Zhou	171	182	202	165	85	67	113	32
	Kit	185	172	175	113	87	62	76	26
1758 CT8 S_{C6} Cold seeps bottom layer *Grey mat*	Zhou	268	278	296	136	134	96	132	21
	Kit	243	286	302	145	128	88	118	31
1766 CT3 S_{H1} Hydrothermal vents surface layer *White mat*	Zhou	243	269	199	257	137	104	94	91
	Kit	208	240	181	222	110	98	89	78
	Zhou	202	240	179	199	119	94	106	69
	Kit	231	246	173	219	130	102	91	73

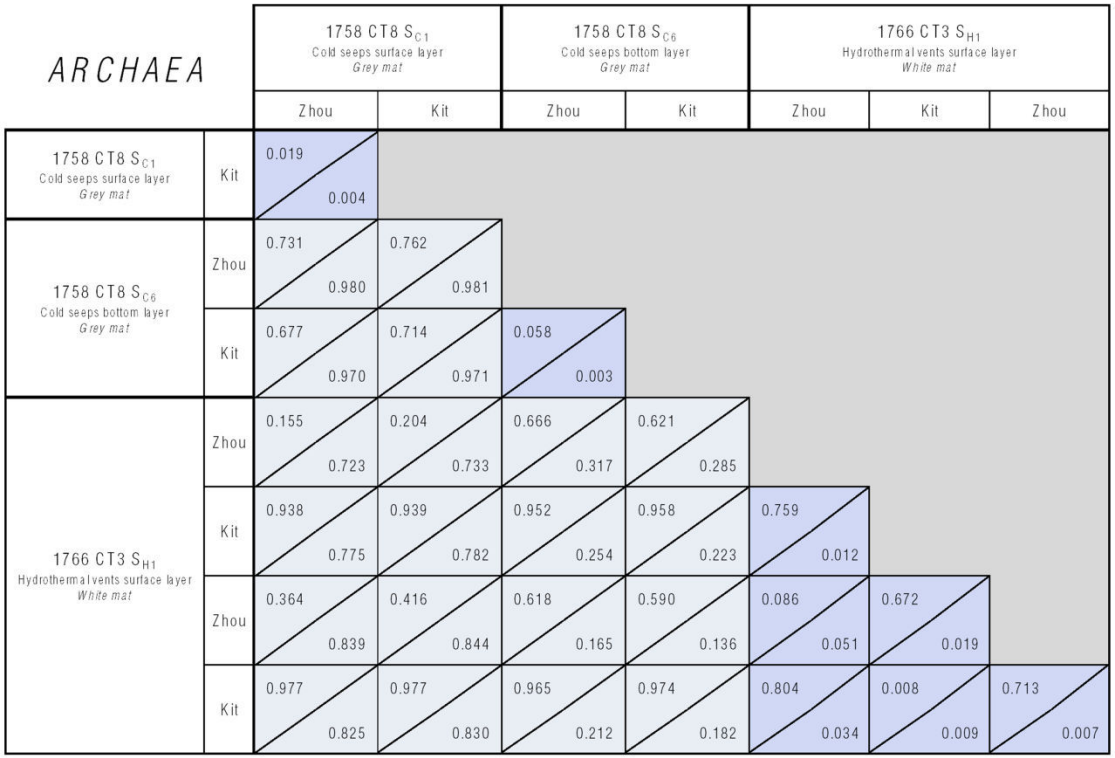
Table 4 : Numbers of OTUs for each sample according to primer set and DNA extraction method used at two levels of dissimilarity (3% and 10%)

Yue & Clayton measure of dissimilarity (Tables 5 and 6) and OTU networks (Figure 1) were used to compare OTU composition between samples, duplicates, extraction methods and amplified regions at a level of dissimilarity of 10%.



BACTERIA		1758 CT8 S_{C1} Cold seeps surface layer *Grey mat*		1758 CT8 S_{C6} Cold seeps bottom layer *Grey mat*		1766 CT3 S_{H1} Hydrothermal vents surface layer *White mat*		
		Zhou	Kit	Zhou	Kit	Zhou	Kit	Zhou
1758 CT8 S_{C1} Cold seeps surface layer *Grey mat*	Kit	0.129 / 0.023						
1758 CT8 S_{C6} Cold seeps bottom layer *Grey mat*	Zhou	0.726 / 0.681	0.624 / 0.655					
	Kit	0.830 / 0.732	0.746 / 0.706	0.371 / 0.018				
1766 CT3 S_{H1} Hydrothermal vents surface layer *White mat*	Zhou	0.923 / 0.723	0.914 / 0.695	0.892 / 0.306	0.858 / 0.301			
	Kit	0.953 / 0.772	0.946 / 0.752	0.910 / 0.340	0.867 / 0.336	0.132 / 0.024		
	Zhou	0.929 / 0.777	0.924 / 0.756	0.894 / 0.345	0.875 / 0.344	0.160 / 0.029	0.125 / 0.003	
	Kit	0.898 / 0.746	0.887 / 0.721	0.855 / 0.362	0.824 / 0.359	0.119 / 0.014	0.127 / 0.009	0.144 / 0.010

Table 5 : Yue & Clayton measure of dissimilarity for *Bacteria* (Bact1 / Bact2 regions) according to OTU composition between samples, duplicates, extraction methods and amplified regions at level of dissimilarity of 10%. The Yue and Clayton dissimilarity estimator measures the dissimilarity of two samples considering OTUs that are shared or not by the samples (Yue and Clayton, 2005). This index is scored on a scale of 0 to 1, where 0 represents identity between samples and 1 represents complete dissimilarity. Blue cells indicate same sample comparisons



ARCHAEA		1758 CT8 S_{C1} Cold seeps surface layer *Grey mat*		1758 CT8 S_{C6} Cold seeps bottom layer *Grey mat*		1766 CT3 S_{H1} Hydrothermal vents surface layer *White mat*		
		Zhou	Kit	Zhou	Kit	Zhou	Kit	Zhou
1758 CT8 S_{C1} Cold seeps surface layer *Grey mat*	Kit	0.019 / 0.004						
1758 CT8 S_{C6} Cold seeps bottom layer *Grey mat*	Zhou	0.731 / 0.980	0.762 / 0.981					
	Kit	0.677 / 0.970	0.714 / 0.971	0.058 / 0.003				
1766 CT3 S_{H1} Hydrothermal vents surface layer *White mat*	Zhou	0.155 / 0.723	0.204 / 0.733	0.666 / 0.317	0.621 / 0.285			
	Kit	0.938 / 0.775	0.939 / 0.782	0.952 / 0.254	0.958 / 0.223	0.759 / 0.012		
	Zhou	0.364 / 0.839	0.416 / 0.844	0.618 / 0.165	0.590 / 0.136	0.086 / 0.051	0.672 / 0.019	
	Kit	0.977 / 0.825	0.977 / 0.830	0.965 / 0.212	0.974 / 0.182	0.804 / 0.034	0.008 / 0.009	0.713 / 0.007

Table 6 : Yue & Clayton measure of dissimilarity for *Archaea* (Arch1 / Arch2 regions) according to OTU composition between samples, duplicates, extraction methods and amplified regions at level of dissimilarity of 10%. The Yue and Clayton dissimilarity estimator measures the dissimilarity of two samples considering OTUs that are shared or not by the samples (Yue and Clayton, 2005). This index is scored on a scale of 0 to 1, where 0 represents identity between samples and 1 represents complete dissimilarity. Blue cells indicate same sample comparisons

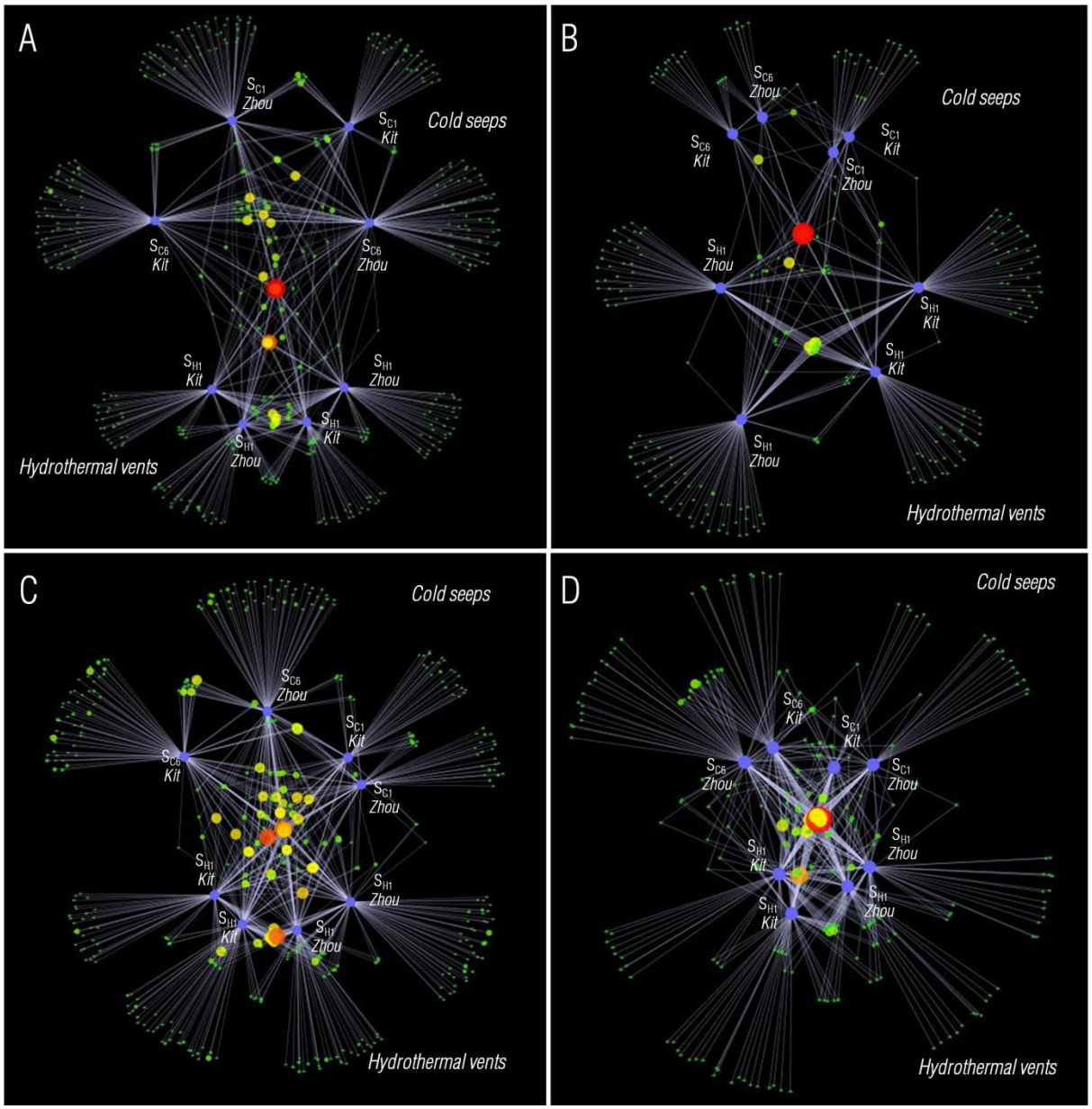


Figure 1 : Network analysis of the microbial communities according to the sample origin and DNA extraction method used. OTUs were defined at 10% dissimilarity. Sample nodes are denoted by purple nodes while other nodes represent individual OTUs. Size and color of OTU nodes indicate OTU abundance (green and small dots indicate few sequences and red and large dots indicate many sequences). Shared OTUs are connected by lines. (A) Arch1 region, (B) Arch2 region, (C) Bact1 region and (D) Bact2 region

The Yue and Clayton dissimilarity estimator measures the dissimilarity of two samples considering OTUs that are shared or not by the samples (Yue and Clayton, 2005). This index is scored on a scale of 0 to 1, where 0 represents identity between samples and 1 represents complete dissimilarity. Indexes obtained showed that OTU compositions between samples were not similar, though some of them were very close (Tables 5 and 6). Regarding the *Bacteria* (Table 5), the highest similarity indexes were obtained between samples from the same origin (comprised between 0.119 and 0.371 for Bact1 region and 0.003 and 0.029 for Bact2 region). For hydrothermal vent sample, differences observed between the two extraction methods did not seem more important than those observed between sample duplicates. Furthermore, community structures obtained with the Bact2 primer set appeared more similar between all samples than those obtained with the Bact1 primer set (Student test, *p-value* < 0.01 with averages of 0.664 and 0.412 respectively for Bact1 and Bact2 region). Regarding the *Archaea* (Table 6), the highest similarity indexes were obtained between the samples from the same origin in the case of the Arch2 region (comprised between 0.003 and 0.029). However community structures appeared more similar between duplicates than between samples extracted with a different method for the Arch1 region (Student test, *p-value* < 0.001 with averages of 0.047 and 0.737 for a same and a different method respectively). This difference between extraction methods was also found when considering comparisons between seep and vent samples. Indeed, for the Arch1 region, community structures were more similar between seeps and vents in the case of Zhou's extraction than in the case of kit extraction (Student test, *p-value* < 0.01, with averages of 0.285 for Zhou's extraction and 0.958 for kit extraction between vent and cold seeps S_{C1}, and 0.624 for Zhou's extraction and 0.962 for kit extraction between vent and cold seeps S_{C6}).

On OTU networks, both OTUs and samples are represented by nodes. In Figure 1, samples are represented in purple dots while other nodes represent OTUs. OTUs including many sequences are represented by big red dots while OTUs including few sequences are represented by small green dots and intermediates. When a sequence is affiliated to an OTU in a sample, the OTU is linked by line to the corresponding sample node. The OTU networks showed that OTUs represented by many sequences were shared between all samples (big red dots in Figure 1) while non-shared OTUs contained only few sequences (small green dots in Figure 1). For the bacterial and archaeal regions, segregation was observed between seep and vent samples (Figure 1). Samples (purple dots in Figure 1) were clustered according to sample origin. Regarding the *Bacteria*, OTUs appeared to be mainly shared between all samples (Figure 1C and D). The more scattered Bact1 network showed that OTUs were more similar between samples when the Bact2 region was amplified. Therefore, community structures obtained with the Bact2 primer set seemed to be more similar than those obtained for the Bact1 region. Regarding the *Archaea*, less OTUs seemed to be shared between seep and vent samples (Figure 1A and B) and OTU composition of the different samples (purple dots) seemed less similar.

3.4 Taxonomic affiliation

Taxonomic affiliation of the remaining sequences after filtering highlighted different community structures according to sampling sites, targeted regions and extraction methods.

Similarities between samples were represented graphically for *Bacteria* (Figure 2) and *Archaea* (Figure 3) using Euclidean distances and proportions of the different microbial groups were reported on Tables 7 and 8. If no bias existed between extraction methods and primer set used, we would expect three different microbial community structures according to the three physicochemically contrasted samples used.

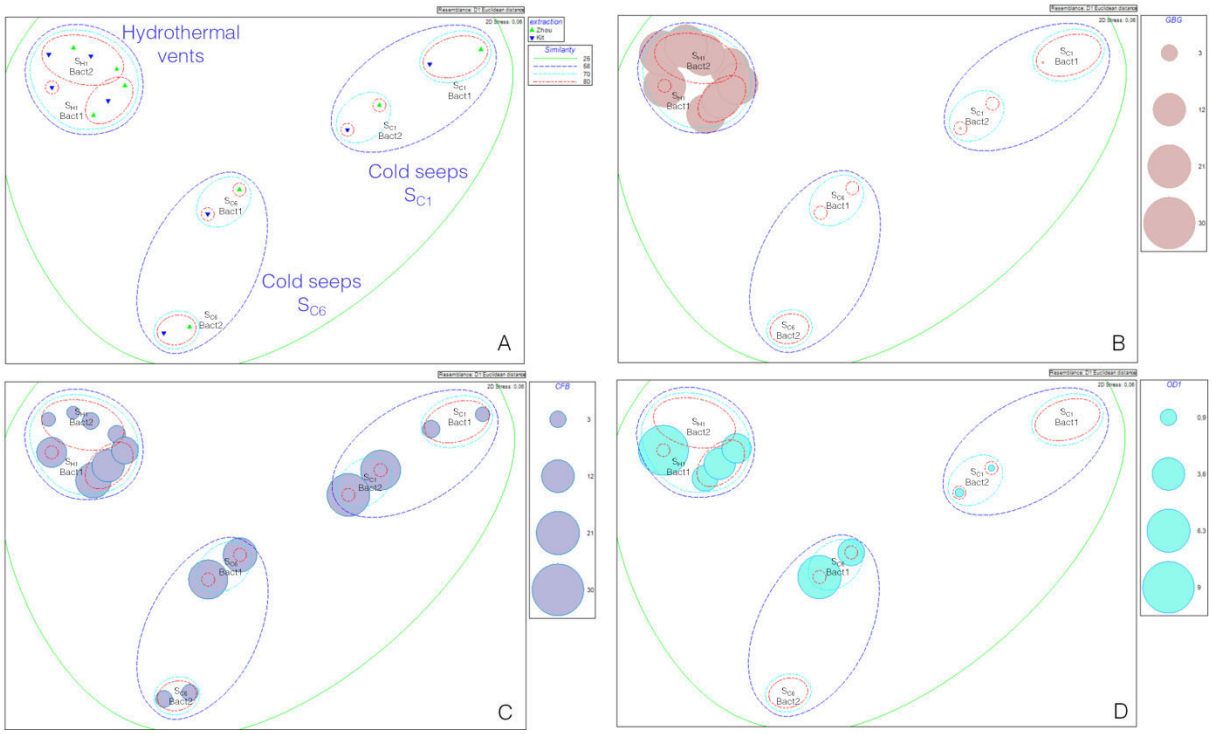


Figure 2 : Ordination by MultiDimensional Scaling (MDS) derived from the Euclidean distances between samples according to DNA extraction and primer set used for Bacteria. Lines indicate percent similarities between grouped samples. (B, C and D) Size of colored circles indicates microbial group proportions in each sample (for GBG [B], CFB [C] and OD1 [D] groups).

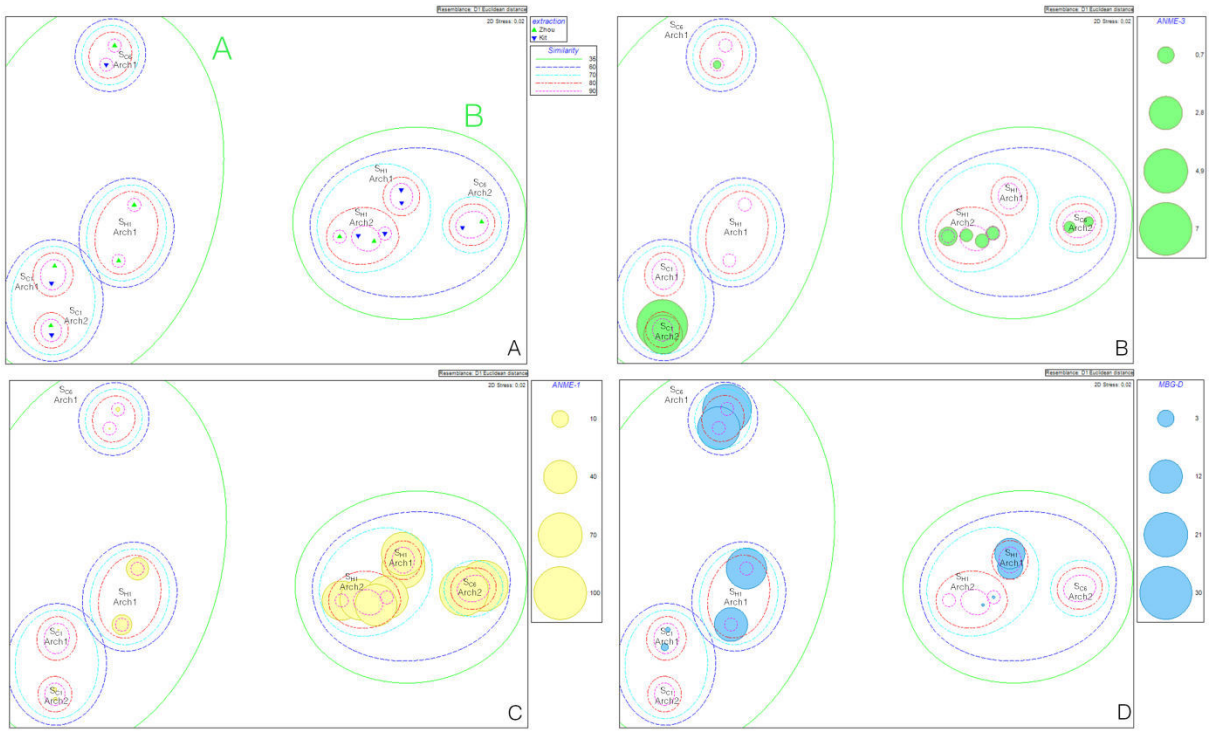


Figure 3 : Ordination by MultiDimensional Scaling (MDS) derived from the Euclidean distances between samples according to DNA extraction and primer set used for Archaea. Lines indicate percent similarities between grouped samples. (B, C and D) Size of colored circles indicates microbial group proportions in each sample (for ANME-3 [B], ANME-1 [C] and MBG-D [D] groups)

					1758 CT8 S_{C1} Cold seeps surface layer – *Grey Mat*				1758 CT8 S_{C6} Cold seeps bottom layer – *Grey Mat*				1766 CT3 SH_1 Hydrothermal vent surface layer – *White Mat*							
					Zhou		Kit		Zhou		Kit		Zhou		Kit		Zhou		Kit	
					Bact1	Bact2	Bact1	Bact2	Bact1	Bact2	Bact1	Bact2	Bact1	Bact2	Bact1	Bact2	Bact1	Bact2	Bact1	Bact2
Acidobacteria					0.13%	0.72%	0.07%	0.59%	1.12%	0.72%	0.26%	0.79%	2.83%	3.42%	3.95%	2.96%	2.30%	3.29%	3.36%	3.55%
Actinobacteria					3.75%	2.57%	5.53%	5.13%	0.53%	1.84%	1.45%	3.16%	0.33%	0.86%	0.07%	0.26%	0.46%	0.72%	0.86%	1.18%
Caldithrix						0.39%		0.99%	0.99%	2.56%	0.07%	2.50%	0.07%	4.47%	0.79%	4.67%	0.99%	5.40%	0.07%	4.01%
CFB					18.03%	2.37%	20.66%	3.42%	12.96%	3.09%	17.30%	3.16%	14.61%	3.36%	10.26%	3.16%	9.55%	1.84%	12.24%	2.17%
Chloroflexi						0.46%	0.20%	0.46%	3.55%	3.16%	4.34%	3.55%	2.96%	1.58%	1.32%	1.51%	2.04%	1.65%	2.63%	1.84%
Firmicutes					1.51%	1.51%	0.59%	0.92%	4.01%	1.71%	1.78%	1.45%	0.66%	3.88%	0.99%	3.55%	3.29%	4.41%	1.97%	2.83%
GBG (Guaymas Bacterial Group)							0.07%	0.07%					17.38%	17.30%	20.00%	19.74%	18.89%	20.61%	16.25%	21.97%
Gemmatimonadetes					0.07%	0.39%		0.33%	0.20%	0.72%	0.13%	1.12%	0.13%	1.84%		2.43%	0.07%	1.51%	0.07%	2.37%
JS-1									6.51%	1.97%	7.30%	5.33%	0.07%	0.20%	0.39%	0.07%		0.20%	0.07%	0.07%
Mollicutes					0.07%	0.13%	0.46%	0.20%		0.33%		0.26%	0.13%	0.07%	0.53%	0.07%	1.71%		1.32%	
NC-10							0.07%	0.13%	0.66%	0.59%	0.66%	0.39%	0.53%	0.26%	0.20%	0.39%	0.13%	0.46%	0.33%	0.20%
OD1					0.13%		0.26%		2.43%		6.32%		2.30%		8.42%		2.96%		3.36%	
OP3					0.07%	0.20%		0.13%		0.79%	0.07%	0.39%	0.07%	0.86%	0.26%	0.99%	0.07%	0.66%		1.18%
OP8					0.07%	0.33%	0.07%	0.39%	0.20%	0.33%	0.99%	0.59%	0.20%	0.72%	0.07%	0.79%		0.46%		0.59%
OP9									0.07%	0.46%		0.07%		0.39%		0.72%		0.53%		0.53%
Planctomycetes					0.39%	0.39%	0.20%	0.26%	0.92%	0.39%	2.17%	0.20%	2.11%	0.46%	0.33%	0.53%	2.44%	0.99%	1.97%	0.20%
SAR406					0.13%	0.33%	0.33%	1.05%	0.46%	1.31%			0.07%	0.07%		0.13%	0.07%	0.20%		0.13%
Spirochaetes					0.72%	1.64%	0.53%	0.59%	0.46%	1.05%	3.03%	1.84%	0.20%	1.78%	0.13%	0.86%	0.46%	2.04%	1.32%	1.84%
Thermodesulfobacteria								0.13%	0.07%	0.07%			0.39%	0.39%	0.33%	0.26%	0.46%	0.07%		0.07%
Thermotogales									0.07%				4.08%	0.33%	0.07%	0.07%	0.39%	0.13%	0.13%	0.13%
Verrucomicrobia					2.04%	0.72%	0.86%	0.92%	0.33%	0.79%	1.91%	0.53%	0.92%	1.25%	0.79%	0.72%	1.25%	1.51%	0.53%	1.58%
WS3/HG2					0.86%	0.33%	0.79%	0.07%	2.76%	1.58%	2.24%	2.17%	0.07%	1.32%	1.78%	0.79%	0.13%	0.66%	0.33%	0.46%
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	*Rhodobacterales*			0.39%	0.07%	0.07%	0.13%	0.20%	0.07%		0.20%	0.13%		0.13%	0.07%			0.13%	
		Other *Alphaproteobacteria*			0.20%	0.26%	0.20%	0.39%	0.33%	0.39%	0.13%	0.13%	0.26%	0.39%	0.26%	0.07%	0.13%		0.07%	0.26%
	Deltaproteobacteria	*Myxococcales*				0.20%	0.07%	0.13%	0.13%	0.20%		0.33%	0.53%	0.39%		0.39%	0.13%	0.66%	0.26%	0.33%
		Desulfuromonadales			2.43%	2.04%	2.57%	2.96%	0.79%	1.05%	3.29%	0.46%	0.20%	0.33%	0.53%	0.59%	0.26%	0.72%	0.99%	0.46%
		Desulfobacterales	***Desulfobulbaceae***	SEEP-SRB3	2.50%	3.22%	4.67%	5.20%	1.05%	1.18%	1.51%	0.59%	0.99%	1.58%	1.12%	0.72%	0.20%	1.05%	1.25%	2.11%
				SEEP-SRB4	8.22%	4.54%	4.47%	3.88%	1.18%	0.59%	0.39%	0.39%	0.26%	0.79%	0.07%	0.26%	0.26%	0.66%	0.20%	0.79%
				Other	11.64%	10.00%	5.92%	7.11%	0.86%	1.25%	2.24%	0.92%	2.76%	1.91%	0.46%	1.51%	1.32%	1.45%	0.79%	1.12%
			Desulfobacteraceae	SEEP-SRB1a	3.42%	4.21%	5.66%	5.46%	0.59%	1.05%	0.46%	0.72%	0.13%	0.39%		0.33%	0.33%	0.39%	0.13%	0.13%
				SEEP-SRB1b		0.20%	0.07%	0.72%	2.11%	25.31%	2.63%	24.87%	0.07%	0.13%		0.26%	0.07%	0.07%	0.20%	0.26%
				SEEP-SRB1c					0.07%	1.25%	0.07%	1.25%		0.59%	0.07%	1.38%	0.07%	0.20%		0.39%
				SEEP-SRB1d	0.07%			0.13%	0.13%	2.10%		1.64%		1.12%		0.59%	0.20%	0.79%		0.72%
				SEEP-SRB1e	0.26%	0.26%			0.39%	0.46%	0.26%	0.59%	0.39%	0.07%	1.18%	0.26%	0.26%	0.07%	1.71%	0.13%
				SEEP-SRB1f					0.07%			0.07%				0.13%		0.46%		
				Other	0.20%	3.75%	0.66%	3.68%	1.71%	1.71%	0.92%	1.05%	1.71%	7.96%	4.93%	9.54%	4.48%	8.03%	3.55%	7.37%
			Other *Desulfobacterales*		3.75%	1.45%	3.09%	1.25%	9.93%	5.33%	3.22%	4.41%	2.04%	2.37%	2.89%	2.11%	2.83%	2.44%	3.68%	2.30%
		SEEP-SRB2				0.07%	0.07%	0.59%	1.45%	3.29%	4.80%	5.13%	15.34%	14.41%	19.34%	15.66%	13.56%	17.71%	14.41%	15.79%
		Other *Deltaproteobacteria*			0.59%	0.72%	0.20%	0.92%	2.24%	1.97%	2.70%	1.78%	3.82%	2.43%	2.50%	2.89%	2.63%	1.91%	3.82%	1.64%
	Gammaproteobacteria	*Seggiatoa*			1.18%	0.26%		0.26%	0.33%	0.07%		0.26%	2.83%	3.82%	5.33%	4.28%	5.20%	4.81%	6.45%	4.80%
		CGS (Clam Gill Symbiont Group)			1.58%	1.78%	1.18%	1.78%	1.51%	1.31%	0.79%	1.78%	0.66%	0.13%	0.86%	0.46%	0.99%	0.33%	1.05%	0.46%
		MHGSII (*M. hadalis* gill symbiont group)			0.99%	3.03%	1.12%	3.88%	2.70%	3.68%	1.78%	3.62%	0.20%	0.13%	0.07%	0.20%	0.92%	0.26%	0.07%	0.20%
		Methylococcales			0.53%	0.20%	2.57%	0.20%	4.41%	0.26%	3.29%	0.20%	0.26%		0.53%		0.13%	0.07%		
		Other *Gammaproteobacteria*			2.24%	4.47%	8.55%	3.09%	12.76%	10.19%	13.03%	10.20%	5.07%	4.67%	1.84%	3.62%	3.62%	3.09%	3.29%	3.55%
	Epsilonproteobacteria	*Campylobacterales*			3.62%	2.11%	4.80%	4.01%	2.50%	0.66%	0.66%	0.99%	1.18%	0.92%	1.12%	0.46%	1.91%	0.46%	1.71%	0.39%
		Other *Epsilonproteobacteria*			26.45%	41.84%	21.32%	36.18%	7.76%	5.92%	2.89%	2.89%	3.09%	7.11%	2.43%	5.72%	7.37%	3.36%	4.54%	6.25%
	Zetaproteobacteria					0.13%		0.79%		0.07%	0.07%		0.07%		0.07%	0.07%	0.07%	0.13%	0.13%	0.07%
Other *Bacteria*					1.78%	2.70%	2.11%	1.45%	6.51%	7.17%	4.87%	8.03%	7.90%	3.55%	3.62%	3.75%	5.40%	3.55%	4.80%	3.55%

Table 7 : Taxonomic affiliation of pyrosequencing reads after filtering. Results for *Bacteria* according to sample, DNA extraction method and primer set used

		1758 CT8 S_{C1} Cold seeps surface layer – *Grey Mat*				1758 CT8 S_{C6} Cold seeps bottom layer – *Grey Mat*				1766 CT3 SH_1 Hydrothermal vent surface layer – *White Mat*							
		Zhou		Kit		Zhou		Kit		Zhou		Kit		Zhou		Kit	
		Arch1	Arch2	Arch1	Arch2	Arch1	Arch2	Arch1	Arch2	Arch1	Arch2	Arch1	Arch2	Arch1	Arch2	Arch1	Arch2
AAG						2.86%		3.58%				0.08%					0.08%
DHVE-6		8.34%	0.40%	7.78%	0.08%	25.50%		24.72%	0.08%	0.95%	1.59%	0.87%	0.64%	1.43%	0.71%	1.51%	1.51%
DHVE-8		1.19%	0.24%	0.24%		0.32%	0.08%	0.08%		0.48%	0.40%		0.40%	0.48%	0.87%		0.24%
RC-V		12.39%	2.07%	7.31%	1.11%	13.82%	0.32%	5.88%	0.40%	7.47%	1.43%	3.65%	1.91%	3.89%	0.56%	3.10%	1.43%
Thermoprotei	*Desulfurococcales*										0.16%		0.64%		0.71%		0.72%
	Thermoproteales								0.08%		0.79%		0.32%	0.08%	0.08%		0.16%
Korarchaeota			0.08%								0.16%		0.16%		0.24%		0.08%
Thaumarchaeota	MCG	1.59%		0.87%	0.24%	3.57%	0.16%	10.89%	0.48%	1.75%	1.59%	1.59%	1.35%	1.99%	3.26%	0.79%	1.99%
	MBG-B	0.95%	3.18%	1.35%	1.19%	3.26%	2.86%	8.19%	3.89%	1.51%	1.51%	0.64%	0.56%	1.19%	0.71%	0.79%	0.24%
	MG-I			0.16%	0.32%	0.32%	0.08%	0.79%		0.16%	0.16%	0.32%		0.40%	0.08%	0.24%	
	Other *Thaumarchaeota*										0.08%		0.16%				0.08%
Euryarchaeota	*Archaeoglobales*										0.32%		0.56%		0.48%	0.08%	0.40%
	Halobacteriales					0.08%					0.08%			0.08%			
	Thermococcales		0.08%							0.40%	1.27%	0.24%	2.62%		1.43%	0.08%	1.99%
	MBG-D	0.24%		0.56%		26.21%		19.71%		12.31%		7.07%		17.95%	0.08%	10.09%	0.08%
	Other *Thermoplasmatales*	0.56%		0.08%		0.48%		0.56%		4.53%	0.56%	4.61%	0.87%	6.91%		6.20%	0.08%
	MBG-E				0.08%	0.08%		0.40%		0.32%	0.08%			0.08%	0.08%		
	SAGMEG	0.32%				0.08%	0.08%	0.16%		0.48%	0.16%	0.16%	0.08%	0.24%	0.08%		0.16%
	GEG	0.24%		0.24%	0.08%	2.22%	0.08%	0.79%		2.38%	0.79%	3.10%	0.95%	5.64%	0.64%	3.49%	
	ANME-1 Guaymas									0.32%	0.64%	0.79%	2.70%	0.56%	0.87%	0.71%	2.15%
	ANME-1	0.08%	0.56%		0.40%	0.48%	92.45%	0.08%	86.34%	14.30%	55.60%	67.12%	60.13%	17.71%	63.22%	67.04%	65.74%
	ANME-2ab	17.87%	24.70%	23.27%	23.75%	3.34%	0.71%	2.70%	1.43%	0.08%			0.32%	0.08%	0.08%		0.64%
	ANME-2c	48.61%	57.43%	50.28%	61.87%	12.47%	2.38%	12.32%	3.97%	49.88%	25.97%	7.70%	22.48%	38.05%	21.13%	4.13%	16.61%
	ANME-2-Sonora	0.71%		1.11%		0.16%		0.08%									
	ANME-2	0.08%	1.59%	0.79%	4.21%	0.08%	0.24%	4.05%	1.19%		0.48%		0.24%		0.24%		0.72%
	ANME-3		6.59%		3.81%		0.24%	0.16%	0.32%		0.87%		0.40%		0.48%		0.48%
	GoM-Arc-I					0.08%	0.24%		0.32%	0.08%	1.11%	0.32%	0.48%	0.16%	0.95%	0.08%	1.59%
	Other *Methanosarcinales*	1.19%	2.94%	0.40%	2.78%	0.08%	0.08%	0.32%	0.95%	0.40%	1.43%	0.08%	0.24%	0.40%	1.27%	0.32%	0.48%
	Methanomicrobiales	0.24%							0.08%				0.32%	0.08%	0.08%	0.08%	
	Methanocellales								0.08%				0.32%		0.08%		
	Methanobacteriales			0.08%					0.08%		0.48%		0.24%		0.40%		
Other *Archaea*		5.40%	0.16%	5.48%	0.08%	4.53%		4.53%	0.32%	2.22%	2.30%	1.67%	0.95%	2.62%	1.19%	1.27%	2.38%

Table 8 : Taxonomic affiliation of pyrosequencing reads after filtering. Results for *Archaea* according to sample, DNA extraction method and primer set used

Regarding *Bacteria*, the higher levels of dissimilarity were observed between samples from different origins. Three main clusters were observed: the surface seep sediments, the deep seep sediments and the surface vent sediments (Figure 2A). The differences observed between samples from different origins were mainly due to variations in some bacterial group proportions (Table 7). Similarity percentage analysis (SIMPER) (Clarke, 1993) highlighted that *Epsilonproteobacteria* (21.75% contribution) and SEEP-SRB1b (sulfate-reducing *Bacteria*) (11.03% contribution) groups were mainly responsible for the differences between surface and deep seep samples (*Epsilonproteobacteria* represented 31.45% of the detected sequences in surface sediments and 4.87% in deep sediments, whereas SEEP-SRB1b represented 0.25% of the detected sequences in surface and 13.73% in depth, Table 7). The difference between seep and vent samples was mainly due to the Guaymas Bacterial Group (GBG) (Figure 2B) (15.10% contribution), *Epsilonproteobacteria* (11.40% contribution) and SEEP-SRB2 (11.01% contribution) (GBG represented 0.02% of the detected sequences in seep sediments and 19.02% in vents, *Epsilonproteobacteria* represented 18.16% of detected sequences in seeps and 4.98% in vents and SEEP-SRB2 represented 1.93% of the detected sequences in seeps and 15.75% in vents, Table 7) which is congruent with previous molecular surveys of these ecosystems (Biddle et al., 2012, Kleindienst et al., 2012, Vigneron et al., 2014). Within the three main clusters, samples grouped according to the primer set used (Figure 2A). SIMPER analysis highlighted that difference in community structures observed between Bact1 and Bact2 amplifications was mainly due to variation in amplification of CFB (*Bacteroidetes* group) (Figure 2C) (25.56%, 14.62%, and 15.11% contribution for surface seep samples, deep seep samples and vent samples respectively). Indeed, CFB represented 19.31%, 15.10% and 11.04% of the sequences amplified with the Bact1 primer set in S_{C1}, S_{C6} and S_{H1} samples respectively and only 2.90%, 3.09% and 2.63% of the sequences amplified with the Bact2 primer set (Table 7). However, *Epsilonproteobacteria* from surface seep sediments (23.55% contribution) and SEEP-SRB1b from deep seep sediments (27.65% contribution) were more amplified with the Bact2 primer set (SIMPER analysis) (23.89% of the sequences for Bact1 and 39.61% for Bact2 for *Epsilonproteobacteria* and 2.37% of the sequences for Bact1 and 25.09% for Bact2 for SEEP-SRB1b, Table 7). Likewise, the candidate division OD1 was only detected with the Bact2 primer set (Figure 2D), contributing to 5.32% and 7.66% of the variation within S_{C6} and S_{H1} samples (Figure 2D and Table 7). Finally we observed low levels of dissimilarity (< 30%, Figure 2A) between extraction methods, though these levels did not seem greater than those observed between duplicates.

Regarding *Archaea*, differences generated by the targeted regions were much conspicuous than for *Bacteria* (Figures 3A). For both Arch1 and Arch2 regions, clustering between samples of the same origin was partially masked by this "region and extraction method effects" (Figure 3A). Two main groups were highlighted. Group A gathered seep surface samples (Arch1 and Arch2 regions), deep seep samples (Arch1 region only) and vent surface samples extracted with the Zhou's method (Arch1 region only) (Figure 3A). Group B clustered the other vent surface samples and deep seep samples (Arch2 region only) (Figure 3A). SIMPER analysis highlighted that ANME-1 (archaeal anaerobic methanotroph) (Figure 3B) (43.45% contribution) and ANME-2c (20.28% contribution) were mainly responsible for the difference observed between groups A and B (ANME-1 4.20% for group A and 69.71% for group B, ANME-2c 41.32% for group A and 13.05% for group B, Table 8). Additional segregations were observed within these two groups. Three different clusters were observed in group A: deep seep sample (Arch1), surface seep samples (Arch1 and Arch2) and vent samples (Arch1) (Figure 3A). Segregation between surface seep samples and deep seep samples was mainly due to ANME-2c (30.52% contribution) and ANME-2ab (14.06% contribution) which were more largely detected in surface seep samples, whereas MBG-D (Marine Benthic Group D) (Figure 3D) (16.51% contribution) and DHVE-6 (Deep-sea Hydrothermal Vent Euryarchaeota) (15.21% contribution) were

more detected in deep seep samples. Distinction between deep seep (Arch1) and vent samples (Zhou, Arch1) was mainly due to the larger detection of ANME-2c (27.69% contribution) and ANME-1 (Figure 3C) (13.79% contribution) in vent samples and DHVE-6 (20.98% contribution) in deep seep samples (ANME-2c 12.4% and 43.97%, DHVE-6 25.11% and 1.19%, ANME-1 0.28% and 16.01%, for deep seep and vent samples respectively, Table 8). Likewise, difference between surface seep and vent samples (Zhou, Arch1) was mainly due to the larger detection of ANME-2ab (23.74% contribution) in vent samples and ANME-1 (Figure 3C) (16.75% contribution) and MBG-D (Figure 3D) (15.88% contribution) in surface seep samples (Figure 3) (ANME-2ab 22.40% and 0.08%, ANME-1 0.26% and 16.01% and MBG-D 0.2% and 15.13%, for vent and surface seep samples respectively, Table 8). Two main clusters were observed in group B: vent *versus* deep seep samples (Arch2) (Figure 3A). This cleavage was mainly due to ANME-1 (Figure 3C) (42.81% contribution) and ANME-2 (21.45% contribution) (ANME-1 89.40% and 63.14% and ANME-2c 3.18% and 16.34%, respectively for vent and seep samples, Table 8). Therefore, for deep seep and vent samples, we observed an important effect of the targeted regions. For deep seep samples, ANME-1 (Figure 3C) (49.20% contribution), DHVE-6 (13.84% contribution) and MBG-D (Figure 3D) (12.68% contribution) were mainly responsible for this cleavage (ANME-1 0.28% and 89.40%, DHVE-6 25.11% and 0.04% and MBG-D 22.96% and 0%, respectively for Arch1 and Arch2 amplified from deep seep samples, Table 8). For vent samples, ANME-1 (Figure 3C) (42.59% contribution), ANME-2c (20.03% contribution) and MBG-D (Figure 3D) (14.81% contribution) were mainly responsible for this cleavage (ANME-1 13.01% and 59.41%, ANME-2c 43.97% and 23.55% and MBG-D 15.13% and 0.04%, respectively for Arch1 and Arch2 amplified from vent samples extracted with the Zhou's method, Table 8). Finally, the region effect detected when DNA extractions from vent samples were performed with the Zhou's method was not observed when the commercial kit was used.

4. Discussion

In marine sediments, like in many other ecosystems, most of the microorganisms remain uncultured. Thus, the identification of the microbial diversity is mainly based on molecular characterization. Most of studies investigating the microbial composition of environments focused on DNA profiling, which requires efficient and unbiased DNA extraction procedures as well as the use of universal primers and relevant bioinformatics tools. These requirements become critical with the emergence and increasing use of high-throughput sequencing and analysis of complex environments harboring various contaminants and almost unknown microbial communities. In this study, we investigated the influence of DNA extraction methods and 16S rRNA regions targeted by four different primer sets through 454 pyrosequencing of three physicochemically contrasted samples from extreme marine environments (cold seeps and hydrothermal vents).

4.1 Impact of DNA extraction methods

We showed that the two extraction methods led to various levels of DNA quantity and quality (Table 2). Indeed, commercial kit extraction (FastDNA®SPIN for Soil), which used bead-beating lysis in reduced size tubes and included a purification step, yielded steadier DNA quantity between samples than the Zhou's method (Zhou et al., 1996 with modifications), which used chemical and freeze-thaw lysis. Quantity of DNA extracted with the commercial kit could be limited by the maximum of DNA concentrations allowed by the filters used in the filtration step. Variations between DNA quantities might also be dependent on sample features. While extracted DNA quantities were similar for the hydrothermal and deep seep samples whatever the extraction method used, extraction of DNA from the surface seep sample with the Zhou's method provided higher quantities than the manufactured kit. These higher concentrations of DNA could be explained by the co-extraction of

DNA from the megafauna living on the surface of this sediment sample (e.g. small gastropods and polychetes). By contrast, the tube sizes used for the bead-beating extraction could have excluded these animals, whose DNA would then not be extracted. Interestingly, previous studies highlighted that co-extraction of eukaryotic DNA or other polyvalent polymers among microbial DNA enhanced DNA extraction efficiency, minimizing adsorption and degradation of target DNA (Frostegård et al., 1999, Volossiouk et al., 1995). Thus co-extraction of eukaryotic DNA by the Zhou's method could eventually provide a benefice in case of low microbial biomass environments. Furthermore, DNA quality seemed also dependent on the extraction method used. While the commercial kit provided higher 260/280 ratios, the Zhou's method led to better 260/230 ratios. Therefore, the commercial kit could perform better in removing contaminant proteins while the Zhou's method could be more efficient in removing humic substances (Griffiths et al., 1997, Logemann et al., 1987, Schultz et al., 1994).

The influence of the extraction methods on pyrosequencing results was investigated. No significant difference in terms of numbers of reads was observed between DNA extraction protocols in the pyrosequencing raw data outputs (Table 3). This result indicates that despite differences in DNA quality after extraction, the purification step led to similar amplification efficiencies. Likewise, after the filtering steps of the raw pyrosequencing data, no significant difference was observed among the numbers of reads obtained whatever the DNA extraction method used (Table 3). Bead-beating has been previously suspected to shear DNA due to the mechanical lysis and thus may rise to the formation of more chimeric PCR products than the Zhou's protocol (de Lipthay et al., 2004, Zhou et al., 1996). However our results indicated that the two extraction methods did not appear to drastically affect the quality of the reads and the chimera formation.

Extraction methods have been previously shown to bias community structure and microbial diversity results (de Lipthay et al., 2004, Frostegård et al., 1999, Maarit Niemi et al., 2001, Webster et al., 2003). In our study, the OTUs obtained when DNA was extracted with the commercial kit or the Zhou's method were globally similar for each given sample (Tables 4, 5 and 6 and Figure 1), which indicated that the two extraction methods might lead to similar estimations of the global microbial diversity. Interestingly, the differences in DNA quantity observed in the surface seep sample did not appear to change the results of the analysis, confirming that the supplementary DNA extracted with the Zhou's method could likely correspond to non-prokaryotic DNA. However, the extraction method used seemed to impact the results we obtained for the vent samples when the Arch1 primer set was used. This could indicate that some groups, which were amplified only by the Arch1 primer set, could be more efficiently extracted with one extraction method, as previously noted (Aakra et al., 2000, de Lipthay et al., 2004, Frostegård et al., 1999, Priemé et al., 1996). This trend was not observed for the other samples amplified with the Arch1 primer set. Therefore, the groups accountable for the difference between extractions could be specific to the vent samples. Thereby, picture of the community structure could be sometimes strongly biased by the extraction step, and combination of several extraction methods would be a good alternative to get a more accurate picture of the microbial diversity.

4.2 Impact of primers and targeted regions

Besides the DNA extraction step, the choice of PCR primers and 16S rRNA gene regions is also critical for molecular analysis of microbial diversity (Claesson et al., 2009, Kim et al., 2011, Sergeant et al., 2012, Vahjen et al., 2010). Two primer sets for *Bacteria* and two other for *Archaea*, each targeting a different 16S rRNA region, have been tested and contrasted results have been obtained.

The primer set choice impacted the results in the early stages of our analysis. Even if an equimolar mix of samples was used for sequencing, significantly different numbers of reads were obtained depending on the primer set used (Table 3), as previously noted in other projects (A. Dheilly, Biogenouest platform, Rennes, France, personal communication). These differences were likely due to the fusion primer set used. Indeed, association of primers with tag sequences and pyrosequencing adaptators may reduce hybridization efficiency on DNA capture beads, which is required for emulsion PCR and sequencing, and/or disadvantage amplification. Fusion primers must be designed carefully to minimize the formation of potential secondary structures. Each sample might also be labeled with two different tags and sequenced twice to reduce amplification bias due to differential binding of the fusion primers. We also observed contrasted impact of read filtering according to the primer set used (Table 3). Chimera detection and specificity of the primer sets for their respective kingdom led to the removal of more or less reads depending on the primer set used (Table 3) thus reducing the amount of sequences available for the rest of our study. The highest number of chimera obtained for the V5-V6 regions (amplified with the Arch2 primer set, Table 3), might reveal that these regions could be more prone to splitting than the V2-V3 regions (amplified with the Arch1 primer set). The amount of low quality data removed during the filtering step could also depend on samples and their associated microbial communities. Indeed, our results reflected some differences in terms of diversity among the samples (Tables 4, 5, 6, 7 and 8 and Figures 1, 2 and 3). For example, we highlighted that the number of detected chimera was dependent on samples for the Arch2 region (Table 3). Origin of these chimera could be explained by the presence of some particular hydrothermal microbial lineages. Due to their nucleotide composition, 16S rRNA V2-V3 regions could not be amplified for these groups with the Arch1 primer set while their successful amplification using the Arch2 primer for the V5-V6 regions could generate more chimera.

Regarding the microbial diversity, important differences in the community structure were observed depending on the primer set used (Tables 5, 6, 7 and 8 and Figures 1, 2 and 3). The use of a custom database allowed a sufficient level of precision for read assignment to detect these differences for some specific groups (e.g. SEEP-SRB1 or MBG-D), while NCBI (EMBL, DDBJ and GenBank databases) and its associated taxonomy was inaccurate and levels of classification were often too high to be informative enough. These differences were more pronounced for *Archaea* than for *Bacteria* and were probably due to disparity of matching efficiency between primers for some microbial groups, as previously observed in marine sediments (Teske and Sorensen, 2008). Thereby the Arch1 primer set appeared to amplify some archaeal groups which were less or not amplified with the Arch2 primer set (Tables 4 and 8), notably some ANME-2c, MBG-D and DHVE-6 lineages (Table 8 and Figure 3). Conversely, the Arch2 primer set appeared to amplify some archaeal groups which were less or not amplified with the Arch1 primer set (Tables 4 and 8), such as ANME-1 lineage (Table 8 and Figure 3). Likewise the Bact1 primer set appeared to successfully amplified some bacterial groups (Tables 4 and 7), particularly CFB and candidate division OD1 bacteria that were less or not amplified with the Bact2 primers, while the Bact2 primers amplified more efficiently *Epsilonproteobacteria* and *Deltaproteobacteria* SEEP-SRB1b (Table 7 and Figure 2). This differential amplification success led to more similar microbial communities between samples when the Bact2 primer set was used instead of the Bact1 primer set (Table 5 and Figure 1). Differences in term of numbers of OTUs at a 3% level of dissimilarity were observed between the two archaeal primer sets but not detected at 10%, suggesting that the variation in the community structure was probably due to misdetection of some archaeal subgroups. This result might suggest a great variability of primer hybridization efficiency and amplification due to sequence mismatches of close microbial lineages (above 97% similarity).

Therefore, the choice of primer sets considerably affects the representation of the microbial community, and more particularly in our study, of the archaeal community. Depending on the primers used and the targeted 16S rRNA regions, some microbial lineages could not be sequenced and proportion of reads could be strongly biased. This is of importance in microbial ecology as much of the discussions in literature are based on the presence/absence of lineages to explain environmental data and microbial community distribution and function. The design of universal primers remains very delicate especially since we do not know *a priori* the microbial composition of the samples. The situation is obviously more delicate for lineages presenting an intra-group heterogeneity. The use of different primer sets might be a good solution to minimize these biases. However, it would be better to totally eliminate the PCR amplification step that can generate many biases.

4.3 Conclusion

In conclusion, we found that DNA extractions and primer sets could have major effects on species richness estimation of our samples. This revealed that every type of sample, because of its own nature, requires being always very careful when drawing community structure conclusions. Indeed, community structure, microbial diversity and proportion of read numbers, sometimes used as proxies for microbial relative abundance (Jorgensen et al., 2012), could be strongly biased in some cases and researchers must be very careful when drawing conclusions about community structures. Differences observed on DNA quantity and quality after extraction did not always reflect a larger microbial diversity. Similarly, if less reads are obtained after pyrosequencing for some samples, it does not necessarily reflect lower microbial diversity richness. As long as molecular studies will be dependent on PCR amplification step, the choice of a good primer set will be crucial to have a non-biased vision of the true composition of the analyzed sample. In our study, the use of either primer sets led to a totally different representation of the microbial communities. Indeed for deep seep samples, we obtained 92.45% of ANME-1 with one set of primers but only 0.48% with the other set. In the same way, while we detected a proportion of 25.31% of the *Deltaproteobacteria* subgroup SEEP-SRB1b with one set of primer and 2.11% with the other set, we did not observe differences for the other *Deltaproteobacteria* lineages between the two sets of primers. Then, even if the two extraction methods gave the same results for one given sample, they could lead to drastic changes for another sample. While the two extraction methods resulted in totally different archaeal community composition for the vent samples with one primer set, no significant impact was detected for all other samples whatever the amplified region. Thus using the Zhou's method we detected 12.31% of MBG-D, 14.30% of ANME-1 and 49.88% of ANME-2c, while using the commercial kit on the same sample, we observed 7.07% MBG-D, 67.12% of ANME-1 and 7.70% of ANME-2. Therefore, in addition to the combination of several extraction methods and primer sets, we recommend combining sequencing methods with complementary approaches to get a more comprehensive picture of the communities under scrutiny. For example, real-time PCR appeared very useful to obtain more details about microbial group quantities (Vigneron et al., 2013). In addition, since we do not really know the numbers of 16S rRNA gene copies within bacterial and archaeal genomes which could drastically increase microbial diversity, a Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH/CARD-FISH) approach (Kleindienst et al., 2012, Lloyd et al., 2013) could allow confirming previous results.

Aknowledgements

We are indebted to the crews of the research vessel *L'Atalante* and the submersible *Nautile* of the cruise "BIG" and the scientific team, in particular Françoise Lesongeur, Mathilde Le Roy, Laurent

Toffin and Nolwenn Callac, for their work on board. This cruise was funded by IFREMER (France) and has benefited from a work permit in Mexican waters (DAPA/2/281009/3803, 28 Octobre 2009). We thank Maxime Galan, Alexandra Dheilly and Sophie Coudouel for very helpful scientific discussions. This study was supported by a Carnot Institute funding and an IFREMER / Brittany region PhD grant to PC.

References

Aakra, Å., Hesselsøe, M., Bakken, L., 2000. Surface attachment of ammonia-oxidizing bacteria in soil. Microbial Ecology 39, 222-235.

Acosta-Martinez, V., Dowd, S.E., Sun, Y., Wester, D., Allen, V., 2010. Pyrosequencing analysis for characterization of soil bacterial populations as affected by an integrated livestock-cotton production system. Applied Soil Ecology 45, 13-25.

Alain, K., Callac, N., Ciobanu, M.-C., Reynaud, Y., Duthoit, F., Jebbar, M., 2011. DNA extractions from deep subseafloor sediments: Novel cryogenic-mill-based procedure and comparison to existing protocols. Journal of Microbiological Methods 87, 355-362.

Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews 59, 143-169.

Baker, G.C., Smith, J.J., Cowan, D.A., 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. Journal of Microbiological Methods 55, 541-555.

Biddle, J.F., Cardman, Z., Mendlovitz, H., Albert, D.B., Lloyd, K.G., Boetius, A., Teske, A., 2012. Anaerobic oxidation of methane at different temperature regimes in Guaymas Basin hydrothermal sediments. Isme Journal 6, 1018-1031.

Biddle, J.F., Lipp, J.S., Lever, M.A., Lloyd, K.G., Sørensen, K.B., Anderson, R., Fredricks, H.F., Elvert, M., Kelly, T.J., Schrag, D.P., Sogin, M.L., Brenchley, J.E., Teske, A., House, C.H., Hinrichs, K.-U., 2006. Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 3846-3851.

Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R.H., Uroz, S., Martin, F., 2009. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. New Phytologist 184, 449-456.

Cambon-Bonavita, M.A., Nadalig, T., Roussel, E., Delage, E., Duperron, S., Caprais, J.C., Boetius, A., Sibuet, M., 2009. Diversity and distribution of methane-oxidizing microbial communities associated with different faunal assemblages in a giant pockmark of the Gabon continental margin. Deep-Sea Research Part Ii-Topical Studies in Oceanography 56, 2248-2258.

Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Pena, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature methods 7, 335-336.

Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., Alland, D., 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. Journal of Microbiological Methods 69, 330-339.

Claesson, M.J., O'Sullivan, O., Wang, Q., Nikkilae, J., Marchesi, J.R., Smidt, H., de Vos, W.M., Ross, R.P., O'Toole, P.W., 2009. Comparative Analysis of Pyrosequencing and a Phylogenetic Microarray for Exploring Microbial Community Structures in the Human Distal Intestine. Plos One 4.

Clarke, K., Warwick, R., 2001. Changes in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation.

Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. Australian journal of ecology 18, 117-143.

Dang, H., Luan, X.-W., Chen, R., Zhang, X., Guo, L., Klotz, M.G., 2010. Diversity, abundance and distribution of amoA-encoding archaea in deep-sea methane seep sediments of the Okhotsk Sea. Fems Microbiology Ecology 72, 370-385.

de Lipthay, J.R., Enzinger, C., Johnsen, K., Aamand, J., Sørensen, S.J., 2004. Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. Soil Biology and Biochemistry 36, 1607-1614.

Dhillon, A., Lever, M., Lloyd, K.G., Albert, D.B., Sogin, M.L., Teske, A., 2005. Methanogen diversity evidenced by molecular characterization of methyl coenzyme M reductase A (mcrA) genes in hydrothermal sediments of the Guaymas Basin. Applied and Environmental Microbiology 71, 4592-4601.

Dhillon, A., Teske, A., Dillon, J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., 2003. Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin. Applied and Environmental Microbiology 69, 2765-2772.

Dojka, M.A., Hugenholtz, P., Haack, S.K., Pace, N.R., 1998. Microbial diversity in a hydrocarbon-and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. Applied and Environmental Microbiology 64, 3869-3877.

Durand, L., Roumagnac, M., Cueff-Gauchard, V., Jan, C., Guri, M., Tessier, C., Haond, M., Crassous, P., Zbinden, M., Arnaud-Haond, S., Cambon Bonavita, M.-A., *in prep*. Biogeographical distribution of *Rimicaris exoculata* epibiont communities along the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent sites.

Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics 27, 2194-2200.

Emerson, D., Rentz, J.A., Lilburn, T.G., Davis, R.E., Aldrich, H., Chan, C., Moyer, C.L., 2007. A Novel Lineage of Proteobacteria Involved in Formation of Marine Fe-Oxidizing Microbial Mat Communities. Plos One 2, e667.

Ettwig, K.F., van Alen, T., van de Pas-Schoonen, K.T., Jetten, M.S., Strous, M., 2009. Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum. Applied and Environmental Microbiology 75, 3656-3662.

Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies : an approach using the bootstrap. Evolution 39, 783-791.

Frostegård, Å., Courtois, S., Ramisse, V., Clerc, S., Bernillon, D., Le Gall, F., Jeannin, P., Nesme, X., Simonet, P., 1999. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. Applied and Environmental Microbiology 65, 5409-5420.

Galan, M., Guivier, E., Caraux, G., Charbonnel, N., Cosson, J.F., 2010. A 454 multiplex sequencing method for rapid and reliable genotyping of highly polymorphic genes in large-scale studies. Bmc Genomics 11.

Griffiths, B., Díaz-Raviña, M., Ritz, K., McNicol, J., Ebblewhite, N., Bååth, E., 1997. Community DNA hybridisation and % G+C profiles of microbial communities from heavy metal polluted soils. Fems Microbiology Ecology 24, 103-112.

Harris, J.K., Kelley, S.T., Pace, N.R., 2004. New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP11. Applied and Environmental Microbiology 70, 845-849.

Harrison, B.K., Zhang, H., Berelson, W., Orphan, V.J., 2009. Variations in archaeal and bacterial diversity associated with the sulfate-methane transition zone in continental margin sediments (Santa Barbara Basin, California). Applied and Environmental Microbiology 75, 1487-1499.

Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R., 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. J. Bacteriol. 180, 4765-4774.

Huse, S.M., Huber, J.A., Morrison, H.G., Sogin, M.L., Mark Welch, D., 2007. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. Genome Biology 8.

Inagaki, F., Suzuki, M., Takai, K., Oida, H., Sakamoto, T., Aoki, K., Nealson, K.H., Horikoshi, K., 2003. Microbial communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the Sea of Okhotsk. Applied and Environmental Microbiology 69, 7224-7235.

Jorgensen, S.L., Hannisdal, B., Lanzén, A., Baumberger, T., Flesland, K., Fonseca, R., Øvreås, L., Steen, I.H., Thorseth, I.H., Pedersen, R.B., 2012. Correlating microbial community profiles with geochemical data in highly stratified sediments from the Arctic Mid-Ocean Ridge. Proceedings of the National Academy of Sciences 109, E2846-E2855.

Juniper, S., Cambon, M.-A., Lesongeur, F., Barbier, G., 2001. Extraction and purification of DNA from organic rich subsurface sediments (ODP Leg 169S). Marine Geology 174, 241-247.

Katoh, K., Kuma, K.-i., Toh, H., Miyata, T., 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. Nucleic Acids Research 33, 511-518.

Kim, M., Morrison, M., Yu, Z., 2011. Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. Journal of Microbiological Methods 84, 81-87.

Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionnary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16, 111-120.

Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H., Trevors, J.T., 2004. Methods of studying soil microbial diversity. Journal of Microbiological Methods 58, 169-188.

Kleindienst, S., Ramette, A., Amann, R., Knittel, K., 2012. Distribution and in situ abundance of sulfate-reducing bacteria in diverse marine hydrocarbon seep sediments. Environmental Microbiology 14, 2689-2710.

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

Kubo, K., Lloyd, K.G., F Biddle, J., Amann, R., Teske, A., Knittel, K., 2012. Archaea of the Miscellaneous Crenarchaeotal Group are abundant, diverse and widespread in marine sediments. ISME J.

Kunin, V., Engelbrektson, A., Ochman, H., Hugenholtz, P., 2010. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. Environmental Microbiology 12, 118-123.

Kuske, C.R., Banton, K.L., Adorada, D.L., Stark, P.C., Hill, K.K., Jackson, P.J., 1998. Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. Applied and Environmental Microbiology 64, 2463-2472.

Lee, O.O., Wang, Y., Yang, J., Lafi, F.F., Al-Suwailem, A., Qian, P.-Y., 2010. Pyrosequencing reveals highly diverse and species-specific microbial communities in sponges from the Red Sea. The ISME journal 5, 650-664.

Lloyd, K.G., Albert, D.B., Biddle, J.F., Chanton, J.P., Pizarro, O., Teske, A., 2010a. Spatial Structure and Activity of Sedimentary Microbial Communities Underlying a Beggiatoa spp. Mat in a Gulf of Mexico Hydrocarbon Seep. Plos One 5.

Lloyd, K.G., Lapham, L., Teske, A., 2006. Anaerobic methane-oxidizing community of ANME-1b archaea in hypersaline Gulf of Mexico sediments. Applied and Environmental Microbiology 72, 7218-7230.

Lloyd, K.G., MacGregor, B.J., Teske, A., 2010b. Quantitative PCR methods for RNA and DNA in marine sediments: maximizing yield while overcoming inhibition. Fems Microbiology Ecology 72, 143-151.

Lloyd, K.G., May, M.K., Kevorkian, R., Steen, A.D., 2013. Meta analysis of quantification methods shows archaea and bacteria to be similarly abundant in the subseafloor. Applied and Environmental Microbiology, AEM. 02090-02013.

Logemann, J., Schell, J., Willmitzer, L., 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. Analytical Biochemistry 163, 16-20.

Maarit Niemi, R., Heiskanen, I., Wallenius, K., Lindstrom, K., 2001. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. Journal of Microbiological Methods 45, 155-165.

Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J., Soulas, G., Catroux, G., 2001. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. Applied and Environmental Microbiology 67, 2354-2359.

Miller, M., Pfeiffer, W., Schwartz, T., 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. 2010, Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE) New Orleans, LA, USA, pp. 1-8.

Pachiadaki, M., Kallionaki, A., Dählmann, A., De Lange, G., Kormas, K., 2011. Diversity and Spatial Distribution of Prokaryotic Communities Along A Sediment Vertical Profile of A Deep-Sea Mud Volcano. Microbial Ecology 62, 655-668.

Pachiadaki, M.G., Lykousis, V., Stefanou, E.G., Kormas, K.A., 2010. Prokaryotic community structure and diversity in the sediments of an active submarine mud volcano (Kazan mud volcano, East Mediterranean Sea). Fems Microbiology Ecology 72, 429-444.

Priemé, A., Bonilla Sitaula, J.I., Klemedtsson, Å.K., Bakken, L.R., 1996. Extraction of methane-oxidizing bacteria from soil particles. Fems Microbiology Ecology 21, 59-68.

Rappé, M.S., Giovannoni, S.J., 2003. The uncultured microbial majority. Annual Reviews in Microbiology 57, 369-394.

Robe, P., Nalin, R., Capellano, C., Vogel, T.M., Simonet, P., 2003. Extraction of DNA from soil. European Journal of Soil Biology 39, 183-190.

Roesch, L.F.W., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A.K.M., Kent, A.D., Daroub, S.H., Camargo, F.A.O., Farmerie, W.G., Triplett, E.W., 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. ISME J 1, 283-290.

Roose-Amsaleg, C., Garnier-Sillam, E., Harry, M., 2001. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. Applied Soil Ecology 18, 47-60.

Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method - A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4, 406-425.

Schloss, P.D., Gevers, D., Westcott, S.L., 2011. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. Plos One 6, e27310.

Schloss, P.D., Handelsman, J., 2004. Status of the microbial census. Microbiology and Molecular Biology Reviews 68, 686-691.

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology 75, 7537-7541.

Schmalenberger, A., Schwieger, F., Tebbe, C.C., 2001. Effect of primers hybridizing to Different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. Applied and Environmental Microbiology 67, 3557-3563.

Schreiber, L., Holler, T., Knittel, K., Meyerdierks, A., Amann, R., 2010. Identification of the dominant sulfate-reducing bacterial partner of anaerobic methanotrophs of the ANME-2 clade. Environmental Microbiology 12, 2327-2340.

Schultz, D.J., Craig, R., Cox-Foster, D.L., Mumma, R.O., Medford, J.I., 1994. RNA isolation from recalcitrant plant tissue. Plant Molecular Biology Reporter 12, 310-316.

Sergeant, M.J., Constantinidou, C., Cogan, T., Penn, C.W., Pallen, M.J., 2012. High-Throughput Sequencing of 16S rRNA Gene Amplicons: Effects of Extraction Procedure, Primer Length and Annealing Temperature. Plos One 7.

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T., 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Research 13, 2498-2504.

Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Mark Welch, D., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M., Herndl, G.J., 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 12115-12120.

Sorensen, K.B., Teske, A., 2006. Stratified communities of active archaea in deep marine subsurface sediments. Applied and Environmental Microbiology 72, 4596-4603.

Sørensen, S.J., de Lipthay, J.R., Müller, A., Barkay, T., Hansen, L.H., Rasmussen, L., 2002. Molecular methods for assessing and manipulationg the diversity of microbial populations and processes. Enzymes in the Environment. Marcel Dekker Incorporated.

Stackebrandt, E., Goebel, B., 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. International Journal of Systematic Bacteriology 44, 846-849.

Stamatakis, A., 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics 22, 2688-2690.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24, 1596-1599.

Tebbe, C.C., Vahjen, W., 1993. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. Applied and Environmental Microbiology 59, 2657-2665.

Teske, A., Hinrichs, K.U., Edgcomb, V., Gomez, A.D., Kysela, D., Sylva, S.P., Sogin, M.L., Jannasch, H.W., 2002. Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: Evidence for anaerobic methanotrophic communities. Applied and Environmental Microbiology 68, 1994-2007.

Teske, A., Sorensen, K.B., 2008. Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? Isme Journal 2, 3-18.

Teske, A.P., 2006. Microbial communities of deep marine subsurface sediments: molecular and cultivation surveys. Geomicrobiology Journal 23, 357-368.

Vahjen, W., Pieper, R., Zentek, J., 2010. Bar-Coded Pyrosequencing of 16S rRNA Gene Amplicons Reveals Changes in Ileal Porcine Bacterial Communities Due to High Dietary Zinc Intake. Applied and Environmental Microbiology 76, 6689-6691.

Valentine, D.L., 2007. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. Nature Reviews Microbiology 5, 316-323.

Van de Peer, Y., Chapelle, S., DeWachter, R., 1996. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. Nucleic Acids Research 24, 3381-3391.

Vigneron, A., Cruaud, P., Pignet, P., Caprais, J.-C., Cambon-Bonavita, M.-A., Godfroy, A., Toffin, L., 2013. Archaeal and anaerobic methane oxidizer communities in the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin (Gulf of California). ISME J.

Vigneron, A., Cruaud, P., Pignet, P., Caprais, J.C., Gayet, N., Cambon-Bonavita, M.A., Godfroy, A., Toffin, L., 2014. Bacterial communities and syntrophic associations involved in anaerobic oxidation of methane process of the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin. Environmental Microbiology.

Volossiouk, T., Robb, E.J., Nazar, R.N., 1995. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. Applied and Environmental Microbiology 61, 3972-3976.

Webster, G., Newberry, C.J., Fry, J.C., Weightman, A.J., 2003. Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale. Journal of Microbiological Methods 55, 155-164.

Webster, G., Parkes, R.J., Cragg, B.A., Newberry, C.J., Weightman, A.J., Fry, J.C., 2006. Prokaryotic community composition and biogeochemical processes in deep subseafloor sediments from the Peru Margin. FEMS Microbiol Ecol 58, 65-85.

Webster, G., Parkes, R.J., Fry, J.C., Weightman, A.J., 2004. Widespread occurrence of a novel division of bacteria identified by 16S rRNA gene sequences originally found in deep marine sediments. Appl Environ Microbiol 70, 5708-5713.

Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms - Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87, 4576-4579.

Yu, Z.T., Morrison, M., 2004. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology 70, 4800-4806.

Yue, J.C., Clayton, M.K., 2005. A similarity measure based on species proportions. Communications in Statistics-Theory and Methods 34, 2123-2131.

Zhou, J., Bruns, M., Tiedje, J., 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. Appl. Environ. Microbiol. 62, 316-322.

Cette étude a donc permis de mettre en évidence le fait que la méthode d'extraction et les amorces PCR utilisées pouvaient avoir un impact considérable sur la diversité microbienne mise en évidence dans un échantillon donné.

L'impact de la méthode d'extraction a été visible dès le début de l'étude puisque différentes quantités et qualités d'ADN ont été obtenues suivant l'échantillon et la méthode d'extraction utilisée. Malgré ces différences, les nombres de séquences obtenues par pyroséquençage étaient semblables entre les deux méthodes d'extraction, et ce, avant et après les étapes de filtration sur *Mothur*. Ainsi, le nombre de chimères détectées par *Uchime* n'était notamment pas plus important dans le cas d'une méthode d'extraction ou de l'autre. De la même façon, les nombres d'OTUs obtenus étaient globalement similaires. En revanche, pour l'échantillon issu de la zone hydrothermale, des différences conséquentes ont été observées pour certains groupes microbiens, mettant en évidence des efficacités d'extraction inégales entre les deux méthodes. Ces différences d'efficacité d'extraction entre les deux méthodes sont confirmées par l'absence d'amplification pour l'échantillon S_6 du tapis blanc chaud extrait par la « méthode Zhou », pour lequel les quantités d'ADN extraites étaient nettement inférieures à toutes celles obtenues pour les autres échantillons (en moyenne 1,1 µg d'ADN par gramme de sédiments extraits).

L'impact des couples d'amorces utilisés s'est avéré beaucoup plus important dans notre étude. Cet impact a été observé dès les premières étapes de l'analyse. En effet, dès la sortie du séquenceur, le nombre de séquences obtenues semblait dépendre du couple d'amorce utilisé. Il est possible que, selon l'amorce de fusion utilisée, l'efficacité de l'hybridation sur les billes nécessaires au pyroséquençage (PCR en émulsion, séquençage) ne soit pas la même. Ainsi certaines combinaisons de tags/adaptateurs/amorces pourraient favoriser ou défavoriser l'amplification des échantillons correspondants, lors de la PCR en émulsion, avant laquelle ces échantillons avaient tous été réunis dans un même mix, de façon équimolaire. Le nombre de chimères obtenues dépendait aussi du couple d'amorce utilisé. Ainsi, l'amplification avec l'un des couples (Arch2) semblait générer plus de chimères. Ce résultat pourrait révéler des différences entre les régions séquencées, avec des régions du gène codant l'ARNr 16S plus sujettes à ces évènements d'interruption d'amplification et de recombinaison de séquences. Des différences importantes ont également été constatées dans les structures des communautés obtenues selon le couple d'amorces utilisé. Ces différences mettaient en évidence des efficacités d'amplification inégales entre les différents groupes microbiens. En effet, un couple d'amorces peut amplifier de façon plus efficace un groupe microbien qu'un autre alors qu'un autre couple d'amorces peut amplifier de façon moins importante ce premier groupe microbien mais mieux amplifier l'autre (différence du nombre de mismatches entre l'amorce et le gène ciblé de l'ARNr 16S). A ce sujet, il est aussi intéressant de noter que même si des proportions de séquences similaires peuvent être obtenues pour une lignée microbienne avec des couples d'amorces différents, il est possible que certains sous-groupes de cette lignée soient amplifiés de manière différente par ces mêmes couples d'amorces.

Au vu des résultats obtenus dans cette expérience pilote, il semblerait que les structures de communautés microbiennes mises en évidence par une étude de pyroséquençage puissent être fortement biaisées par la méthode d'extraction et le couple d'amorce utilisé. Pour la suite de notre étude, nous avons donc décidé d'extraire l'ADN de tous nos échantillons selon les deux méthodes d'extraction utilisées ici, afin d'étendre la diversité potentiellement extraite et d'obtenir des résultats au plus proches de la réalité. En revanche, notamment pour des raisons budgétaires, nous n'avons pas pu utiliser différents couples d'amorces pour le séquençage des autres échantillons de sédiments. Nous n'avons en effet utilisé qu'un seul couple d'amorce ciblant les bactéries et un autre ciblant les archées, tous deux différents des couples utilisés pour l'étude pilote, certaines amorces de fusion étant déjà

disponibles au laboratoire. Par ailleurs, nous avons décidé de compléter nos résultats de pyroséquençage par des résultats obtenus grâce à d'autres techniques comme le FISH et la Q-PCR. Ainsi, les résultats obtenus en pyroséquençage pourront être confirmés, ou réfutés par l'utilisation de ces autres méthodes d'analyse. La présence d'un groupe microbien et la proportion de cellules appartenant à ce groupe pourra ainsi être vérifiée grâce à des sondes FISH spécifiques et/ou des amorces Q-PCR spécifiques.

Après avoir réalisé cette expérience pilote, nous nous sommes intéressés aux communautés microbiennes des sédiments des deux écosystèmes du Bassin de Guaymas à proprement parler. Cette étude s'est déroulée en deux temps et a consisté en la réalisation de deux runs de pyroséquençage, un run dédié à l'étude des communautés microbiennes des sédiments associés aux suintements froids de la Marge de Sonora, le « *Pôle froid* », puis un run dédié à l'étude des sédiments associés aux écosystèmes hydrothermaux, le « *Pôle chaud* ». Nous avons commencé par l'étude du « *Pôle froid* ».

2) Pôle froid – Marge de Sonora

Ce travail portait sur cinq habitats différents : (1) l'habitat « *vésicomyidés* » du site Ayala, (2) l'habitat « *siboglinidés* » du site Juarez et les habitats (3) « *vésicomyidés* », (4) « *tapis microbien* » et enfin (5) « *pourtour du tapis microbien* » du site Vasconcelos. Cette étude avait pour but d'identifier les communautés microbiennes présentes mais aussi de comprendre les influences réciproques éventuelles des colonisateurs, de la chimie des eaux interstitielles et de la structure des communautés microbiennes, entre eux. Pour cela, nous avons adopté une approche pluridisciplinaire couplant ARISA, pyroséquençage, Q-PCR, microscopie FISH et profils géochimiques au sein des sédiments.

Ce travail fait l'objet d'un article intitulé « *Microbial diversity associated with different faunal assemblages in the cold seep sediments of the Sonora Margin, Guaymas Basin* ». Il est actuellement en cours d'écriture et c'est une première ébauche qui est présentée dans les pages suivantes de ce manuscrit.

Article 3

Microbial diversity associated with different faunal assemblages in the cold seep sediments of the Sonora Margin, Guaymas Basin

Perrine Cruaud, Adrien Vigneron, Patricia Pignet, Jean-Claude Caprais, Françoise Lesongeur, Laurent Toffin, Anne Godfroy and Marie-Anne Cambon-Bonavita

In prep.

Microbial diversity associated with different faunal assemblages in the cold seep sediments of the Sonora Margin, Guaymas Basin

Perrine Cruaud [1, 2, 3], Adrien Vigneron[1, 2, 3], Patricia Pignet[1], Jean-Claude Caprais[4], Françoise Lesongeur[1, 2, 3], Laurent Toffin[1, 2, 3], Anne Godfroy[1, 2, 3], Marie-Anne Cambon-Bonavita[1, 2, 3]

[1]IFREMER, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, Technopôle Brest Iroise, Plouzané, France ; [2]Université de Bretagne Occidentale, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, Plouzané, France, [3]CNRS, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, Technopôle Brest Iroise, Plouzané, France and [4]IFREMER, Laboratoire « Environnements Profonds », EEP-LEP, Technopôle Brest Iroise, Plouzané, France

ABSTRACT:

The Sonora Margin cold seeps present a seafloor mosaic pattern consisting of different faunal assemblages and microbial mats. To better understand if sedimentary microbial communities reflect the patchy distribution of chemosynthetic organisms, all major chemosynthetic habitats at the Sonora Margin were investigated with an unprecedented spatial scale using complementary and interdisciplinary approaches combining Automated method of Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA), 16S rRNA 454 pyrosequencing, quantitative polymerase chain reaction and fluorescence *in situ* hybridization completed by geochemistry of each habitat. This study reveals that sediments populated by different faunal assemblages or microbial mats show distinct porewater geochemistry features and are associated with distinct sediment microbial communities. Molecular results indicate that archaeal communities were dominated by known clades of anaerobic methane oxidizers (archaeal anaerobic methanotrop ANME) in the sediments underlying the microbial mat and the surrounding macrofauna. However, archaeal communities underlying the megafauna habitat were characterized by a globally lower biomass than microbial mat habitat and important proportions of the uncultivated lineage of Marine Benthic Group D (MBG-D) within the Thermoplasmatales. Other microbial groups such as Chloroflexi Division 1 and Division 2 as well as filamentous *Gammaproteobacteria* and *Deltaproteobacteria* were specifically detected in the surface sediment of megafauna habitats. Porewater methane concentrations, by the enhancement of anaerobic methane oxidizers and sulfate-reducers, play an important role in the microbial community structure and in the establishment of the surface colonizers. However the presence and activity of the surface colonizers also strongly shaped the underlying microbial communities probably due to the modification of energy source availabilities.

KEY WORDS: microbial communities ; pyrosequencing ; FISH ; MBG-D ; ANME ; faunal assemblages ; *Vesicomyidae* ; *Siboglinidae* ; microbial mats.

1. Introduction

Cold seeps are among the most productive deep-sea ecosystems (Pop Ristova et al., 2012). The most conspicuous features of these ecosystems are seafloor emissions of hydrocarbon fluids and gases that support complex food webs based on microbial chemoautotrophic primary production (Van Dover et al., 2002). These fluids are derived from sedimented organic matters that are progressively degraded and transformed into deeply buried hydrocarbons at continental margins. High concentrations of reduced energy sources from sediments, such as sulfide and methane, in close proximity to oxidants from water column such as oxygen, nitrate and sulfate (Dubilier et al., 2008) generate various geochemical gradients in sediments. Diffusive and advective transport processes of potential substrates in sediments create distinct zonations of microbial activity based on the availability of electron donors (oxidizable compounds) and acceptors (reducable compounds) (Engelen and Cypionka, 2009, Froelich et al., 1979, Jørgensen, 1977, Orcutt et al., 2011). For example, the sulfate-dependent anaerobic oxidation of methane (AOM) occurs in anoxic zones of sediments, where upwardly diffusing or advecting methane meets sulfate from the seawater (Devol et al., 1984, Iversen and Jørgensen, 1985, Orcutt et al., 2011). This process appears to be mainly mediated by anaerobic methanotrophic *Archaea* (ANMEs), related to methanogens, which are frequently observed in structured aggregates with *Deltaproteobacteria* (*Desulfosarcina*/*Desulfococcus* and *Desulfobulbus*), but also as single cells or monospecific clusters (Boetius et al., 2000, Knittel et al., 2005, Lösekann et al., 2007, Orphan et al., 2002, Vigneron et al., 2013). Even if the exact metabolic pathway of this sulfate-dependent anaerobic oxidation of methane remains enigmatic (Beal et al., 2009, Dekas et al., 2009, Joye, 2012, Milucka et al., 2012), this process, as well as the activity of abundant sulfate-reducing bacteria, generate high concentrations of sulfide in the sediments (Boetius et al., 2000, Hinrichs and Boetius, 2002, Jorgensen and Boetius, 2007, Orphan et al., 2001). These uprising seeps and products from microbial metabolic activities allow the development at the surface of the sediments of various organisms such as mat-forming giant bacteria (Grünke et al., 2011, Lloyd et al., 2010, McKay et al., 2012) or symbiont-bearing invertebrates (Cambon-Bonavita et al., 2009, Dubilier et al., 2008, Sibuet and Olu, 1998).

Microbial mat-forming bacteria oxide the merging sulfide generated by anaerobic microbial metabolisms in sediments and produce new organic biomass by chemoautotrophy (Grünke et al., 2011, Lloyd et al., 2010, McKay et al., 2012, Nelson et al., 1989). These thiotrophic bacteria live in the seafloor, at the interface between opposed gradients of oxygen in the water column and H_2S in the sediments (Schulz and Jorgensen, 2001). Some mobile organisms, such as heterotrophic gastropods, might feed on these mat-forming bacteria and thus be "grazers" and secondary consumers (Waren and Bouchet, 2009). Other invertebrates harboring symbiotic microorganisms such as annelid polychaetes of the family *Siboglinidae* and bivalves from the *Vesicomyidae* family rely on thiotrophic and/or methanotrophic endosymbiotic bacteria for growth and metabolism (Cavanaugh, 1983, Felbeck et al., 1981, Fisher, 1990). These symbionts are localized in the trophosome of siboglinids and in the hypertrophied gills of vesicomyids (Bright and Giere, 2005, Cavanaugh, 1983, Fiala-Médioni and Métivier, 1986). While vesicomyids live partially buried in sediments and capture buried sulfide with their vascularized foot (Arp et al., 1984, Cavanaugh, 1983, Fisher, 1990), siboglinids use posterior extension of their body and tube, the 'root', to acquire sulfide from sediments (Freytag et al., 2001, Julian et al., 1999). Other organisms would also feed on microorganisms occurring in sediments, such as heterotrophic ampharetids (*Ampharetidae*, *Polychaetes*) which are able to digest and grow on methanotrophic bacteria

occurring in the oxic zone of the sediments (Ruff et al., 2013, Sommer et al., 2010, Thurber et al., 2010). In most cold seep environments such chemosynthetic organisms dominate the community biomass and form specific habitats (Cambon-Bonavita et al., 2009). Numerous studies have demonstrated that the surface sediment pattern and the presence of the different types of dominant megafauna or microbial mat indicate spatial variations in fluid flow intensity and composition (Barry et al., 1997, Lichtschlag et al., 2010, Niemann et al., 2006, Pop Ristova et al., 2012, Ruff et al., 2013, Sahling et al., 2002, Sibuet and Olu, 1998).

The cold seeps of the Guaymas Basin, located along a transform fault of the Sonora Margin, form a complex ecosystem composed of all of these different organisms (Cruaud et al., *Subm.-a,* Paull et al., 2007, Simoneit et al., 1990, Vigneron et al., 2013). Indeed bare sediments are interspersed with chemosynthetic assemblages of vesicomyid clams, siboglinid tubeworms and microbial mats surrounded by gastropods and polychaetes. Microbial communities that occur in sediments underlying the microbial mats and the surrounding macrofauna have already been studied, especially those involved in AOM (Vigneron et al., 2013, Vigneron et al., 2014). These works highlighted that ANMEs were metabolically active for these sites and AOM might represented a major microbial process on the Sonora Margin cold seeps as already suggested for hydrothermal vent ecosystems of the Guaymas Basin (Biddle et al., 2012, Teske et al., 2002). However the other habitats of the Sonora Margin cold seeps remain unstudied for microbiology.

In this study, we aim to analyze a cold seep ecosystem with an unprecedented spatial scale. Sedimentary microbial communities from four different kinds of cold seep habitats, dominated respectively by vesicomyids, siboglinids, microbial mats and gastropods and polychaetes, were analyzed in details from the seawater/sediment interface down to 15 cmbsf. The main objectives of this study were (i) to characterize microbial communities inhabiting unexplored sediments of the Sonora Margin cold seeps, (ii) to compare these microbial communities between the different kinds of cold seep habitats and within a given habitat (iii) to define the impact of the surface chemosynthetic organisms on the sedimentary microbial communities through their own activity (iv) to evaluate how the porewater geochemistry shaped the microbial diversity structures and (v) to better understand how the different sedimentary microbial communities and their respective metabolisms impact on the surface colonizer distribution and therefore influence diversity patterns of chemosynthetic organisms at cold seeps. Thereby all major chemosynthetic habitats at the Sonora Margin were investigated using an interdisciplinary approach combining ARISA fingerprinting, 454-pyrosequencing, quantification of dominant microbial groups and microscopy completed by porewater geochemistry.

2. Materials and methods

2.1 Description of sampling sites and sampling procedure

Five cold seep sites located on the Sonora Margin, in the Guaymas Basin, were investigated in this study. Sediment samples were collected using push cores operated by the manned submersible *Nautile* during the "BIG" cruise (June 2010). Sites were chosen for sampling according to visual observations of the seafloor and bubbles detection in the water column (Ondreas et al. in prep) (Table 1 and Figure 1). Two sites were characterized by the occurrence of vesicomyid bivalves (Cruaud et al., *Subm.-a*) : (i) The Ayala site and (ii) the

Vasconcelos site. The Ayala site was located at about 1560 m depth and spotted with BIG14 and BIG11 markers (27°35.5796N; 111°28.9879W) (Figure 1). This site was covered by a lot of scattered vesicomyid aggregates distributed on about 15 by 20 meters area (Cruaud et al., *Subm.-a*). The Vasconcelos site, located 1 km away from the Ayala site, was located at about 1570 m depth and spotted with BIG13 and BIG15 markers (27°35.5887N; 111°28.9663W) (Figure 1). In this site, vesicomyids occurred on the periphery of a large and thin microbial mat (Cruaud et al., *Subm.-a*). The Juarez site, situated 160 m from Ayala site, was located in a previously unexplored area to date at about 1560 m depth and spotted with BIG12 marker (27°35.2741N; 111°28.4071W) (Figure 1). This site was characterized by the occurrence of multispecies tubeworm bushes composed of *Lamellibrachia barhami* and *Escarpia* spp. siboglinids. Two sites were situated 30 m from the Vasconcelos BIG13 site and spotted with marker BIG18 in the "Vasconcelos"site (27°35.5770N; 111°28.9840W). They were colonized by a thick white *Beggiatoa* mat surrounded by grey mat-like macrofauna assemblage (called WM14 and EWM14 in Vigneron et al., 2013). This grey mat-like was mainly composed of *Hyalogirina* sp. gastropods (A. Waren and M. Portail pers. com.) and *Ampharetidae* (M. Rabiller pers. com.) assumed to be respectively deposit feeders and grazers (Fauchald and Jumars, 1979, Vigneron et al., 2014, Waren and Bouchet, 2009). Finally, a reference site (27°25.483N; 111°30.0759W) was also sampled outside of the active area (called REF in Vigneron et al. 2013).

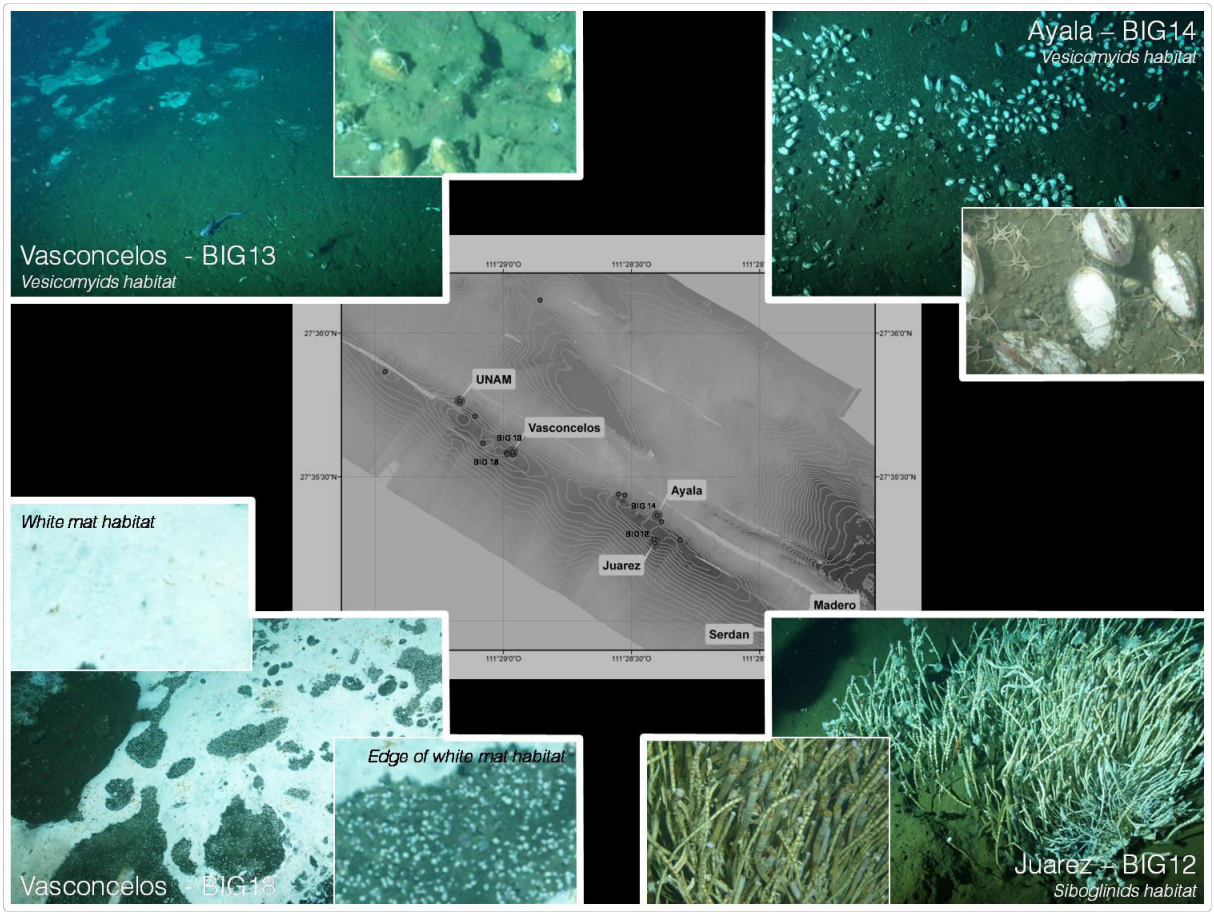


Figure 1 : Map of the Sonora Bassin and localization and pictures of the sampling sites

Site		Localisation	Depth	Push core	Habitat	Analyses
Ayala	BIG14 / BIG11	27°35.5796N; 111°28.9879W	1560 m	1760 CT7	Vesicomyid	ARISA, Pyrosequencing, Q-PCR, FISH
				1759 CT4		ARISA, sulfate porewater concentration
				1760 CT5		Methane, sulfide, sulfate porewater concentration
Juarez	BIG12	27°35.2741N; 111°28.4071W	1560 m	1761 CT3	Siboglinid	ARISA, Pyrosequencing, Q-PCR, FISH, sulfate porewater concentration
				1761 CT2		ARISA
				1761 CT1		Methane, sulfide, sulfate porewater concentration
Vasconcelos	BIG13 / BIG15	27°35.5887N; 111°28.9663W	1570 m	1757 CT8	Vesicomyid *(near microbial mat)*	ARISA, Pyrosequencing, Q-PCR, FISH, sulfate porewater concentration
				1757 CT6		ARISA, sulfate porewater concentration
				1757 CT5		Methane, sulfide, sulfate porewater concentration
	BIG18	27°35.5770N; 111°28.9840W	1574 m	1758 CT8	Grey mat-like	ARISA, Pyrosequencing, Q-PCR, FISH, sulfate porewater concentration
				1758 CT6		ARISA, sulfate porewater concentration
				1758 CT9		Methane, sulfide, sulfate porewater concentration
				1758 CT3	*Beggiatoa* mat	ARISA, Pyrosequencing, Q-PCR, FISH, sulfate porewater concentration
				1758 CT4		ARISA, sulfate porewater concentration
				1758 CT1		Methane, sulfide, sulfate porewater concentration
Reference site	BIG16	27°25.483N; 111°30.0759W	1850 m	1753 CT3	Naked sediments	ARISA, Pyrosequencing, Q-PCR, FISH, sulfate porewater concentration
				1753 CT1		Methane, sulfide, sulfate porewater concentration

Table 1 : Overview of some site features: localization, depth, sampled push cores, corresponding habitat and analyses realized on each push core.

At each location, two replicate sediment push cores were collected for microbiological and sulfate analyses and one for methane, sulfate and sulfide analyses (Table 1). Porewater analyses were performed as described in Vigneron et al., 2013. Temperature measurements were also performed in surface sediments using an independent thermal lance T-Rov (NKE, Electronics, France).

Immediately after recovering on board, sediment cores were transferred to the cold room for sub-sampling. For microbiology, sediment cores were sub-sampled for molecular analyses in 2 cm thick layers and sub-samples were then frozen at -80°C until nucleic acid extractions. Two cm^3 of cold seep sediments were collected from each layer and fixed for 4 hours in PBS/Formaldehyde (3% final) at 4°C, washed twice with PBS and stored in an ethanol/PBS (1:1, vol/vol) buffer at -20°C until analyses by fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

2.2 DNA extraction

Total nucleic acids were extracted with two different methods in order to extend the extracted microbial diversity : FastDNA® SPIN Kit for Soil (Bio101 Systems, MP Biomedicals™) and a method described in (Zhou et al., 1996) with modifications as described in (Cruaud et al., *Subm.-b*). First, DNA was extracted from 4 x 0.6 g frozen sediment using the commercial kit according to the manufacturer's recommendations with some modifications (Roussel et al., 2009, Webster et al., 2003). This method consists on a mechanical lysis of cells with ceramic and silica particles and bead-beating using a FastPrep FP120 homogenizer (Bio101 Systems, MP Biomedicals™). Secondly, DNA was also extracted in triplicate from 2.5 grams of sediments according to the Zhou's method with modifications. Briefly, sediments were mixed with a hypersaline buffer containing CTAB, then preparations were frozen in liquid nitrogen and thawed at 65°C in a heating bath for the first 7 cycles and at 85°C for the last 3 cycles, a total of ten times. In order to preserve DNA, 2 mL were deduced from the preparations and then pooled after 3, 5, 7 and 10 freezing-thawing cycles. The next Zhou's extraction steps were performed as described in (Lazar et al., 2010). Replicate of crude DNA extracts were then pooled and purified using the Wizard DNA clean-up kit (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer instructions. Purified DNA extracts were stored at -20°C until PCR amplification.

2.3 ARISA

An Automated method of Ribosomal Intergenic Spacer Analyses (ARISA) was carried out for rapid monitoring of microbial diversity and community composition in all sediment samples (Fisher and Triplett, 1999) using DNA 7500® Chip on an Agilent 2100 Bioanalyzer® (Agilent Technology, Santa Clara, USA). ARISA-PCR was performed with primers targeting the archaeal 16S-23S intergenic spacer region (Table 2). PCR conditions were as described in Vigneron et al., 2013. All data were recovered using 2100 Expert® software (Agilent Technology). Comparisons between samples were allowed by normalization of the data by the raw signal intensity before statistical analyses. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) (Kruskal, 1964) was carried out based on the Bray-Curtis similarity measure (Bray and Curtis, 1957) using the software package Vegan (Oksanen et al., 2012) based on the software environment R (v. 3.0.2).

Name	*Function*	*Target group*	*Sequence (5' - 3')*	*Amplicon size (bp)*	*Annealing temp. (°C)*	*Primer conc. (mM)*	*Reference*
A915F A71R (23S)	ARISA	ITS of *Archaea*	AAA-GGA-ATT-GGC-GGG-GGA-GCA-C TCG-GYG-CCG-AGC-CGA-GCC-ATC-C	Variable	55	0.4	Casamayor et al. (2002)
ANME-1F ANME-1R	Q-PCR	ANME-1	GCT-TTC-AGG-GAA-TAC-TGC TCG-CAG-TAA-TGC-CAA-CAC	200	60	1.1	Lloyd et al. (2011)
ANME-2cF ANME-2cR	Q-PCR	ANME-2c	TCG-TTT-ACG-GCT-GGG-ACT-AC TCC-TCT-GGG-AAA-TCT-GGT-TG	224	60	1.1	Vigneron et al. (2013)
ANME-3F ANME-3R	Q-PCR	ANME-3	GGA-TTG-GCA-TAA-CAC-CGG TAT-GCT-GGC-ACT-CAG-TGT-CC	234	60	1.1	Vigneron et al. (2013)
MBGD-F MBGD-R	Q-PCR	MBG-D	ATA-TCT-GAG-ACA-CGA-TAT-CRG-G CAC-CAC-TTG-AGC-TGC-AGG-TA	227	60	1	Vigneron et al. (*in prep*)
DSS-F DSS-R	Q-PCR	*Desulfosarcinales Desulfococcales*	ACT-TGA-GTA-TGG-GAG-AGG-GAA-G ACC-TAG-TGT-TCA-CCG-TTT-ACT-GC	180	60	1	Vigneron et al. (2014)
DBB-F DBB-R	Q-PCR	*Desulfobulbaceae*	GCT-TGA-GTA-TGG-GAG-GGG-A CAC-CTA-GTT-CTC-ATC-GTT-TAC-AGC	180	60	1	Vigneron et al. (2014)
JS1-F JS1-R	Q-PCR	JS-1	GAC-TTG-AGG-TTA-GAA-GAG-GAA-AGT-G GAG-ATA-GAC-CAG-AAA-GCC-GC	102	60	1.1	Vigneron et al. (2014)
ARC787F ARC1059R	Q-PCR	*Archaea*	ATT-AGA-TAC-CCS-BGT-AGT-CC GCC-ATG-CAC-CWC-CTC-T	273	60	0.5	Yu et al. (2005)
BACT1369F BACT1492R	Q-PCR	*Bacteria*	CGG-TGA-ATA-CGT-TCY-CGG GGW-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T	142	58	0.6	Suzuki et al. (2000)

Abbreviations: ANME, archaeal anaerobic methanotroph; MBG-D, Marine Benthic Group B; JS-1, Japan Sea 1; ARISA, Automated method of Ribosomal Intergenic Spacer Analysis; ITS, Intergenic Transcribed Spacer; Q-PCR, quantitative polymerase chain reaction.

Table 2 : PCR primers used for ARISA and real-time PCR of 16S rRNA genes.

2.4 PCR amplifications and pyrosequencing

For each studied site, the 16S rRNA gene was amplified from one sediment push core replicate using a primer set targeting *Bacteria* and another targeting *Archaea*. The primer set for *Bacteria* amplified the V4-V5 hypervariable regions *via* SSU536F (5'- GTGCCAGCMGCCGCGGTAATAC -3') (Dufresne et al., 1996) and 907R (5'- CCGTCAATTCCTTTGAGTTT -3') (Yu and Morrison, 2004), while archaeal primer set amplified the V1-V2-V3 hypervariable regions *via* 27F (5'- TCYGGTTGATCCTGSCGG -3') (Fish et al., 2002) and Arc518R (5'- GGTDTTACCGCGGCKGCTG -3') (Sorensen and Teske, 2006). The primers were fused to 5 to 10-nucleotide key tags and to the 454 GS-FLX sequencing adaptator using the Lib-A chemistry. To allow multiplex sequencing, 23 such primers associated to Roche adaptator A and 23 associated to Roche adaptator B were synthesized for both primer sets, each with a different key tag (Table S1). These fusion primers were designed based on MIDs recommended by Roche and in order to minimize secondary structures using RNAfold algorithm (Hofacker, 2003) and OligoAnalyzer software (Owczarzy et al., 2008). Amplifications of the 16S rRNA were performed under the following conditions: 10 min at 95°C, then 30 cycles for *Bacteria* PCRs and 35 cycles for *Archaea* PCRs including 30 sec at 95°C, 45 sec at 58°C and 45 sec at 72°C and a final step of 6 min at 72°C. PCR amplifications were performed in duplicate (A and B duplicates) using the following reagents in a 25

µL reaction volume: 1X Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), 0.5 µM of each primer (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany) and 1 µL of purified DNA template. The final volume was adjusted to 25 µL with sterile water. Absence of contaminations was checked by negative controls. PCR products were purified on TAE agarose gel (1.2 %) and using PCR clean-up Gel extraction Nucleospin® Gel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

Microfluidic digital PCR (Fluidigm Corporation, San Francisco, CA) was used to quantify nucleic acids in purified amplicons. Amplicon products obtained for each PCR duplicate were mixed equimolarly (10^8 molecules per microliter of each amplicon) and separately. A total of 4 mixes were obtained, one mix for *Bacteria* replicate A, another for *Bacteria* replicate B and in the same way two mixes for *Archaea*. Emulsion PCR and sequencing were then performed independently for these 4 mixes on a 454 Life Sciences Genome Sequencer GS-FLX (PicoTiterPlate divided in 4 regions) (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Quantification, emulsion PCR and sequencing were performed by the Biogenouest platform (Rennes, France).

2.5 Pyrosequencing analyses

To minimize the effect of random sequencing errors (Huse et al., 2007, Kunin et al., 2010), pyrosequencing reads analyses and filtering were performed from the sff file using the Mothur pipeline (Schloss et al., 2009). We removed sequences *(i)*shorter than 200 bp, *(ii)* containing homopolymer longer than 8 bp *(iii)* that aligned to the incorrect region within the 16S rRNA gene (Silva release 115, www.arb-silva.de), *(iv)* identified as chimeras using Uchime algorithm (Edgar et al., 2011, Schloss et al., 2011) and *(v)* affiliated to *Archaea* when *Bacteria* was targeted and inversely.

Using the tag combinations, sequences were assigned to their respective sample. Only sequences retrieved in both PCR duplicates (A and B) were retained. In order to minimize the impact of higher number of sequences per sample, all the following analyzes were performed on the same number of sequences for the bacterial and the archaeal regions.

Taxonomic assignments of the reads were performed using the Mothur version of the "Bayesian" classifier (Schloss et al., 2009) on both SILVA database (release 115, 418 497 sequences of *Bacteria* and 17 530 sequences of *Archaea*, www.arb-silva.de) and on a personal database designed specifically with deep-sea marine sediment sequences from reference publications (1 677 bacterial and 786 archaeal sequences, as described in(Cruaud et al., *Subm.-b*)). Results obtained from the two databases were then confronted. If the results obtained for some microbial groups were different between the two databases, sequences affiliated to these groups were retrieved and consistencies of SILVA taxonomic affiliations were checked by phylogenetic reconstructions with our reference database sequences. Phylogenetic trees were estimated using distance (Neighbor-joining) method. Pairwise nucleotide sequence divergences were calculated using a Kimura-2-parameter model of substitution (Kimura, 1980) and Neighbor-Joining trees (Saitou and Nei, 1987) were reconstructed using MEGA 4.0.2 (Tamura et al., 2007). Robustness of topologies was assessed by bootstrap procedures using 100 replicates (Felsenstein, 1985). When groups of sequences appeared not consistent in the phylogenetic reconstruction, corresponding sequences were re-affiliated to a more correct classification.

Non-metric multidimensional scaling (NMDS) (Kruskal, 1964) was carried out based on the Bray-Curtis similarity measure (Bray and Curtis, 1957). Analysis of similarity (ANOSIM) was used to determine significant differences between groups based on a Bray-Curtis similarity measure. SIMPER (Similarity Percentages) analysis were used to determine the contribution of each microbial groups to the Bray-Curtis dissimilarity (Clarke, 1993). Statistical analysis were performed using the software package Vegan (Oksanen et al., 2012) based on the software environment R (v. 3.0.2).

2.6 Quantitative real-time PCR

Quantitative measurements were performed with a Step One Plus instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a final volume of 25µL using PerfeCTa SYBR Green SuperMix ROX (Quanta Bioscience), 1 ng of crude DNA template extracted with the Zhou's method and primers with appropriate concentrations and annealing temperatures (Table 2) according to the manufacturer's instructions. Standard curves were obtained in triplicate with 10-fold serial dilution (10^5 – 10^9 copies per µL) of plasmids containing environmental 16S rRNA genes of corresponding microbial groups. The efficiencies of the reaction were above 85% and R^2 close to 0.99. Samples were diluted until the crossing point decreased log-linearly with sample dilutions, indicating the absence of inhibition effect. Q-PCR results were expressed in copy number per gram of sediment.

2.7 Fluorescence in situ hybridization (FISH)

Twenty microliters of a 100-fold dilution of fixed sediment subsamples were immobilized on 0.22 µm GTTP polycarbonate filters (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Hybridization conditions were optimized to maximize fluorescence signal and probe specificity. Filters were hybridized in a reaction mix containing 0.5 µM of each probe in a formamide hybridization buffer [0.9M NaCl, 0.02M Tris-HCl, 0.01% sodium dodecyl sulphate (SDS), X% deionized formamide, Table 3] for 3 h at 46°C. Sections were washed at 48°C for 15 min in a washing buffer (NaCl, 0.02 M Tris-HCl, 0.004 M EDTA, 0.01% SDS, Table 3) and rinsed briefly with cold water. Finally, filters were fixed on slides and treated with Slow Fade® Gold antifading reagent containing 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen, Life technologies, CA, USA). Observations were performed with a Zeiss Imager Z2 microscope (Zeiss, Göttingen, Germany) equipped with the slider module ApoTome (Zeiss), the Colibri light technology (Zeiss) and using an AxioCam MRm camera (Zeiss). Epifluorescence acquisitions were treated using the ZEN software (Zeiss).

Name	*Target group*	*Sequence (5' - 3')*	*Formamide (X%)*	*Reference*
ANME-1-350	ANME-1	AGT-TTT-CGC-GCC-TGA-TGC	40%	Boetius et al. (2000)
ANME-2-712	ANME-2	TTC-GCC-ACA-GAT-GGT-CCC	40%	Knittel and Boetius (2009)
ANME-3-1249	ANME-3	TCG-GAG-TAG-GGA-CCC-ATT	40%	Losekann et al. (2007)
ANME-3-1249H3	ANME-3 helper	GTC-CCA-ATC-ATT-GTA-GCC-GGC	40%	Losekann et al. (2007)
ANME-3-1249H5	ANME-3 helper	TTA-TGA-GAT-TAC-CAT-CTC-CTT	40%	Losekann et al. (2007)
TPM666	Thermoplasmatales	CCC-AGG-AGT-ACC-TCT-AGC	30%	Schubert et al. (2011)
Delta495b	*Deltaproteobacteria*	AGT-TAG-CCG-GCG-CTT-CCT	40%	Loy et al. (2002)
Gam42A	*Gammaproteobacteria*	GCC-TTC-CCA-CAT-CGT-TT	35%	Manz et al. (1992)
Epsi549	*Epsilonproteobacteria*	CAG-TGA-TTC-CGA-GTA-ACG	35%	Lin et al. (2006)
ARCH915	Most of *Archaea*	GTG-CTC-CCC-CGC-CAA-TTC-CT	30 - 40%	Amann et al. (1990)
EUB338	Most of *Bacteria*	GCT-GCC-TCC-CGT-AGG-AGT	30 - 40%	Amann et al. (1990)

Abbreviations: ANME, archaeal anaerobic methanotroph

Table 3 : Oligonucleotide probes used for fluorescence *in situ* hybridization.

3. Results

In this study, we investigated five cold seep sites located in the Guaymas Basin at water depths of about 1560 m (Figure 1, Table 1): i) Ayala and ii) Vasconcelos BIG13 sites were populated by chemosynthetic vesicomyid bivalves; iii) Juarez site was colonized by chemosynthetic siboglinid tubeworms while Vasconcelos BIG18 site hosted i) a white microbial mat surrounded by v) a grey mat-like macrofaunal assemblage composed of ampharetid polychaetes and gastropods. Additionally, one site without seepage was analyzed as reference. Temperature measurements indicated *in situ* temperatures around 3°C from the surface water to about 40 cmbsf on each habitat before sampling.

3.1 Geochemical characterization

Even if methane concentrations might have been underestimated due to outgassing during core retrieval, methane was detected in all cores except in the reference core (Cross in Figure 2). The highest methane concentrations were measured throughout the Vasconcelos BIG18 white mat core (almost 1.2 mM, Figure 2F). Methane concentrations were also high but two fold lower in the sediments of the Vasconcelos BIG18 grey mat-like habitat (up to 606.5 µM at 7 cmbsf, Figure 2E). Methane concentrations were hundred fold lower for other habitats reaching maximum concentrations of 13 µM at 8 cmbsf for vesicomyid Ayala site (Figure 2B), 4.60 µM for siboglinid Juarez site (Figure 2C) and 3.40 µM for vesicomyid Vasconcelos site (Figure 2D).

Sulfide porewater concentrations were measured on the same push core than methane porewater concentrations. Sulfide porewater concentrations increased quickly with depth and reached 40 mM and 20 mM at the deepest sediment layers of the Vasconcelos BIG18 white mat and the grey mat-like cores respectively (Figure 2E and F). Peaks of sulfide (28 and 25 mM) were also measured at 2 and 5 cmbsf for white mat and grey mat-like cores respectively (Figure 2E and F). Sulfide porewater concentrations remained under the detection limit for other habitats and reference core (Figure 2A, B, C and D).

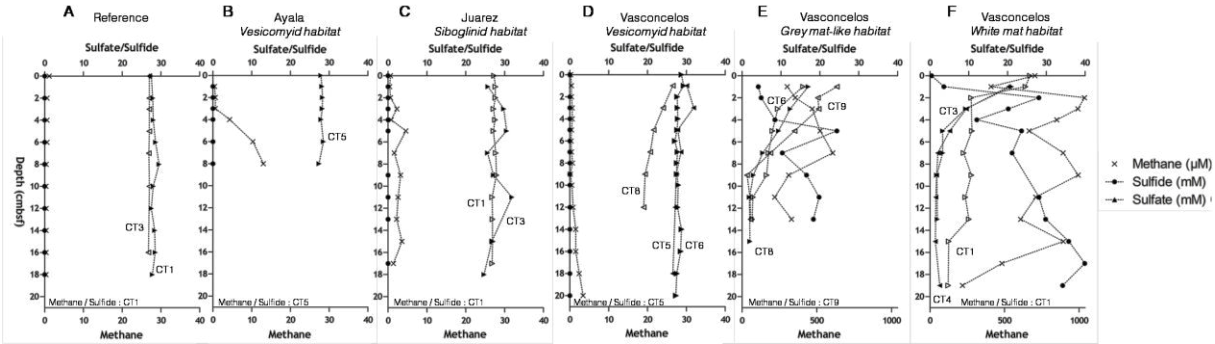


Figure 2 : Geochemical profiles in cold seep sediments of the Sonora Margin, Guaymas Basin. Dissolved methane (cross), sulfate (triangle) and sulfide (circle) concentrations in porewaters. Sediment cores were from (A) Reference, (B) vesicomyid Ayala, (C) siboglinid Juarez, (D) vesicomyid Vasconcelos BIG13, (E)grey mat-like Vasconcelos BIG18 and (F) microbial mat Vasconcelos BIG18 sites.

Sulfate porewater concentrations were measured on the same push core than methane and sulfide porewater concentrations and on some push cores that have been used for microbiological analyses. These push core replicates being close on a specific site, they allowed us to access on potential variations in sulfate porewater concentrations within a given habitat. At white mat and grey mat-like habitats, porewater sulfate

concentrations decreased quickly from about 22 mM in surface layer to about 7 mM at 7 cmbsf. Sulfate concentrations at other habitats remained relatively constant to 28 mM with depth except for CT8 in vesicomyid Vasconcelos habitat where sulfate concentrations decreased until 19 mM at 12 cmbsf.

3.2 ARISA fingerprints

ARISA was used as a rapid method to compare archaeal community structure across the different samples by analyzing the lengths of the intergenic spacers between 16S and 23S rRNA genes. Statistical analyses of the archaeal-community fingerprints showed a clear cleavage between microbial communities from the reference site and those from cold seep sites (Figure 3). Focusing on cold seep samples, the NMDS ordination plot indicated that all samples from a given site appeared to cluster together. Archaeal community structure from the Vasconcelos BIG18 habitats (white mat and grey mat-like macrofaunal assemblages) appeared to be the most divergent from the archaeal community structure of the reference area. Archaeal community structures of the sediments colonized by vesicomyids and siboglinids seemed intermediate but were still closer to the Vasconcelos BIG18 habitat than to the reference site. However, NMDS analyses revealed that archaeal community composition might vary between duplicate cores (Figure 3).

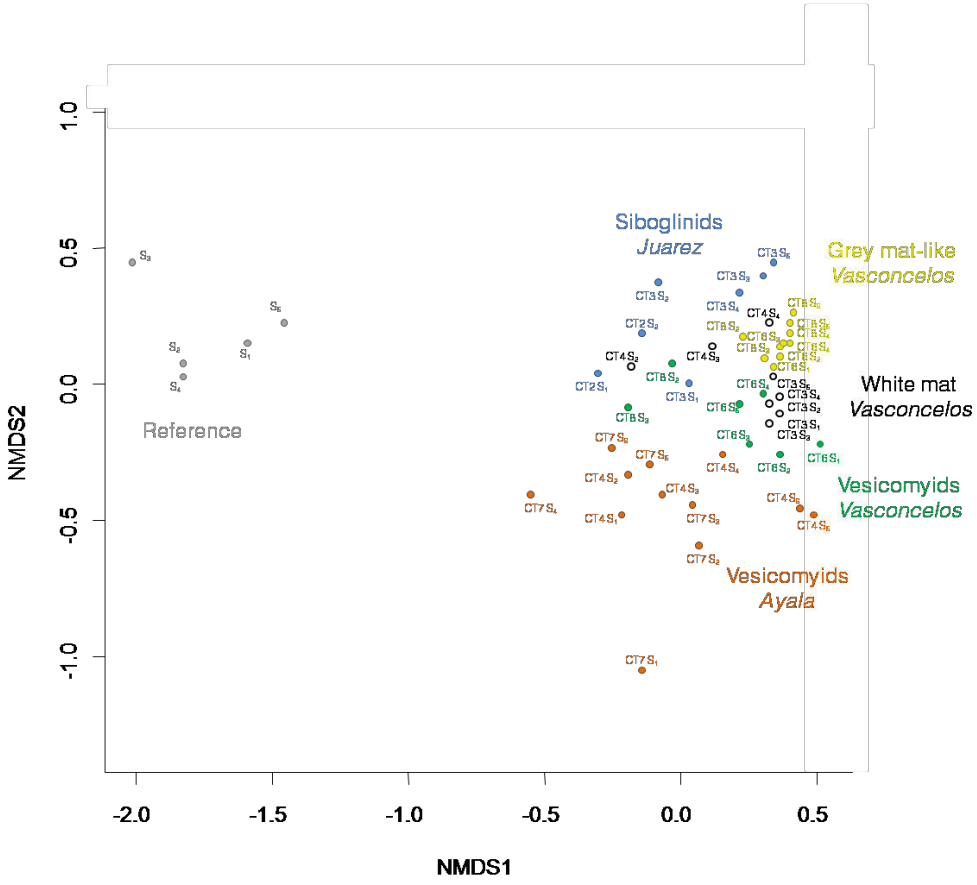


Figure 3 : NMDS ordination plot derived from the Bray Curtis similarity measure between samples based on archaeal ARISA fingerprinting. Stress = 0.1. Each sample is represented by an colored and annotated dot. Sediment cores from (grey dots) Reference, (orange dots) vesicomyid Ayala, (blue dots) siboglinid Juarez, (green dots) vesicomyid Vasconcelos BIG13, (yellow dots)grey mat-like Vasconcelos BIG18 and (black and white dots) microbial mat Vasconcelos BIG18 sites.

3.3 Archaeal diversity

A total of 8 993 partial 16S rRNA gene sequences were used for archaeal diversity analyses. Taxonomic affiliation of these sequences highlighted various community structures according to sampling sites. Similarities between samples were represented graphically using Bray-Curtis similarity comparison (Figure 4A) and proportions for the different archaeal groups were reported on Table 4.

Statistical analyses showed a clear separation between microbial communities from the reference site and those from cold seep sites (ANOSIM, *p-value* < 0.001) (Figure 4A). Similarity percentage analyses (SIMPER) (Clarke, 1993) highlighted that Marine Group I (MG-I) (43% contribution), Marine Benthic Group D (MBG-D) (22.8% contribution) (Figure 4B) and ANME-2 (Anaerobic Methanotroph) (6.8% contribution) (Figure 4C) were mainly responsible for the differences between cold seep sediments and reference sediments (MG-I represented on average 79% of the detected sequences in reference sediment and 2.5% in cold seep sediments while ANME-2, MBG-D and more largely the Thermoplasmatales group were mainly detected in cold seep sediments, Table 4). Other archaeal groups such as Marine Benthic Group E (MBG-E) and Marine Group II (MG-II) were only detected in reference sediments (Table 4). Regarding cold seep sites, archaeal communities from sediments colonized by siboglinid and vesicomyid assemblages (megafauna habitats) appeared to be more similar to each other than the archaeal communities of the sediments underlying microbial mat (ANOSIM, *p-value* < 0.003) (Figure 4A). SIMPER analyses highlighted that MBG-D (39.7% contribution) (Figure 4B), ANME-2 (16% contribution) (Figure 4C) and DHVE-8 (Deep Sea Hydrothermal Vent Euryarchaeota group 8) (15.6% contribution) (Figure 4D) were mainly responsible for the differences between megafauna habitats and microbial mat habitat. While sequences affiliated to MBG-D were largely dominant in samples from megafauna habitats (Figure 4B and Table 4), ANME-2, ANME-1 and DHVE-8 were the main archaeal groups detected in the sediments underlying the Vasconcelos BIG18 microbial mat (Figure 4B, C and Table 4). Archaeal communities associated with grey mat-like habitat seemed to be intermediate between those associated to microbial mat (more surface samples) and those associated to megafauna habitats (deeper samples) (Figure 4A). Sequences affiliated to ANME-2 and DHVE-8 were detected in surface samples from grey mat-like habitat as in surface samples from microbial mat habitat (Figure 4C, D and Table 4). Sequences affiliated to MBG-D were detected in deeper samples from grey mat-like as in samples from megafauna habitats (Figure 4B and Table 4). However ANME-1 sequences detected in deeper samples from microbial mat were also retrieved in deeper samples from grey mat-like habitat (Table 4). Considering megafauna habitats, archaeal communities associated with the two vesicomyid habitats did not cluster significantly compared with those associated with the siboglinid habitat. Interestingly, archaeal communities from sediments of the vesicomyid Ayala site appeared different from those found in sediments of the vesicomyid Vasconcelos site (ANOSIM, *p-value* < 0.05). This difference was mainly due to ANME-2 sequences (22% contribution), detected in vesicomyid Vasconcelos site sediments (34.8% of the sequences affiliated to ANME-2 in the surface sample of the vesicomyid Vasoncelos site (Figure 4C and Table 4), while ANME-2 sequences were little or not detected in vesicomyid Ayala site sediments except for the deepest sediment with 3.3% of the sequences affiliated to this group (22% contribution) (Table 4 and Figure 4C).

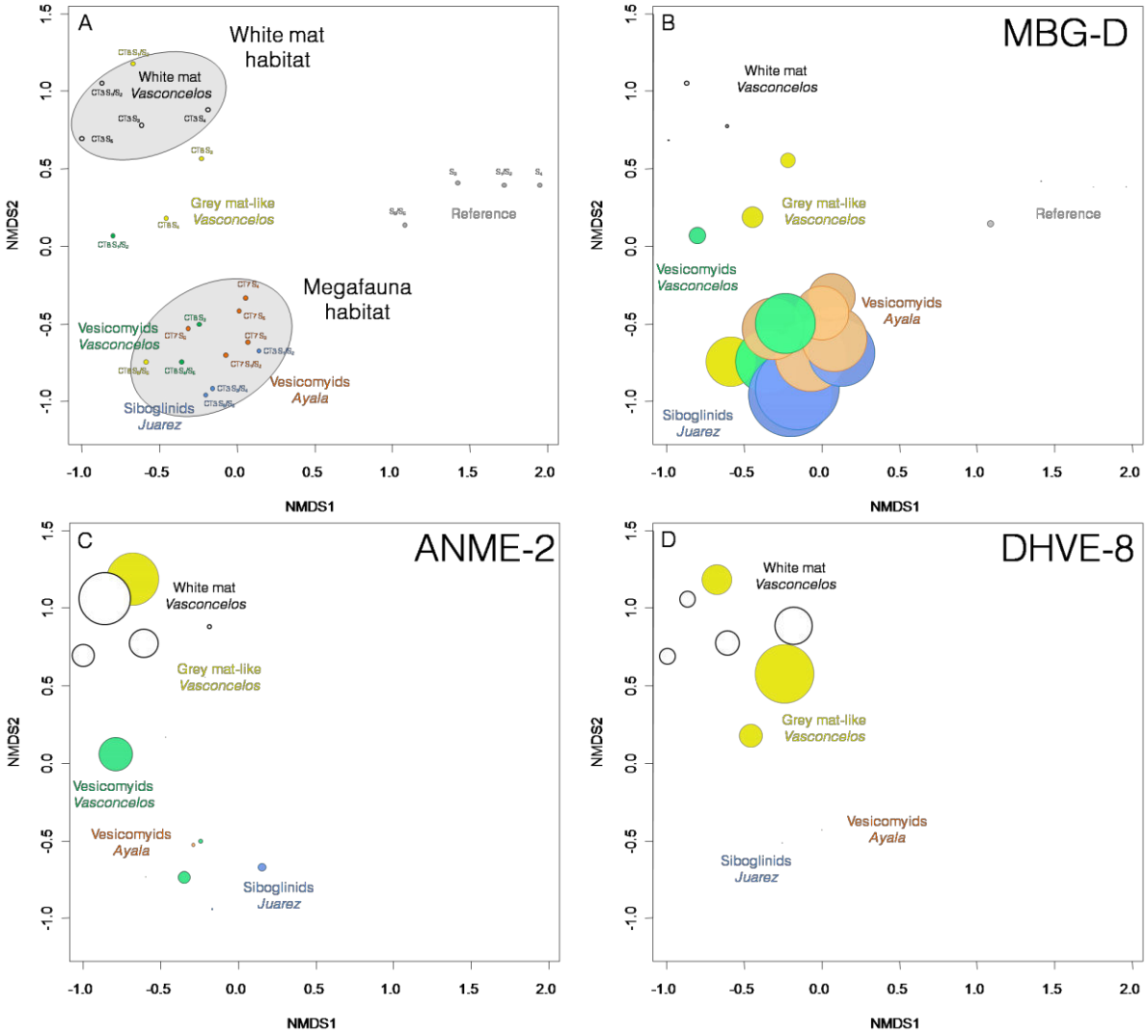


Figure 4 : (A) NMDS ordination plots derived from the Bray-Curtis similarity measure between samples based on taxonomic affialiation of pyrosequencing reads for *Archaea*. Stress = 0.10. (B), (C) and (D) Size of colored circles (grey: Reference, orange : vesicomyid Ayala, blue : siboglinid Juarez, green : vesicomyid Vasconcelos BIG13, yellow: grey mat-like Vasconcelos BIG18 and black : microbial mat Vasconcelos BIG18 sites) indicates microbial group proportions in each sample (B) MBG-D, (C) ANME-2 and (D) DHVE-8 groups.

			AYALA *Vesicomyids*					JUAREZ *Siboglinids*			VASCONCELOS *Vesicomyids*			VASCONCELOS *Grey mat-like*				VASCONCELOS *White mat*				Reference			
			S_1/S_2 0-4 cmbsf	S_3 4-6 cmbsf	S_4 6-8 cmbsf	S_5 8-10 cmbsf	S_6 10-12 cmbsf	S_1/S_2 0-4 cmbsf	S_3/S_4 4-8 cmbsf	S_5/S_6 8-12 cmbsf	S_1/S_2 0-4 cmbsf	S_3 4-6 cmbsf	S_4/S_5 6-10 cmbsf	S_1/S_2 0-4 cmbsf	S_3 4-6 cmbsf	S_4 6-8 cmbsf	S_5/S_6 8-12 cmbsf	S_1/S_2 0-4 cmbsf	S_3 4-6 cmbsf	S_4 6-8 cmbsf	S_5 8-10 cmbsf	S_1/S_2 0-2 cmbsf	S_3 2-4 cmbsf	S_4 4-6 cmbsf	S_5/S_6 6-12 cmbsf
Euryarchaeota	ANME-1		0,0%	0,3%	1,5%	0,5%	2,6%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,0%	0,0%	3,3%	35,8%	39,1%	3,8%	0,8%	5,9%	39,9%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	Methanosarcinales	ANME-2	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	3,3%	7,9%	1,3%	0,0%	34,8%	4,3%	12,3%	54,0%	0,3%	0,5%	0,5%	54,2%	30,2%	4,1%	23,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
		ANME-3	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,5%	4,9%	1,8%	0,0%	4,1%	0,3%	0,0%	0,0%	10,7%	0,5%	9,5%	4,6%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
		GoM-Arc I	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,3%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	MBG-E		0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	7,2%	10,0%	0,5%	13,3%
	Thermoplasmatales	MG-II	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,3%	0,5%	1,0%	0,0%
		MBG-D	74,7%	68,0%	48,8%	56,3%	64,5%	69,3%	87,0%	87,2%	17,1%	62,4%	66,0%	0,3%	14,8%	21,2%	51,4%	4,6%	3,1%	0,3%	0,8%	0,5%	1,0%	0,5%	6,4%
		AMOS1	4,6%	7,4%	9,0%	7,7%	4,6%	1,0%	1,8%	1,0%	3,6%	5,9%	0,3%	4,9%	5,1%	3,3%	2,0%	6,9%	17,4%	7,7%	4,6%	0,0%	0,8%	0,0%	2,0%
		VC2	1,3%	0,0%	5,6%	2,3%	0,3%	1,5%	0,0%	0,0%	7,4%	2,0%	1,0%	0,5%	2,3%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,0%	0,5%	1,5%	2,0%	0,8%	2,6%
		Other *Thermoplasmatales*	13,3%	9,2%	20,2%	19,7%	17,6%	7,4%	7,2%	8,4%	10,2%	14,8%	5,1%	4,1%	9,0%	13,0%	2,6%	3,3%	18,4%	23,5%	7,9%	2,0%	5,4%	0,8%	12,0%
	Other *Euryarchaeota*		0,5%	0,3%	0,5%	0,0%	0,0%	0,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,8%	0,0%	0,3%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,8%	0,0%	1,0%
Thaumarchaeota	MBG-B		0,5%	0,8%	1,3%	0,3%	4,3%	0,3%	0,3%	1,8%	7,7%	1,3%	7,7%	0,0%	1,3%	0,5%	3,1%	0,0%	0,8%	1,8%	0,0%	0,5%	0,5%	0,0%	1,8%
	MG-I		2,8%	9,7%	8,4%	6,6%	0,0%	12,0%	1,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,3%	0,5%	0,0%	1,0%	0,0%	0,0%	0,0%	3,3%	0,3%	85,7%	77,2%	96,4%	57,0%
	MCG		0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,8%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,0%
DHVE-8			0,0%	0,0%	0,0%	0,5%	0,0%	0,0%	0,8%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	30,7%	61,1%	23,8%	0,0%	16,4%	25,3%	38,9%	16,6%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
MHVG			0,0%	1,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	11,3%	6,6%	5,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,8%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
PBG			0,0%	0,3%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,3%
VAL-IIIa			0,5%	0,3%	0,8%	0,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,3%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,3%	0,3%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
VAL-IIIb			1,0%	0,5%	0,5%	0,0%	0,3%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,0%
Other *Archaea*			0,8%	1,8%	3,3%	5,6%	2,6%	0,0%	0,8%	0,3%	1,8%	0,0%	0,3%	0,8%	2,6%	0,8%	1,3%	0,0%	1,5%	3,1%	1,3%	1,3%	1,8%	0,0%	0,5%

Table 4 : Taxonomic affiliation of pyrosequencing reads after filtering. Results for *Archaea* according to samples. Higher proportions are represented in darker blue cells.

3.4 Bacterial diversity

A total of 25 346 partial bacterial 16S rRNA gene sequences were used for diversity analyses. Taxonomic affiliation of these sequences highlighted various community structures according to sampling sites. Similarities between samples were represented graphically using Bray-Curtis similarity comparison (Figure 5A) and proportions for the different bacterial groups were reported on Table 5.

Statistical analyses showed a clear separation between bacterial communities from the reference site and those from cold seep sites (ANOSIM, *p-value* < 0.001) (Figure 5A). SIMPER analyses highlighted that *Gammaproteobacteria* were mainly responsible for the differences between cold seep sediments and reference sediments. The *Gammaproteobacteria* subgroup 1, affiliated to Xanthomonadales with Silva taxonomic assignment, represented on average 25% of the detected sequences in reference sediments while almost no sequence was detected in cold seep sediments. Other bacterial groups such as Gemmatimonadetes, *Betaproteobacteria* and a *Gammaproteobacteria* subgroup (*Gammaproteobacteria*_2), closed to the *Gammaproteobacteria* subgroup 1, were mainly detected in reference sediment. In contrast microbial communities identified in cold seep sediments were mainly affiliated to various lineages of Thiotrichales, *Deltaproteobacteria,* especially SEEP-SRB1 and other Desulfobacterales, *Epsilonproteobacteria* and Chloroflexi. Within the cold seep sites, microbial communities clustering appeared less clear than those observed with archaeal sequences. The main clustering was observed between bacterial communities associated with vesicomyid Ayala site and those associated to the other cold seep habitats (ANOSIM, *p-value* < 0.003) (Figure 5A). SIMPER analyses highlighted that *Gammaproteobacteria* and more particularly Thiotrichales relatives with on average 21% of sequences detected in the Ayala sediments were mainly responsible (16% contribution) for the differences between Ayala sediments and other sediments (Figure 5C). The group "Thiotrichales relatives" included both filamentous bacteria close to *Beggiatoa* or *Thioploca* and invertebrate endosymbionts or Marine Methylotrophic Group 3 (MMG-3). Bacterial communities associated with sediment from grey mat-like and white mat habitats appeared more closer to each other than with other samples (ANOSIM, *p-value* < 0.002) (Figure 5A). This is partially due to the detection of SEEP-SRB1 sequences (8.1% contribution) in both grey mat-like (from 8.4% in surface sample to 22.6% in deepest sample) and in white mat habitats (from 5.4% in surface sample to 11.5% in deepest sample) (Figure 5B). Moreover the bacterial communities associated to the surface sample from white mat habitat appeared different from all other cold seep samples (Figure 5A). This was mainly due to *Epsilonproteobacteria* sequences detected in this sample (41.9% of sequences). Finally, bacterial communities associated to megafauna habitats (siboglinid Juarez and vesicomyid Vasconcelos sites) appeared more similar to each other than to all other habitats (ANOSIM, *p-value* < 0.02). SIMPER analyses highlighted that Choroflexi D1 (Division 1) including Caldilineales and Anaerolineales lineages (Figure 5D), and candidate division JS-1 (Japan Sea 1), identified in these sediments, were at 7.7% and 6.3% of contribution respectively responsible for the differences observed between Juarez and vesicomyid Vasconcelos sites and the other habitats. The bacterial communities associated to the deepest sample from the siboglinid Juarez site appeared also different from all other cold seep samples. This was mainly due to Chloroflexi D2 (Division 2, including Dehalococcoidetes lineages) sequences detected in this sample (18.6% of sequences).

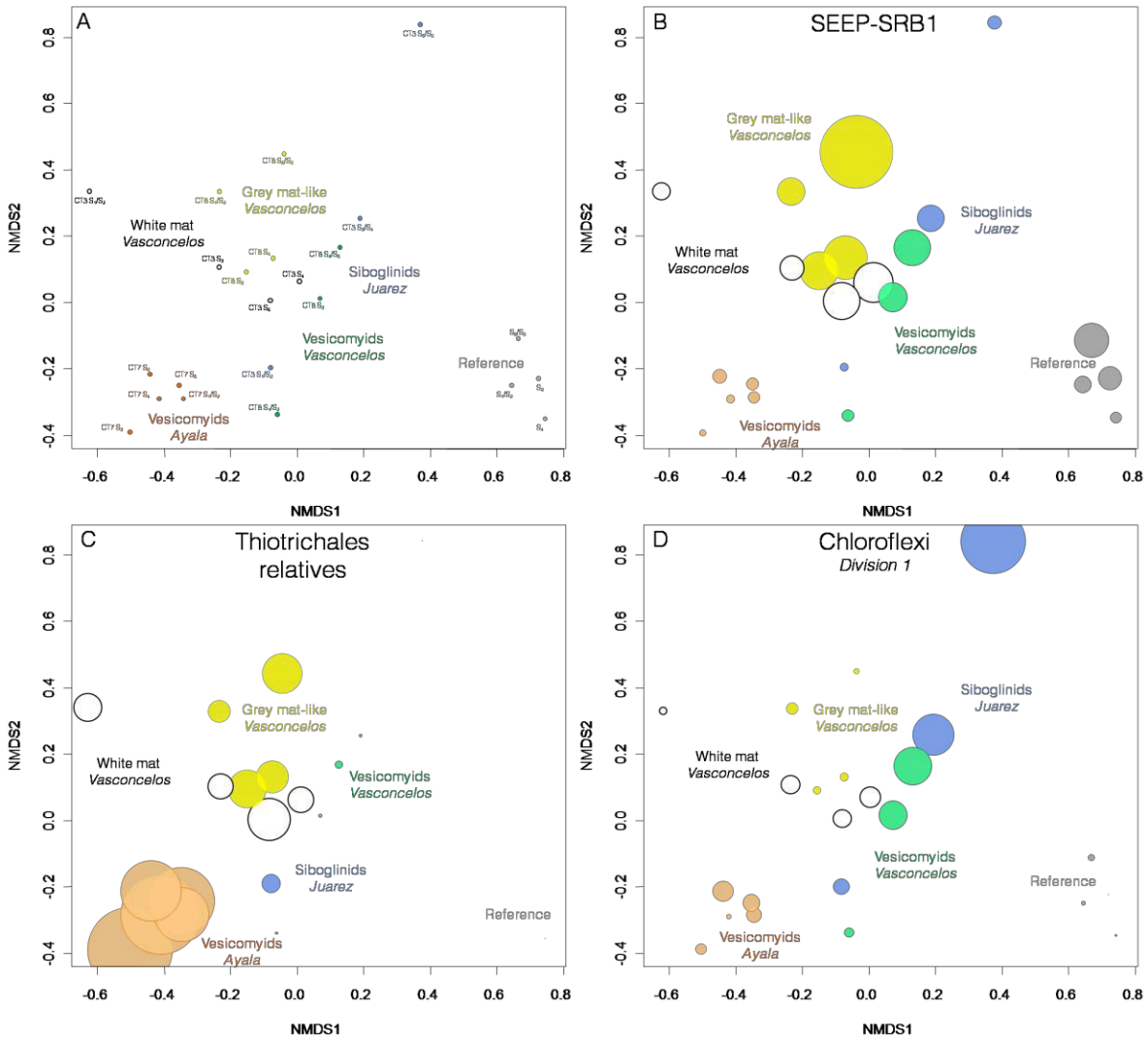


Figure 5 : (A) NMDS ordination plots derived from the Bray-Curtis similarity measure between samples based on taxonomic affialiation of pyrosequencing reads for *Bacteria*. Stress = 0.12. (B), (C) and (D) Size of colored circles (grey: Reference, orange : vesicomyid Ayala, blue : siboglinid Juarez, green : vesicomyid Vasconcelos BIG13, yellow: grey mat-like Vasconcelos BIG18 and black : microbial mat Vasconcelos BIG18 sites) indicates microbial group proportions in each sample (B) SEEP-SRB1, (C) Thiotrichales relatives and (D) Chloroflexi D1 groups.

				AYALA *Vesicomyids*					JUAREZ *Siboglinids*			VASCONCELOS *Vesicomyids*			VASCONCELOS *Grey mat-like*				VASCONCELOS *White mat*				Reference			
				S_1/S_2 0-4 cmbsf	S_3 4-6 cmbsf	S_4 6-8 cmbsf	S_5 8-10 cmbsf	S_6 10-12 cmbsf	S_1/S_2 0-4 cmbsf	S_3/S_4 4-8 cmbsf	S_5/S_6 8-12 cmbsf	S_1/S_2 0-4 cmbsf	S_3 4-6 cmbsf	S_4/S_5 6-10 cmbsf	S_1/S_2 0-4 cmbsf	S_3 4-6 cmbsf	S_4 6-8 cmbsf	S_5/S_6 8-12 cmbsf	S_1/S_2 0-4 cmbsf	S_3 4-6 cmbsf	S_4 6-8 cmbsf	S_5 8-10 cmbsf	S_1/S_2 0-2 cmbsf	S_3 2-4 cmbsf	S_4 4-6 cmbsf	S_5/S_6 6-12 cmbsf
Acidobacteria				0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%	0,8%	0,0%	0,0%	1,4%	1,7%	0,3%	0,6%	0,0%	0,5%	0,1%	0,3%	0,7%	2,0%	1,8%	1,5%	1,5%	1,1%	1,0%
Actinobacteria				0,0%	0,0%	0,3%	0,1%	0,2%	0,6%	2,6%	0,5%	2,4%	1,1%	1,6%	0,9%	0,7%	1,1%	0,1%	0,1%	1,8%	3,0%	1,1%	3,8%	4,1%	7,6%	3,7%
Chlorobi	Ignavibacteriales			0,5%	0,2%	0,0%	0,1%	0,0%	3,4%	2,6%	0,8%	0,3%	1,8%	1,5%	1,5%	0,2%	1,1%	0,5%	0,0%	0,2%	0,3%	0,5%	2,5%	4,2%	2,8%	5,0%
	Other Chlorobi			0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,2%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
Chloroflexi	Chloroflexi_D1			4,6%	3,3%	1,5%	5,3%	6,4%	4,8%	12,8%	20,1%	3,0%	8,8%	11,8%	3,5%	2,3%	2,5%	1,7%	2,5%	5,8%	6,4%	5,5%	1,4%	0,3%	0,6%	2,0%
	Chloroflexi_D2			0,4%	0,0%	0,5%	0,8%	0,4%	0,9%	6,4%	18,6%	0,5%	2,5%	3,0%	0,0%	0,5%	1,4%	3,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,6%	0,2%	0,1%	0,0%	0,4%
	Other Chloroflexi			0,1%	0,0%	0,0%	0,1%	0,2%	0,3%	0,9%	0,5%	0,2%	0,1%	0,2%	0,1%	0,1%	0,0%	0,5%	0,0%	0,1%	0,5%	0,0%	0,7%	0,7%	1,5%	0,9%
Bacteroidetes	Bacteroidales			0,3%	0,0%	0,2%	0,2%	0,0%	0,3%	0,1%	0,0%	0,2%	0,2%	0,0%	0,0%	0,1%	0,3%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%	1,2%	0,0%	0,1%	0,0%	1,3%
	Cytophagales			0,0%	0,3%	0,4%	0,2%	0,1%	1,3%	0,4%	0,0%	0,5%	1,0%	0,6%	0,2%	0,5%	0,6%	0,5%	0,0%	1,3%	0,5%	0,5%	0,7%	1,1%	0,9%	0,0%
	Flavobacteriales			3,5%	1,2%	3,0%	1,9%	0,8%	5,6%	3,8%	0,6%	2,5%	1,5%	1,4%	7,3%	4,2%	3,0%	3,7%	1,6%	3,0%	6,8%	2,1%	6,1%	5,8%	5,1%	2,7%
	Sphingobacteriales			0,1%	0,0%	0,2%	0,0%	0,0%	0,2%	0,7%	0,0%	0,0%	0,0%	1,1%	0,0%	0,0%	0,3%	1,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,4%	0,2%	0,2%	0,0%
	Other Bacteroidetes			4,6%	2,3%	2,7%	3,4%	2,8%	6,5%	7,2%	3,0%	10,2%	6,4%	4,4%	4,3%	8,0%	7,1%	3,4%	5,4%	7,3%	9,1%	4,4%	2,5%	0,9%	0,5%	0,4%
Planctomycetes	*C. Brocadiales*			0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,3%	0,7%	0,0%	0,0%	0,0%
	Phycisphaerae			0,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,4%	1,1%	1,9%	2,4%	0,2%	0,4%	1,0%	0,1%	0,3%	1,3%	1,7%	0,7%	0,6%	0,7%	0,9%	3,2%	1,6%	1,7%	2,5%
	Other Planctomycetes			0,1%	0,2%	0,0%	0,4%	0,2%	0,3%	0,6%	1,0%	0,5%	0,7%	0,3%	1,1%	0,5%	0,5%	0,2%	1,2%	1,8%	1,0%	0,6%	1,2%	2,1%	0,8%	0,5%
Firmicutes	Clostridiales			0,0%	0,0%	0,3%	0,3%	0,3%	1,3%	0,6%	0,1%	0,4%	0,0%	0,0%	1,0%	1,5%	0,6%	0,7%	0,4%	0,1%	1,8%	1,8%	0,0%	0,0%	0,0%	0,5%
Fusobacteria				0,0%	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,3%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%	0,5%	0,0%	0,0%	0,2%	1,5%	1,8%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
Gemmatimonadetes				0,0%	0,0%	0,0%	0,3%	0,0%	0,0%	0,1%	0,5%	0,5%	0,2%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,2%	0,0%	1,4%	0,9%
Spirochaetes				1,2%	1,2%	0,4%	1,0%	0,8%	0,7%	0,8%	0,5%	0,6%	0,4%	0,2%	1,0%	1,7%	0,9%	1,5%	0,5%	1,6%	0,8%	0,2%	0,1%	0,4%	0,0%	0,5%
JS1				0,0%	0,0%	0,0%	0,8%	1,0%	1,0%	6,0%	15,1%	0,0%	3,3%	8,3%	0,0%	0,0%	0,5%	1,3%	0,0%	0,0%	0,6%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
OP3				0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%	0,1%	0,5%	0,0%	0,3%	0,1%	0,0%	0,0%	0,1%	0,2%	0,0%	0,0%	0,3%	0,4%	0,1%	0,0%	0,0%	0,2%
OP8				0,2%	0,5%	0,2%	0,6%	0,5%	0,0%	3,4%	5,3%	0,2%	0,5%	1,3%	0,4%	0,0%	0,2%	0,2%	0,0%	0,9%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%
OP11				0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,3%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,1%	0,1%	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Verrucomicrobia	Verrucomicrobia_D4			0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,3%	0,2%	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,3%	0,0%	0,1%	0,4%	0,2%	0,0%
	Verrucomicrobia_D5			2,5%	1,4%	1,3%	1,1%	0,0%	1,6%	1,3%	0,1%	4,3%	1,4%	0,1%	0,7%	0,2%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,3%	0,9%	0,3%	0,9%
	Other Verrucomicrobia			0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Proteobacteria	*Alphaproteobacteria*			2,4%	2,4%	1,5%	2,6%	3,6%	0,3%	0,0%	0,2%	0,1%	0,1%	0,0%	0,0%	0,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	3,8%	1,9%	4,3%	2,4%
	Betaproteobacteria			0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,9%	0,9%	1,3%	0,7%
	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales		0,0%	0,0%	0,1%	0,0%	0,1%	0,3%	0,2%	0,0%	0,3%	0,1%	0,0%	1,4%	0,6%	0,5%	1,0%	1,9%	0,5%	0,1%	0,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
		SEEP-SRB2		0,0%	0,8%	0,3%	1,4%	1,9%	0,2%	0,9%	0,0%	0,0%	0,3%	0,0%	0,4%	2,8%	4,1%	4,4%	1,6%	1,1%	1,2%	1,4%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
		Desulfobacterales	*Desulfobacteraceae* SEEP-SRB1	3,7%	2,0%	2,5%	3,7%	4,2%	2,4%	8,3%	4,2%	3,5%	8,9%	11,3%	8,4%	11,7%	13,5%	22,6%	5,4%	7,5%	12,4%	11,5%	5,1%	7,3%	3,4%	10,7%
			Desulfobacteraceae Other *Desulfobacteraceae*	2,4%	1,4%	1,6%	1,6%	0,6%	4,3%	2,6%	1,2%	3,8%	5,1%	3,3%	7,1%	3,8%	4,4%	0,8%	4,0%	1,5%	2,5%	1,7%	1,1%	0,7%	0,9%	0,8%
			Desulfobulbaceae SEEP-SRB4	4,6%	4,2%	3,9%	3,1%	1,5%	2,9%	2,7%	1,0%	9,5%	3,8%	2,8%	10,1%	5,8%	4,3%	1,8%	4,1%	3,6%	3,2%	2,4%	0,0%	0,0%	0,4%	0,0%
			Desulfobulbaceae Other *Desulfobulbaceae*	5,3%	6,3%	5,8%	3,8%	6,1%	5,4%	5,0%	2,8%	4,6%	6,8%	7,1%	14,3%	7,3%	6,6%	0,5%	5,7%	6,3%	5,2%	5,4%	0,7%	1,2%	0,1%	1,5%
		Syntrophobacterales		0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,9%	1,0%	1,5%	1,4%	1,5%	1,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,3%	0,0%	0,7%	0,9%	0,5%	2,2%
		Other *Deltaproteobacteria*		2,5%	1,5%	3,2%	3,7%	3,3%	6,4%	6,9%	3,6%	0,7%	7,8%	8,5%	4,2%	5,1%	6,8%	8,2%	1,4%	4,4%	6,6%	9,5%	10,7%	12,7%	9,9%	14,3%
	Epsilonproteobacteria	*Helicobacteraceae*		0,3%	0,4%	0,8%	0,2%	0,4%	0,5%	0,2%	0,6%	0,0%	0,0%	0,3%	0,9%	2,3%	1,5%	1,3%	11,4%	2,1%	0,3%	0,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
		Other *Epsilonproteobacteria*		0,0%	0,4%	4,8%	0,8%	3,3%	3,7%	1,0%	2,5%	10,0%	2,3%	0,9%	7,8%	4,2%	2,3%	2,3%	30,5%	17,3%	2,0%	3,9%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	Gammaproteobacteria	*Gammaproteobacteria* _1		0,0%	0,3%	0,0%	0,3%	0,0%	0,1%	0,4%	0,0%	0,7%	0,5%	1,2%	0,4%	0,6%	0,7%	0,0%	0,0%	0,0%	0,3%	0,0%	25,0%	26,7%	27,0%	21,4%
		Gammaproteobacteria _2		0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,4%	0,2%	0,5%	0,3%
		Gammaproteobacteria _3		11,0%	10,4%	9,7%	10,5%	7,6%	15,2%	2,8%	0,0%	9,3%	8,5%	7,8%	0,0%	0,7%	1,9%	3,0%	0,8%	2,8%	0,9%	4,9%	0,2%	0,0%	0,4%	0,9%
		Methylococcales		0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,6%	0,0%	0,0%	0,5%	0,0%	0,0%	0,8%	0,0%	0,0%	0,0%	0,7%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
		Thiotrichales relatives		16,9%	26,2%	24,6%	20,8%	18,8%	5,8%	0,9%	0,2%	0,1%	1,1%	2,4%	6,7%	11,8%	10,1%	12,2%	8,6%	7,8%	7,9%	13,2%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
		Other *Gammaproteobacteria*		26,6%	28,5%	24,9%	24,5%	28,7%	15,9%	9,8%	4,9%	18,0%	11,3%	10,8%	5,3%	10,3%	9,9%	5,8%	7,3%	11,3%	12,1%	12,5%	13,5%	15,3%	15,2%	11,6%
	Zetaproteobacteria			0,0%	0,4%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,0%
Other *Bacteria*				5,8%	4,7%	5,4%	6,4%	5,7%	4,6%	4,9%	7,4%	9,5%	9,3%	5,1%	9,6%	11,7%	10,9%	14,9%	4,4%	7,8%	9,5%	8,2%	11,3%	8,0%	11,1%	8,7%

Table 5 : Taxonomic affiliation of pyrosequencing reads after filtering. Results for *Bacteria* according to samples. Higher proportions are represented in darker green cells.

3.5 Quantitative real-time PCR

Relative abundances of ANME-1, ANME-2, ANME-3 and MBG-D for *Archaea* and DSS (*Desulfosarcina-Desulfococcus* group), DBB (*Desulfobulbus* group) and candidate division JS-1 for *Bacteria* were estimated by Q-PCR (Figure 6). Due to the very few data available on microorganisms from cold seeps (pure culture or metagenomic analyses), the number of 16S rRNA genes copy per cell remains uncertain thus we considered a single 16S rRNA gene copy for each quantified populations. Overall, relative abundances were higher for Vasconcelos BIG18 grey mat-like and microbial mat habitats for each microbial group (yellow triangle and red square shaped respectively in Figure 6) except for MBG-D group for which higher relative abundances were found for the siboglinid Juarez and the vesicomyid Vasconcelos BIG13 habitats.

Regarding the *Archaea*, ANME-1 relative abundances increased with depth, except for microbial mat habitat (maximum concentrations around $6.30x10^7$ 16S rRNA gene copies for the vesicomyid Ayala habitat, $7.49x10^7$ for the siboglinid Juarez habitat, $2.32x10^8$ for the vesicomyid Vasoncelos habitat and highest value for the grey mat-like Vasconcelos habitat with $2.60x10^9$ copies of 16S rRNA gene per gram of sediments, while relative abundances decreased slightly from $1.02x10^9$ between 2 and 4 cmbsf to $5.93x10^8$ between 8 and 10 cmbsf for the microbial mat). ANME-2 relative abundances increased with depth for megafauna habitats (vesicomyids and siboglinids) (up to $1.48x10^8$ gene copies at vesicomyid Ayala habitat, $5.01x10^8$ for the siboglinid Juarez habitat and $3.56x10^8$ for the vesicomyid Vasconcelos habitat), while they decreased with depth but were globally higher for the grey mat-like Vasconcelos BIG18 habitat (from $2.65x10^9$ to $1.25x10^8$ copies of 16S rRNA gene per gram of sediments) and were relatively constant for the microbial mat habitat ($1.54x10^9$). ANME-3 relative abundances increased with depth for the siboglinid Juarez and the vesicomyid Vasconcelos habitats (max. $2.12x10^7$ and $7.7x10^6$ respectively), while they decreased for the grey mat-like habitat (from $5.79x10^7$ to $1.35x10^6$), were relatively constant for the microbial mat habitat ($1.45x10^8$) and not detected for the vesicomyid Ayala habitat. MBG-D relative abundances increased with depth and reached highest quantities for the vesicomyid Vasconcelos, the siboglinid Juarez, and the grey mat-like habitats (highest abundances of $1.73x10^8$, $1.34x10^8$, and $5.90x10^7$ respectively), while they were relatively constant with depth for the vesicomyid Ayala and the microbial mat habitats ($3.36x10^7$ and $1.03x10^7$ respectively).

Regarding the *Bacteria*, DSS relative abundances slightly decreased with depth for the siboglinid Juarez and the microbial mat habitats (from $2.85x10^8$ to $1.52x10^8$ and $5.76x10^8$ to $3.56x10^8$ copies of 16S rRNA gene per gram of sediments respectively), while they were relatively constant for the other habitats ($1.58x10^8$ for the vesicomyid Ayala habitat, $2.34x10^8$ for the vesicomyid Vasconcelos habitat and $3.63x10^8$ for the grey mat-like habitat). DBB relative abundances decreased with depth for the grey mat-like and the microbial mat habitats (from $1.22x10^8$ to $2.75x10^6$ for the grey mat-like habitat and $5.44x10^7$ to $2.22x10^7$ for the microbial mat habitat), while they were relatively constant and in lower quantities for the other habitats ($4.66x10^6$ for the vesicomyid Ayala site, $3.4x10^6$ for the siboglinid Juarez habitat and $4.37x10^6$ for the vesicomyid Vasconcelos habitat). Finally, JS-1 relative abundances increased with depth for the vesicomyid Vasconcelos and the grey mat-like habitats (max $1.80x10^8$ and $7.55x10^8$ respectively), while they decreased for the microbial mat habitat (from $4.23x10^8$ to $6.43x10^7$) and were relatively constant and in lower quantity at the other habitats ($3.58x10^7$ for the vesicomyid Ayala habitat and $5.04x10^7$ for the siboglinid Juarez habitat).

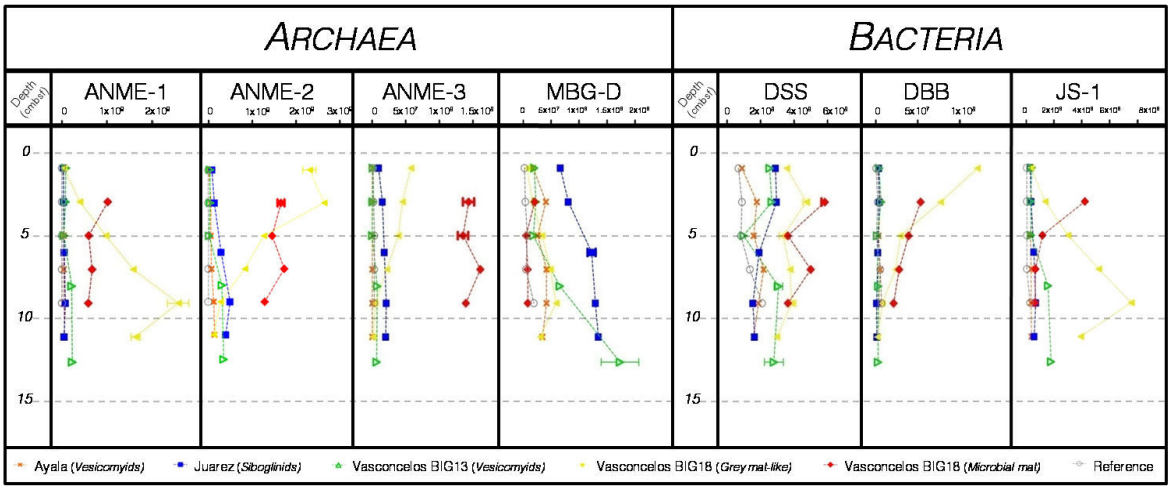


Figure 6 : DNA copy numbers of the 16S rRNA gene per gram of sediment for ANME-1, ANME-2, ANME-3, MBG-D, *Desulfosarcina/Desulfococcus* group (DSS), *Desulfobulbus* group (DBB) and candidate division JS-1, from cores of (grey) Reference, (orange) vesicomyid Ayala, (blue) siboglinid Juarez, (green) vesicomyid Vasconcelos BIG13, (yellow) grey mat-like Vasconcelos BIG18 and (red) microbial mat Vasconcelos BIG18 sites in function of depth in cold seep sediments of the Sonora Margin.

3.6 Fluorescence in situ hybridization (FISH)

FISH observations using probes described in Table 3 were carried out to visualize likely active microbial cells (Teske, 2005). Overall higher cell density and morphological diversity were observed in sediments underlying the grey mat-like and the microbial mat habitats (Figure 7).

Regarding the *Archaea*, ANME-2 labeled cells were detected in each habitat and at each depth. They were always observed in structured consortia with bacterial cells hybridized with *Deltaproteobacteria* probe (Figure 7). The most abundant and largest ANME-2/*Deltaprotebacteria* aggregates were observed in deep sediments from the microbial mat habitats (Figure 7E). Abundant but smaller ANME-2/*Deltaproteobacteria* aggregates were also observed in surface of the grey mat-like habitats (Figure 7D) and in a minor proportion in deepest sediments of the siboglinid habitat (Figure 7B). In sediments colonized by vesicomyids, ANME-2/*Deltaprotebacteria* aggregates were scarce and small (2-5 µm diameter) throughout the sediment core (Figure 7A and C). Numerous ANME-1 labeled archaeal cells were observed as rod chains without detectable bacterial partner in the deep sediments of the grey mat-like (Figure 7D) and the microbial mat habitats (Figure 7E) and as scarce rod-shaped cells in the other habitats. Unfortunately MBG-D and *Thermoplasmatales* were not detected using TPM666 probe but the majority of the observed cells labeled with the archaeal probe (Arch915) were also hybridized with ANME probes.

Regarding the *Bacteria*, *Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria* and *Epsilonprocteobacteria* labeled cells were detected in each cold seep sediment core. Within each habitat, morphological diversity of *Deltaproteobacteria* cells (green cells in Figure 7) was greater in surface sediments than in deep sediments. *Deltaproteobacteria* were observed as tetrads, multicellular filaments, cocci monospecific clusters and associated with ANME-2 labeled cells in shallow sediment and almost exclusively within ANME consortia in deepest sediment layers (Figure 7). *Gammaproteobacteria* (blue cells in Figure 7) were observed as diplococci, tetrads, streptobacilli and cluster of small cocci or large shapeless cocci. Quantity of observed *Gammaproteobacteria* cells seemed to increase with depth in the vesicomyid Ayala habitat (Figure 7A), while it

seemed to decrease with depth in the siboglinid Juarez, the grey mat-like and the microbial mat habitats (Figure 7B, D and E) and seemed steadier with depth in the vesicomyid Vasconcelos habitat (Figure 7C). *Epsilonproteobacteria* (purple in Figure 7) were less detected than *Deltaprotebacteria* and *Gammaproteobacteria* labeled cells, except for the surface sediments of the microbial mat habitat (Figure 7E) and were mainly observed in compact monospecific aggregates of small cocci. *Epsilonproteobacteria* cells seemed to be more numerous in surface sediments than in depth of the vesicomyid Ayala habitat (Figure 7A), while it were the opposite situation for the siboglinid Juarez, the grey mat-like and the microbial mats habitats (Figure 7B, D and E) Interestingly, long multicellular bacterial filaments (mainly *Delta-* and *Gammaproteobacteria*) up to 0.7 cm long were recorded only in the surface sediments of the megafauna habitats (vesicomyid and siboglinid habitats) (Figure 7A, N and C) and rare giant filamentous *Gammaproteobacteria*, probably corresponding to mat-forming bacteria, were observed in the surface sediments of the microbial mat habitat (Figure 7E).

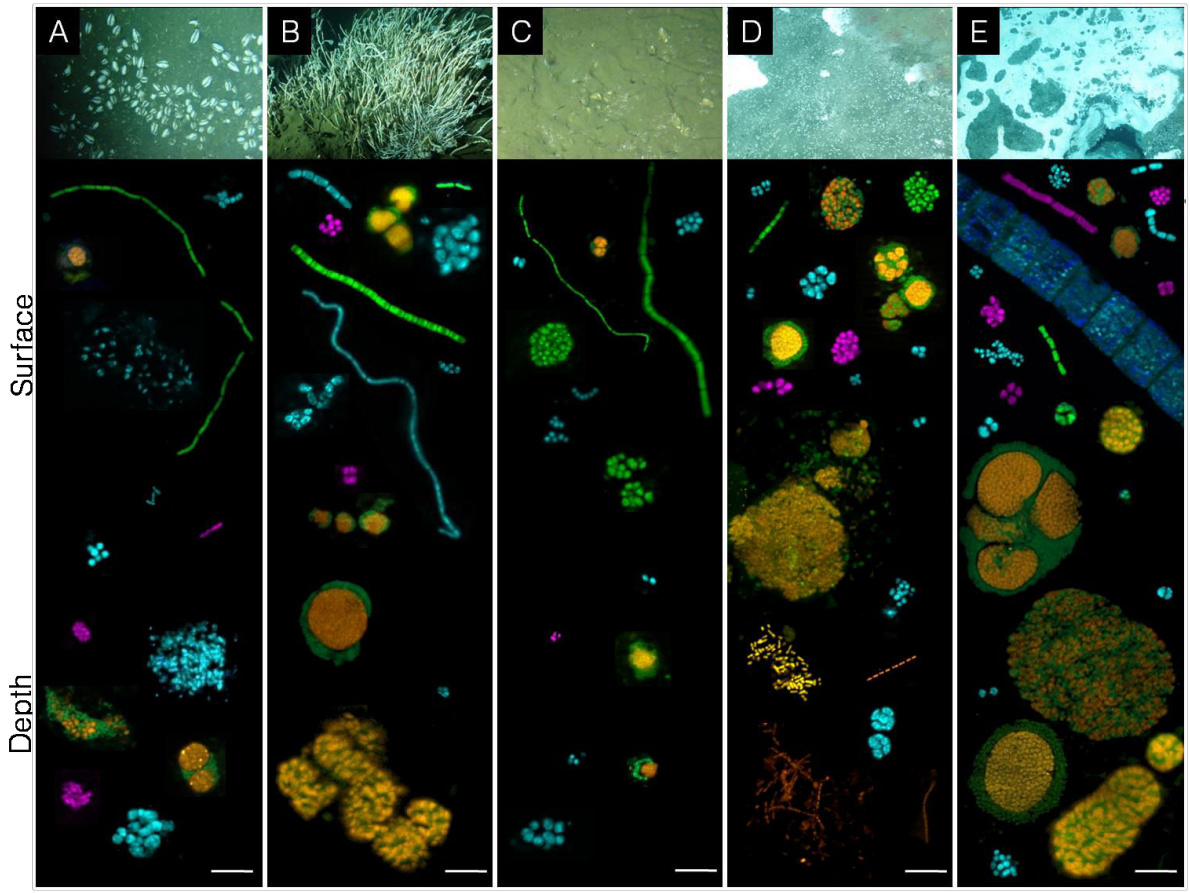


Figure 7 : Individual cells and cell aggregates of ANME (orange), *Deltaproteobacteria* (green), *Gammaproteobacteria* (blue) and *Epsilonproteobacteria* (purple) visualized with fluorescent-labeled oligonucleotide probes. Each aggregate, single cell or heaps were taken from different pictures. Sediments were from from (A) vesicomyid Ayala, (B) siboglinid Juarez, (C) vesicomyid Vasconcelos, (D) grey mat-like and (E) microbial mat Vasconcelos BIG18 sites, according to depth (surface and depth).

4. Discussion

Cold seep ecosystems of the Sonora Margin in the Guaymas Basin show a high spatial heterogeneity with non-overlapping habitats dominated by different chemosynthetic organisms as previously observed in other cold seep ecosystems (Fischer et al., 2012, Niemann et al., 2006, Ruff et al., 2013). On the Sonora Margin seafloor, dense communities of bivalve *Vesicomyidae*, tubeworm *Siboglinidae* and microbial mats interspersed visually with large area of bare sediments. Thus the main objectives of this study were to identify the microbial diversity, to determine the role of both porewater geochemistry and sedimentary microbial communities on this patchiness distribution of the seafloor assemblages and to identify interactions between these different factors. Five cold seep sites were investigated, three were colonized either by vesicomyid bivalves or by siboglinid tubeworms (megafauna habitats), one was colonized by heterotrophic gastropods and polychaetes (macrofauna habitat) and one colonized by a thick microbial mat.

4.1 Overview of the sedimentary microbial communities of the Sonora Margin

The microbial community structure, highlighted by ARISA fingerprinting (Figure 3), and composition obtained by 16S rRNA gene pyrosequencing (Figures 4, 5 and Tables 4, 5) indicated that microorganisms occurring in the cold seep sediments were strongly different from the microbial community identified in the non-active area. Sequences obtained from the reference sediments were mainly affiliated to Marine Group I (MG-I) and Marine Benthic Group E (MBG-E) (Table 4) and some *Gammaproteobacteria* (Table5). Previous study on the same samples failed to amplified 16S rRNA suggesting that these microbial communities were probably not very active in the sediments (Vigneron et al., 2013). MG-I account for a major portion of prokaryotic picoplankton (DeLong et al., 1994, Fuhrman and Campbell, 1998, Karner et al., 2001) thus sequences detected in our study may result in part from amplification of 16S rRNA genes of some decaying cells. Likewise MBG-E is frequently detected in deep-sea sediments located outside any active area (Suzuki et al., 2004, Vetriani et al., 1999, Wang et al., 2010). In contrast, microbial communities from cold seep sites were mainly characterized by archaeal sequences affiliated to Anaerobic MEthanotrophic *Archaea* (ANME-1, -2 and -3) and Marine Benthic Group D (MBG-D) (Figure 4B, C and Table 4) and bacterial sequences affiliated to other subgroups of *Gammaproteobacteria* and *Deltaproteobacteria* (Table 5 and Figure 5C). These detected microbial communities of the cold seep sediments were comparable to communities previously identified in other methane-rich environments (Cambon-Bonavita et al., 2009, Inagaki et al., 2006, Lloyd et al., 2010, Lösekann et al., 2007, Pachiadaki et al., 2011, Pachiadaki et al., 2010). These congruent results suggested that microbial populations identified in the Sonora Margin cold seep sediments were directly or indirectly related to the fluid emissions.

Besides the differences detected between microbial communities from the cold seep sites and the background reference, our detailed molecular characterization of the different cold seep habitats of the Sonora Margin showed that habitat differences were clearly reflected by variations in the microbial diversity (Figures 3, 4, 5 and Table 4, 5), activity (Figure 7) and *in situ* abundances (Figure 6), as previously observed for other methane-rich sediments (Lösekann et al., 2007, Niemann et al., 2006).

4.2 Sedimentary microbial communities underlying microbial mat

NMDS analyses of ARISA fingerprinting and pyrosequencing suggested that microbial community structure of the sediments underlying the microbial mat of the Vasconcelos site was the most divergent regarding to the microbial community structure of the non-active area (Figures 3, 4 and 5). Q-PCR and FISH indicated that microbial community was strongly dominated by ANME as previously detected in sediments underlying microbial mats and in other methane-rich environments (Cambon-Bonavita et al., 2009, Heijs et al., 2007, Knittel et al., 2005, Niemann et al., 2006, Orphan et al., 2002, Pachiadaki et al., 2011, Pachiadaki et al., 2010). ANME-2 were observed in large consortia (diameter up to 100 µm) with *Deltaprotebacteria.* Previous study identified these *Deltaproteobacteria* as members of the SEEP-SRB1 and some *Desulfobulbus* relative (DBB) lineages (Vigneron et al., 2014). Congruently, these lineages were detected in high proportion in these sediments by pyrosequencing and Q-PCR (Table 5, Figure 6). These ANME-2/*Deltaproteobacteria* consortia are probably involved in anaerobic oxidation of methane (Boetius et al., 2000, Joye, 2012, Lloyd et al., 2011, Milucka et al., 2012, Orphan et al., 2002). ANME-1 cells were detected as single rod in chain by FISH and in higher proportion in the deepest sediment layers by Q-PCR (Figure 6). They could also be involved in AOM even if an alternative metabolism such as methanogenesis might eventually be possible (Lloyd et al., 2010). Anaerobic oxidation of methane could generate the high porewater concentrations of sulfide, detected in sediments (Figure 2) (Boetius et al., 2000, Hinrichs and Boetius, 2002, Milucka et al., 2012), and thus allow the development at the sediment surface of the microbial mat (Figure 1). The high sulfide concentrations might also allow the presence of some *Epsilonproteobacteria* detected by pyrosequencing and FISH in the surface layer such as sulfur oxidizer related to *Sulfurovum* sp. (Pachiadaki et al., 2011). Additionally, a high proportion of sequences related to DHVE-8 was detected in the sediment underlying the microbial mat of the Vasconcelos site (Figure 4D and Table 4), as previously detected in both cold seep and hydrothermal vent ecosystems (Lloyd et al., 2010, Nercessian et al., 2004). Important proportions of sequences affiliated to DHVE-8 group are unusual in cold seep ecosystems but have already been detected in sediments underlying a microbial mat from a Gulf of Mexico hydrocarbon seep (Lloyd et al., 2010), revealing a potential link between the occurrences of both microbial mat at the surface and DHVE-8 in sediments. Likewise important proportions of sequences were related to gammaproteobacterial lineages. FISH observations confirmed the presence and the potential activity of *Gammaproteobacteria* cells, as previously reported in the same samples (Vigneron et al., 2014) and in other cold seep ecosystems (Cambon-Bonavita et al., 2009, Knittel et al., 2003, Lösekann et al., 2007, Pachiadaki et al., 2011, Teske et al., 2002). The *Gammaproteobacteria* ecophysiological roles are diverse and they can be involved in sulfur and methane cycling (Jiang et al., 2007, Lösekann et al., 2007, Pachiadaki et al., 2010, Ruff et al., 2013). In our study, some of the detected *Gammaproteobacteria* were affiliated to the "Thiotrichales relative" lineage, which includes some aerobic methanotroph groups, such as Marine Methylotrophic Group 3 (MMG3 defined in Ruff et al., 2013) and various sequences related to marine methylotrophic endosymbionts. These detected *Gammaprotebacteria* might be involved in methane or other hydrocarbon oxidation as previously suggested (Ruff et al., 2013).

4.3 Sedimentary microbial communities underlying macrofauna

Statistical analyses of the microbial community structure suggested that upper sediments of the macrofauna habitat, dominated by polychaetes and gastropods and located at the edge of the microbial mat, shared similarity with the sediment underlying the microbial mat (Figures 4A and 5A). Indeed, molecular and

microscopic approaches highlighted that surface sediments harbored a high concentration of ANME-2 in consortia with *Deltaproteobacteria,* as observed throughout the microbial mat sediment core (Figures 4C, 7D and E, Tables 4 and 5). Likewise, sequences related to DHVE-8 and *Gamma-* and *Epsilonproteobacteria* with similar morphologies with those observed by FISH in the microbial mat sediments, were detected in the surface sediments of the macrofauna habitat (Figure 4D, Tables 4 and 5). In contrast, the microbial community, and especially the archaeal community, of the deeper sediments appeared to be more similar to the microbial community structure detected in sediments colonized by the megafauna (vesicomyids and siboglinids) (Figure 4A). The archaeal community appears to be dominated by both ANME-1 and MBG-D *Archaea* (Figure 4B and Table 4). If presence and activity of ANME-1 were confirmed by FISH, the occurrence and activity of MBG-D cells could not be confirmed. This failure in MBG-D visualization might be due to a low level of ribosomes in MBG-D cells or a low activity in the sediments. If 16S rRNA were previously detected by gene library by Vigneron et al., 2013, no 16S rRNA sequences of MBG-D were obtained in this study, which may indicate a lower activity compared to ANME-1. Concerning the bacterial communities; the deepest sediments of the macrofauna habitat harbored high concentrations of the deltaproteobacterial lineage *Desulfosarcina/Desulfococcus* (DSS group) and candidate division JS-1. While DSS cells could be bacterial partners in AOM consortia (Knittel et al., 2003, Schreiber et al., 2010, Vigneron et al., 2014), candidate division JS-1 members, detected in various anoxic sedimentary habitats and especially in methane-rich sediments (Pachiadaki et al., 2011, Webster et al., 2004, Webster et al., 2007), could be hydrocarbon-degrading bacteria (Phelps et al., 1998).

4.4 Sedimentary microbial communities underlying megafauna

Overall, relative quantification of the dominant microbial groups and FISH observations indicated that microbial biomass in sediments underlying the megafauna was lower than in other habitats, suggesting that these ecosystems might be less active than the former environments. Furthermore, our results clearly indicated that microbial communities inhabiting sediments colonized by megafaunal assemblages (vesicomyid bivalves and siboglinid tubeworms) were more similar to each other than with those from grey mat-like and microbial mat habitats. This clustering was more obvious with the archaeal community structure (Figure 4A). Indeed, megafauna habitat were mainly characterized by sequences affiliated to MBG-D *Archaea*, as detected in the bottom of the megafauna habitat (Figure 4B and Table 4). MBG-D group, equivalent to Marine Group III (Delong, 1998) is a common and sometimes dominant euryarchaeotic group found in cold seep sediments (Beal et al., 2009, Heijs et al., 2005, Knittel et al., 2005, Lazar et al., 2010, Lloyd et al., 2006, Orphan et al., 2001) as well as in marine sub-seafloor (Lloyd et al., 2013, Teske and Biddle, 2008, Teske, 2006), in hydrothermal environments (Girguis et al., 2003, Mills et al., 2005, Takai and Horikoshi, 1999) or in freshwater and hypersaline sediments (Borrel et al., 2012, Schubert et al., 2011, Swan et al., 2010) but is not detected in the water column (Teske, 2006). While the exact metabolism of MBG-D representatives remains relatively unknown, recent genome analysis of MBG-D single cell indicated a potential for detrital proteins degradation. Thus some members of MBG-D may be heterotrophic degraders of complex organic matters (Lloyd et al., 2013). However, several other hypotheses have been postulated according to their environmental distribution and their phylogenetic affiliation assigning them to an eventual methanogenic activity, a role in AOM process (Beal et al., 2009) or a scavenger behavior by use of components from decaying microorganism as carbon and/or energetic

sources for growth (Borrel et al., 2012). Interestingly, MBG-D sequences were also dominant in sediments sampled at the edge of an extensive microbial mat in the hydrothermal vent area of the Guaymas Basin (MegaMat site, Biddle et al., 2012). Nevertheless, ANME-2/*Deltaproteobacteria* were also detected and observed throughout the sediment cores of the megafauna, as previously detected in the pockmark REGAB (Cambon-Bonavita et al., 2009). This would indicate that AOM probably occurs in these sediments and that sulfide might be produced and be available for surface colonizer metabolism. However relative abundance and size of the aggregates were considerably lower than in sediments underlying the microbial mat. This may explain that sulfide was not detected in porewater (Figure 2). Other *Gamma-, Epsilon-* and *Deltaproteobacteria* were detected in these sediments. Interestingly long multicellular filaments were exclusively recorded in the shallow sediments of the megafauna habitats. Similar filamentous bacteria have been previously reported in marine sediments with stratified geochemistry (Nielsen et al., 2010, Pfeffer et al., 2012). Previous studies demonstrated that filamentous *Deltaproteobacteria* were able to link oxidic and sulfidic zones over centimeters and grow on sulfide oxidation through the anoxic sediments (Nielsen et al., 2010, Pfeffer et al., 2012). Finally analyses of the bacterial community structure highlighted a relative heterogeneity between microbial communities of each megafaunal habitat. Indeed important proportions of Chloroflexi D1(including '*Anaerolineae*' class which could grow under strictly anaerobic conditions and be chemoorganotrophs (Hugenholtz et al., 1998, Sekiguchi and Kamagata, 2004, Yamada et al., 2006)) and candidate division JS-1 were detected in deepest sediments of the siboglinid Juarez and the vesicomyid Vasconcelos habitats while *Gammaproteobacteria*, and especially "Thiotrichales relatives" group, were dominant in the vesicomyid Ayala habitat (Figure 5C, D and Table 5). Chloroflexi Division 2, detected in high proportion in sediments of the siboglinid Juarez site (Table 5), includes *Dehalococcoidetes* lineages which could involve in aromatic and fatty acid or chlorinated compounds degradation (Durbin and Teske, 2011, Hugenholtz et al., 1998, Löffler et al., 2013, Wasmund et al., 2014). These variations may reflect differences in substrate availability probably due to the occurrence of the surface megafauna.

4.5 Link between surface colonizers, geochemistry and microbial community structures

In the Sonora Margin sediments we clearly detected that differences of surface colonizers reflected different microbial populations and distinct porewater geochemistry, revealing potential niche differences among microbial and animal communities. In our study methane concentrations appear to be an important factor, as previously proposed (Boetius et al., 2000, Constan, 2009, Pachiadaki et al., 2011). The microbial mat habitat, which is fuelled by the highest methane porewater concentrations as previously observed in other cold seep ecosystems (Fischer et al., 2012, Knittel et al., 2003, Knittel et al., 2005, Niemann et al., 2006, Sahling et al., 2002) (Figure 2E, F), harbored the most abundant and active microorganisms (Figures 3, 4, 5, 6 and 7). These microorganisms, mainly ANME and *Deltaproteobacteria*, could oxidize the methane and produce high concentrations of sulfide in the porewater (Figure 2) (Boetius et al., 2000, Milucka et al., 2012). These high sulfide porewater concentrations could allow the development at the surface sediment of thiotrophic microbial mat (DeBeer et al., 2006, Fischer et al., 2012) and exclude the megafauna from these areas since hydrogen sulfide is usually toxic to all metazoans (Vetter et al., 1991). While many ANME were detected in these sediments, porewater methane concentrations remained high even at the top layer, suggesting a potential methane production in these sediments which might also be mediated by ANME (Lloyd et al., 2011). In the edge

of the microbial mat, colonized by gastropods and polychaetes, methane porewater concentrations were two fold lower than in microbial mat sediments. Lower sulfide concentrations could be produced by the ANME and deltaproteobacteria populations detected. The low sulfide concentrations measured in the top layer (Figure 2) might allow colonization of the area by gastropods and polychaetes which live at the seafloor. However, sulfide concentrations measured in the sediments were probably still higher (25 mM at 5 cmbsf) for siboglinid tubeworms and vesicomyid bivalves which live half-buried in sediments (Arp et al., 1984, Julian et al., 1999). In megafauna habitats methane porewater concentrations were 100-fold lower than in microbial mat sediments. These low methane concentrations could limit the ANME biomass (Constan, 2009, Pachiadaki et al., 2011) explaining the very few ANME/*Deltaprotebacteria* detected in these sediments. These low methane concentrations and ANME abundances might lead to a low sulfide production (Figure 2B, C, D). Lack of sulfide in the surface sediment is a common feature on clam and tubeworm habitats at cold seeps (Barry et al., 1997, Fischer et al., 2012, Levin et al., 2003, Niemann et al., 2006, Sahling et al., 2002). Since ANME aggregates were observed by FISH (Figure 7A, B, C) and ANME-2 and potential sulfato-reducers were detected by Q-PCR (Figure 6) and sequencing analyses (Tables 4 and 5), sulfide might likely be produced in these sediments but remained below our technical detection limit (10 µM) and/or was directly consume by sedimentary microbial communities and thiotroph symbionts associated to the macrofauna. Without elevated and toxic sulfide concentrations, vesicomyids and tubeworms colonized the sediments, dwelling down in the sediments to reach the buried sulfide pool required for their symbionts metabolism (Childress et al., 1991, Fischer et al., 2012, Freytag et al., 2001). Thus, our results indicate that porewater geochemistry and fluid flows could shape directly the microbial community structure in the sediments, as previously observed in mud volcanoes (Lösekann et al., 2007, Niemann et al., 2006). Fluid flows could also exert a selective pressure and therefore influence the faunal distribution at cold seep seafloor through microbial activities.

Furthermore if the nature of the dominant surface colonizer reflects the underlying chemistry profiles and microbial activity, colonizers could also have an impact on the microbial community structures and modify the sediment geochemistry (Cordes et al., 2005, Fischer et al., 2012). Indeed previous study demonstrated that chemosynthetic megafauna and microbial mat influences their local environment by bioturbation, bioirrigation, burrowing and by exudates, altering the local seafloor biogeochemistry (Barry et al., 1997, Fischer et al., 2012, Levin et al., 2003, Schulz and Jorgensen, 2001). In the Vasconcelos microbial mat habitat, giant filamentous bacteria could microoxygenate the first sediment layers by their gliding mobility (Schulz and Jorgensen, 2001). This micro-oxygenation could allow the development of some aerobic groups in the surface layers of the sediments. For example, *Epsilonproteobacteria* potentially affiliated to sulfur-oxidizing *Sulfurovum* sp. (Vigneron et al., 2014), representing 30% of the pyrosequencing reads in the surface sediments of the microbial mat might be enhanced by this micro-oxygenation. Likewise, gammaproteobacterial aerobic methanotrophs (included in "Thiotrichales relative" group) might probably be enhanced in the sediments. In contrast, the heterotrophic gastropods and polychaetes do not dig into the sediments but graze the surface microbial communities and/or use a part of sedimented organic matter (Fauchald and Jumars, 1979, Ruff et al., 2013, Sahling et al., 2002, Waren and Bouchet, 2009). Thus microoxygenation in sediment underlying the macrofauna was probably low or inexistent. This feature is consistent with the development of ANME-2 aggregates near the sediment surface (Figures 6 and 7) and the elevated abundance of ANME-1, mainly detected in totally anoxic sediments (Biddle et al., 2012). Finally, megafauna assemblages with their root or foot could modify porewater

and microbial communities structures in deeper sediments (Cordes et al., 2005, Cordes et al., 2010, Fischer et al., 2012, Sahling et al., 2002). Bioirrigation by the vesicomyid bivalves and siboglinid tubeworms might sustain a habitat suitable for aerobic methanotrophs such as *Gammaproteobacteria* from "Thiotrichales relative" lineages in the top sediments, which might correspond to the monospecific cluster of large cocci with a diameter of about 2 µm detected on FISH observations (Figure 7B) as observed in other studies (Hanson and Hanson, 1996, Lösekann et al., 2007). Furthermore, this bioturbation could generate a more buried sulfate transition zone (SMTZ) and could explain the non-sulfide detection and the reduced sizes of the observed AOM aggregates, which could be present in higher abundances more deeply in sediments. The occurrence of gaps between oxic and sulfidic zones might also enhance the development of *Deltaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* multicellular filaments, observed in surface sediment of megafauna assemblages, which could actively seek out microenvironments where they find an optimal nutrient supply and couple oxygen consumption at the seafloor to oxidation of hydrogen sulfide more buried in sediments (Nielsen et al., 2010, Pfeffer et al., 2012). This bioturbation could generate important oxidative stress for anaerobic microbial communities. ANME, detected in sediment surface might benefit to a protection against this oxidative stress thanks to their organization in consortia characterized by an outer shell of sulfato-reducer bacteria (Figure 2). The occurrence of some other microbial groups under faunal assemblages, such as MBG-D, Chloroflexi D1 and D2 could also be explained by the occurrence of surface animals. Tubeworm and vesicomyid exudates could provide some substrates available for microbial communities. For example, recent studies highlighted a local excretions of metabolites by the bivalves (Joye et al., 2010, Pop Ristova et al., 2012). Thereby MBG-D and Chloroflexi with metabolisms based on protein, amino acid and fatty acid degradations could be enhanced by some exudates or metabolic wastes from the megafauna. The release of sulfate by tubeworm roots (Cordes et al., 2005, Freytag et al., 2001, Julian et al., 1999) could also potentially increase microbial hydrocarbon degradation in the vicinity of tubeworm aggregations (Boetius, 2005, Joye et al., 1999). This might explain the presence of other *Deltaproteobacteria* and candidate division JS-1 in the siboglinid Juarez sediments, which could be possible partners in hydrocarbon-degrading sulfate reducing consortia (Phelps et al., 1998).

Conclusion

In this study we used various and complementary approaches to characterize unexplored sediments of the Sonora Margin. Sediments underlying microbial mat and the surrounding macrofauna as well as vesicomyid and siboglinid assemblages were colonized by microbial communities typically found in other methane-rich ecosystems. However difference in microbial community structure and abundance were detected according to the sampled habitat. Our results indicated strong relationship between porewater geochemistry, microbial communities and surface colonizers. The occurrence of chemosynthetic communities at the seafloor might depend on the intensity and composition of the fluid seepages as well as on the abundance and activity of hydrogen sulfide producing microbial communities. In return surface colonizers impact the microbial community by modifying the spatial localization of the different energy sources and by probably releasing organic substrates.

Acknowledgements

We are indebted to the crews of the research vessel *L'Atalante* and the submersible *Nautile* of the cruise "BIG" and the scientific team for their work on board. This cruise was funded by IFREMER (France) and has benefited from a work permit in Mexican waters (DAPA/2/281009/3803, 28 Octobre 2009). We thank Maxime Galan, Maria-Cristina Ciobanu, Philippe Vandenkoornhuyse, Alexandra Dheilly and Sophie Coudouel for very helpful scientific discussions. This study was supported by a Carnot Institute funding and by an IFREMER / Brittany region PhD grant for PC. Carnot

References

Arp, A.J., Childress, J.J., Fisher, C.R., 1984. Metabolic and blood-gas transport characteristics of the hydrothermal vent bivalve *Calyptogena magnifica*. Physiological Zoology 57, 648-662.

Barry, J.P., Kochevar, R.E., Baxter, C.H., 1997. The influence of pore-water chemistry and physiology on the distribution of vesicomyid clams at cold seeps in Monterey Bay: Implications for patterns of chemosynthetic community organization. Limnology and Oceanography 42, 318-328.

Beal, E.J., House, C.H., Orphan, V.J., 2009. Manganese- and Iron-Dependent Marine Methane Oxidation. Science 325, 184-187.

Biddle, J.F., Cardman, Z., Mendlovitz, H., Albert, D.B., Lloyd, K.G., Boetius, A., Teske, A., 2012. Anaerobic oxidation of methane at different temperature regimes in Guaymas Basin hydrothermal sediments. Isme Journal 6, 1018-1031.

Boetius, A., 2005. Microfauna–macrofauna interaction in the seafloor: lessons from the tubeworm. PLoS biology 3, e102.

Boetius, A., Ravenschlag, K., Schubert, C.J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., Amann, R., Jorgensen, B.B., Witte, U., Pfannkuche, O., 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. Nature 407, 623-626.

Borrel, G., Lehours, A.-C., Crouzet, O., Jézéquel, D., Rockne, K., Kulczak, A., Duffaud, E., Joblin, K., Fonty, G., 2012. Stratification of Archaea in the Deep Sediments of a Freshwater Meromictic Lake: Vertical Shift from Methanogenic to Uncultured Archaeal Lineages. Plos One 7, e43346.

Bray, J.R., Curtis, J.T., 1957. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. Ecological monographs 27, 325-349.

Bright, M., Giere, O., 2005. Microbial symbiosis in Annelida. Symbiosis 38, 1-45.

Cambon-Bonavita, M.A., Nadalig, T., Roussel, E., Delage, E., Duperron, S., Caprais, J.C., Boetius, A., Sibuet, M., 2009. Diversity and distribution of methane-oxidizing microbial communities associated with different faunal assemblages in a giant pockmark of the Gabon continental margin. Deep-Sea Research Part Ii-Topical Studies in Oceanography 56, 2248-2258.

Cavanaugh, C.M., 1983. Symbiotic chemoautotrophic bacteria in marine-invertebrates from sulphid-rich habitats. Nature 302, 58-61.

Childress, J., Fisher, C., Favuzzi, J., Kochevar, R., Sanders, N., Alayse, A., 1991. Sulfide-driven autotrophic balance in the bacterial symbiont-containing hydrothermal vent tubeworm, Riftia pachyptila Jones. The Biological Bulletin 180, 135-153.

Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. Australian journal of ecology 18, 117-143.

Constan, L., 2009. A correlation of anaerobic methane oxidizing archaea with geochemical gradients in Coastal Californian Marine sediments.

Cordes, E.E., Arthur, M.A., Shea, K., Arvidson, R.S., Fisher, C.R., 2005. Modeling the mutualistic interactions between tubeworms and microbial consortia. PLoS biology 3, e77.

Cordes, E.E., Cunha, M.R., Galeron, J., Mora, C., Roy, O.L., Sibuet, M., Van Gaever, S., Vanreusel, A., Levin, L.A., 2010. The influence of geological, geochemical, and biogenic habitat heterogeneity on seep biodiversity. Marine Ecology 31, 51-65.

Cruaud, P., Decker, C., Olu, K., Arnaud-Haond, S., Papot, C., Vigneron, A., Khripounoff, A., Gayet, N., Godfroy, A., Cambon Bonavita, M.-A., *Subm.-a*. Comparative study of vesicomyid-symbiont communities at cold seeps and hydrothermal vents of the Guaymas Basin.

Cruaud, P., Vigneron, A., Lucchetti-Miganeh, C., Ciron, P.-E., Godfroy, A., Cambon Bonavita, M.-A., *Subm.-b*. Influence of DNA extraction methods, 16S rRNA targeted hypervariable regions and sample origins on the microbial diversity detected by 454 pyrosequencing in marine chemosynthetic ecosystems.

DeBeer, D., Sauter, E., Niemann, H., Kaul, N., Foucher, J.P., Witte, U., 2006. In situ fluxes and zonation of microbial activity in surface sediments of the Haakon Mosby mud volcano. Limnol Oceanogr 51, 1315-1331.

Dekas, A.E., Poretsky, R.S., Orphan, V.J., 2009. Deep-Sea Archaea Fix and Share Nitrogen in Methane-Consuming Microbial Consortia. Science 326, 422-426.

Delong, E.F., 1998. Everything in moderation: archaea as 'non-extremophiles'. Current opinion in genetics & development 8, 649-654.

DeLong, E.F., Wu, K.Y., Prézelin, B.B., Jovine, R.V., 1994. High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton. Nature 371, 695-697.

Devol, A., Anderson, J., Kuivila, K., Murray, J., 1984. A model for coupled sulfate reduction and methane oxidation in the sediments of Saanich Inlet. Geochimica Et Cosmochimica Acta 48, 993-1004.

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

Dufresne, S., Bousquet, J., Boissinot, M., Guay, R., 1996. Sulfobacillus disulfidooxidans sp. nov., a new acidophilic, disulfide-oxidizing, gram-positive, spore-forming bacterium. International Journal of Systematic Bacteriology 46, 1056-1064.

Durbin, A.M., Teske, A., 2011. Microbial diversity and stratification of South Pacific abyssal marine sediments. Environmental Microbiology 13, 3219-3234.

Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics 27, 2194-2200.

Engelen, B., Cypionka, H., 2009. The subsurface of tidal-flat sediments as a model for the deep biosphere. Ocean Dynamics 59, 385-391.

Fauchald, K., Jumars, P.A., 1979. The diet of worms: a study of polychaete feeding guilds.

Felbeck, H., Childress, J.J., Somero, G.N., 1981. Calvin-Benson cycle and sulfide oxidation enzymes in animals from sulfide-rich habitats. Nature 293, 291-293.

Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies : an approach using the bootstrap. Evolution 39, 783-791.

Fiala-Médioni, A., Métivier, C., 1986. Ultrastructure of the gill of the hydrothermal vent bivalve *Calyptogena magnifica*, with a discussion of its nutrition. Marine Biology 90, 215-222.

Fischer, D., Sahling, H., Nöthen, K., Bohrmann, G., Zabel, M., Kasten, S., 2012. Interaction between hydrocarbon seepage, chemosynthetic communities, and bottom water redox at cold seeps of the Makran accretionary prism: insights from habitat-specific pore water sampling and modeling. Biogeosciences 9, 2013-2031.

Fish, S.A., Shepherd, T.J., McGenity, T.J., Grant, W.D., 2002. Recovery of 16S ribosomal RNA gene fragments from ancient halite. Nature 417, 432-436.

Fisher, C., 1990. Chemoautotrophic and methanotrophic symbioses in marine invertebrates. Rev. Aquat. Sci 2, 399-436.

Fisher, M.M., Triplett, E.W., 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. Applied and Environmental Microbiology 65, 4630-4636.

Freytag, J.K., Girguis, P.R., Bergquist, D.C., Andras, J.P., Childress, J.J., Fisher, C.R., 2001. A paradox resolved: sulfide acquisition by roots of seep tubeworms sustains net chemoautotrophy. Proceedings of the National Academy of Sciences 98, 13408-13413.
Froelich, P.N., Klinkhammer, G., Bender, M.a.a., Luedtke, N., Heath, G.R., Cullen, D., Dauphin, P., Hammond, D., Hartman, B., Maynard, V., 1979. Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the eastern equatorial Atlantic: suboxic diagenesis. Geochimica Et Cosmochimica Acta 43, 1075-1090.
Fuhrman, J.A., Campbell, L., 1998. Marine ecology: microbial microdiversity. Nature 393, 410-411.
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. Applied and Environmental Microbiology 69, 5472-5482.
Grünke, S., Felden, J., Lichtschlag, A., Girnth, A.C., De Beer, D., Wenzhoefer, F., Boetius, A., 2011. Niche differentiation among mat-forming, sulfide-oxidizing bacteria at cold seeps of the Nile Deep Sea Fan (Eastern Mediterranean Sea). Geobiology 9, 330-348.
Hanson, R.S., Hanson, T.E., 1996. Methanotrophic bacteria. Microbiological Reviews 60, 439-471.
Heijs, S.K., Damste, J.S.S., Forney, L.J., 2005. Characterization of a deep-sea microbial mat from an active cold seep at the Milano mud volcano in the Eastern Mediterranean Sea. Fems Microbiology Ecology 54, 47-56.
Heijs, S.K., Haese, R.R., van der Wielen, P., Forney, L.J., van Elsas, J.D., 2007. Use of 16S rRNA gene based clone libraries to assess microbial communities potentially involved in anaerobic methane oxidation in a Mediterranean cold seep. Microbial Ecol 53, 384-398.
Hinrichs, K., Boetius, A., 2002. The anaerobic oxidation of methane: new insights in microbial ecology and biogeochemistry. Ocean margin systems, 457-477.
Hofacker, I.L., 2003. Vienna RNA secondary structure server. Nucleic Acids Research 31, 3429-3431.
Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R., 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. J. Bacteriol. 180, 4765-4774.
Huse, S.M., Huber, J.A., Morrison, H.G., Sogin, M.L., Mark Welch, D., 2007. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. Genome Biology 8.
Inagaki, F., Nunoura, T., Nakagawa, S., Teske, A., Lever, M., Lauer, A., Suzuki, M., Takai, K., Delwiche, M., Colwell, F.S., Nealson, K.H., Horikoshi, K., D'Hondt, S., Jorgensen, B.B., 2006. Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments, on the Pacific Ocean Margin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 2815-2820.
Iversen, N., Jørgensen, B., 1985. Anaerobic methane oxidation rates at the sulfate-methane transition in marine sediments from Kattegat and Skagerrak (Denmark). Limnol. Oceanogr 30, 944-955.
Jiang, H., Dong, H., Ji, S., Ye, Y., Wu, N., 2007. Microbial diversity in the deep marine sediments from the Qiongdongnan Basin in South China Sea. Geomicrobiology Journal 24, 505-517.
Jørgensen, B., 1977. Bacterial sulfate reduction within reduced microniches of oxidized marine sediments. Marine Biology 41, 7-17.
Jorgensen, B.B., Boetius, A., 2007. Feast and famine - microbial life in the deep-sea bed. Nature Reviews Microbiology 5, 770-781.
Joye, S.B., 2012. Microbiology: A piece of the methane puzzle. Nature.
Joye, S.B., Bowles, M.W., Samarkin, V.A., Hunter, K.S., Niemann, H., 2010. Biogeochemical signatures and microbial activity of different cold-seep habitats along the Gulf of Mexico deep slope. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography 57, 1990-2001.
Joye, S.B., Connell, T.L., Miller, L.G., Oremland, R.S., Jellison, R.S., 1999. Oxidation of ammonia and methane in an alkaline, saline lake. Limnology and Oceanography 44, 178-188.
Julian, D., Gaill, F., Wood, E., Arp, A.J., Fisher, C.R., 1999. Roots as a site of hydrogen sulfide uptake in the hydrocarbon seep vestimentiferan Lamellibrachia sp. Journal of Experimental Biology 202, 2245-2257.
Karner, M.B., DeLong, E.F., Karl, D.M., 2001. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. Nature 409, 507-510.

Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionnary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16, 111-120.
Knittel, K., Boetius, A., Lemke, A., Eilers, H., Lochte, K., Pfannkuche, O., 2003. Activity, distribution, and diversity of sulfate reducers and other bacteria in sediments above gas hydrate (Cascadia margin, Oregon). Geomicrobiol J 20, 269-294.
Knittel, K., Losekann, T., Boetius, A., Kort, R., Amann, R., 2005. Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. Applied and Environmental Microbiology 71, 467-479.
Kruskal, J.B., 1964. Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method. Psychometrika 29, 115-129.
Kunin, V., Engelbrektson, A., Ochman, H., Hugenholtz, P., 2010. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. Environmental Microbiology 12, 118-123.
Lazar, C.S., Dinasquet, J., Pignet, P., Prieur, D., Toffin, L., 2010. Active Archaeal Communities at Cold Seep Sediments Populated by Siboglinidae Tubeworms from the Storegga Slide. Microbial Ecology 60, 516-527.
Levin, L.A., Ziebis, W., Mendoza, G.F., Growney, V.A., Tryon, M.D., Brown, K.M., Mahn, C., Gieskes, J.M., Rathburn, A.E., 2003. Spatial heterogeneity of macrofauna at northern California methane seeps: influence of sulfide concentration and fluid flow. Marine Ecology Progress Series 265, 123-139.
Lichtschlag, A., Felden, J., Bruchert, V., Boetius, A., de Beer, D., 2010. Geochemical processes and chemosynthetic primary production in different thiotrophic mats of the Hakon Mosby Mud Volcano (Barents Sea). Limnology and Oceanography 55, 931-949.
Lloyd, K.G., Albert, D.B., Biddle, J.F., Chanton, J.P., Pizarro, O., Teske, A., 2010. Spatial Structure and Activity of Sedimentary Microbial Communities Underlying a Beggiatoa spp. Mat in a Gulf of Mexico Hydrocarbon Seep. Plos One 5.
Lloyd, K.G., Alperin, M.J., Teske, A., 2011. Environmental evidence for net methane production and oxidation in putative ANaerobic MEthanotrophic (ANME) archaea. Environ Microbiol 13, 2548-2564.
Lloyd, K.G., Lapham, L., Teske, A., 2006. Anaerobic methane-oxidizing community of ANME-1b archaea in hypersaline Gulf of Mexico sediments. Applied and Environmental Microbiology 72, 7218-7230.
Lloyd, K.G., Schreiber, L., Petersen, D.G., Kjeldsen, K.U., Lever, M.A., Steen, A.D., Stepanauskas, R., Richter, M., Kleindienst, S., Lenk, S., 2013. Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins. Nature 496, 215-218.
Löffler, F.E., Yan, J., Ritalahti, K.M., Adrian, L., Edwards, E.A., Konstantinidis, K.T., Müller, J.A., Fullerton, H., Zinder, S.H., Spormann, A.M., 2013. Dehalococcoides mccartyi gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, Dehalococcoidia classis nov., order Dehalococcoidales ord. nov. and family Dehalococcoidaceae fam. nov., within the phylum Chloroflexi. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 63, 625-635.
Lösekann, T., Knittel, K., Nadalig, T., Fuchs, B., Niemann, H., Boetius, A., Amann, R., 2007. Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby mud volcano, Barents Sea. Applied and Environmental Microbiology 73, 3348-3362.
McKay, L.J., MacGregor, B.J., Biddle, J.F., Albert, D.B., Mendlovitz, H.P., Hoer, D.R., Lipp, J.S., Lloyd, K.G., Teske, A.P., 2012. Spatial heterogeneity and underlying geochemistry of phylogenetically diverse orange and white Beggiatoa mats in Guaymas Basin hydrothermal sediments. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers 67, 21-31.
Mills, A.M., Ward, M.E., Heyl, T.P., Van Dover, C.L., 2005. Parasitism as a potential contributor to massive clam mortality at the Blake Ridge Diapir methane-hydrate seep. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 85, 1489-1497.

Milucka, J., Ferdelman, T.G., Polerecky, L., Franzke, D., Wegener, G., Schmid, M., Lieberwirth, I., Wagner, M., Widdel, F., Kuypers, M.M., 2012. Zero-valent sulphur is a key intermediate in marine methane oxidation. Nature 491, 541-546.

Nelson, D.C., Wirsen, C.O., Jannasch, H.W., 1989. Characterization of large, autotrophic beggiatoa spp abundant at hydrothermal vents of the Guaymas basin. Applied and Environmental Microbiology 55, 2909-2917.

Nercessian, O., Prokofeva, M., Lebedinski, A., L'Haridon, S., Cary, C., Prieur, D., Jeanthon, C., 2004. Design of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for detecting cultured and uncultured archaeal lineages in high-temperature environments. Environmental Microbiology 6, 170-182.

Nielsen, L.P., Risgaard-Petersen, N., Fossing, H., Christensen, P.B., Sayama, M., 2010. Electric currents couple spatially separated biogeochemical processes in marine sediment. Nature 463, 1071-1074.

Niemann, H., Losekann, T., de Beer, D., Elvert, M., Nadalig, T., Knittel, K., Amann, R., Sauter, E.J., Schluter, M., Klages, M., Foucher, J.P., Boetius, A., 2006. Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. Nature 443, 854-858.

Oksanen, J., Blanchet, F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O'Hara, R., Simpson, G., Solymos, P., Stevens, M., Wagner, H., 2012. Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.1–14/r2120.

Orcutt, B.N., Sylvan, J.B., Knab, N.J., Edwards, K.J., 2011. Microbial ecology of the dark ocean above, at, and below the seafloor. Microbiology and Molecular Biology Reviews 75, 361-422.

Orphan, V.J., Hinrichs, K.U., Ussler, W., Paull, C.K., Taylor, L.T., Sylva, S.P., Hayes, J.M., Delong, E.F., 2001. Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. Applied and Environmental Microbiology 67, 1922-1934.

Orphan, V.J., House, C.H., Hinrichs, K.-U., McKeegan, K.D., DeLong, E.F., 2002. Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99, 7663-7668.

Owczarzy, R., Tataurov, A.V., Wu, Y., Manthey, J.A., McQuisten, K.A., Almabrazi, H.G., Pedersen, K.F., Lin, Y., Garretson, J., McEntaggart, N.O., 2008. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. Nucleic Acids Research 36, W163-W169.

Pachiadaki, M., Kallionaki, A., Dählmann, A., De Lange, G., Kormas, K., 2011. Diversity and Spatial Distribution of Prokaryotic Communities Along A Sediment Vertical Profile of A Deep-Sea Mud Volcano. Microbial Ecology 62, 655-668.

Pachiadaki, M.G., Lykousis, V., Stefanou, E.G., Kormas, K.A., 2010. Prokaryotic community structure and diversity in the sediments of an active submarine mud volcano (Kazan mud volcano, East Mediterranean Sea). Fems Microbiology Ecology 72, 429-444.

Paull, C.K., Ussler, W., III, Peltzer, E.T., Brewer, P.G., Keaten, R., Mitts, P.J., Nealon, J.W., Greinert, J., Herguera, J.-C., Perez, M.E., 2007. Authigenic carbon entombed in methane-soaked sediments from the northeastern transform margin of the Guaymas Basin, Gulf of California. Deep-Sea Research Part Ii-Topical Studies in Oceanography 54, 1240-1267.

Pfeffer, C., Larsen, S., Song, J., Dong, M., Besenbacher, F., Meyer, R.L., Kjeldsen, K.U., Schreiber, L., Gorby, Y.A., El-Naggar, M.Y., 2012. Filamentous bacteria transport electrons over centimetre distances. Nature.

Phelps, C.D., Kerkhof, L.J., Young, L.Y., 1998. Molecular characterization of a sulfate-reducing consortium which mineralizes benzene. Fems Microbiology Ecology 27, 269-279.

Pop Ristova, P., Wenzhöfer, F., Ramette, A., Zabel, M., Fischer, D., Kasten, S., Boetius, A., 2012. Bacterial diversity and biogeochemistry of different chemosynthetic habitats of the REGAB cold seep (West African margin, 3160 m water depth). Biogeosciences Discussions 9, 8337-8385.

Roussel, E.G., Sauvadet, A.-L., Allard, J., Chaduteau, C., Richard, P., Bonavita, M.-A.C., Chaumillon, E., 2009. Archaeal methane cycling communities associated with gassy subsurface sediments of Marennes-Oléron Bay (France). Geomicrobiology Journal 26, 31-43.

Ruff, S.E., Arnds, J., Knittel, K., Amann, R., Wegener, G., Ramette, A., Boetius, A., 2013. Microbial Communities of Deep-Sea Methane Seeps at Hikurangi Continental Margin (New Zealand). Plos One 8, e72627.

Sahling, H., Rickert, D., Lee, R.W., Linke, P., Suess, E., 2002. Macrofaunal community structure and sulfide flux at gas hydrate deposits from the Cascadia convergent margin, NE Pacific. Marine Ecology-Progress Series 231, 121-138.

Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method - A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4, 406-425.

Schloss, P.D., Gevers, D., Westcott, S.L., 2011. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. Plos One 6, e27310.

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology 75, 7537-7541.

Schreiber, L., Holler, T., Knittel, K., Meyerdierks, A., Amann, R., 2010. Identification of the dominant sulfate-reducing bacterial partner of anaerobic methanotrophs of the ANME-2 clade. Environmental Microbiology 12, 2327-2340.

Schubert, C.J., Vazquez, F., Lösekann-Behrens, T., Knittel, K., Tonolla, M., Boetius, A., 2011. Evidence for anaerobic oxidation of methane in sediments of a freshwater system (Lago di Cadagno). Fems Microbiology Ecology 76, 26-38.

Schulz, H.N., Jorgensen, B.B., 2001. Big bacteria. Annual Review of Microbiology 55, 105-137.

Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., 2004. Microbial community structure and functions in methane fermentation technology for wastewater treatment. Strict and facultative anaerobes: medical and environmental aspects. Horizon Scientific Press, Norfolk, United Kingdom, 361-384.

Sibuet, M., Olu, K., 1998. Biogeography, biodiversity and fluid dependence of deep-sea cold-seep communities at active and passive margins. Deep-Sea Research Part Ii-Topical Studies in Oceanography 45, 517-+.

Simoneit, B.R.T., Lonsdale, P.F., Edmond, J.M., Shanks, W.C., 1990. Deep-water hydrocarbon seeps in Guaymas basin, Gulf of California. Applied Geochemistry 5, 41-49.

Sommer, S., Linke, P., Pfannkuche, O., Niemann, H., Treude, T., 2010. Benthic respiration in a seep habitat dominated by dense beds of ampharetid polychaetes at the Hikurangi Margin (New Zealand). Marine Geology 272, 223-232.

Sorensen, K.B., Teske, A., 2006. Stratified communities of active archaea in deep marine subsurface sediments. Applied and Environmental Microbiology 72, 4596-4603.

Suzuki, Y., Inagaki, F., Takai, K., Nealson, K., Horikoshi, K., 2004. Microbial diversity in inactive chimney structures from deep-sea hydrothermal systems. Microbial Ecology 47, 186-196.

Swan, B.K., Ehrhardt, C.J., Reifel, K.M., Moreno, L.I., Valentine, D.L., 2010. Archaeal and bacterial communities respond differently to environmental gradients in anoxic sediments of a California hypersaline lake, the Salton Sea. Applied and Environmental Microbiology 76, 757-768.

Takai, K., Horikoshi, K., 1999. Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. Genetics 152, 1285-1297.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24, 1596-1599.

Teske, A., Biddle, J.F., 2008. Analysis of Deep Subsurface Microbial Communities by Functional Genes and Genomics. Links between Geological Processes, Microbial Activities & Evolution of Life: Microbes and Geology 4, 159-176.

Teske, A., Hinrichs, K.U., Edgcomb, V., Gomez, A.D., Kysela, D., Sylva, S.P., Sogin, M.L., Jannasch, H.W., 2002. Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: Evidence for anaerobic methanotrophic communities. Applied and Environmental Microbiology 68, 1994-2007.

Teske, A.P., 2005. The deep subsurface biosphere is alive and well. Trends in Microbiology 13, 402-404.
Teske, A.P., 2006. Microbial communities of deep marine subsurface sediments: molecular and cultivation surveys. Geomicrobiology Journal 23, 357-368.
Thurber, A.R., Kröger, K., Neira, C., Wiklund, H., Levin, L.A., 2010. Stable isotope signatures and methane use by New Zealand cold seep benthos. Marine Geology 272, 260-269.
Van Dover, C.L., German, C.R., Speer, K.G., Parson, L.M., Vrijenhoek, R.C., 2002. Evolution and Biogeography of Deep-Sea Vent and Seep Invertebrates. Science 295, 1253-1257.
Vetriani, C., Jannasch, H.W., MacGregor, B.J., Stahl, D.A., Reysenbach, A.L., 1999. Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments. Applied and Environmental Microbiology 65, 4375-4384.
Vetter, R.D., Powell, M.A., Somero, G.N., 1991. Metazoan adaptations to hydrogen sulphide. Metazoan life without oxygen (Bl)'ant, C.; editor). Chapman and Ha/l, 109-128.
Vigneron, A., Cruaud, P., Pignet, P., Caprais, J.-C., Cambon-Bonavita, M.-A., Godfroy, A., Toffin, L., 2013. Archaeal and anaerobic methane oxidizer communities in the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin (Gulf of California). ISME J.
Vigneron, A., Cruaud, P., Pignet, P., Caprais, J.C., Gayet, N., Cambon-Bonavita, M.A., Godfroy, A., Toffin, L., 2014. Bacterial communities and syntrophic associations involved in anaerobic oxidation of methane process of the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin. Environmental Microbiology.
Wang, P., Li, T., Hu, A., Wei, Y., Guo, W., Jiao, N., Zhang, C., 2010. Community structure of archaea from deep-sea sediments of the South China Sea. Microbial Ecology 60, 796-806.
Waren, A., Bouchet, P., 2009. New gastropods from deep-sea hydrocarbon seeps off West Africa. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography 56, 2326-2349.
Wasmund, K., Schreiber, L., Lloyd, K.G., Petersen, D.G., Schramm, A., Stepanauskas, R., Jørgensen, B.B., Adrian, L., 2014. Genome sequencing of a single cell of the widely distributed marine subsurface Dehalococcoidia, phylum Chloroflexi. The ISME journal 8, 383-397.
Webster, G., Newberry, C.J., Fry, J.C., Weightman, A.J., 2003. Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale. Journal of Microbiological Methods 55, 155-164.
Webster, G., Parkes, R.J., Fry, J.C., Weightman, A.J., 2004. Widespread occurrence of a novel division of bacteria identified by 16S rRNA gene sequences originally found in deep marine sediments. Appl Environ Microbiol 70, 5708-5713.
Webster, G., Yarram, L., Freese, E., Koester, J., Sass, H., Parkes, R.J., Weightman, A.J., 2007. Distribution of candidate division JS1 and other Bacteria in tidal sediments of the German Wadden Sea using targeted 16S rRNA gene PCR-DGGE. Fems Microbiology Ecology 62, 78-89.
Yamada, T., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y., 2006. Anaerolinea thermolimosa sp. nov., Levilinea saccharolytica gen. nov., sp. nov. and Leptolinea tardivitalis gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes Anaerolineae classis nov. and Caldilineae classis nov. in the bacterial phylum Chloroflexi. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56, 1331-1340.
Yu, Z.T., Morrison, M., 2004. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology 70, 4800-4806.
Zhou, J., Bruns, M., Tiedje, J., 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. Appl. Environ. Microbiol. 62, 316-322.

Cette étude nous a tout d'abord permis de constater que, quelque soient les colonisateurs présents en surface des sédiments, tous les habitats étudiés de la Marge de Sonora abritaient des communautés microbiennes typiquement retrouvées au niveau d'autres écosystèmes de suintements froids, comme les ANMEs, les MBG-D, la division candidate JS-1 ou encore les Chloroflexi divisions 1 et 2. Au contraire, les sédiments de la zone de référence, située en dehors de toutes zones actives, abritaient des communautés microbiennes totalement différentes, retrouvées notamment au niveau des sédiments de subsurface ou dans la colonne d'eau (MG-I ou encore MBG-E).

Par ailleurs, malgré les similarités observées entre les différents habitats associés aux suintements froids, nous avons aussi pu mettre en évidence que chacun d'eux était caractérisé par une structure différente des communautés microbiennes sédimentaires. Les différences les plus notables ont été observées entre les habitats tapis microbien et son pourtour et les habitats colonisés par de la macrofaune (vésicomyidés et siboglinidés). Alors que les sédiments sous-jacents au tapis microbien et à son pourtour semblaient largement dominés par les archées méthanotrophes anaérobies ANMEs, les habitats colonisés par la macrofaune montraient une biomasse microbienne globalement plus réduite comprenant beaucoup moins d'ANME et des agrégats ANME-2/*Deltaproteobacteria* beaucoup moins nombreux et de taille plus réduite, mais présents sur toute la longueur de toutes les carottes de sédiments étudiées. En revanche, un grand nombre de séquences affiliées au groupe d'archées MBG-D a été retrouvé dans les sédiments associés à la macrofaune et ce résultat a été confirmé par Q-PCR. D'autres différences ont aussi été notées entre les habitats, notamment la présence de Chloroflexi (Divisions 1 et 2) dans les sédiments associés à la macrofaune et celle des DHVE-8 dans ceux associés au tapis microbien et à son pourtour. Cette étude a également permis de mettre en évidence la nécessité d'utiliser des approches complémentaires en plus du pyroséquençage qui permettent de confirmer, heureusement, dans la plupart des cas, ou de contredire les résultats, qui peuvent être les conséquences de biais inhérents au pyroséquençage ou aux autres techniques utilisées en écologie microbienne. Ainsi, alors qu'aucune séquence d'ANME-2 n'avait été détectée dans un des échantillons par pyroséquençage, la Q-PCR et le FISH montraient la présence de ce groupe d'archées dans cet échantillon. Il en est de même pour la division candidate JS-1 dont la présence a été révélée par pyroséquençage et Q-PCR dans les sédiments associés à la macrofaune mais uniquement par Q-PCR au niveau des sédiments associés au tapis microbien et à son pourtour.

Pour finir, nous avons tenté de relier la structure des communautés microbiennes ainsi déterminée avec le type de communautés chimiosynthétiques colonisant la surface du sédiment et les profils géochimiques associés. Ainsi, nous avons pu montrer que les tapis microbiens étaient associés aux plus fortes concentrations en méthane dans les eaux interstitielles alors que les vésicomyidés et les siboglinidés étaient associés aux plus faibles concentrations. Ces fortes concentrations en méthane pourraient permettre le développement de nombreux microorganismes capables d'oxyder le méthane, comme les ANMEs observées en grands nombres sous les tapis et leur pourtour, qui produiraient ainsi d'importantes quantités de sulfure. Les différentes concentrations de sulfure arrivant en surface du sédiment permettraient alors l'installation de telles ou telles communautés d'organismes en fonction de leur métabolisme propre ou de celui de leurs symbiontes (tapis microbien, vésicomyidés, siboglinidés…). Après leur installation, les organismes de surface modifieraient à leur tour les profils géochimiques au sein des sédiments ce qui provoquerait des modifications dans l'arrangement spatial des communautés microbiennes sédimentaires, en fonction des donneurs et des accepteurs d'électrons disponibles. Ainsi, la bioturbation générée par les organismes de surface permettrait notamment le développement de méthanotrophes aérobies au niveau des couches supérieures du sédiment, comme des *Gammaproteobacteria* observées en FISH ou, dans le cas des tapis, de nombreuses *Epsilonproteobacteria* probablement sulfo-oxydantes, présentes en surface. La zone sulfidique serait

aussi repoussée plus profondément au sein des sédiments au niveau des macroorganimes enfouis, comme les vésicomyidés et les siboglinidés, ce qui pourrait expliquer la présence de *Gammaproteobacteria* et *Deltaproteobacteria* filamenteuses qui seraient capables de coupler l'oxydation des sulfures présents en profondeur avec l'oxygène présent en surface des sédiments, comme accepteur terminal d'électrons. Enfin, ces macroorganismes pourraient aussi modifier la structure des communautés microbiennes sédimentaires par l'intermédiaire de composés qu'ils relargueraient dans leur environnement, comme le sulfate évacué par les racines des siboglinidés ou encore des éventuels déchets azotés, qui permettraient le développement de communautés microbiennes particulières comme par exemple certains groupes de Chloroflexi ou de candidate division JS-1.

Ainsi, on peut supposer un système en équilibre entre les communautés microbiennes sédimentaires, les organismes colonisant la surface du sédiment et la composition géochimique des eaux interstitielles. Les communautés microbiennes utiliseraient notamment les émissions de méthane des couches profondes et produiraient des sulfures qui seront utilisés par les communautés microbiennes libres ou symbiotiques, à la surface du sédiment. Les organismes colonisant la surface impacteront à leur tour, de part leur activité (bioturbation, excrétions…), sur les couches plus profondes. Nous avons donc bien un système complexe avec des communautés microbiennes de surface (libres ou symbiotiques) et sédimentaires, dans un contexte géochimique donné et l'étude de l'ensemble des paramètres permet de définir la structure tridimensionnelle de l'habitat, en terme de chimie, biologie et microbiologie.

3) Pôle chaud – Southern Through

La dernière partie de ce travail de thèse consiste en l'étude des communautés microbiennes sédimentaires de la zone de sources hydrothermales du Bassin de Guaymas, Southern Trough, le « *Pôle chaud* ». Les techniques utilisées pour cette études sont les mêmes que pour la zone de suintements froids du Bassin de Guaymas dans le but de pouvoir comparer ces deux écosystèmes : deux méthodes d'extraction différentes, ARISA, pyroséquençage 454 des gènes codant l'ARNr 16S avec les mêmes couples d'amorces archées et bactéries, Q-PCR et enfin FISH. Malheureusement, les échantillons correspondant à la zone de Southern Trough sont encore aujourd'hui en attente de séquençage à la plateforme génomique de Rennes. Pour autant, les résultats obtenus dans le cadre de l'étude « pilote » ainsi que les études déjà réalisées par d'autres équipes (Teske et al., 2002; Weber and Jorgensen, 2002; Dhillon et al., 2003; Holler et al., 2011; Biddle et al., 2012) ont permis de connaître certains des groupes microbiens qui pourraient être intéressants d'analyser en Q-PCR et en FISH. Ainsi, ce sont ces premiers résultats qui sont présentés ici, montrant déjà des ressemblances et des différences intéressantes entre le « pôle froid » et le « pôle chaud » du Bassin de Guaymas.

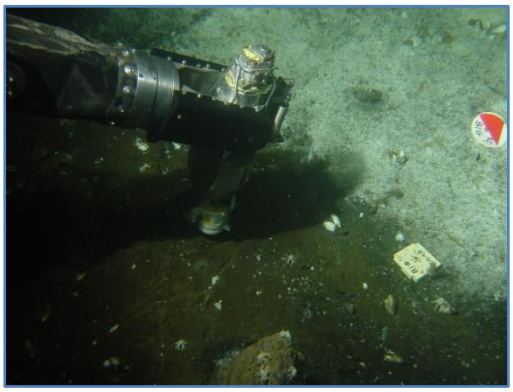


Figure 128 : Le site Morelos. Prélèvement d'une carotte de sédiment au niveau du marqueur BIG6. Campagne BIG 2010.

La particularité de la zone de sources hydrothermales du Bassin de Guaymas réside en partie dans le fait que le fond du Bassin est recouvert d'une épaisse couche sédimentaire (Simoneit and Lonsdale, 1982). Les fluides hydrothermaux surchauffés vont donc traverser une couche de plus de 100 m d'épaisseur de sédiment, ce qui va accélérer les processus de diagénèse tels que la précipitation de sulfures métalliques et la pyrolyse à haute température de la matière organique enfouie (Simoneit and Lonsdale, 1982; Kawka and Simoneit, 1987), et enrichir les sédiments hydrothermaux en hydrocarbures et en ammoniac (Von Damm et al., 1985; Bazylinski et al., 1988; Martens, 1990). Les fluides hydrothermaux du Bassin de Guaymas émanent soit par diffusion à la surface du sédiment avec des températures généralement inférieures à 200°C (Von Damm et al., 1985), soit par des petits monts ou des cheminées qui se dressent sur le fond. Les fluides contiennent notamment de l'hydrogène, du dioxyde de carbone et de l'hydrogène sulfuré (Welhan and Lupton, 1987; Elsgaard et al., 1994; Paull et al., 2007). Cette large variété de sources d'énergies potentielles va engendrer la présence de communautés microbiennes diverses au niveau des sédiments (Teske et al., 2002). Les flux de sulfures vont notamment permettre le développement en surface de tapis microbiens composés de bactéries filamenteuses thiotrophes, qui vont consommer ce sulfure et produire de la biomasse par chimioautotrophie (Jannasch et al., 1989; Nelson et al., 1989). Les consortia *Archaea*/*Bacteria* qui réalisent l'oxydation anaérobie du méthane (AOM) sont un des composants majeurs des communautés microbiennes retrouvées dans les sédiments hydrothermaux du Bassin de Guaymas (Teske et al., 2002). Beaucoup de communautés microbiennes présentes dans ces sédiments sont adaptées à un environnement riche en hydrocarbures, comme les bactéries sulfato-réductrices anaérobies qui oxydent les alcanes, les composés aromatiques et les acides gras

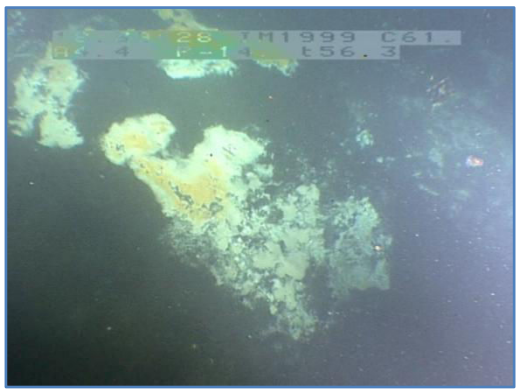


Figure 129 : Le site MegaMat. Plan large du site au cours de la plongée 1766 de la campagne BIG.

(Rueter et al., 1994; Phelps et al., 1998) ou les bactéries aérobies dégradant les hydrocarbures aromatiques (Goetz and Jannasch, 1993).

Notre étude porte sur deux habitats différents, colonisés par des communautés chimiosynthétiques de surface caractérisées par la présence de vésicomyidés, c'est le cas du site Morelos, et par la présence de tapis microbiens, c'est le cas du site MegaMat. Les vésicomyidés du site Morelos sont situés en périphérie d'un large voile blanchâtre recouvrant les sédiments, un peu granuleux et moins épais que les tapis microbiens (Figure 128, Plan détaillé à la Figure 114). Le site MegaMat est quant à lui caractérisé par la présence de tapis microbiens blancs et orange en surface des sédiments. A proximité de ces tapis, des bouquets de *Riftia* et des *Alvinella* sont observés sur des monts d'où diffuse un fluide moiré (Figure 129, Plan détaillé à la Figure 115). Des carottes de sédiments ont été prélevées au niveau de ces deux habitats, afin d'analyser les communautés microbiennes présentes dans les sédiments ainsi que la composition chimique des eaux interstitielles (concentrations en méthane, sulfate et sulfure). Ainsi, deux carottes ont été prélevées pour la microbiologie dans la zone de vésicomyidés du site Morelos (1768 CT2 et 1770 CT8), une autre dans le tapis blanc du site MegaMat (1766 CT3) et une dernière dans le tapis orange de ce même site (1767 GCT1) (Figure 114, Figure 115). Des sondes de température ont également été plantées dans le sédiment, mesurant cette dernière dans les cinquante premiers centimètres sous la surface. Cette étude a pour but (i) d'identifier les communautés microbiennes présentes dans les sédiments de la zone hydrothermale du Bassin de Guaymas, (ii) de comparer la structure de ces communautés entre l'habitat tapis et l'habitat vésicomyidés, (iii) de mettre en évidence des éventuels liens entre colonisateurs de surface, compositions des fluides interstitiels et structures des communautés microbiennes sédimentatires et enfin (iv) de comparer les structures des communautés microbiennes de Southern Trough avec celles de la Marge de Sonora, la zone de suintements froids du Bassin de Guaymas.

Les communautés microbiennes présentes au niveau des sédiments ont tout d'abord été étudiées par une technique d'empreinte moléculaire, l'ARISA (Fisher and Triplett, 1999) (Figure 130). Les résultats obtenus montrent que les communautés d'archées présentes dans les sédiments sous-jacents aux tapis microbiens de la marge de Sonora et ceux de Southern Trough semblent relativement similaires entre elles. On observe en revanche que les communautés présentes en profondeur du sédiment associé au tapis microbiens de Southern Through sont différentes. De façon intéressante, les communautés d'archées présentes sous les vésicomyidés du site Morelos semblent complètement différentes des autres sites étudiés et semblent être plus proches des communautés archéennes du site de référence.

Les résultats de PCR quantitatives (Figure 131), uniquement réalisées sur la carotte 1766 CT3 de MegaMat et 1768 CT2 de Morelos, et les observations FISH (Figure 132) mettent en évidence une grande différence entre les sédiments de surface et les sédiments de profondeur du site MegaMat. En effet, les quantités relatives de tous les groupes microbiens testés en Q-PCR sont beaucoup plus importantes en surface qu'en profondeur. De grandes abondances relatives d'ANME-1, D'ANME-2, de MBG-D, de DSS (groupe *Desulfosarcina/Desulfococcus*), de candidate division JS-1 et de SEEP-SRB2 ont en effet été retrouvées dans la section de surface provenant de l'habitat tapis microbien. Ces groupes microbiens seraient d'ailleurs en quantités relatives bien plus importantes, à l'exception du groupe DSS, que pour tous les habitats du « *pôle froid* » du Bassin de Guaymas. En revanche, les ANME-3, les MBG-B n'ont pas été retrouvés sous les tapis de MegaMat. Le groupe de bactéries DBB (*Desulfobulbus*) a été détecté en quantité beaucoup moins importante que sur le « *pôle froid* ». Il est aussi intéressant de noter que les ANME-1 semblent être présentes en grande quantité et plus profondément que tous les autres groupes microbiens. Le groupe de bactéries SEEP-SRB2 est communément retrouvé au niveau des sédiments de suintements froids et préalablement observé dans

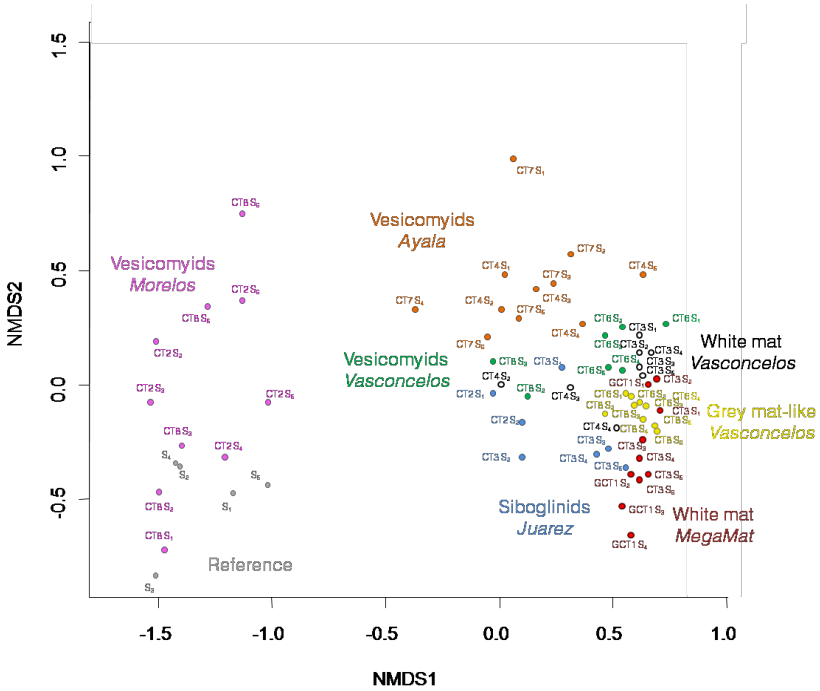


Figure 130 : Résultats ARISA Pôle Chaud / Pôle froid. Graphe NMDS basé sur des mesures de similarité de Bray-Curtis. Chaque échantillon est représenté par un point coloré et annoté : (points gris) référence, (points orange) Ayala, (points bleus) Juarez, (points verts) Vasconcelos BIG13, (points jaunes) tapis gris, (points noirs et blancs) tapis microbiens Vasconcelos BIG18, (points rouges) tapis microbiens MegaMat, (points violets) Morelos.

les sédiments de Southern Trough (Knittel et al., 2003; Wegener et al., 2008; Joye et al., 2010; Kleindienst et al., 2012) a été détecté en forte concentration. Cette lignée incultivée inclut le groupe Eel-2 détecté dans les sédiments associés aux suintements froids de Eel River (Orphan et al., 2001; Knittel et al., 2003). Les SEEP-SRB2 ont été observées non seulement sous forme de cellules isolées mais aussi associés aux ANME-2 et aux ANME-1 (Kleindienst et al., 2012). Ces bactéries pourraient également dégrader les hydrocarbures et les composés aromatiques présents dans les sédiments (Kleindienst et al., 2012). La présence des SEEP-SRB2 ainsi que des ANME-1 et ANME-2 en quantités importantes dans les sédiments sous-jacents au tapis microbien du site MegaMat suggèreraient que les SEEP-SRB2 pourraient être associées aux ANME dans ces sédiments. Les observations FISH ont en effet permis de mettre en évidence des agrégats de SEEP-SRB2 avec un partenaire non bactérien qui reste pour le moment non identifié (Figure 132). Outre les SEEP-SRB2, les bactéries affiliées au groupe HotSeep-1(Holler et al., 2011), anciennement GBG (Guaymas Bacterial Group) (Teske et al., 2002), retrouvées uniquement dans le Bassin de Guaymas, seraient les partenaires des ANME-1 au niveau des sédiments du Bassin de Guaymas. Les observations FISH n'ont pour le moment pas permis de visualiser ces bactéries grâce aux sondes spécifiques dessinées par l'équipe de T. Holler (Holler et al., 2011). Les ANME-1 ont été détectées en forte quantité relative, ce qui confirme les précédentes études réalisées au niveau du Bassin de Guaymas (Teske et al., 2002, Holler et al., 2011, Biddle et al., 2012). Les observations FISH ont pour l'instant permis de mettre en évidence de nombreuses cellules marquées avec la sonde ANME-1, beaucoup plus abondantes en surface du sédiment, et associées à un partenaire non-archéen pour le moment non-identifié. De très nombreux agrégats *Archaea/Bacteria* ont été observés en microscopie FISH, en surface du sédiment associé au tapis de MegaMat. Ces agrégats, dont les tailles peuvent atteindre des proportions importantes, ressemblent fortement aux agrégats marqués avec la sonde ANME-1 mais leur affiliation stricte demande des expérimentations plus poussées qui restent encore à réaliser. Les sédiments situés sous les tapis MegaMat semblent donc être colonisés par des communautés microbiennes un peu différentes de celles observées sous les tapis de Vasconcelos (Marge de Sonora). Cela pourrait

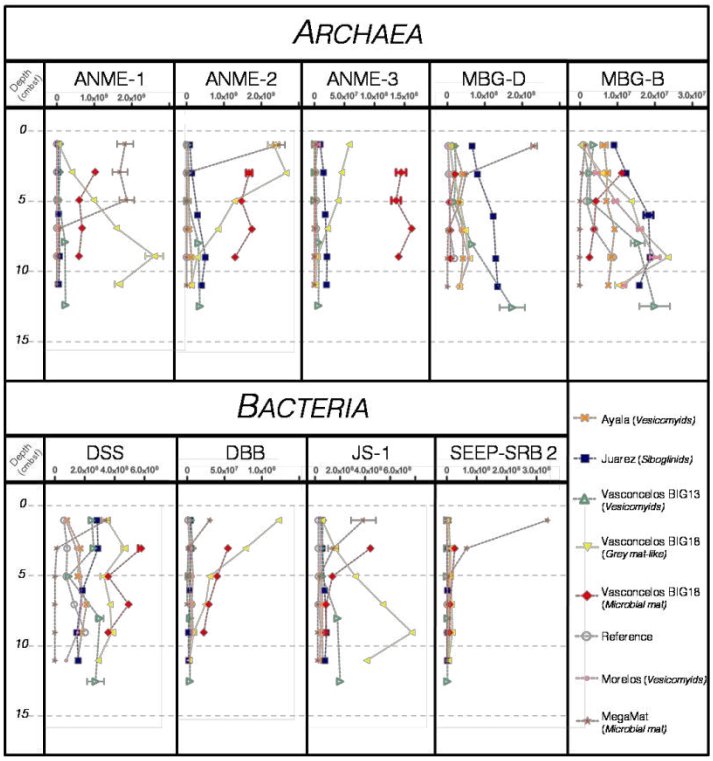


Figure 131 : Résultats de PCR quantitative pour le « *pôle chaud* ». Nombre de copies de gène codant l'ARNr 16S par gramme de sédiments pour les ANME-1, -2, -3, MBG-D, MBG-B, DSS (*Desulfosarcina/Desulfococcus* group), DBB (*Desulfobulbus* group), division candidate JS-1 et SEEP-SRB2.

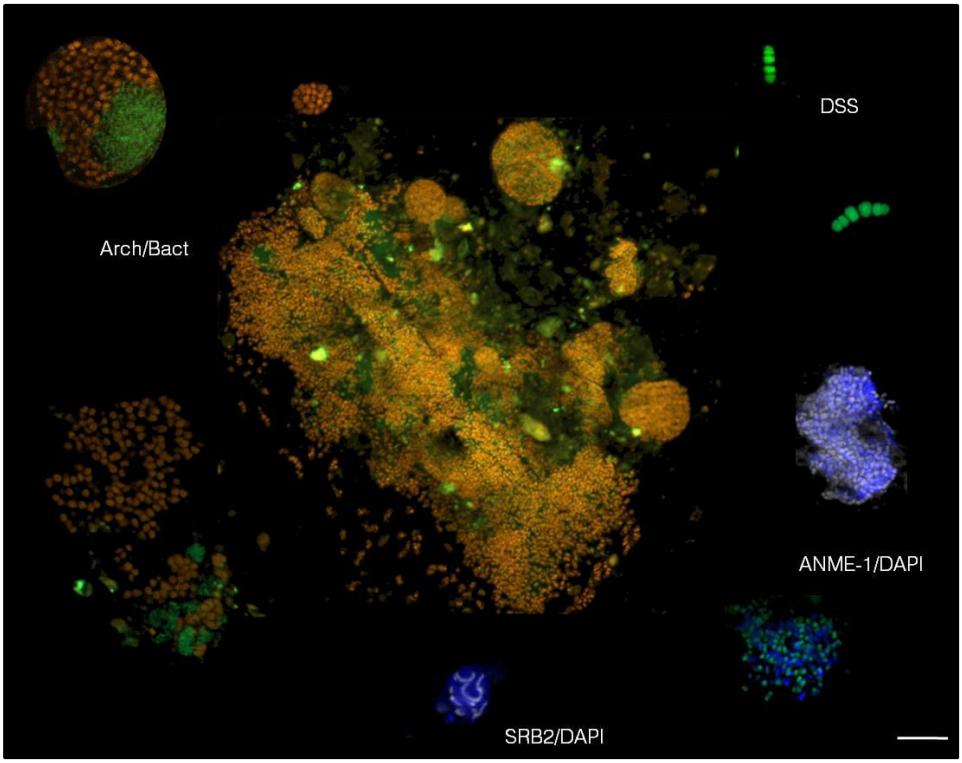


Figure 132 : Observations préliminaires de FISH pour le « *pôle chaud* ». Toutes les photos ont été prises dans des champs de microscope distincts sur un échantillon de sédiments de surface des tapis microbiens de MegaMat. Agrégats *Archaea/Bacteria* en orange/vert, DSS en chaînettes en vert en haut à droite, agrégats d'ANME-1 en blanc et vert en bas à droite, associées avec un partenaire non identifié (DAPI) et un agrégat SEEP-SRB2 en blanc, associé avec un partenaire non identifié (DAPI).

notamment être dû à la température beaucoup plus élevée mesurée dans les sédiments de MegaMat, qui monte à plus de 120°C à 50 cm de profondeur (55°C à 10 cm sous le tapis blanc et 113°C à 10 cm sous le tapis orange) (Figure 134). Les membres des groupes d'ANME-1 associés aux sédiments de Southern Trough ainsi que leurs partenaires bactériens HotSeep-1 ont en effet été proposés comme étant thermophiles et oxyderaient le méthane en association avec la réduction des sulfates à une température optimale située entre 45 et 60°C (Holler et al., 2011). Cela pourrait aussi s'expliquer par la présence d'une quantité plus importante d'hydrocarbures générés par la traversée des sédiments par les fluides hydrothermaux surchauffés (Simoneit and Lonsdale 1982, Kawka and Simoneit 1987). Bien que les sulfures puissent aussi être apportés par le fluide hydrothermal, il est aussi intéressant de noter que les concentrations en méthane et en sulfures mesurées dans les eaux interstitielles du site MegaMat sont plus basses que celles mesurées sous le tapis microbien de la Marge de Sonora, au niveau du site Vasconcelos. Ces résultats pourraient suggérer une oxydation anaérobie du méthane moins importante au niveau des tapis blancs de Southern Trough, à haute température, que dans les sédiments associés aux tapis microbiens de la Marge de Sonora, à une température approximative de 3°C.

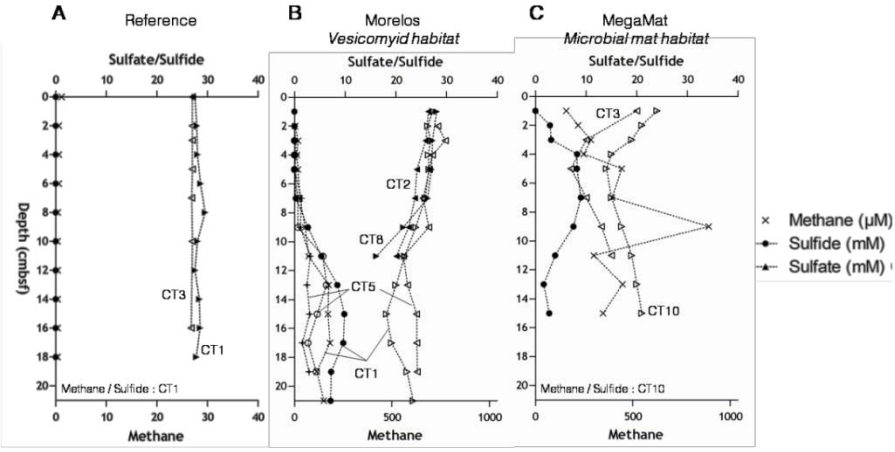


Figure 133 : Profils géochimiques associés au « *pôle chaud* ». Concentrations dans les eaux interstitielles en méthane dissous (croix), sulfate (triangles), sulfure (cercles)

Les communautés microbiennes associées au sédiment du site Morelos restent beaucoup plus énigmatiques. En effet, bien que la température (Figure 134) et les profils de concentrations en méthane et en sulfures des eaux interstitielles (Figure 133) soient typiques d'un habitat vésicomyidés « classique » des suintements froids (e.g. Sahling et al., 2002, Barry et al., 1997), c'est-à-dire absence de sulfures en surface et production de sulfures entre 10 et 15 cm, les communautés microbiennes mises en évidence par ARISA semblent totalement différentes des autres habitats, qu'ils soient situés en environnement hydrothermal (site MegaMat) ou en environnement de suintements froids (Marge de Sonora). Par ailleurs les résultats de Q-PCR montrent une certaine similarité avec les communautés microbiennes des sédiments du site de référence, avec une absence d'ANME, de DBB, de JS-1 et de SEEP-SRB2. Une quantité plus importante de bactéries DSS ainsi que d'archées MBG-D et MBG-B a cependant été mise en évidence. La présence de sulfato-réductrices (DSS) pourrait en partie expliquer la présence de sulfure dans le sédiment et de vésicomyidés en surface. Cependant, les résultats de pyroséquençage pourront certainement permettre d'apporter d'autres hypothèses pour expliquer le fonctionnement de cet habitat, qui reste pour nous très énigmatique.

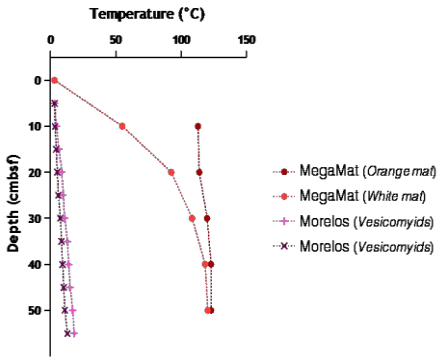


Figure 134 : Profils de températures dans les sédiments du « *pôle chaud* ».

Bilan et perspectives

Nous voilà à présent arrivés à la fin de ce manuscrit de thèse. Il est maintenant temps de dresser un petit bilan autour de ce qui a été effectué au cours de ces trois années. Dans une première partie, c'est une prise de recul sur certaines des techniques utilisées qui sera exposée. Nous passerons ensuite aux bilans et aux perspectives envisagées sur les résultats obtenus.

I. Bilan sur les techniques utilisées

1) Techniques d'échantillonnage

Figure 135 : Mise à l'eau d'un carottier multitube. Campagne WACS 2011 - Ifremer

Durant ma thèse, j'ai eu l'immense privilège de participer à deux campagnes hauturières de cinq semaines chacune, WACS (février 2011) et CongoLobe (décembre 2011 – janvier 2012), dans le Golfe de Guinée. Ces campagnes se sont déroulées à bord du NO Pourquoi Pas ? avec le ROV Victor 6000 et m'ont permis de prendre notamment conscience de la complexité de l'échantillonnage en milieu marin profond. Comme nous l'avons vu dans le chapitre « *Réflexions autour des techniques utilisées* », les échantillons de sédiments peuvent être prélevés grâce à des carottiers tubes d'une trentaine de centimètres de longueur et de cinq centimètres de diamètre. Ces carottiers permettent d'effectuer un échantillonnage précis, réalisé directement à l'aide du bras articulé du Nautile ou du ROV. Cela permet de voir exactement où les sédiments ont été prélevés et quels étaient les colonisateurs de surface, ce que ne permettent pas d'autres systèmes de carottage, tel que les carottiers multitubes (Figure 135) qui ont un diamètre plus grand mais sont réalisées directement à partir du pont du navire. Ainsi, il est possible d'échantillonner un habitat précis, comme il était nécessaire pour ce travail de thèse. Cependant, si l'échantillonnage des sédiments recouverts de tapis microbiens ou de macrofaune comme des petits gastéropodes est facilement réalisable, l'échantillonnage d'habitats colonisés par de la mégafaune comme les vésicomyidés et les siboglinidés peut s'avérer compliqué. En effet, le diamètre des carottiers tubes ne permet pas l'échantillonnage directement sur le vésicomyidé et encore moins dans les buissons de siboglinidés. Les petits vésicomyidés peuvent être récupérés dans les carottiers tubes puis enlevés au moment du conditionnement des carottes de sédiments. Il n'est alors pas évident de ne pas perturber les horizons sédimentaires occupés par le vésicomyidé et étudiés par la suite. Les vésicomyidés plus gros ne peuvent tout simplement pas entrer dans le carottier. L'échantillonnage des vésicomyidés et des siboglinidés ne peut donc pas être réalisés directement sous l'assemblage, ou difficilement. Cela peut s'avérer très limitant du fait de l'hétérogénéité potentielle des écosystèmes chimiosynthétiques profonds. En effet, les profils géochimiques et par conséquent les communautés microbiennes présentes dans les sédiments, peuvent être totalement différents à quelques centimètres de distance. Pour donner un exemple concret, l'un des sites des lobes terminaux du chenal du Congo, échantillonné lors de la campagne CongoLobe, était caractérisé par un patch très dense de vésicomyidés disposés autour de sédiments très noirs (Figure 136). En périphérie, le sédiment était très clair et la surface était nue. Si le centre noir et la périphérie nue paraissaient facilement échantillonnable grâce à des carottiers tubes, le sédiment colonisé par les vésicomyidés

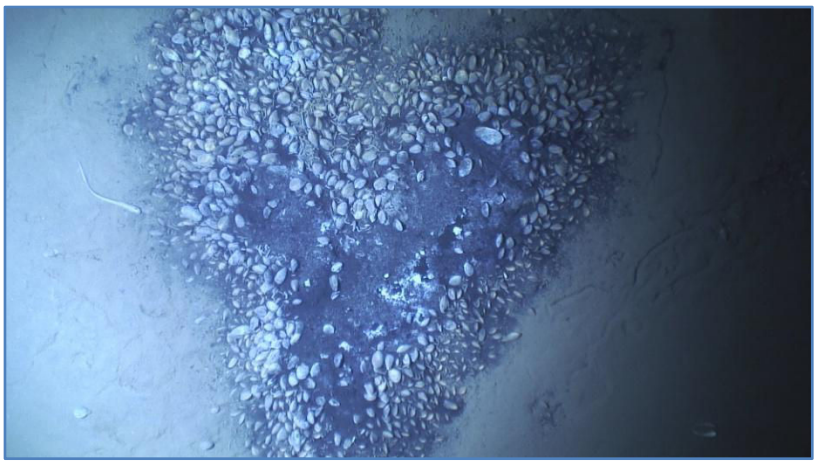


Figure 136 : Coeur de vésicomyidés. Campagne WACS 2011 - Ifremer

était inaccessible pour ces carottiers. Ce type d'assemblage aux frontières très nettes doit pourtant refléter des différences intéressantes notamment au niveau géochimique et microbiologique. Des analyses réalisées par l'équipe de chimistes du département lors des campagnes WACS 2011 et CongoLobe 2011 et d'autres études ont d'ailleurs montré que la composition des fluides pouvait changer de façon drastique entre une zone fortement colonisée et une zone peu colonisée, même si ces deux zones sont situées à quelques centimètres l'une de l'autre (J.C. Caprais, communication personnelle et Barry et al., 1997). Une des possibilités pour rendre plus aisé l'échantillonnage des sédiments sous-jacents à des assemblages de vésicomyidés serait d'utiliser des carottiers plus larges, comme par exemple des grands carottiers lames, qui permettent de prélever les vésicomyidés en même temps que le sédiment (Figure 137). Une autre possibilité envisagée serait de retirer la faune de surface à l'aide de la pince du Nautile ou du ROV, avant de prélever les sédiments à l'aide des carottiers tubes. Ce mode d'échantillonnage risquerait cependant de perturber de façon trop importante la surface du sédiment et l'emploi d'un carottier plus large resterait tout de même plus approprié. Par ailleurs, il serait intéressant de faire des transects et de prélever, à la manière de l'équipe de Barry et al. (1997) (Figure 138), des carottiers au sein de l'habitat, en périphérie directe et à l'écart de l'habitat, en plus des duplicats. Cependant, il est parfois compliqué de réaliser autant de carottes, notamment dans le cas de surface colonisée restreinte ou selon le type de sédiment. En effet, dans certains cas, l'échantillonnage dans un sédiment trop mou peut perturber les sédiments situés à proximité. Dans tous les cas, il est important d'enfoncer toutes les carottes dans le sédiment dans un premier temps, puis de les retirer toutes dans un second temps pour minimiser la perturbation des sédiments alentours.

Figure 137 : Prélèvement de vésicomyidés et de sédiments à l'aide d'un grand carottier lame. Ifremer – Campagne WACS 2011

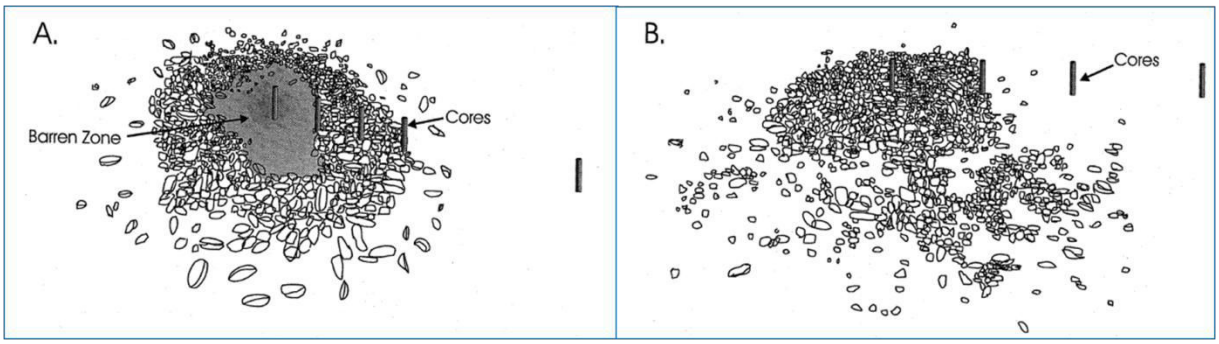


Figure 138 : Plan d'échantillonnage de patch de vésicomyidés. Barry et al. 1997

2) Approche moléculaire

Les communautés microbiennes présentes au niveau de la zone de suintements froids de la Marge de Sonora et de la zone de sources hydrothermales de Southern Trough, situées dans le Bassin de Guaymas, ont été étudiées, au cours de cette thèse, grâce à l'utilisation de techniques moléculaires, toutes basées sur l'ADN et plus particulièrement sur le gène codant l'ARNr 16S des microorganismes, archées et bactéries. Trois techniques particulières ont été majoritairement utilisées : le séquençage par pyroséquençage 454, la Q-PCR et la microscopie FISH. Ces techniques sont très intéressantes puisqu'elles permettent d'accéder à la diversité microbienne sans nécessairement passer par une étape de culture ou d'enrichissement, qui peut être très sélective au niveau de la diversité obtenue (Amann et al., 1995, Rappé and Giovannoni, 2003). Cependant, comme nous l'avons vu dans ce manuscrit, toutes ces techniques peuvent elles aussi présenter des biais très importants.

La technique d'extraction est la première étape problématique mise en évidence au cours de cette thèse. Nous avons en effet pu constater qu'une unique technique d'extraction ne permettait pas toujours d'extraire toute la diversité microbienne associée à un échantillon (Valentine, 2007, Maarit Niemi et al., 2001). Il peut en résulter qu'une partie importante des communautés microbiennes présentes dans un échantillon ne soit pas présente dans les inventaires moléculaires. Comme le deuxième article présenté dans ce manuscrit le montre, l'efficacité de la technique d'extraction dépend aussi de l'échantillon traité. Alors qu'une technique d'extraction peut montrer de très bons résultats pour un échantillon, elle peut être peu efficace voire inefficace dans le cas d'un autre échantillon. Il est par exemple intéressant de noter que la technique « Zhou » décrite dans ce manuscrit montrait de très bons résultats pour certains échantillons, que ce soit dans le cadre de notre étude ou de d'autres études (Lazar, 2009; Vigneron, 2012), alors qu'elle ne semblait pas adaptée à certains échantillons comme, par exemple, les échantillons de cheminées hydrothermales utilisés pour notre étude pilote. Il peut être parfois pertinent d'utiliser plusieurs méthodes d'extraction et de réunir les ADN extraits. L'attitude à adopter dépend aussi de la question scientifique qui est posée au début. Il peut être intéressant de tester préalablement différentes méthodes d'extraction sur les échantillons à étudier et d'analyser les extraits notamment par empreinte génétique, en utilisant des techniques comme l'ARISA ou la DGGE, qui peuvent être de bons indicateurs pour juger de l'efficacité de l'extraction.

Une des étapes les plus problématiques rencontrée dans le cadre de notre étude est l'étape d'amplification des fragments d'ADN par PCR. Cette étape nécessite l'utilisation d'amorces complémentaires aux ADN extraits. Comme dans le cas d'études précédentes (Baker et al., 2003; Teske and Sorensen, 2008; Sergeant et al., 2012), notre étude « pilote » a mis en évidence les biais énormes que pouvaient engendrer l'utilisation de tel ou tel couple d'amorce. Comme pour l'étape d'extraction de l'ADN, il est possible d'utiliser plusieurs couples d'amorces différents comme le souligne Teske et al. (2008). Cependant, lorsque deux couples d'amorces différents donnent des résultats complètement différents pour un échantillon donné, comme c'était le cas dans notre étude « pilote », il est difficile de déterminer quelle est la vrai diversité microbienne présente dans l'échantillon étudié. Celle détectée par le premier couple d'amorces ? Celle détectée par l'autre couple d'amorces ? Celle détectée lorsque les résultats obtenus dans les deux cas sont réunis ? Ou alors aucun de ces résultats ne reflète vraiment la réalité… Il est en tous cas nécessaire de bien garder en tête les biais engendrés par cette étape de PCR, qui est aussi une des étapes, ne l'oublions pas, de la technique de pyroséquençage. Si certains couples d'amorces, dites « universelles », donnent de bons résultats sur des échantillons donnés et semblent couvrir la diversité présente dans ces échantillons, la solution la plus fiable serait de s'affranchir de cette étape de PCR avant le séquençage ou d'utiliser, au moins à titre comparatif, des techniques qui ne font pas intervenir d'étape de PCR (Teske and Sorensen, 2008).

Une autre étape délicate dans les études moléculaires passant par le séquençage de l'ADN est l'affiliation des séquences obtenues aux microorganismes d'origine. Nous avons pu voir tout au long de ce manuscrit que cette étape pouvait être très délicate. Il y a plusieurs raisons à cela. Premièrement, la taille des séquences obtenues peut rendre l'identification compliquée voire impossible. Les techniques de séquençage haut-débit ne permettent pas, à l'heure actuelle, de séquencer l'ARNr 16S dans son intégralité. Or, de trop courtes séquences d'ARNr 16S, et à plus forte raison dans certaines zones du gène codant l'ARNr 16S, ne permettent pas d'attribuer une affiliation certaine au microorganisme d'origine (Kim et al., 2011). Ensuite, les banques de données disponibles ne sont pas toujours suffisamment complètes et précises pour toutes les études d'écologie environnementale. En effet, comme nous l'avons vu dans ce manuscrit, de nombreuses séquences présentes dans ces bases de données sont peu ou mal renseignées sur leur affiliation taxonomique. Le troisième point explique en partie le deuxième. La taxonomie des *Archaea* et des *Bacteria* est revisitée en permanence et peut évoluer très vite, et notamment au niveau des environnements marins profonds. La découverte de nouveaux groupes microbiens influe constamment sur la phylogénie des microorganismes, remettant en question les différents liens de parenté qui existent entre eux. Les études de métagénomiques ou plus généralement les études qui prennent en compte plusieurs gènes pour un même microorganisme modifient aussi notre vision de la classification des différents groupes microbiens. Pour donner un exemple, le phylum archéen des *Thaumarchaeota* est actuellement totalement revisité notamment avec les anciennes Marine Crenarchaeota Group (MCG) qui ont été réaffiliées aux *Thaumarchaeota* plutôt qu'aux *Crenarchaeota* (Brochier-Armanet et al., 2008; Brochier-Armanet et al., 2012; Lloyd et al., 2013). Le quatrième point concerne les études de séquençage haut-débit qui nécessite un traitement automatisé des séquences obtenues. En effet, de plus en plus d'études utilisent des outils de séquençage de masse qui donnent accès à des quantités énormes de données. Ces outils, comme le pyroséquençage ou encore la technologie Illumina (Mi-Seq, Hi-Seq), sont en plein essor et permettent de plus en plus de réaliser des études de diversité microbienne de grande envergure, de la métagénomique ou encore de la transcriptomique. L'automatisation des traitements des séquences nécessite l'utilisation d'outils informatiques qui nécessite un savoir-faire évident. D'un point de vue personnel, un dialogue soutenu entre informaticiens, bioinformaticiens, et microbiologistes reste incontournable pour optimiser et rendre ce traitement adéquat. Le microbiologiste peut bien entendu connaître un certain nombre d'outils informatiques, savoir construire de petits programmes, comprendre le fonctionnement des outils, cela facilitera le dialogue entre la biologie et l'informatique. Au-delà de cela, construire ensemble permet de développer des solutions plus adaptées et plus pertinentes que les informaticiens ou les biologistes seuls. Alors que les informaticiens ne comprennent pas forcement les problématiques scientifiques des biologistes ou les aberrations biologiques potentielles, les biologistes ne connaissent pas forcement les meilleurs outils informatiques et les meilleures façons de les utiliser pour répondre à leurs questions scientifiques. Ce qui nous amène à introduire le fait qu'il faut toujours bien garder en tête que la question scientifique prévaut et qu'une technique n'est utilisée que pour répondre à cette question.

Une des techniques utilisées dans cette thèse, qui vient compléter l'étude de séquençage à proprement parler, est la Q-PCR. Cette technique possède un aspect beaucoup plus quantitatif que le séquençage qui inclut des étapes de PCR classique. La Q-PCR permet notamment de quantifier le nombre de copies d'ARNr 16S contenues dans un échantillon donné. Elle fait donc suite à une étape d'extraction, qui peut, comme nous l'avons vu plus haut, biaiser les résultats. Outre les amorces de Q-PCR dites « universelles » qui peuvent engendrer les même biais que ceux exposés pour le séquençage, il est possible d'utiliser, comme nous l'avons fait dans le cadre de notre étude, des amorces plus spécifiques ciblant certains groupes microbiens. Dessiner ce type d'amorces peut permettre d'amplifier des groupes non amplifiés avec des amorces universelles. Cependant, il est aussi

délicat d'être réellement spécifique et de ne pas amplifier en même temps un autre groupe microbien non ciblé. Un autre biais de la Q-PCR réside dans le fait que les génomes de tous les microorganismes ne contiennent pas le même nombre de copies de 16S, y compris au sein d'une même espèce bactérienne (Klappenbach et al., 2001; Acinas et al., 2004; Větrovský and Baldrian, 2013). Comparer les résultats obtenus pour différents groupes microbiens peut donc être délicat.

La seconde technique utilisée pour compléter l'étude de séquençage est la microscopie FISH. Cette technique ne nécessite pas d'étape d'extraction préalable. En revanche, elle nécessite une étape de perméabilisation qui va permettre aux sondes de pénétrer dans les cellules pour venir s'hybrider sur leur cible, notamment l'ARNr 16S. La perméabilisation nécessaire peut dépendre des microorganismes cibles et à plus forte raison dans le cas de la technique CARD-FISH, qui nécessite une perméabilisation plus importante pour permettre l'entrée de la sonde oligonucléotidique liée à l'enzyme HRP (Pernthaler et al., 2002a). Il faut alors jouer entre perméabilisation suffisante et maintien de l'intégrité cellulaire (Schönhuber et al., 1999). Dessiner des sondes spécifiques d'un certain groupe microbien est aussi un travail délicat. Comme mentionné pour les amorces de Q-PCR, il est nécessaire de vérifier la spécificité de la sonde. Tout le travail effectué au cours de cette thèse en microscopie FISH aura aussi montré que l'observation en elle-même n'est pas non plus tâche aisée. De longues journées passées dans la petite pièce noire du microscope à épifluorescence et des centaines de lames auront été nécessaires pour obtenir les images présentées dans cette thèse. Il est tout d'abord nécessaire de s'habituer à l'observation en fluorescence et d'apprendre à différencier les cellules réellement marquées d'éléments qui autofluorescent à la longueur d'onde utilisée. Les amas cellulaires sont aussi plus facilement observables que les cellules uniques, qui sont souvent difficile à identifier formellement comme étant des cellules microbiennes réelles. Les échantillons qui présentent une biomasse microbienne très élevée et très active, comme les sédiments sous-jacents aux tapis microbiens de la Marge de Sonora, permettent une observation plus aisée que dans le cas d'échantillons à faible biomasse, peu active, comme par exemple les sédiments associés au site Ayala de la Marge de Sonora (qui restent tout de même des sédiments bien actifs au point de vue microbiologique), notamment lorsque ce sont les agrégats AOM très actifs de 50 µm de diamètre qui sont recherchés. Le microscope en lui-même fait aussi beaucoup, notamment au niveau de la qualité des acquisitions. Le module Apotome, dont est équipé le microscope à épifluorescence Zeiss du laboratoire, permet en effet d'améliorer considérablement la qualité des images obtenues, en permettant notamment une netteté impressionnante au niveau des contours.

II. Bilan et perspectives sur les résultats obtenus

1) Bilan de l'étude

Cette thèse proposait d'étudier les communautés microbiennes sédimentaires du Bassin de Guaymas, présentes au niveau de la zone de suintements froids de la Marge de Sonora ainsi qu'au niveau de la zone de sources hydrothermales de Southern Trough. Ces deux types d'écosystèmes sont colonisés par des assemblages faunistiques et des tapis microbiens comparables entre les deux zones. Ces colonisateurs de surface sont répartis en patch isolés à la surface du sédiment, séparés par des zones de sédiments nus. Notre étude avait pour but d'identifier les communautés microbiennes présentes dans les sédiments sous-jacents à ces différents colonisateurs de surface. Nous cherchions aussi à appréhender le rôle éventuel des communautés microbiennes sédimentaires sur la répartition des différents colonisateurs de surface. Enfin, nous voulions tenter de mieux comprendre le fonctionnement global très complexe des écosystèmes de suintements froids et de sources

hydrothermales au travers des interactions qui peuvent exister entre flux géochimiques, communautés microbiennes sédimentaires et colonisateurs de surface.

Cette étude portait sur cinq habitats différents de la zone de suintements froids et deux habitats différents de la zone de sources hydrothermales. Au niveau de la Marge de Sonora, ce sont les habitats caractérisés par la présence de vésicomyidés (sites Ayala et Vasconcelos BIG13), de siboglinidés (site Juarez), de tapis microbiens (site Vasconcelos BIG18) et de gastéropodes et petits polychètes (pourtour du tapis du site Vasconcelos BIG18) qui ont été analysés. Au niveau de Southern Trough, ce sont les habitats caractérisés par la présence de vésicomyidés (site Morelos) et de tapis microbiens (site MegaMat) qui ont été considérés. L'étude comparative globale entre tous ces sites n'a pas encore pu être réalisée dans son intégralité puisqu'il manque les résultats du séquençage des habitats de Southern Trough (en attente à la plateforme génomique de Rennes).

L'analyse microbiologique détaillée des sédiments du Bassin de Guaymas a mis en évidence la présence de communautés bactériennes et archéennes diverses. Les communautés microbiennes détectées au niveau de la Marge de Sonora sont celles habituellement retrouvées dans d'autres écosystèmes de suintements froids (Cambon-Bonavita et al., 2009, Lloyd et al., 2006, Knittel et al., 2005, Orphan et al., 2001). Les groupes microbiens majoritairement détectés sont les archées anaérobies qui réalisent l'oxydation du méthane (ANME), les Thermoplasmatales MBG-D (Marine Benthic Group D) et les DHVE-8 (Deep Sea Hydrothermal Vent Euryarchaeota group 8) pour les archées et les *Proteobacteria* avec notamment les *Gammaproteobacteria* et les *Deltaproteobacteria* (dont les partenaires DSS et DBB des ANME) ainsi que les Chloroflexi et la division candidate JS-1 (Japan Sea 1) en ce qui concerne les bactéries. Les groupes microbiens détectés au niveau de Southern Trough par Q-PCR et par microscopie FISH ont également déjà été observés dans d'autres systèmes hydrothermaux sédimentaires (Teske et al., 2002; Nunoura et al., 2010; Biddle et al., 2012). Parmi eux, les ANME-1 et -2 semblent être présentes en quantités importantes sous le tapis microbiens du site MegaMat.

Ces différentes lignées archéennes et bactériennes ne sont pas réparties de la même façon dans les sédiments de chaque habitat. Les ANME semblent être largement dominantes sous le tapis microbien ainsi que son pourtour au niveau du site Vasconcelos alors que les MBG-D semblent caractériser les habitats colonisés par de la mégafaune, au niveau de la Marge de Sonora. D'autres groupes microbiens semblent également caractériser certains sites comme les Chloroflexi Division 1 (incluant les *Anaerolineae*) et Divison 2 (incluant les *Dehalococcoides*) ainsi que la division candidate JS-1 qui sont détectées majoritairement par pyroséquençage dans les sédiments des sites Juarez et Vasconcelos BIG13, colonisés respectivement par des siboglinidés et des vésicomyidés. Les communautés microbiennes détectées sous les tapis de la zone hydrothermale du Bassin de Guaymas semblent être plus similaires à celles qui caractérisent le site de tapis microbiens et son pourtour au niveau de la Marge de Sonora, que celles associées aux sites colonisés par de la mégafaune. Le site Morelos, situé dans la zone hydrothermale du Bassin de Guaymas et colonisé par des vésicomyidés semble quant à lui abriter des communautés microbiennes totalement différentes de celles qui colonisent les sédiments de tous les autres sites étudiés. Les résultats de pyroséquençage nous en diront certainement plus sur cet habitat. Hormis les différences observées entre les habitats, des différences importantes ont été détectées entre les horizons sédimentaires étudiés. En effet, certaines communautés détectées en surface des sédiments ne sont pas retrouvées ou en moindre quantité en profondeur, à une dizaine de centimètres sous la surface. C'est notamment le cas des *Epsilonproteobacteria* détectées sous les tapis de Vasconcelos ou encore des filamenteuses détectées en FISH sous les habitats colonisés par de la mégafaune, ou encore des ANME-2 dans les sédiments colonisés par des gastéropodes et des polychètes (Tapis gris, site Vasconcelos) et de la majorité des

groupes détectés sous les tapis de MegaMat. Au contraire, certaines communautés microbiennes sont majoritairement détectées dans les couches sédimentaires les plus profondes comme c'est le cas des ANME-1 sous le tapis gris ou des MBG-D sous les vésicomyidés de Vasconcelos et les siboglinidés de Juarez ou encore de la division candidate JS-1 sous les vésicomyidés de Vasconcelos et le tapis gris de Vasconcelos.

Ces différences entre habitats et horizons sédimentaires étudiés peuvent refléter des différences au niveau de la composition chimique des eaux interstitielles, de l'intensité des fluides hydrothermaux ou de suintements froids, ou encore un impact des colonisateurs de surface sur les sédiments sous-jacents. Ces différents éléments vont en effet impacter sur la disponibilité des sources d'énergies potentielles utilisables par les microorganismes (Niemann et al., 2006; Pachiadaki et al., 2011; Fischer et al., 2012). Les concentrations élevées en méthane dans les sédiments vont en effet permettre le développement de nombreuses ANME, comme observé en FISH sous les tapis microbiens du pôle froid et du pôle chaud, qui vont permettre la production de quantités importantes de sulfures. Les concentrations importantes de sulfure produites vont permettre le développement de bactéries géantes filamenteuses oxydant ce dernier et formant des tapis microbiens denses à la surface du sédiment (Knittel et al., 2005; Niemann et al., 2006; Pachiadaki et al., 2011; Fischer et al., 2012). Ces quantités importantes de sulfures peuvent être toxiques pour tous les métazoaires (Vetter et al., 1991) et ainsi exclure les animaux comme les vésicomyidés et les siboglinidés de ces zones. Au niveau des zones où les concentrations en méthane sont plus faibles, les ANME vont être présentes en moindre quantité, comme on peut l'observer sous les assemblages faunistiques des sites Ayala, Juarez et Vasconcelos BIG13. Cette faible quantité d'ANME va potentiellement produire moins de sulfure, non détecté au niveau de ces habitats, ce qui va permettre l'installation et être potentiellement suffisant pour le maintien des siboglinidés et des vésicomyidés, invertébrés symbiotiques, sur ces sites.

Après leur installation, la présence et l'activité des colonisateurs de surface vont impacter sur la composition géochimique des sédiments et sur la répartition spatiale des différentes communautés microbiennes, comme il a déjà été montré dans d'autres études (Boetius, 2005; Fischer et al., 2012; Ruff et al., 2013). Les bactéries formant les tapis microbiens vont engendrer une microoxygénation des sédiments de surface (Schulz and Jorgensen, 2001), ce qui pourra permettre l'installation de microorganismes sulfo-oxydant aérobies dans les premiers horizons sédimentaires, comme par exemple les *Epsilonproteobacteria* fortement détectées à ce niveau pour le site Vasconcelos BIG18. Les premières différences observées entre les communautés microbiennes présentes sous les tapis du pôle chaud et ceux du pôle froid pourraient s'expliquer par les hautes températures présentes dans les sédiments de MegaMat et des différences dans la composition des fluides (Simoneit and Lonsdale, 1982 ; Welhan and Lupton, 1987 ; Elsgaard et al., 1994 ; Paull et al., 2007). Ces températures ne permettraient le développement que d'organismes thermophiles, et notamment les ANME-1, détectées en nombre sous les tapis de MegaMat et leurs partenaires bactériens, les HotSeep-1 ou GBG (Holler et al., 2011; Kellermann et al., 2012). L'augmentation rapide de la température au sein des sédiments de MegaMat, qui passe de 3°C dans l'eau de mer à plus de 50°C à 10 cm sous la surface des sédiments et à plus de 90°C à 20 cm pourrait quant à elle expliquer la rapide diminution avec la profondeur des quantités relatives de tous les groupes microbiens testés en Q-PCR. La présence de gastéropodes et de polychètes, potentiellement brouteurs de tapis microbiens et suspensivores (Waren and Bouchet, 2009; Ruff et al., 2013), engendreraient moins de microoxygenation et les sédiments de surface seraient alors plus anoxiques. Cela pourrait expliquer la quantité plus importante d'ANME-2 observée en surface du « tapis gris » et celles des ANME-1 au niveau de cet habitat. La répartition des ANME-2 sous le tapis microbien du site Vasconcelos, et son pourtour, pourrait aussi s'expliquer par des besoins métaboliques particuliers des partenaires bactériens des agrégats AOM (Vigneron, 2012; Vigneron et

al., 2013; Vigneron et al., 2014). De leur côté, les vésicomyidés et les siboglinidés vont créer une bioturbation beaucoup plus importante que les autres colonisateurs. Ils vont augmenter la pénétration de l'eau de mer dans les sédiments et ainsi augmenter l'oxygénation des couches supérieures du sédiment (Sahling et al., 2002; Cordes et al., 2005; Fischer et al., 2012). Cela pourrait expliquer la présence de *Gammaproteobacteria* et *Deltaproteobacteria* filamenteuses à la surface de ces habitats. Ces filamenteuses pourraient en effet être capables de coupler l'oxydation des sulfures présents en profondeur avec l'oxygène présent en surface (Nielsen et al., 2010; Pfeffer et al., 2012). Cette bioturbation ainsi que les exsudats libérés par les siboglinidés et les vésicomyidés pourraient aussi permettre le développement d'autres groupes microbiens comme les Chloroflexi ou la division candidate JS-1. Ces microorganismes pourraient en effet utiliser, directement ou indirectement, des substrats potentiels présents uniquement grâce à la présence des colonisateurs de surface.

De façon intéressante, les communautés microbiennes présentent au niveau des trois habitats colonisés par des vésicomyidés, Ayala, Vasconcelos BIG13 et Morelos, semblent être différentes. Au niveau de la Marge de Sonora, les différences observées entre les deux sites, Ayala et Vasconcelos, pourraient s'expliquer par certaines caractéristiques notées lors de l'étude des habitats de surface des vésicomyidés. En effet, au niveau du site Ayala, les vésicomyidés identifiés comme étant majoritairement des *Phreagena soyoae* sont regroupés en petits amas denses sur une zone d'environ 300 m² de sédiments très granuleux. Au contraire, les vésicomyidés du site Vasconcelos BIG13, identifiés comme étant majoritairement des *Archivesica gigas*, sont très dispersés, dans des sédiments très mous et liquides et se trouvent en périphérie d'un large tapis microbien. Par ailleurs, de nombreuses traces de vésicomyidés observées sur le site Vasconcelos pourraient refléter une hétérogénéité spatiale importante des flux et des sorties de fluides très ponctuelles. Cette caractéristique pourrait expliquer les différences observées en termes de communautés microbiennes. La présence de tapis au niveau du site Vasconcelos, et donc d'une zone potentiellement fortement abondée en méthane et en sulfure, pourrait expliquer la présence de communautés microbiennes retrouvées sous les tapis microbiens, comme la division candidate JS-1. L'hétérogénéité spatiale et la ponctualité des sorties de fluides pourraient créer une pression sélective sur les communautés microbiennes, en ne permettant qu'aux communautés capables de supporter des stress au niveau absence de substrats. Le type de sédiments, beaucoup plus granuleux au niveau du site Ayala, pourrait aussi avoir un effet sur les communautés microbiennes sédimentaires. En effet, le type de sédiment, et la porosité associée, peuvent impacter sur les propriétés de diffusion des composés chimiques et rendre ainsi plus ou moins disponibles certains substrats pour les microorganismes. En revanche, d'un point de vue visuel, les sites Morelos et Vasconcelos BIG13 se ressemblent beaucoup. C'est la même espèce de vésicomyidés qui est retrouvée sur les deux sites et les individus sont dispersés de la même façon dans un sédiment mou, parsemé de nombreuses traces de déplacement et bordent un tapis microbien. Des différences dans la composition chimique des eaux interstitielles ont cependant été notées, puisque un maximum 9 mM de sulfures a été détecté à 7 cm sous la surface au niveau du site Morelos alors que le sulfure n'a pas été détecté au niveau du site Vasconcelos et ce, jusqu'à 20 cm sous la surface. En revanche, si la température augmente avec la profondeur au niveau du site Morelos (3,5°C à 10 cm, 5,3°C à 20 cm et jusqu'à 13°C à 55 cm sous la surface), elle reste peu différente de celle mesurée sur le site Vasconcelos, pour la profondeur de sédiments étudiée en microbiologie. Ainsi, la composition différente des fluides hydrothermaux et fluides associés aux suintements froids pourrait permettre le développement de colonisateurs de surface à première vue identiques mais modifier totalement les communautés microbiennes sédimentaires. Les résultats de séquençage nous permettront de mieux comprendre les différences observées en Q-PCR et en ARISA entre ces deux écosystèmes.

2) Perspectives de l'étude

Les travaux entrepris dans le cadre de ce travail de thèse ont permis de mieux connaître mais aussi de découvrir, dans le cas des sites inexplorés jusque-là, les communautés microbiennes qui colonisent les sédiments hydrothermaux ainsi que les suintements froids du Bassin de Guaymas. Les résultats obtenus permettent de mieux comprendre l'influence réciproque que peuvent avoir entre eux les communautés microbiennes sédimentaires, les caractéristiques physico-chimiques des sédiments et des fluides et les colonisateurs de surface au niveau de ces deux écosystèmes. Cette étude ouvre des perspectives de travail très intéressantes que ce soit à petite échelle, et réalisables sous peu, à moyenne échelle, et nécessitant un investissement plus important, ou envisageables à plus longs termes.

La première perspective est bien sûr l'obtention des résultats de séquençage de la zone hydrothermale du Bassin de Guaymas. Ces résultats permettront d'avoir une vue plus globale et plus détaillée de la diversité microbienne associée aux sédiments hydrothermaux, par rapport à celle détectée grâce aux techniques d'ARISA, de Q-PCR et de microscopie FISH. Les communautés microbiennes détectées pourront par exemple permettre de mieux comprendre les différences observées entre le site Morelos et tous les autres sites étudiés. En attente depuis le mois d'octobre 2013 à la plateforme génomique de Rennes, les échantillons ne devraient plus tarder à être séquencés et les résultats, à arriver sur nos ordinateurs. Par ailleurs, la zone hydrothermale correspondant au tapis microbien MegaMat, que nous avons étudié, a préalablement été échantillonnée par les équipes d'Andreas Teske lors de la campagne de 2009 dans le Bassin de Guaymas (A. Teske, communication personnelle). Une analyse comparative entre ces deux jeux de données pourrait ainsi ouvrir des perspectives intéressantes quant à l'évolution temporelle des communautés microbiennes au sein de ces environnements.

Une autre perspective directe de ce travail de thèse est l'étude à une échelle plus globale des habitats. Ce travail a déjà été initié, notamment dans le cadre de la thèse de Marie Portail (Laboratoire Environnements Profonds). Il s'agit alors de ne plus prendre uniquement en compte les organismes qui dominent visuellement les sites comme les vésicomyidés, les siboglinidés ou encore les tapis microbiens mais d'inclure tout le réseau trophique existant autour de la macrofaune qui colonise ces sites. Plusieurs études récentes témoignent des relations étroites qui peuvent exister entre macrofaune et communautés microbiennes sédimentaires. Il a notamment été montré que des polychètes *Ampharetidae* pourraient se nourrir des bactéries méthanotrophes présentes dans les sédiments (Sommer et al., 2010; Ruff et al., 2013). Par ailleurs, il a aussi été montré que les archées, et notamment celles qui constituent les agrégats AOM, pourraient constituer une source de nourriture pour certains *Dorvelleidae,* famille de polychètes qui a été retrouvée dans le Bassin de Guaymas. L'étude des structures des communautés de macrofaune et des réseaux trophiques du Bassin de Guaymas, mise en relation avec les structures des communautés microbiennes sédimentaires observées pourrait apporter des éléments de réponse très intéressants afin de mieux comprendre le fonctionnement complexe des écosystèmes hydrothermaux et de suintements froids dans les milieux marins profonds. Par ailleurs, poursuivre l'étude des fameuses structures formant les « poils » à la surface des gastéropodes pourrait aussi nous apporter des éléments de compréhension quant aux interactions faune / microorganismes. Il serait notamment intéressant de tenter une nouvelle extraction en réunissant plusieurs coquilles de gastéropodes puis de séquencer les éventuelles bactéries ou archées présentes. Essayer à nouveau de réaliser du FISH, avec des sondes ciblant les bactéries et les archées, sur ces gastéropodes pourrait aussi apporter des éléments de réponse, notamment grâce à l'utilisation de la nouvelle loupe binoculaire à épifluorescence récemment acquise par le laboratoire.

Ce travail pourrait aussi être envisagé en association avec la thèse de Marie Portail au Laboratoire Environnements Profonds.

Certains points soulignés dans le manuscrit mériteraient également d'être approfondis. Tout d'abord, la très grande proportion d'archées MBG-D détectées dans les sédiments associés aux vésicomyidés et aux siboglinidés n'a pas pu être confirmée par observation FISH et nous ne pouvons pas savoir si ce groupe microbien est actif dans les sédiments étudiés, avec les résultats obtenus. Il serait donc intéressant de tenter de mettre en évidence ces cellules par FISH. La sonde Thermoplasmatales proposée dans une autre étude (Schubert et al., 2011) n'a pour l'instant pas donné de bons résultats même à faible stringence. Une autre sonde ciblant plus spécifiquement les MBG-D a été dessinée par nos soins et testée sur nos sédiments mais n'a pour l'instant pas non plus donné de résultats concluants. Il pourrait être notamment intéressant de tester ces sondes en CARD-FISH. D'autres groupes qui semblent jouer un rôle important au sein des sédiments pourraient aussi être intéressants à observer en FISH, notamment les Chloroflexi Divisions 1 et 2, la division candidate JS-1, les DHVE-8, ou encore les GBG et le groupe des ANME-1 Guaymas. La visualisation de ces cellules permettrait de confirmer les premiers résultats obtenus et d'éventuellement mieux comprendre la distribution des communautés microbiennes. Il serait également intéressant de se focaliser sur la partie active des communautés microbiennes, au travers du séquençage de l'ARNr 16S et de gènes fonctionnels. En effet, toute notre étude, hormis la microscopie FISH, porte sur l'ADN, qui peut rester stable dans les sédiments anoxiques froids et peut perdurer longtemps après la mort des cellules(Willerslev and Cooper, 2005). Il est donc délicat de parler d'activité cellulaire simplement avec une étude portant sur l'ADN. L'ARN, en revanche, serait un témoin plus fiable d'une activité cellulaire récente, et notamment les ARN messagers (Nomura et al., 1984; Srivastava and Schlessinger, 1990). L'étude de la partie plus « active » des communautés microbiennes permettrait de mieux mettre en évidence quels sont réellement les microorganismes qui jouent un rôle clef dans l'environnement. La détection de l'expression de gènes fonctionnels, au travers des ARN messagers, pourrait permettre de mieux connaître les voies métaboliques intervenant à chaque horizon sédimentaire et dans chaque habitat, et ne plus émettre d'hypothèses basées uniquement sur les propriétés métaboliques de représentants cultivés plus ou moins proches phylogénétiquement parlant, ou en fonction des milieux où sont retrouvés les microorganismes. Il serait aussi possible d'utiliser la technique FISH en ciblant les ARN messagers en plus des ARNr 16S. Cela permettrait de savoir, en plus de l'identité taxonomique, quelles fonctions peuvent avoir les cellules observées. Au-delà des techniques moléculaires très largement utilisées dans cette thèse, il pourrait être intéressant de travailler sur des cultures et des enrichissements pour étudier les substrats potentiels utilisables par les différents groupes microbiens par l'intermédiaire, par exemple, d'expérimentations SIP (*Stable-Isotope Probing*) qui permettent de suivre l'incorporation d'un substrat marqué dans une culture cellulaire. Cette méthode peut aussi être couplée au FISH et au nanoSIMS (FISH-nanoSIMS – *Stable-Isotope Mass Spectrometry*). Cette combinaison de technologies permet de détecter l'incorporation d'un substrat spécifique (marqué, SIP, nanoSIMS) par une cellule dont l'affiliation est connue (FISH) au sein d'un échantillon complexe (Orphan et al., 2001; Neufeld et al., 2007; Dekas et al., 2009).

Concernant les communautés microbiennes impliquées dans l'AOM, un type d'agrégat particulier a été observé de façon récurrente, grâce à la technique FISH dans les sédiments associés au tapis microbien de la Marge de Sonora et son pourtour. Ces agrégats, de grande taille (généralement supérieure à 50 µm) présentaient une forme particulièrement sphérique (Figure 139) et les cellules qui le constituaient étaient marquées pour une partie avec la sonde bactérie (en vert sur la figure) et pour une autre partie avec la sonde archée (en orange sur la figure). Le point étonnant était que les cellules d'archées hybridaient à la fois avec les sondes spécifiques des ANME-1, ANME-2 et ANME-3, sans

différences d'intensité apparente, quelle que soit la stringence utilisée. Une de nos hypothèses était que ces archées pouvaient être les « *ANME-2 Sonora* », dont la séquence du gène codant l'ARNr 16S présentait des similarités entre les trois groupes d'ANME, mises en évidence durant la thèse d'Adrien Vigneron (Vigneron, 2012; Vigneron et al., 2013). Pour identifier ces agrégats étonnants, il aurait été intéressant de les isoler et de les séquencer, du moins en ce qui concerne le gène codant l'ARNr 16S. Pour cela, nous avions envisagé de tester la microdissection laser proposée par la société Zeiss (http: // microscopy.zeiss.com/microscopy /en_de/ products/ laser-microdissection .html). Malheureusement, l'appareil, qui devait être en démonstration aux journées organisées par Zeiss en juin 2013, n'a pas été présenté et cette étude a dû être repoussée.

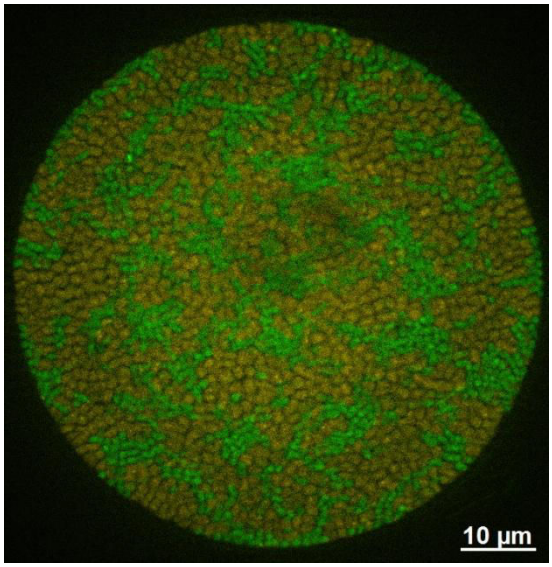


Figure 139 : Observation en FISH d'un agrégat sphérique d'archées (orange) et de bactéries (vert). Agrégat observé dans un échantillon de sédiments prélevés sous un tapis microbien de la Marge de Sonora.

En dehors de la microscopie à épifluorescence, un élément remarqué durant les observations réalisées en microscopie électronique à balayage a également retenu notre attention. En effet, nous avons observé de nombreux agrégats ressemblant fortement à des « *greigites framboïdes* » (Figure 140). Ces microstructures framboïdes ont approximativement la même taille et la même forme que les agrégats AOM observés dans nos sédiments. Ces structures, qui montraient en microanalyse de fortes proportions en soufre et en fer, seraient en fait des structures minérales (Bailey et al., 2010; Cavalazzi et al., 2012). Initialement, ces structures avaient été identifiées comme des fossiles de colonies microbiennes, pouvant être une trace éventuelle d'une activité AOM passée (Gong et al., 2008; Bailey et al., 2010). Elles seraient en réalité le résultat de processus diagénétiques sur des cristaux de pyrite ou de greigite (Bailey et al., 2010). Ces structures auraient pourtant un lien potentiel avec l'AOM (Bailey et al., 2010, Cavalazzi et al., 2012). Il serait intéressant d'approfondir un peu cette curiosité, notamment avec l'aide de géologues afin de mieux comprendre l'origine de ces structures et ce qu'elles peuvent nous apprendre sur le fonctionnement de l'AOM.

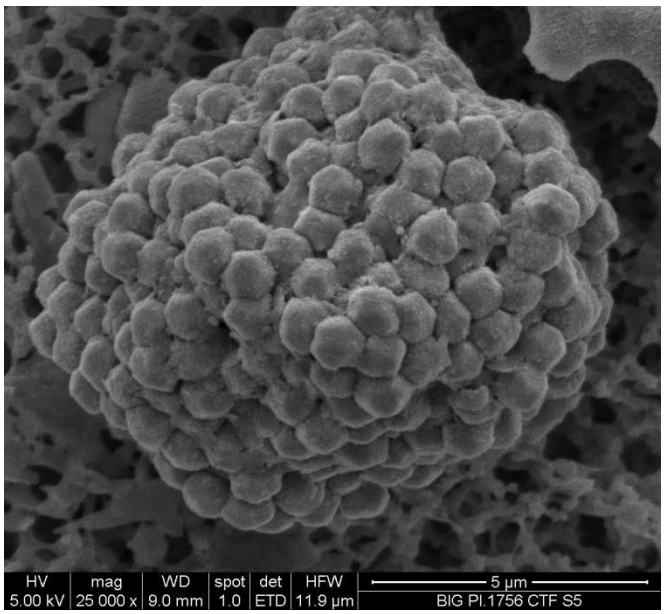


Figure 140 : Microstructures framboïdes observées en microscopie électronique à balayage. Agrégat observé dans un échantillon de sédiments prélevés sous un tapis microbien de la Marge de Sonora.

Enfin, à l'image de la macrofaune qui impacterait sur la distribution des communautés microbiennes sédimentaires, il serait aussi intéressant d'étudier les communautés fongiques associées aux sédiments du Bassin de Guaymas (Burgaud et al., 2009; Le Calvez et al., 2009; Nagahama et al., 2011) ou encore les eucaryotes unicellulaires comme les levures et la meiofaune (nématodes,

copépodes…). En effet, ces communautés pourraient aussi jouer un rôle important dans les sédiments marins (Orsi et al., 2013) et impacter sur la distribution des communautés microbiennes en modifiant notamment la disponibilité de certains substrats ou en dégradant des substrats complexes comme la lignine (Nagahama et al., 2011).

A plus grande échelle, d'autres campagnes pourraient permettre de nouvelles investigations. Dans le Bassin de Guaymas, elles pourraient faire suite à cette étude et pourraient non seulement permettre de réaliser des transects d'échantillonnage plus précis afin de mieux comprendre, par exemple, l'hétérogénéité de l'habitat Vasconcelos (échantillons prélevés dans les tapis, juste à la frontière des tapis et s'éloigner de plus en plus dans l'habitat caractérisé par la présence de vésicomyidés) mais aussi de poursuivre l'étude de l'évolution au cours du temps des assemblages de surface, des communautés microbiennes associées et des émissions de fluides froids et hydrothermaux. Ce type d'étude temporelle devient de plus en plus fréquent et permet de mieux comprendre la dynamique des écosystèmes marins profonds, à l'image du projet MoMAR qui s'intéresse notamment aux variations temporelles de la faune grâce à l'installation d'un observatoire de fond de mer enregistrant tout au long de l'année des photos et des vidéos de fonds marins ainsi que divers paramètres physico-chimiques de l'eau environnante.

D'autres campagnes permettraient aussi d'envisager d'autres types de prélèvements. Afin de mieux comprendre l'impact des caractéristiques des fluides, les concentrations en méthane, en sulfure ou encore la température des fluides sur les communautés microbiennes, il pourrait être envisagé de réaliser de « carottes-bioréacteurs » telles que celles développées par l'équipe de Peter Girguis (Wankel et al., 2012). Dans ce cas, les incubations sont faites directement sur les carottes de sédiments prélevées et permettent de reproduire l'environnement sédimentaire au plus proche de la réalité. Ce type de culture pourrait aussi permettre l'incorporation de molécules marquées (SIP) comme nous en avons discuté dans un des paragraphes précédents.

Enfin, un des points qu'il reste encore à élucider est de comprendre d'où viennent tous ces microorganismes. Si la macrofaune, comme les vésicomyidés, peut coloniser de nouveaux sites grâce à la dispersion larvaire et aux courants marins, comment des microorganismes anaérobies présents uniquement à plusieurs centimètres sous la surface du sédiment peuvent-ils se retrouver à des sites distants de plusieurs centaines de kilomètres ? Est-ce les fluides sortant des sédiments qui vont permettre la propagation des cellules présentes dans les couches de sédiment ; ces cellules pourraient, à l'image des larves, aller coloniser d'autres sites au gré des courants marins ? Existe-t-il des réservoirs profonds qui libéreraient des communautés microbiennes en dormance qui s'activeraient lorsque les conditions environnementales deviendraient adaptées ? Toutes les communautés microbiennes sont-elles présentes partout, en très petites quantités et se développeraient lorsque les conditions le permettraient ? Pour le savoir, il pourrait par exemple être envisagé de prélever des sédiments abyssaux, en dehors de toutes zones actives et de les soumettre, dans des bioréacteurs, à des flux de méthane puis d'analyser l'impact de ce changement d'environnement géochimique sur les communautés microbiennes présentes dans les sédiments prélevés. Il pourrait aussi être envisagé d'incuber ces sédiments sous flux de méthane, avec de l'eau de mer prélevée à proximité de suintements de méthane ou de sources hydrothermales, servant ainsi d'inoculum.

Pour conclure, il est important de retenir que la compréhension du fonctionnement global de ces écosystèmes complexes fait nécessairement intervenir des études pluridisciplinaires et une étroite collaboration entre microbiologistes, biologistes, chimistes ou encore géologues. Les échanges entre les différentes disciplines doivent avoir lieu tout au long de l'étude, non seulement lors des préparations de campagnes et lors de la préparation des plongées, en élaborant des plans

d’échantillonnage communs, mais aussi durant l’exploitation des données. Ce n’est qu’en fonctionnant de cette façon que nous pourrons progressivement reconstituer le puzzle complexe que forment ces environnements hors du commun.

Références bibliographiques

A

Aakra, A., Utåker, J., Pommerening-Röser, A., Koops, H.-P., and Nes, I.F. (2001a) Detailed phylogeny of ammonia-oxidizing bacteria determined by rDNA sequences and DNA homology values. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51: 2021-2030.

Aakra, Å., Utåker, J.B., and Nes, I.F. (2001b) Comparative phylogeny of the ammonia monooxygenase subunit A and 16S rRNA genes of ammonia-oxidizing bacteria. Fems Microbiology Letters 205: 237-242.

Acinas, S.G., Marcelino, L.A., Klepac-Ceraj, V., and Polz, M.F. (2004) Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple rrn operons. Journal of Bacteriology 186: 2629-2635.

Acosta-Martinez, V., Dowd, S.E., Sun, Y., Wester, D., and Allen, V. (2010) Pyrosequencing analysis for characterization of soil bacterial populations as affected by an integrated livestock-cotton production system. Applied Soil Ecology 45: 13-25.

Adler, C.J., Dobney, K., Weyrich, L.S., Kaidonis, J., Walker, A.W., Haak, W. et al. (2013) Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. Nature genetics.

Alain, K., Holler, T., Musat, F., Elvert, M., Treude, T., and Krüger, M. (2006) Microbiological investigation of methane-and hydrocarbon-discharging mud volcanoes in the Carpathian Mountains, Romania. Environmental Microbiology 8: 574-590.

Alain, K., Postec, A., Grinsard, E., Lesongeur, F., Prieur, D., and Godfroy, A. (2010) Thermodesulfatator atlanticus sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60: 33-38.

Albers, S.-V., and Meyer, B.H. (2011) The archaeal cell envelope. Nature Reviews Microbiology 9: 414-426.

Allen, J. (1998) Suspension feeding in the brittle-star Ophiothrix fragilis: efficiency of particle retention and implications for the use of encounter-rate models. Marine Biology 132: 383-390.

Allison, P.A., Smith, C.R., Kukert, H., Deming, J.W., and Bennett, B.A. (1991) Deep-water taphonomy of vertebrate carcasses: a whale skeleton in the bathyal Santa Catalina Basin. Paleobiology: 78-89.

Alonso-Sáez, L., Waller, A.S., Mende, D.R., Bakker, K., Farnelid, H., Yager, P.L. et al. (2012) Role for urea in nitrification by polar marine Archaea. Proceedings of the National Academy of Sciences 109: 17989-17994.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215: 403-410.

Altshuler, D., Pollara, V.J., Cowles, C.R., Van Etten, W.J., Baldwin, J., Linton, L., and Lander, E.S. (2000) An SNP map of the human genome generated by reduced representation shotgun sequencing. Nature 407: 513-516.

Amann, R., and Fuchs, B.M. (2008) Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. Nature Reviews Microbiology 6: 339-348.

Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews 59: 143-169.

Anthony, C. (1982) The biochemistry of methylotrophs.

Aronson, R.B., and Harms, C.A. (1985) Ophiuroids in a Bahamian saltwater lake: the ecology of a Paleozoic-like community. Ecology: 1472-1483.

Arp, A.J., and Childress, J.J. (1983) Sulfide binding by the blood of the hydrothermal vent tube worm Riftia pachyptila. Science 219: 295-297.

Arp, A.J., Childress, J.J., and Fisher, C.R. (1984) Metabolic and blood-gas transport characteristics of the hydrothermal vent bivalve Calyptogena magnifica. Physiological Zoology 57: 648-662.

Audzijonyte, A., Krylova, E.M., Sahling, H., and Vrijenhoek, R.C. (2012) Molecular taxonomy reveals broad trans-oceanic distributions and high species diversity of deep-sea clams (Bivalvia:

Vesicomyidae: Pliocardiinae) in chemosynthetic environments. Systematics and Biodiversity 10: 403-415.

B

Badger, M.R., and Bek, E.J. (2008) Multiple Rubisco forms in proteobacteria: their functional significance in relation to CO2 acquisition by the CBB cycle. Journal of Experimental Botany 59: 1525-1541.

Bailey, J.V., Raub, T.D., Meckler, A.N., Harrison, B.K., Raub, T.M.D., Green, A.M., and Orphan, V.J. (2010) Pseudofossils in relict methane seep carbonates resemble endemic microbial consortia. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 285: 131-142.

Bailey, J.V., Salman, V., Rouse, G.W., Schulz-Vogt, H.N., Levin, L.A., and Orphan, V.J. (2011) Dimorphism in methane seep-dwelling ecotypes of the largest known bacteria. Isme Journal 5: 1926-1935.

Bak, F., and Pfennig, N. (1987) Chemolithotrophic growth of Desulfovibrio sulfodismutans sp. nov. by disproportionation of inorganic sulfur compounds. Archives of Microbiology 147: 184-189.

Baker, G.C., Smith, J.J., and Cowan, D.A. (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. Journal of Microbiological Methods 55: 541-555.

Baret, J.C., Tally, V., Ryckelynck, M., Merten, C.A., and Griffiths, A.D. (2009) Droplets and emulsions: very high-throughput screening in biology. M S-Medecine Sciences 25: 627-632.

Bar-Even, A., Noor, E., Lewis, N.E., and Milo, R. (2010) Design and analysis of synthetic carbon fixation pathways. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107: 8889-8894.

Barns, S.M., Delwiche, C.F., Palmer, J.D., and Pace, N.R. (1996) Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. Proc Natl Acad Sci USA 93: 9188-9193.

Barry, J.P., and Kochevar, R.E. (1998) A tale of two clams: differing chemosynthetic life styles among vesicomyids in Monterey Bay cold seeps. Cahiers De Biologie Marine 39: 329-331.

Barry, J.P., Kochevar, R.E., and Baxter, C.H. (1997) The influence of pore-water chemistry and physiology on the distribution of vesicomyid clams at cold seeps in Monterey Bay: Implications for patterns of chemosynthetic community organization. Limnology and Oceanography 42: 318-328.

Bavykin, S.G., Lysov, Y.P., Zakhariev, V., Kelly, J.J., Jackman, J., Stahl, D.A., and Cherni, A. (2004) Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and gyrB gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of Bacillus cereus group microorganisms. Journal of Clinical Microbiology 42: 3711-3730.

Bazylinski, D.A., Farrington, J.W., and Jannasch, H.W. (1988) Hydrocarbons in surface sediments from a Guaymas Basin hydrothermal vent site. Organic geochemistry 12: 547-558.

Beal, E.J., House, C.H., and Orphan, V.J. (2009) Manganese- and Iron-Dependent Marine Methane Oxidation. Science 325: 184-187.

Becker, K., Harmsen, D., Mellmann, A., Meier, C., Schumann, P., Peters, G., and von Eiff, C. (2004) Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of Staphylococcus species. Journal of Clinical Microbiology 42: 4988-4995.

Beebe, W. (1931) A round trip to Davy Jones' locker. Natl Geogr Mag 59: 653-678.

Behrens, S., Fuchs, B.M., Mueller, F., and Amann, R. (2003a) Is the in situ accessibility of the 16S rRNA of Escherichia coli for Cy3-labeled oligonucleotide probes predicted by a three-dimensional structure model of the 30S ribosomal subunit? Applied and Environmental Microbiology 69: 4935-4941.

Behrens, S., Rühland, C., Inácio, J., Huber, H., Fonseca, A., Spencer-Martins, I. et al. (2003b) In situ accessibility of small-subunit rRNA of members of the domains Bacteria, Archaea, and Eucarya to Cy3-labeled oligonucleotide probes. Applied and Environmental Microbiology 69: 1748-1758.

Berg, I.A., Kockelkorn, D., Buckel, W., and Fuchs, G. (2007) A 3-hydroxypropionate/4-

hydroxybutyrate autotrophic carbon dioxide assimilation pathway in archaea. Science 318: 1782-1786.

Berner, R.A. (1982) Burial of organic carbon and pyrite sulfur in the modern ocean: its geochemical and environmental significance. Am J Sci 282: 451-473.

Biddle, J.F., Cardman, Z., Mendlovitz, H., Albert, D.B., Lloyd, K.G., Boetius, A., and Teske, A. (2012) Anaerobic oxidation of methane at different temperature regimes in Guaymas Basin hydrothermal sediments. Isme Journal 6: 1018-1031.

Biddle, J.F., Lipp, J.S., Lever, M.A., Lloyd, K.G., Sørensen, K.B., Anderson, R. et al. (2006) Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 3846-3851.

Binder, B.J., and Liu, Y.C. (1998) Growth Rate Regulation of rRNA Content of a Marine Synechococcus (Cyanobacterium) Strain. Applied and Environmental Microbiology 64: 3346-3351.

Binladen, J., Gilbert, M.T.P., Bollback, J.P., Panitz, F., Bendixen, C., Nielsen, R., and Willerslev, E. (2007) The Use of Coded PCR Primers Enables High-Throughput Sequencing of Multiple Homolog Amplification Products by 454 Parallel Sequencing. Plos One 2.

Björnsson, L., Hugenholtz, P., Tyson, G.W., and Blackall, L.L. (2002) Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. Microbiology 148: 2309-2318.

Blankenship, R.E. (2008) Molecular mechanisms of photosynthesis: Wiley. com.

Blöchl, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H.W., and Stetter, K.O. (1997) Pyrolobus fumarii, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 C. Extremophiles 1: 14-21.

Bobrow, M.N., Harris, T.D., Shaughnessy, K.J., and Litt, G.J. (1989) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification application to immunoassays. Journal of immunological methods 125: 279-285.

Boetius, A. (2005) Microfauna–macrofauna interaction in the seafloor: lessons from the tubeworm. PLoS biology 3: e102.

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

Borrel, G., Lehours, A.-C., Crouzet, O., Jézéquel, D., Rockne, K., Kulczak, A. et al. (2012) Stratification of Archaea in the Deep Sediments of a Freshwater Meromictic Lake: Vertical Shift from Methanogenic to Uncultured Archaeal Lineages. Plos One 7: e43346.

Bowles, M.W., Samarkin, V.A., Bowles, K.M., and Joye, S.B. (2011) Weak coupling between sulfate reduction and the anaerobic oxidation of methane in methane-rich seafloor sediments during< i> ex situ</i> incubation. Geochimica Et Cosmochimica Acta 75: 500-519.

Bright, M., Keckeis, H., and Fisher, C. (2000) An autoradiographic examination of carbon fixation, transfer and utilization in the Riftia pachyptila symbiosis. Marine Biology 136: 621-632.

Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., and Forterre, P. (2008) Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. Nat Rev Microbiol 6: 245-252.

Brochier-Armanet, C., Gribaldo, S., and Forterre, P. (2012) Spotlight on the Thaumarchaeota. Isme Journal 6: 227-230.

Brodin, J., Mild, M., Hedskog, C., Sherwood, E., Leitner, T., Andersson, B., and Albert, J. (2013) PCR-Induced Transitions Are the Major Source of Error in Cleaned Ultra-Deep Pyrosequencing Data. Plos One 8: e70388.

Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J., and Noller, H.F. (1978) Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene form Escherichia coli. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 75: 4801-4805.

Bruns, A., Rohde, M., and Berthe-Corti, L. (2001) Muricauda ruestringensis gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, appendaged bacterium from German North Sea intertidal sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51: 1997-2006.

Bruun, A.F. (1957) Deep sea and abyssal depths. Geological Society of America Memoirs 67: 641-673.

Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R.H., Uroz, S., and Martin, F. (2009) 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. New Phytologist 184: 449-456.

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

Burggraf, S., Jannasch, H.W., Nicolaus, B., and Stetter, K.O. (1990) Archaeoglobus profundus sp. nov., Represents a New Species within the Sulfate-reducing Archaebacteria. Systematic and Applied Microbiology 13: 24-28.

Burggraf, S., Mayer, T., Amann, R., Schadhauser, S., Woese, C.R., and Stetter, K.O. (1994) Identifying members of the domain Archaea with rRNA-targeted oligonucleotide probes. Applied and Environmental Microbiology 60: 3112-3119.

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

C

Callen, J.-C., and Perasso, R. (2005) Biologie cellulaire - Des molécules aux organismes. DUNOD 2ème édition.

Cambon-Bonavita, M.A., Nadalig, T., Roussel, E., Delage, E., Duperron, S., Caprais, J.C. et al. (2009) Diversity and distribution of methane-oxidizing microbial communities associated with different faunal assemblages in a giant pockmark of the Gabon continental margin. Deep-Sea Research Part Ii-Topical Studies in Oceanography 56: 2248-2258.

Canfield, D.E. (2004) The evolution of the Earth surface sulfur reservoir. American Journal of Science 304: 839-861.

Cary, S., and Giovannoni, S. (1993) Transovarial inheritance of endosymbiotic bacteria in clams inhabiting deep-sea hydrothermal vents and cold seeps. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90: 5695 - 5699.

Case, R.J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W.F., and Kjelleberg, S. (2007) Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. Applied and Environmental Microbiology 73: 278-288.

Cavalazzi, B., Barbieri, R., Cady, S.L., George, A.D., Gennaro, S., Westall, F. et al. (2012) Iron-framboids in the hydrocarbon-related Middle Devonian Hollard Mound of the Anti-Atlas mountain range in Morocco: Evidence of potential microbial biosignatures. Sedimentary Geology 263: 183-193.

Cavanaugh, C.M., Gardiner, S.L., Jones, M.L., Jannasch, H.W., and Waterbury, J.B. (1981) Prokaryotic cells in the hydrothermal vent tube worm Rftia pachyptila Jones : possible chemoautotrophic symbionts. Science 213: 340-342.

Cavanaugh, C.M. (1983) Symbiotic chemoautotrophic bacteria in marine-invertebrates from sulphid-rich habitats. Nature 302: 58-61.

Cavanaugh, C.M. (1985) Symbioses of chemoautotrophic bacteria and marine invertebrates from hydrothermal vents and reducing sediments. Bulletin of the Biological Society of Washington: 373-388.

Cavicchioli, R. (2010) Archaea—timeline of the third domain. Nature Reviews Microbiology 9: 51-61.

Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., and Alland, D. (2007) A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. Journal of Microbiological Methods 69: 330-339.

Childress, J., and Girguis, P. (2011) The metabolic demands of endosymbiotic chemoautotrophic metabolism on host physiological capacities. The Journal of experimental biology 214: 312-325.

Childress, J., Fisher, C., Favuzzi, J., and Sanders, N. (1991a) Sulfide and carbon dioxide uptake by the hydrothermal vent clam, Calyptogena magnifica and its chemoautotrophic symbionts. Physiol Zool 64: 1444 - 1470.

Childress, J., Fisher, C., Favuzzi, J., Kochevar, R., Sanders, N., and Alayse, A. (1991b) Sulfide-driven autotrophic balance in the bacterial symbiont-containing hydrothermal vent tubeworm, Riftia pachyptila Jones. The Biological Bulletin 180: 135-153.

Childress, J.J., Felbeck, H., and Somero, G.N. (1987) Symbiosis in the deep sea. Scientific American 256: 115-120.

Childress, J.J., Fisher, C.R., Favuzzi, J.A., Arp, A.J., and Oros, D.R. (1993) The role of a zinc-based, serum-borne sulfide-binding component in the uptake and transport of dissolved sulfide by the chemoautotrophic symbiont-containing clam Calyptogena elongata. Journal of Experimental Biology 179: 131-158.

Choi, B.K., Wyss, C., and Gobel, U.B. (1996) Phylogenetic analysis of pathogen-related oral spirochetes. Journal of Clinical Microbiology 34: 1922-1925.

Claesson, M.J., O'Sullivan, O., Wang, Q., Nikkilae, J., Marchesi, J.R., Smidt, H. et al. (2009) Comparative Analysis of Pyrosequencing and a Phylogenetic Microarray for Exploring Microbial Community Structures in the Human Distal Intestine. Plos One 4.

Conway, N.M., Howes, B.L., Capuzzo, J.E.M., Turner, R.D., and Cavanaugh, C.M. (1992) Characterization and site description of Solemya borealis (Bivalvia; Solemyidae), another bivalve-bacteria symbiosis. Marine Biology 112: 601-613.

Coolen, M.J.L., Cypionka, H., Sass, A.M., Sass, H., and Overmann, J. (2002) Ongoing modification of Mediterranean Pleistocene sapropels mediated by prokaryotes. Science 296: 2407-2410.

Cooper, G.M. (1999) La cellule - Une approche moléculaire. De Boeck Université.

Cordes, E.E., Arthur, M.A., Shea, K., Arvidson, R.S., and Fisher, C.R. (2005) Modeling the mutualistic interactions between tubeworms and microbial consortia. PLoS biology 3: e77.

Corliss, J.B., and Ballard, R.D. (1977) Oases of life in cold abyss. National Geographic 152: 441-453.

Corliss, J.B., Dymond, J., Gordon, L.I., Edmond, J.M., Herzen, R.P.V., Ballard, R.D. et al. (1979) Submarine thermal springs on the Galapagos rift. Science 203: 1073-1083.

Crosby, L.D., and Criddle, C.S. (2003) Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrn operon copy number heterogeneity. Biotechniques 34: 790-803.

D

Dang, H., Luan, X.-W., Chen, R., Zhang, X., Guo, L., and Klotz, M.G. (2010) Diversity, abundance and distribution of amoA-encoding archaea in deep-sea methane seep sediments of the Okhotsk Sea. Fems Microbiology Ecology 72: 370-385.

Dattagupta, S., Miles, L.L., Barnabei, M.S., and Fisher, C.R. (2006) The hydrocarbon seep tubeworm Lamellibrachia luymesi primarily eliminates sulfate and hydrogen ions across its roots to conserve energy and ensure sulfide supply. Journal of Experimental Biology 209: 3795-3805.

Davoult, D., and Gounin, F. (1995) Suspension-feeding activity of a dense Ophiothrix fragilis (Abildgaard) population at the water-sediment interface: Time coupling of food availability and feeding behaviour of the species. Estuarine, Coastal and Shelf Science 41: 567-577.

Dean, J. (1999) What makes an ophiuroid? A morphological study of the problematic Ordovician stelleroid Stenaster and the palaeobiology of the earliest asteroids and ophiuroids. Zoological Journal of the Linnean Society 126: 225-250.

Decker, C. (2011) Diversité, écologie et adaptation des bivalves Vesicomyidae associés aux environnements réducteurs profonds des marges continentales. Thèse.

Decker, C., Olu, K., Cunha, R.L., and Arnaud-Haond, S. (2012) Phylogeny and Diversification Patterns among Vesicomyid Bivalves. Plos One 7.

Dekas, A.E., Poretsky, R.S., and Orphan, V.J. (2009) Deep-Sea Archaea Fix and Share Nitrogen in Methane-Consuming Microbial Consortia. Science 326: 422-426.

DeLong, E.F., and Pace, N.R. (2001) Environmental diversity of bacteria and archaea. Systematic Biology 50: 470-478.

DeLong, E.F., Taylor, L.T., Marsh, T.L., and Preston, C.M. (1999) Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and

bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. Applied and Environmental Microbiology 65: 5554-5563.

DeLong, E.F., Wickham, G.S., and Pace, N.R. (1989) Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. Science 243: 1360-1363.

Dercourt, J., Paquet, J., Thomas, P., and Langlois, C. (2006) Géologie : Objets, méthodes et modèles. DUNOD 12ème édition.

Dhillon, A., Lever, M., Lloyd, K.G., Albert, D.B., Sogin, M.L., and Teske, A. (2005) Methanogen diversity evidenced by molecular characterization of methyl coenzyme M reductase A (mcrA) genes in hydrothermal sediments of the Guaymas Basin. Applied and Environmental Microbiology 71: 4592-4601.

Dhillon, A., Teske, A., Dillon, J., Stahl, D.A., and Sogin, M.L. (2003) Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin. Applied and Environmental Microbiology 69: 2765-2772.

Di Meo, C.A., Wilbur, A.E., Holben, W.E., Feldman, R.A., Vrijenhoek, R.C., and Cary, S.C. (2000) Genetic variation among endosymbionts of widely distributed vestimentiferan tubeworms. Applied and Environmental Microbiology 66: 651-658.

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

Dojka, M.A., Hugenholtz, P., Haack, S.K., and Pace, N.R. (1998) Microbial diversity in a hydrocarbon-and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. Applied and Environmental Microbiology 64: 3869-3877.

Dolinšek, J., Lagkouvardos, I., Wanek, W., Wagner, M., and Daims, H. (2013) Interactions of Nitrifying Bacteria and Heterotrophs: Identification of a Micavibrio-Like Putative Predator of Nitrospira spp. Applied and Environmental Microbiology 79: 2027-2037.

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

Duperron, S., Nadalig, T., Caprais, J.C., Sibuet, M., Fiala-Medioni, A., Amann, R., and Dubilier, N. (2005) Dual symbiosis in a Bathymodiolus sp mussel from a methane seep on the gabon continental margin (southeast Atlantic): 16S rRNA phylogeny and distribution of the symbionts in gills. Applied and Environmental Microbiology 71: 1694-1700.

Durand, L., Roumagnac, M., Cueff-Gauchard, V., Jan, C., Guri, M., Tessier, C. et al. (in prep) Biogeographical distribution of Rimicaris exoculata epibiont communities along the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent sites.

Durand, L., Zbinden, M., Cueff-Gauchard, V., Duperron, S., Roussel, E.G., Shillito, B., and Cambon-Bonavita, M.A. (2009) Microbial diversity associated with the hydrothermal shrimp Rimicaris exoculata gut and occurrence of a resident microbial community. Fems Microbiology Ecology 71: 291-303.

Durbin, A.M., and Teske, A. (2011) Microbial diversity and stratification of South Pacific abyssal marine sediments. Environmental Microbiology 13: 3219-3234.

E

Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., and Knight, R. (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics 27: 2194-2200.

Edmond, J.M., Von Damm, K., and McDuff, R. (1982) Chemistry of hot springs on the East Pacific Rise and their effluent dispersal.

Eller, G., Känel, L., and Krüger, M. (2005) Cooccurrence of aerobic and anaerobic methane oxidation in the water column of Lake Plußsee. Applied and Environmental Microbiology 71: 8925-8928.

Elsgaard, L., Isaksen, M.F., Jorgensen, B.B., Alayse, A.M., and Jannasch, H.W. (1994) Microbial sulfate reduction in deep-sea sediments at the Guaymas basin hydrothermal vent area : influence of temperature and substrates. Geochimica Et Cosmochimica Acta 58: 3335-3343.

Emerson, D., Rentz, J.A., Lilburn, T.G., Davis, R.E., Aldrich, H., Chan, C., and Moyer, C.L. (2007) A Novel Lineage of Proteobacteria Involved in Formation of Marine Fe-Oxidizing Microbial Mat Communities. Plos One 2: e667.

Endow, K., and Ohta, S. (1990) Occurrence of bacteria in the primary oocytes of vesicomyid clam Calyptogena soyoae. Marine Ecology-Progress Series 64: 309-311.

Engelen, B., and Cypionka, H. (2009) The subsurface of tidal-flat sediments as a model for the deep biosphere. Ocean Dynamics 59: 385-391.

Enrich-Prast, A., and Crill, P. (2009) Chemosynthesis.

Erauso, G., Reysenbach, A.L., Godfroy, A., Meunier, J.R., Crump, B., Partensky, F. et al. (1993) Pyrococcus abyssi sp-nov, a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. Archives of Microbiology 160: 338-349.

Ettwig, K.F., Butler, M.K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M.M. et al. (2010) Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. Nature 464: 543-548.

Ettwig, K.F., van Alen, T., van de Pas-Schoonen, K.T., Jetten, M.S., and Strous, M. (2009) Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum. Applied and Environmental Microbiology 75: 3656-3662.

Evans, M.C.W., Buchanan, B.B., and Arnon, D.I. (1966) A new ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 55: 928-&.

F

Fabri, M.-C., Bargain, A., Briand, P., Gebruk, A., Fouquet, Y., Morineaux, M., and Desbruyeres, D. (2011) The hydrothermal vent community of a new deep-sea field, Ashadze-1, 12 58'N on the Mid-Atlantic Ridge. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 91: 1-13.

Fan, L.-F., Tang, S.-L., Chen, C.-P., and Hsieh, H.-L. (2012) Diversity and composition of sulfate-and sulfite-reducing prokaryotes as affected by marine-freshwater gradient and sulfate availability. Microbial Ecology 63: 224-237.

Fang, Q., Brockmann, S., Botzenhart, K., and Wiedenmann, A. (2003) Improved detection of Salmonella spp. in foods by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA probes: a comparison with conventional culture methods. Journal of Food Protection® 66: 723-731.

Fauque, G.D., and Barton, L.L. (2012) Hemoproteins in Dissimilatory Sulfate-and Sulfur-Reducing Prokaryotes. Advances in microbial physiology 60: 2.

Felbeck, H., Childress, J.J., and Somero, G.N. (1981) Calvin-Benson cycle and sulfide oxidation enzymes in animals from sulfide-rich habitats. Nature 293: 291-293.

Ferry, J.G., and Lessner, D.J. (2008) Methanogenesis in marine sediments. Annals of the New York Academy of Sciences 1125: 147-157.

Fiala-Médioni, A. (1984) Mise en évidence par microscopie électronique à transmission de l'abondance de bactéries symbiotiques dans la branchie de Mollusques bivalves de sources hydrothermales profondes. Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences Série 3, Sciences de la vie 298: 487-492.

Fiala-Medioni, A., and Felbeck, H. (1990) Autotrophic processes in invertebrate nutrition: bacterial symbiosis in bivalve molluscs. Comp Physiol 5: 49-69.

Fiala-Médioni, A., and LePennec, M. (1988) Structural adaptations in the gill of the japanese subduction zone bivalves (vesicomyidae) calyptogena-phaseoliformis and calyptogena-laubieri. Oceanologica acta 11: 185-192.

Fiala-Médioni, A., and Lepennec, M. (1989) Adaptative features of the bivalve mollusks associated with fluid venting in the subduction zones off Japan. Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology 71: 161-167.

Fiala-Médioni, A., and Métivier, C. (1986) Ultrastructure of the gill of the hydrothermal vent bivalve Calyptogena magnifica, with a discussion of its nutrition. Marine Biology 90: 215-222.

Finster, K. (2008) Microbiological disproportionation of inorganic sulfur compounds. Journal of Sulfur Chemistry 29: 281-292.

Fischer, D., Sahling, H., Nöthen, K., Bohrmann, G., Zabel, M., and Kasten, S. (2012) Interaction between hydrocarbon seepage, chemosynthetic communities, and bottom water redox at cold seeps of the Makran accretionary prism: insights from habitat-specific pore water sampling and modeling. Biogeosciences 9: 2013-2031.

Fisher, C. (1990) Chemoautotrophic and methanotrophic symbioses in marine invertebrates. Rev Aquat Sci 2: 399-436.

Fisher, C.R., Childress, J.J., Arp, A.J., Brooks, J.M., Distel, D.L., Dugan, J.A. et al. (1988) Variation in the hydrothermal vent clam, Calyptogen magnifica, at the Rose Garden vent on the Galapagos spreading center. Deep Sea Research Part A Oceanographic Research Papers 35: 1811-1831.

Fisher, M.M., and Triplett, E.W. (1999) Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. Applied and Environmental Microbiology 65: 4630-4636.

Flores, J.F., Fisher, C.R., Carney, S.L., Green, B.N., Freytag, J.K., Schaeffer, S.W., and Royer, W.E. (2005) Sulfide binding is mediated by zinc ions discovered in the crystal structure of a hydrothermal vent tubeworm hemoglobin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102: 2713-2718.

Fornari, D.J., and Embley, R.W. (1995) Tectonic and volcanic controls on hydrothermal processes at the mid-ocean ridge: An overview based on near-bottom and submersible studies. Geophysical Monograph Series 91: 1-46.

Freitas, S., Hatosy, S., Fuhrman, J.A., Huse, S.M., Welch, D.B.M., Sogin, M.L., and Martiny, A.C. (2012) Global distribution and diversity of marine Verrucomicrobia. The ISME journal 6: 1499-1505.

Frenzel, P., Thebrath, B., and Conrad, R. (1990) Oxidation of methane in the oxic surface layer of a deep lake sediment (Lake Constance). Fems Microbiology Letters 73: 149-158.

Freytag, J.K., Girguis, P.R., Bergquist, D.C., Andras, J.P., Childress, J.J., and Fisher, C.R. (2001) A paradox resolved: sulfide acquisition by roots of seep tubeworms sustains net chemoautotrophy. Proceedings of the National Academy of Sciences 98: 13408-13413.

Friend, J.P. (1973) The global sulfur cycle. In Chemistry of the lower atmosphere: Springer, pp. 177-201.

Fuchs, B.M., Glöckner, F.O., Wulf, J., and Amann, R. (2000) Unlabeled helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. Applied and Environmental Microbiology 66: 3603-3607.

Fuchs, B.M., Wallner, G., Beisker, W., Schwippl, I., Ludwig, W., and Amann, R. (1998) Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of Escherichia coli 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. Applied and Environmental Microbiology 64: 4973-4982.

G

Gage, J.D., and Tyler, P.A. (1991) Deep-sea biology: a natural history of organisms at the deep-sea floor: Cambridge University Press.

Galan, M., Guivier, E., Caraux, G., Charbonnel, N., and Cosson, J.F. (2010) A 454 multiplex sequencing method for rapid and reliable genotyping of highly polymorphic genes in large-scale studies. Bmc Genomics 11.

Garrity, G.M., and Holt, J.G. (2001) Phylum BIII. Thermodesulfobacteria phy. nov. In Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Springer, pp. 389-393.

Germain, G., Mari, R., and Burnel, D. (2001) Chimie Générale. Ed MASSON.

Goetz, F.E., and Jannasch, H.W. (1993) Aromatic hydrocarbon degrading bacteria in the petroleum rich sediments of the Guaymas basin hydrothermal vent site preference for aromatic carboxylic acids. Geomicrobiology Journal 11: 1-18.

Goffredi, S., Hurtado, L., Hallam, S., and Vrijenhoek, R. (2003) Evolutionary relationships of deep-sea vent and cold seep clams (Mollusca: Vesicomyidae) of the "pacifica/lepta" species complex. Marine Biology 142: 311 - 320.

Goffredi, S.K., and Barry, J.P. (2002) Species-specific variation in sulfide physiology between closely related Vesicomyid clams. Marine Ecology-Progress Series 225: 227-238.

Goffredi, S.K., and Orphan, V.J. (2010) Bacterial community shifts in taxa and diversity in response to localized organic loading in the deep sea. Environmental Microbiology 12: 344-363.

Gong, Y.-M., Shi, G.R., Weldon, E.A., Du, Y.-S., and Xu, R. (2008) Pyrite framboids interpreted as microbial colonies within the Permian Zoophycos spreiten from southeastern Australia. Geological Magazine 145: 95.

Grabowski, B., and Kelman, Z. (2003) Archaeal DNA replication: eukaryal proteins in a bacterial context. Annual Reviews in Microbiology 57: 487-516.

Gregory, R.P.F. (1989) Biochemistry of photosynthesis: John Wiley & Sons.

Grünke, S., Felden, J., Lichtschlag, A., Girnth, A.C., De Beer, D., Wenzhoefer, F., and Boetius, A. (2011) Niche differentiation among mat-forming, sulfide-oxidizing bacteria at cold seeps of the Nile Deep Sea Fan (Eastern Mediterranean Sea). Geobiology 9: 330-348.

Grünke, S., Lichtschlag, A., de Beer, D., Kuypers, M., Loesekann-Behrens, T., Ramette, A., and Boetius, A. (2010) Novel observations of Thiobacterium, a sulfur-storing Gammaproteobacterium producing gelatinous mats. Isme Journal 4: 1031-1043.

H

Haas, B.J., Gevers, D., Earl, A.M., Feldgarden, M., Ward, D.V., and Giannoukos, G. (2011) Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. Genome Res 21: 494-504.

Hageage, G.J., Jr., Eanes, E.D., and Gherna, R.L. (1970) X-ray diffraction studies of the sulfur globules accumulated by Chromatium species. Journal of Bacteriology 101: 464-469.

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

Hallam, S.J., Putnam, N., Preston, C.M., Detter, J.C., Rokhsar, D., Richardson, P.M., and DeLong, E.F. (2004) Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics. Science 305: 1457-1462.

Hannington, M.D., Jonasson, I.R., Herzig, P.M., and Petersen, S. (1995) Physical and Chemical Processes of Seafloor Mineralization at Mid-Ocean Ridges. Seafloor hydrothermal systems: Physical, chemical, biological, and geological interactions: 115-157.

Hargrave, B.T. (1969) Similarity of oxygen uptake by benthic communities. Limnol Oceanogr 14: 801-805.

Haroon, M.F., Hu, S., Shi, Y., Imelfort, M., Keller, J., Hugenholtz, P. et al. (2013) Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage. Nature 500: 567-570.

Harris, J.K., Kelley, S.T., and Pace, N.R. (2004) New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP11. Applied and Environmental Microbiology 70: 845-849.

Harrison, B.K., Zhang, H., Berelson, W., and Orphan, V.J. (2009) Variations in archaeal and bacterial diversity associated with the sulfate-methane transition zone in continental margin sediments (Santa Barbara Basin, California). Applied and Environmental Microbiology 75: 1487-1499.

Hebert, P.D., Ratnasingham, S., and de Waard, J.R. (2003a) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences 270: S96-S99.

Hebert, P.D., Cywinska, A., and Ball, S.L. (2003b) Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences 270: 313-321.

Hecker, B. (1985) Fauna from a cold sulfur-seep in the Gulf of Mexico: comparison with hydrothermal vent communities and evolutionary implications. Bulletin of the Biological Society of Washington: 465-473.

Heijs, S.K., Damste, J.S.S., and Forney, L.J. (2005) Characterization of a deep-sea microbial mat from an active cold seep at the Milano mud volcano in

the Eastern Mediterranean Sea. Fems Microbiology Ecology 54: 47-56.

Hennen, G. (2002) Biochimie. DUNOD 3ème édition.

Hentscher, M., and Bach, W. (2012) Geochemically induced shifts in catabolic energy yields explain past ecological changes of diffuse vents in the East Pacific Rise 9° 50'N area. Geochemical transactions 13: 2.

Herbert, R. (1999) Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. Fems Microbiology Reviews 23: 563-590.

Herter, S., Fuchs, G., Bacher, A., and Eisenreich, W. (2002) A bicyclic autotrophic CO2 fixation pathway in Chloroflexus aurantiacus. Journal of Biological Chemistry 277: 20277-20283.

Hessler, R., and Smithey Jr, W. (1983) The distribution and community structure of megafauna at the Galapagos Rift hydrothermal vents. Hydrothermal processes at seafloor spreading centers: 735-770.

Hinrichs, K., and Boetius, A. (2002) The anaerobic oxidation of methane: new insights in microbial ecology and biogeochemistry. Ocean margin systems: 457-477.

Hinrichs, K.U., Hayes, J.M., Sylva, S.P., Brewer, P.G., and DeLong, E.F. (1999) Methane-consuming archaebacteria in marine sediments. Nature 398: 802-805.

Holler, T., Widdel, F., Knittel, K., Amann, R., Kellermann, M.Y., Hinrichs, K.-U. et al. (2011) Thermophilic anaerobic oxidation of methane by marine microbial consortia. The ISME journal 5: 1946-1956.

Hollister, E.B., Engledow, A.S., Hammett, A.J.M., Provin, T.L., Wilkinson, H.H., and Gentry, T.J. (2010) Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments. Isme Journal 4: 829-838.

Hoshino, T., Yilmaz, L.S., Noguera, D.R., Daims, H., and Wagner, M. (2008) Quantification of target molecules needed to detect microorganisms by fluorescence in situ hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition-FISH. Applied and Environmental Microbiology 74: 5068-5077.

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

Huber, H., Gallenberger, M., Jahn, U., Eylert, E., Berg, I.A., Kockelkorn, D. et al. (2008) A dicarboxylate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon assimilation cycle in the hyperthermophilic Archaeum Ignicoccus hospitalis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 7851-7856.

Huber, J.A., Welch, D.B.M., Morrison, H.G., Huse, S.M., Neal, P.R., and Butterfield, D.A. (2007) Microbial population structures in the deep marine biosphere. Science 318: 97-100.

Huber, R., Langworthy, T.A., König, H., Thomm, M., Woese, C.R., Sleytr, U.B., and Stetter, K.O. (1986) Thermotoga maritima sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90 C. Archives of Microbiology 144: 324-333.

Hügler, M., and Sievert, S.M. (2011) Beyond the Calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean. Marine Science 3.

Hugenholtz, P., Goebel, B.M., and Pace, N.R. (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. Journal of Bacteriology 180: 4765-4774.

Huse, S.M., Huber, J.A., Morrison, H.G., Sogin, M.L., and Mark Welch, D. (2007) Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. Genome Biology 8.

Hyman, E.D. (1988) A new method of sequencing DNA. Analytical Biochemistry 174: 423-436.

Inagaki, F., Nunoura, T., Nakagawa, S., Teske, A., Lever, M., Lauer, A. et al. (2006) Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments, on the Pacific Ocean Margin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 2815-2820.

Inagaki, F., Suzuki, M., Takai, K., Oida, H., Sakamoto, T., Aoki, K. et al. (2003) Microbial communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the Sea of

Okhotsk. Applied and Environmental Microbiology 69: 7224-7235.

J

Jannasch, H. (1985) Review lecture: The chemosynthetic support of life and the microbial diversity at deep-sea hydrothermal vents. Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences: 277-297.

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

Jetten, M., Sliekers, O., Kuypers, M., Dalsgaard, T., Van Niftrik, L., Cirpus, I. et al. (2003) Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater planctomycete-like bacteria. Applied microbiology and biotechnology 63: 107-114.

Jetten, M.S., Wagner, M., Fuerst, J., van Loosdrecht, M., Kuenen, G., and Strous, M. (2001) Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process. Current Opinion in Biotechnology 12: 283-288.

Jørgensen, B. (1977) Bacterial sulfate reduction within reduced microniches of oxidized marine sediments. Marine Biology 41: 7-17.

Jørgensen, B.B., and Bak, F. (1991) Pathways and microbiology of thiosulfate transformations and sulfate reduction in a marine sediment (Kattegat, Denmark). Applied and Environmental Microbiology 57: 847-856.

Jorgensen, S.L., Hannisdal, B., Lanzén, A., Baumberger, T., Flesland, K., Fonseca, R. et al. (2012) Correlating microbial community profiles with geochemical data in highly stratified sediments from the Arctic Mid-Ocean Ridge. Proceedings of the National Academy of Sciences 109: E2846-E2855.

Joye, S.B., Bowles, M.W., Samarkin, V.A., Hunter, K.S., and Niemann, H. (2010) Biogeochemical signatures and microbial activity of different cold-seep habitats along the Gulf of Mexico deep slope. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography 57: 1990-2001.

Julian, D., Gaill, F., Wood, E., Arp, A.J., and Fisher, C.R. (1999) Roots as a site of hydrogen sulfide uptake in the hydrocarbon seep vestimentiferan Lamellibrachia sp. Journal of Experimental Biology 202: 2245-2257.

Juniper, S., Cambon, M.-A., Lesongeur, F., and Barbier, G. (2001) Extraction and purification of DNA from organic rich subsurface sediments (ODP Leg 169S). Marine Geology 174: 241-247.

Juniper, S.K., Tunnicliffe, V., and Southward, E.C. (1992) Hydrothermal vents in turbidite sediments on a Northeast Pacific spreading centre: organisms and substratum at an ocean drilling site. Canadian Journal of Zoology 70: 1792-1809.

K

Kalanetra, K.M., Huston, S.L., and Nelson, D.C. (2004) Novel, attached, sulfur-oxidizing bacteria at shallow hydrothermal vents possess vacuoles not involved in respiratory nitrate accumulation. Applied and Environmental Microbiology 70: 7487-7496.

Kallmeyer, J., Pockalny, R., Adhikari, R.R., Smith, D.C., and D'Hondt, S. (2012) Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. Proceedings of the National Academy of Sciences 109: 16213-16216.

Karl, D.M. (2007) Microbial oceanography: paradigms, processes and promise. Nature Reviews Microbiology 5: 759-769.

Karl, D.M., Knauer, G.A., and Martin, J.H. (1988) Downward flux of particulate organic matter in the ocean: a particle decomposition paradox. Nature 332: 438-441.

Kato, C., Li, L., Tamaoka, J., and Horikoshi, K. (1997) Molecular analyses of the sediment of the 11000-m deep Mariana Trench. Extremophiles 1: 117-123.

Katoh, K., Kuma, K.-i., Toh, H., and Miyata, T. (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. Nucleic Acids Research 33: 511-518.

Kawka, O.E., and Simoneit, B.R. (1987) Survey of hydrothermally-generated petroleums from the

Guaymas Basin spreading center. Organic geochemistry 11: 311-328.

Kellermann, M.Y., Wegener, G., Elvert, M., Yoshinaga, M.Y., Lin, Y.-S., Holler, T. et al. (2012) Autotrophy as a predominant mode of carbon fixation in anaerobic methane-oxidizing microbial communities. Proceedings of the National Academy of Sciences 109: 19321-19326.

Kelley, D.S., Karson, J.A., Blackman, D.K., Früh-Green, G.L., Butterfield, D.A., Lilley, M.D. et al. (2001) An off-axis hydrothermal vent field near the Mid-Atlantic Ridge at 30 N. Nature 412: 145-149.

Kelly, D.P. (1989) Physiology and biochemistry of unicellular sulfur bacteria. Biology of autotrophic bacteria Springer: 193-217.

Kendall, M.M., Wardlaw, G.D., Tang, C.F., Bonin, A.S., Liu, Y., and Valentine, D.L. (2007) Diversity of Archaea in marine sediments from Skan Bay, Alaska, including cultivated methanogens, and description of Methanogenium boonei sp. nov. Applied and Environmental Microbiology 73: 407-414.

Kersters, K., De Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P., and Stackebrandt, E. (2006) Introduction to the Proteobacteria. The Prokaryotes 5: 3-37.

Kim, M., Morrison, M., and Yu, Z. (2011) Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. Journal of Microbiological Methods 84: 81-87.

Kimbell, J.R., and McFall-Ngai, M.J. (2003) The squid-vibrio symbioses: From demes to genes. Integrative and Comparative Biology 43: 254-260.

Kimura, H., Higashide, Y., and Naganuma, T. (2003) Endosymbiotic microflora of the vestimentiferan tubeworm (Lamellibrachia sp.) from a bathyal cold seep. Marine Biotechnology 5: 593-603.

Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionnary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16: 111-120.

Kirk, J.T.O. (1994) Light and photosynthesis in aquatic ecosystems: Cambridge university press.

Klappenbach, J.A., Saxman, P.R., Cole, J.R., and Schmidt, T.M. (2001) rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. Nucleic Acids Research 29: 181-184.

Kleindienst, S., Ramette, A., Amann, R., and Knittel, K. (2012) Distribution and in situ abundance of sulfate-reducing bacteria in diverse marine hydrocarbon seep sediments. Environmental Microbiology 14: 2689-2710.

Knittel, K., and Boetius, A. (2009) Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. Ann Rev Microbiol 63: 311-334.

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

Knittel, K., Losekann, T., Boetius, A., Kort, R., and Amann, R. (2005) Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. Applied and Environmental Microbiology 71: 467-479.

Knowles, R. (1982) Denitrification. Microbiological Reviews 46: 43.

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

Kragelund, C., Levantesi, C., Borger, A., Thelen, K., Eikelboom, D., Tandoi, V. et al. (2007) Identity, abundance and ecophysiology of filamentous Chloroflexi species present in activated sludge treatment plants. Fems Microbiology Ecology 59: 671-682.

Kroll, G. (2008) America's Ocean Wilderness: A Cultural History of Twentieth-Century Exploration: University Press of Kansas.

Krüger, M., Meyerdierks, A., Glöckner, F.O., Amann, R., Widdel, F., Kube, M. et al. (2003) A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically. Nature 426: 878-881.

Krylova, E.M., and Sahling, H. (2010) Vesicomyidae (Bivalvia): Current Taxonomy and Distribution. Plos One 5.

Kubo, K., Lloyd, K.G., F Biddle, J., Amann, R., Teske, A., and Knittel, K. (2012) Archaea of the Miscellaneous Crenarchaeotal Group are abundant, diverse and widespread in marine sediments. ISME J.

Kunin, V., Engelbrektson, A., Ochman, H., and Hugenholtz, P. (2010) Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. Environmental Microbiology 12: 118-123.

Kurr, M., Huber, R., König, H., Jannasch, H.W., Fricke, H., Trincone, A. et al. (1991) Methanopyrus kandleri, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110 C. Archives of Microbiology 156: 239-247.

Kuwahara, H., Yoshida, T., Takaki, Y., Shimamura, S., Nishi, S., Harada, M. et al. (2007) Reduced genome of the thioautotrophic intracellular symbiont in a deep-sea clam, Calyptogena okutanii. Curr Biol 17: 881 - 886.

Kuypers, M.M., Sliekers, A.O., Lavik, G., Schmid, M., Jørgensen, B.B., Kuenen, J.G. et al. (2003) Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. Nature 422: 608-611.

Kuznetsov, A., and Schileyko, A. (1984) On gutless Protobranchia (Bivalvia). Biol Nauki 2: 39-49.

L

Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J.C., Bouizegarene, P., and Bogard, M. (2008) DNA sequencing technologies: A revolution in motion. Part one. Immuno-Analyse & Biologie Specialisee 23: 260-279.

Larkin, J.M., and Henk, M.C. (1996) Filamentous sulfide-oxidizing bacteria at hydrocarbon seeps of the Gulf of Mexico. Microscopy research and technique 33: 23-31.

Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., and Fierer, N. (2009) Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. Applied and Environmental Microbiology 75: 5111-5120.

Lazar, C.S. (2009) Diversité et activité des communautés microbiennes dans des sédiments marins associés aux émissions de fluides froids. Thèse.

Lazar, C.S., Parkes, R.J., Cragg, B.A., L'Haridon, S., and Toffin, L. (2012) Methanogenic activity and diversity in the centre of the Amsterdam Mud Volcano, Eastern Mediterranean Sea. Fems Microbiology Ecology 81: 243-254.

Le Calvez, T., Burgaud, G., Mahé, S., Barbier, G., and Vandenkoornhuyse, P. (2009) Fungal diversity in deep-sea hydrothermal ecosystems. Applied and Environmental Microbiology 75: 6415-6421.

Lee, O.O., Wang, Y., Yang, J., Lafi, F.F., Al-Suwailem, A., and Qian, P.-Y. (2010) Pyrosequencing reveals highly diverse and species-specific microbial communities in sponges from the Red Sea. The ISME journal 5: 650-664.

Lees, H., and Simpson, J. (1957) The biochemistry of the nitrifying organisms. 5. Nitrite oxidation by Nitrobacter. Biochemical Journal 65: 297.

Leigh, J.A. (2000) Nitrogen fixation in methanogens: the archaeal perspective. Current issues in molecular biology 2: 125-131.

Leloup, J., Fossing, H., Kohls, K., Holmkvist, L., Borowski, C., and Jørgensen, B.B. (2009) Sulfate-reducing bacteria in marine sediment (Aarhus Bay, Denmark): abundance and diversity related to geochemical zonation. Environmental Microbiology 11: 1278-1291.

Leloup, J., Loy, A., Knab, N.J., Borowski, C., Wagner, M., and Jørgensen, B.B. (2007) Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea. Environmental Microbiology 9: 131-142.

Lindeman, R.L. (1942) The trophic-dynamic aspect of ecology. Ecology 23: 399-417.

Liu, Y., and Whitman, W.B. (2008) Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. Annals of the New York Academy of Sciences 1125: 171-189.

Lloyd, K.G., Albert, D.B., Biddle, J.F., Chanton, J.P., Pizarro, O., and Teske, A. (2010) Spatial Structure and Activity of Sedimentary Microbial Communities Underlying a Beggiatoa spp. Mat in a Gulf of Mexico Hydrocarbon Seep. Plos One 5.

Lloyd, K.G., Alperin, M.J., and Teske, A. (2011) Environmental evidence for net methane production and oxidation in putative ANaerobic MEthanotrophic (ANME) archaea. Environ Microbiol 13: 2548-2564.

Lloyd, K.G., Lapham, L., and Teske, A. (2006) Anaerobic methane-oxidizing community of

ANME-1b archaea in hypersaline Gulf of Mexico sediments. Applied and Environmental Microbiology 72: 7218-7230.

Lloyd, K.G., Schreiber, L., Petersen, D.G., Kjeldsen, K.U., Lever, M.A., Steen, A.D. et al. (2013) Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins. Nature 496: 215-218.

Löffler, F.E., Yan, J., Ritalahti, K.M., Adrian, L., Edwards, E.A., Konstantinidis, K.T. et al. (2013) Dehalococcoides mccartyi gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, Dehalococcoidia classis nov., order Dehalococcoidales ord. nov. and family Dehalococcoidaceae fam. nov., within the phylum Chloroflexi. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 63: 625-635.

Lonsdale, P. (1977) Deep-tow observations at the mounds abyssal hydrothermal field, Galapagos Rift. Earth and Planetary Science Letters 36: 92-110.

López-Archilla, A.I., Moreira, D., Velasco, S., and López-García, P. (2007) Archaeal and bacterial community composition of a pristine coastal aquifer in Donana National Park, Spain. Aquatic microbial ecology 47: 123-139.

Lösekann, T., Knittel, K., Nadalig, T., Fuchs, B., Niemann, H., Boetius, A., and Amann, R. (2007) Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby mud volcano, Barents Sea. Applied and Environmental Microbiology 73: 3348-3362.

Lovrich, G.A., and Thiel, M. (2011) Ecology, physiology, feeding and trophic role of squat lobsters. Crustacean Issues The Biology of Squat Lobsters: 183-222.

Lythgoe, J.N. (1988) Light and vision in the aquatic environment. In Sensory biology of aquatic animals: Springer, pp. 57-82.

M

Madigan, M., and Martinko, J. (2007) Brock Biologie des micro-organismes. 11ème édition.

Madigan, M.T., and Orent, A. (1999) Thermophilic and halophilic extremophiles. Current Opinion in Microbiology 2: 265-269.

Maignien, L., Parkes, R.J., Cragg, B., Niemann, H., Knittel, K., Coulon, S. et al. (2013) Anaerobic oxidation of methane in hypersaline cold seep sediments. Fems Microbiology Ecology 83: 214-231.

Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., and Wade, W.G. (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology 64: 795-799.

Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A. et al. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature 437: 376-380.

Markert, S., Arndt, C., Felbeck, H., Becher, D., Sievert, S.M., Huegler, M. et al. (2007) Physiological proteomics of the uncultured endosymbiont of Riftia pachyptila. Science 315: 247-250.

Martens, C.S. (1990) Generation of short chain acid anions in hydrothermally altered sediments of the Guaymas Basin, Gulf of California. Applied Geochemistry 5: 71-76.

Maugeri, T.L., Lentini, V., Gugliandolo, C., Cousin, S., and Stackebrandt, E. (2010) Microbial Diversity at a Hot, Shallow-Sea Hydrothermal Vent in the Southern Tyrrhenian Sea (Italy). Geomicrobiology Journal 27: 380-390.

McKay, L.J., MacGregor, B.J., Biddle, J.F., Albert, D.B., Mendlovitz, H.P., Hoer, D.R. et al. (2012) Spatial heterogeneity and underlying geochemistry of phylogenetically diverse orange and white Beggiatoa mats in Guaymas Basin hydrothermal sediments. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers 67: 21-31.

McMullin, E.R., Hourdez, S., Schaeffer, S.W., and Fisher, C.R. (2003) Phylogeny and biogeography of deep sea vestimentiferan tubeworms and their bacterial symbionts. Symbiosis 34: 1-41.

Meselson, M., and Stahl, F.W. (1958) The replication of DNA. In Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 9-12.

Métivier, B., and Von Cosel, R. (1993) Acharax alinae n. sp., Solemyidae (Mollusca: Bivalvia) géante du bassin de Lau. Comptes rendus de l'Académie des sciences Série 3, Sciences de la vie 316: 229-237.

Meyerdierks, A., Kube, M., Lombardot, T., Knittel, K., Bauer, M., Glöckner, F.O. et al. (2005) Insights into the genomes of archaea mediating the anaerobic oxidation of methane. Environmental Microbiology 7: 1937-1951.

Mills, H.J., Hodges, C., Wilson, K., MacDonald, I.R., and Sobecky, P.A. (2003) Microbial diversity in sediments associated with surface-breaching gas hydrate mounds in the Gulf of Mexico. Fems Microbiology Ecology 46: 39-52.

Mills, H.J., Martinez, R.J., Story, S., and Sobecky, P.A. (2004) Identification of members of the metabolically active microbial populations associated with Beggiatoa species mat communities form Gulf of Mexico cold-seep sediments. Applied and Environmental Microbiology 70: 5447-5458.

Milucka, J., Ferdelman, T.G., Polerecky, L., Franzke, D., Wegener, G., Schmid, M. et al. (2012) Zero-valent sulphur is a key intermediate in marine methane oxidation. Nature 491: 541-546.

Mira, A., Ochman, H., and Moran, N.A. (2001) Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. Trends in Genetics 17: 589-596.

Morgenroth, E., Obermayer, A., Arnold, E., Brl, A., Wagner, M., and Wilderer, P. (2000) Effect of long-term idle periods on the performance of sequencing batch reactors. Water science and technology 41: 105-113.

Morita, M., Malvankar, N.S., Franks, A.E., Summers, Z.M., Giloteaux, L., Rotaru, A.E. et al. (2011) Potential for direct interspecies electron transfer in methanogenic wastewater digester aggregates. Mbio 2.

Moussard, C. (2006) Biochimie structurale et métabolique. De Boeck Université.

Müller, P.J., and Suess, E. (1979) Productivity, sedimentation rate, and sedimentary organic matter in the oceans—I. Organic carbon preservation. Deep Sea Research Part A Oceanographic Research Papers 26: 1347-1362.

N

Nagahama, T., Takahashi, E., Nagano, Y., Abdel-Wahab, M.A., and Miyazaki, M. (2011) Molecular evidence that deep-branching fungi are major fungal components in deep-sea methane cold-seep sediments. Environmental Microbiology 13: 2359-2370.

Nakanishi, M., and Hashimoto, J. (2011) A precise bathymetric map of the world's deepest seafloor, Challenger Deep in the Mariana Trench. Marine Geophysical Research 32: 455-463.

Neefs, J.M., Vandepeer, Y., Derijk, P., Chapelle, S., and Dewachter, R. (1993) Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. Nucleic Acids Research 21: 3025-3049.

Nelson, D.C., and Hagen, K.D. (1995) Physiology and Biochemistry of Symbiotic and Free-Living Chemoautotrophic Sulfur Bacteria. American Zoologist 35: 91-101.

Nelson, D.C., Wirsen, C.O., and Jannasch, H.W. (1989) Characterization of large, autotrophic beggiatoa spp abundant at hydrothermal vents of the Guaymas basin. Applied and Environmental Microbiology 55: 2909-2917.

Nelson, K., and Fisher, C. (2000) Absence of cospeciation in deep-sea vestimentiferan tube worms and their bacterial endosymbionts. Symbiosis 28: 1-15.

Neufeld, J.D., Wagner, M., and Murrell, J.C. (2007) Who eats what, where and when? Isotope-labelling experiments are coming of age. Isme Journal 1: 103-110.

Neulinger, S., Sahling, H., Süling, J., and Imhoff, J.F. (2006) Presence of two phylogenetically distinct groups in the deep sea mussel Acharax (Mollusca, Bivalvia, Solemyidae). Marine Ecology Progress Series 312: 161-168.

Newberry, C.J., Webster, G., Cragg, B.A., Parkes, R.J., Weightman, A.J., and Fry, J.C. (2004) Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough, Ocean Drilling Program Leg 190. Environmental Microbiology 6: 274-287.

Newton, I., Woyke, T., Auchtung, T., Dilly, G., Dutton, R., Fisher, M. et al. (2007) The

Calyptogena magnifica chemoautotrophic symbiont genome. Science 315: 998 - 1000.

Nielsen, L.P., Risgaard-Petersen, N., Fossing, H., Christensen, P.B., and Sayama, M. (2010) Electric currents couple spatially separated biogeochemical processes in marine sediment. Nature 463: 1071-1074.

Niemann, H., Losekann, T., de Beer, D., Elvert, M., Nadalig, T., Knittel, K. et al. (2006) Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. Nature 443: 854-858.

Niftrik, L.A., Fuerst, J.A., Damsté, J.S.S., Kuenen, J.G., Jetten, M.S., and Strous, M. (2004) The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. Fems Microbiology Letters 233: 7-13.

Nomura, M., Gourse, R., and Baughman, G. (1984) Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. Annual review of biochemistry 53: 75-117.

Nunoura, T., Oida, H., Nakaseama, M., Kosaka, A., Ohkubo, S.B., Kikuchi, T. et al. (2010) Archaeal Diversity and Distribution along Thermal and Geochemical Gradients in Hydrothermal Sediments at the Yonaguni Knoll IV Hydrothermal Field in the Southern Okinawa Trough. Applied and Environmental Microbiology 76: 1198-1211.

Nussbaumer, A.D., Fisher, C.R., and Bright, M. (2006) Horizontal endosymbiont transmission in hydrothermal vent tubeworms. Nature 441: 345-348.

O

Oda, Y., Slagman, S.J., Meijer, W.G., Forney, L.J., and Gottschal, J.C. (2000) Influence of growth rate and starvation on fluorescent in situ hybridization of Rhodopseudomonas palustris. Fems Microbiology Ecology 32: 205-213.

Odom, J.M., and Peck Jr, H. (1984) Hydrogenase, electron-transfer proteins, and energy coupling in the sulfate-reducing bacteria Desulfovibrio. Annual Reviews in Microbiology 38: 551-592.

Okutani, T., and Fujikura, K. (2002) Abyssal gastropods and bivalves collected by Shinkai 6500 on slope of the Japan Trench. Venus 60: 211-224.

Olu-Le Roy, K., Caprais, J.C., Fifis, A., Fabri, M.C., Galéron, J., Budzinsky, H. et al. (2007) Cold-seep assemblages on a giant pockmark off West Africa: spatial patterns and environmental control. Marine Ecology 28: 115-130.

Omoregie, E.O., Mastalerz, V., de Lange, G., Straub, K.L., Kappler, A., Røy, H. et al. (2008) Biogeochemistry and community composition of iron-and sulfur-precipitating microbial mats at the Chefren Mud Volcano (Nile Deep Sea Fan, Eastern Mediterranean). Applied and Environmental Microbiology 74: 3198-3215.

Ondreas, H., Olu, K., Fouquet, Y., Charlou, J.L., Gay, A., Dennielou, B. et al. (2005) ROV study of a giant pockmark on the Gabon continental margin. Geo-Marine Letters 25: 281-292.

Orcutt, B., Boetius, A., Elvert, M., Samarkin, V., and Joye, S.B. (2005) Molecular biogeochemistry of sulfate reduction, methanogenesis and the anaerobic oxidation of methane at Gulf of Mexico cold seeps (vol 69, pg 4267, 2005). Geochimica Et Cosmochimica Acta 69: 5633-5633.

Orcutt, B.N., Sylvan, J.B., Knab, N.J., and Edwards, K.J. (2011) Microbial ecology of the dark ocean above, at, and below the seafloor. Microbiology and Molecular Biology Reviews 75: 361-422.

Orphan, V.J., Hinrichs, K.U., Ussler, W., Paull, C.K., Taylor, L.T., Sylva, S.P. et al. (2001) Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. Applied and Environmental Microbiology 67: 1922-1934.

Orphan, V.J., House, C.H., Hinrichs, K.-U., McKeegan, K.D., and DeLong, E.F. (2002) Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99: 7663-7668.

Orphan, V.J., House, C.H., Hinrichs, K.-U., McKeegan, K.D., and DeLong, E.F. (2001) Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. Science 293: 484-487.

Orsi, W., Biddle, J.F., and Edgcomb, V. (2013) Deep sequencing of subseafloor eukaryotic rRNA reveals active fungi across marine subsurface provinces. Plos One 8: e56335.

Ovreas, L., Forney, L., Daae, F.L., and Torsvik, V. (1997) Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology 63: 3367-3373.

P

Pachiadaki, M., Kallionaki, A., Dählmann, A., De Lange, G., and Kormas, K. (2011) Diversity and Spatial Distribution of Prokaryotic Communities Along A Sediment Vertical Profile of A Deep-Sea Mud Volcano. Microbial Ecology 62: 655-668.

Pachiadaki, M.G., Lykousis, V., Stefanou, E.G., and Kormas, K.A. (2010) Prokaryotic community structure and diversity in the sediments of an active submarine mud volcano (Kazan mud volcano, East Mediterranean Sea). Fems Microbiology Ecology 72: 429-444.

Pailleret, M., Haga, T., Petit, P., Privé-Gill, C., Saedlou, N., Gaill, F., and Zbinden, M. (2007) Sunken wood from the Vanuatu Islands: identification of wood substrates and preliminary description of associated fauna. Marine Ecology 28: 233-241.

Palacios, C., Zbinden, M., Baco, A.R., Treude, T., Smith, C.R., Gaill, F. et al. (2006) Microbial ecology of deep-sea sunken wood: quantitative measurements of bacterial biomass and cellulolytic activities. Cahiers De Biologie Marine 47: 415.

Pantoja-Feliciano, I.G., Clemente, J.C., Costello, E.K., Perez, M.E., Blaser, M.J., Knight, R., and Dominguez-Bello, M.G. (2013) Biphasic assembly of the murine intestinal microbiota during early development. The ISME journal 7: 1112-1115.

Parkes, R.J., Cragg, B.A., and Wellsbury, P. (2000) Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: a review. Hydrogeology Journal 8: 11-28.

Parkes, R.J., Webster, G., Cragg, B.A., Weightman, A.J., Newberry, C.J., Ferdelman, T.G. et al. (2005) Deep sub-seafloor prokaryotes stimulated at interfaces over geological time. Nature 436: 390-394.

Patel, P.H., Suzuki, M., Adman, E., Shinkai, A., and Loeb, L.A. (2001) Prokaryotic DNA polymerase I: evolution, structure, and "base flipping" mechanism for nucleotide selection. Journal of Molecular Biology 308: 823-837.

Paull, C.K., Hecker, B., Commeau, R., Freemanlynde, R.P., Neumann, C., Corso, W.P. et al. (1984) Biological communities at the Florida escarpment resemble hydrothermal vent taxa. Science 226: 965-967.

Paull, C.K., Ussler, W., III, Peltzer, E.T., Brewer, P.G., Keaten, R., Mitts, P.J. et al. (2007) Authigenic carbon entombed in methane-soaked sediments from the northeastern transform margin of the Guaymas Basin, Gulf of California. Deep-Sea Research Part Ii-Topical Studies in Oceanography 54: 1240-1267.

Peek, A.S., Feldman, R.A., Lutz, R.A., and Vrijenhoek, R.C. (1998) Cospeciation of chemoautotrophic bacteria and deep sea clams. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 9962-9966.

Peek, A.S., Gustafson, R.G., Lutz, R.A., and Vrijenhoek, R.C. (1997) Evolutionary relationships of deep-sea hydrothermal vent and cold-water seep clams (Bivalvia: Vesicomyidae): results from the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I. Marine Biology 130: 151-161.

Pernthaler, A., and Amann, R. (2004) Simultaneous fluorescence in situ hybridization of mRNA and rRNA in environmental bacteria. Applied and Environmental Microbiology 70: 5426-5433.

Pernthaler, A., Pernthaler, J., and Amann, R. (2002a) Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. Appl Environ Microbiol 68: 3094-3101.

Pernthaler, A., Preston, C.M., Pernthaler, J., DeLong, E.F., and Amann, R. (2002b) Comparison of fluorescently labeled oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine bacteria and archaea. Applied and Environmental Microbiology 68: 661-667.

Pfeffer, C., Larsen, S., Song, J., Dong, M., Besenbacher, F., Meyer, R.L. et al. (2012)

Filamentous bacteria transport electrons over centimetre distances. Nature.

Pflugfelder, B., Fisher, C., and Bright, M. (2005) The color of the trophosome: elemental sulfur distribution in the endosymbionts of Riftia pachyptila (Vestimentifera; Siboglinidae). Marine Biology 146: 895-901.

Phelps, C.D., Kerkhof, L.J., and Young, L.Y. (1998) Molecular characterization of a sulfate-reducing consortium which mineralizes benzene. Fems Microbiology Ecology 27: 269-279.

Piccard, J., and Dietz, R.S. (1961) Seven miles down: the story of the bathyscaph Trieste.

Poulsen, L.K., Licht, T.R., Rang, C., Krogfelt, K.A., and Molin, S. (1995) Physiological state of Escherichia coli BJ4 growing in the large intestines of streptomycin-treated mice. Journal of Bacteriology 177: 5840-5845.

R

Rabus, R., Hansen, T.A., and Widdel, F. (2006) Dissimilatory sulfate-and sulfur-reducing prokaryotes. In The Prokaryotes: Springer, pp. 659-768.

Raghoebarsing, A.A., Pol, A., Van de Pas-Schoonen, K.T., Smolders, A.J., Ettwig, K.F., Rijpstra, W.I.C. et al. (2006) A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. Nature 440: 918-921.

Ragsdale, S.W., and Pierce, E. (2008) Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO2 fixation. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics 1784: 1873-1898.

Rappé, M.S., and Giovannoni, S.J. (2003) The uncultured microbial majority. Annual Reviews in Microbiology 57: 369-394.

Rau, G.H. (1981) Hydrothermal vent clam and tube worm 13C/12C: further evidence of nonphotosynthetic food sources. Science 213: 338-340.

Raymond, J., Siefert, J.L., Staples, C.R., and Blankenship, R.E. (2004) The natural history of nitrogen fixation. Molecular Biology and Evolution 21: 541-554.

Reed, A.J., Lutz, R.A., and Vetriani, C. (2006) Vertical distribution and diversity of bacteria and archaea in sulfide and methane-rich cold seep sediments located at the base of the Florida Escarpment. Extremophiles 10: 199-211.

Reed, D.W., Fujita, Y., Delwiche, M.E., Blackwelder, D.B., Sheridan, P.P., Uchida, T., and Colwell, F.S. (2002) Microbial communities from methane hydrate-bearing deep marine sediments in a forearc basin. Applied and Environmental Microbiology 68: 3759-3770.

Reimer, R.D., and Reimer, A.A. (1975) Chemical control of feeding in four species of tropical ophiuroids of the genus< i> Ophioderma</i>. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 51: 915-927.

Robinson, J.J., Stein, J.L., and Cavanaugh, C.M. (1998) Cloning and sequencing of a form II ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from the bacterial symbiont of the hydrothermal vent tubeworm Riftia pachyptila. Journal of Bacteriology 180: 1596-1599.

Robinson, R.W., Aldrich, H., Hurst, S.F., and Bleiweis, A. (1985) Role of the cell surface of Methanosarcina mazei in cell aggregation. Applied and Environmental Microbiology 49: 321-327.

Roesch, L.F.W., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A.K.M., Kent, A.D. et al. (2007) Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. ISME J 1: 283-290.

Roh, S.W., Kim, K.H., Nam, Y.D., Chang, H.W., Park, E.J., and Bae, J.W. (2010) Investigation of archaeal and bacterial diversity in fermented seafood using barcoded pyrosequencing. Isme Journal 4: 1-16.

Roh, S.W., Nam, Y.-D., Chang, H.-W., Sung, Y., Kim, K.-H., Lee, H.-J. et al. (2007) Natronococcus jeotgali sp. nov., a halophilic archaeon isolated from shrimp jeotgal, a traditional fermented seafood from Korea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 2129-2131.

Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W., and Schleifer, K.-H. (1994) In situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+ C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. Microbiology 140: 2849-2858.

Ronaghi, M., Uhlen, M., and Nyren, P. (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. Science 281: 363-+.

Rothberg, J.M., and Leamon, J.H. (2008) The development and impact of 454 sequencing. Nature Biotechnology 26: 1117-1124.

Roussel, E.G., Bonavita, M.-A.C., Querellou, J., Cragg, B.A., Webster, G., Prieur, D., and Parkes, R.J. (2008) Extending the sub-sea-floor biosphere. Science 320: 1046-1046.

Ruelas-Inzunza, J., Soto, L.A., and Páez-Osuna, F. (2003) Heavy-metal accumulation in the hydrothermal vent clam Vesicomya gigas from Guaymas basin, Gulf of California. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers 50: 757-761.

Rueter, P., Rabus, R., Wilkest, H., Aeckersberg, F., Rainey, F.A., Jannasch, H.W., and Widdel, F. (1994) Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria. Nature 372: 455-458.

Ruff, S.E., Arnds, J., Knittel, K., Amann, R., Wegener, G., Ramette, A., and Boetius, A. (2013) Microbial Communities of Deep-Sea Methane Seeps at Hikurangi Continental Margin (New Zealand). Plos One 8: e72627.

Russ, L., Kartal, B., Op Den Camp, H.J., Sollai, M., Le Bruchec, J., Caprais, J.-C. et al. (2013) Presence and diversity of anammox bacteria in cold hydrocarbon-rich seeps and hydrothermal vent sediments of the Guaymas Basin. Frontiers in Microbiology 4: 219.

S

Sahling, H., Rickert, D., Lee, R.W., Linke, P., and Suess, E. (2002) Macrofaunal community structure and sulfide flux at gas hydrate deposits from the Cascadia convergent margin, NE Pacific. Marine Ecology-Progress Series 231: 121-138.

Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method - A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4: 406-425.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74: 5463-5467.

Sangwan, P., Kovac, S., Davis, K.E., Sait, M., and Janssen, P.H. (2005) Detection and cultivation of soil Verrucomicrobia. Applied and Environmental Microbiology 71: 8402-8410.

Schaechter, M., Maaløe, O., and Kjeldgaard, N. (1958) Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of Salmonella typhimurium. Journal of General Microbiology 19: 592-606.

Schaefer, R.G., Galushkin, Y.I., Kolloff, A., and Littke, R. (1999) Reaction kinetics of gas generation in selected source rocks of the West Siberian Basin: implications for the mass balance of early-thermogenic methane. Chemical Geology 156: 41-65.

Schiff, J., and Fankhauser, H. (1981) Assimilatory sulfate reduction. In Biology of inorganic nitrogen and sulfur: Springer, pp. 153-168.

Schink, B. (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. Microbiology and Molecular Biology Reviews 61: 262-280.

Schink, B., and Stams, A.J. (2006) Syntrophism among prokaryotes. Prokaryotes 2: 309-335.

Schleper, C., Puehler, G., Holz, I., Gambacorta, A., Janekovic, D., Santarius, U. et al. (1995) Picrophilus gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0. Journal of Bacteriology 177: 7050-7059.

Schloss, P.D., and Handelsman, J. (2004) Status of the microbial census. Microbiology and Molecular Biology Reviews 68: 686-691.

Schmalenberger, A., Schwieger, F., and Tebbe, C.C. (2001) Effect of primers hybridizing to Different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. Applied and Environmental Microbiology 67: 3557-3563.

Schmid, M., Schmitz-Esser, S., Jetten, M., and Wagner, M. (2001) 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and in situ detection. Environmental Microbiology 3: 450-459.

Schmid, M., Twachtmann, U., Klein, M., Strous, M., Juretschko, S., Jetten, M. et al. (2000) Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. Systematic and Applied Microbiology 23: 93-106.

Schmid, M.C., Maas, B., Dapena, A., van de Pas-Schoonen, K., van de Vossenberg, J., Kartal, B. et al. (2005) Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. Applied and Environmental Microbiology 71: 1677-1684.

Schönhuber, W., Zarda, B., Eix, S., Rippka, R., Herdman, M., Ludwig, W., and Amann, R. (1999) In situ identification of cyanobacteria with horseradish peroxidase-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. Applied and Environmental Microbiology 65: 1259-1267.

Schramm, A., Fuchs, B.M., Nielsen, J.L., Tonolla, M., and Stahl, D.A. (2002) Fluorescence in situ hybridization of 16S rRNA gene clones (Clone-FISH) for probe validation and screening of clone libraries. Environ Microbiol 4: 713-720.

Schreiber, L., Holler, T., Knittel, K., Meyerdierks, A., and Amann, R. (2010) Identification of the dominant sulfate-reducing bacterial partner of anaerobic methanotrophs of the ANME-2 clade. Environmental Microbiology 12: 2327-2340.

Schubert, C.J., Vazquez, F., Lösekann-Behrens, T., Knittel, K., Tonolla, M., and Boetius, A. (2011) Evidence for anaerobic oxidation of methane in sediments of a freshwater system (Lago di Cadagno). Fems Microbiology Ecology 76: 26-38.

Schulz, H.N., and Jorgensen, B.B. (2001) Big bacteria. Annual Review of Microbiology 55: 105-137.

Schut, G.J., Boyd, E.S., Peters, J.W., and Adams, M.W. (2012) The modular respiratory complexes involved in hydrogen and sulfur metabolism by heterotrophic hyperthermophilic archaea and their evolutionary implications. Fems Microbiology Reviews.

Segonzac, M. (1992) The hydrothermal vent communities of snake pit area (Mid Atlantic Ridge, 23°N, 3480m) megafaunal composition and microdistribution. Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences 314: 593-600.

Sergeant, M.J., Constantinidou, C., Cogan, T., Penn, C.W., and Pallen, M.J. (2012) High-Throughput Sequencing of 16S rRNA Gene Amplicons: Effects of Extraction Procedure, Primer Length and Annealing Temperature. Plos One 7.

Sibuet, M., and Olu, K. (1998) Biogeography, biodiversity and fluid dependence of deep-sea cold-seep communities at active and passive margins. Deep-Sea Research Part Ii-Topical Studies in Oceanography 45: 517-+.

Sibuet, M., and Olu-Le Roy, K. (2002) Cold seep communities on continental margins: structure and quantitative distribution relative to geological and fluid venting patterns. Ocean margin systems: 235-251.

Simon-Colin, C., Raguénès, G., Cozien, J., and Guezennec, J. (2008) Halomonas profundus sp. nov., a new PHA-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp. Journal of Applied Microbiology 104: 1425-1432.

Simoneit, B.R., and Lonsdale, P.F. (1982) Hydrothermal petroleum in mineralized mounds at the seabed of Guaymas Basin.

Simoneit, B.R.T., Lonsdale, P.F., Edmond, J.M., and Shanks, W.C. (1990) Deep-water hydrocarbon seeps in Guaymas basin, Gulf of California. Applied Geochemistry 5: 41-49.

Smith, C.R., and Baco, A.R. (2003) Ecology of whale falls at the deep-sea floor. Oceanography and Marine Biology, Vol 41 41: 311-354.

Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Mark Welch, D., Huse, S.M., Neal, P.R. et al. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 12115-12120.

Somero, G., Childress, J., and Anderson, A. (1989) Transport, metabolism, and detoxification of hydrogen sulfide in animals from sulfide-rich marine environments. Reviews in Aquatic Sciences RAQSEL 1.

Sommer, S., Linke, P., Pfannkuche, O., Niemann, H., and Treude, T. (2010) Benthic respiration in a seep habitat dominated by dense beds of ampharetid polychaetes at the Hikurangi Margin (New Zealand). Marine Geology 272: 223-232.

Sommer, S., Linke, P., Pfannkuche, O., Niemann, H., and Treude, T. (2010) Benthic respiration in a

seep habitat dominated by dense beds of ampharetid polychaetes at the Hikurangi Margin (New Zealand). Marine Geology 272: 223-232.

Sorensen, K.B., and Teske, A. (2006) Stratified communities of active archaea in deep marine subsurface sediments. Applied and Environmental Microbiology 72: 4596-4603.

Sorensen, K.B., Lauer, A., and Teske, A. (2004) Archaeal phylotypes in a metal-rich and low-activity deep subsurface sediment of the Peru Basin, ODP Leg 201, Site 1231. Geobiology 2: 151-161.

Sørensen, S.J., de Lipthay, J.R., Müller, A., Barkay, T., Hansen, L.H., and Rasmussen, L. (2002) Molecular methods for assessing and manipulationg the diversity of microbial populations and processes. Enzymes in the Environment. In: Marcel Dekker Incorporated.

Soto, L.A. (2009) Stable carbon and nitrogen isotopic signatures of fauna associated with the deep-sea hydrothermal vent system of Guaymas Basin, Gulf of California. Deep-Sea Research Part Ii-Topical Studies in Oceanography 56: 1675-1682.

Spang, A., Hatzenpichler, R., Brochier-Armanet, C., Rattei, T., Tischler, P., Spieck, E. et al. (2010) Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota. Trends in Microbiology 18: 331-340.

Srivastava, A.K., and Schlessinger, D. (1990) Mechanism and regulation of bacterial ribosomal RNA processing. Annual Reviews in Microbiology 44: 105-129.

Stackebrandt, E., Zeytun, A., Lapidus, A., Nolan, M., Lucas, S., Hammon, N. et al. (2013) Complete genome sequence of Coriobacterium glomerans type strain (PW2 T) from the midgut of Pyrrhocoris apterus L. (red soldier bug).

Stahl, D.A., Lane, D.J., Olsen, G.J., and Pace, N.R. (1984) Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences. Science 224: 409-411.

Stal, L.J., and Caumette, P. (1993) Microbial mats: Springer.

Stamatakis, A. (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics 22: 2688-2690.

Stams, A.J., and Plugge, C.M. (2009) Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. Nature Reviews Microbiology 7: 568-577.

Stevens, H., Stübner, M., Simon, M., and Brinkhoff, T. (2005) Phylogeny of Proteobacteria and Bacteroidetes from oxic habitats of a tidal flat ecosystem. Fems Microbiology Ecology 54: 351-365.

Stewart, F. (2008) Genetic diversification and evolution of chemosynthetic endosymbionts in deep-sea clams (Vesicomyidae).

Stewart, F.J., and Cavanaugh, C.M. (2009) Pyrosequencing analysis of endosymbiont population structure: co-occurrence of divergent symbiont lineages in a single vesicomyid host clam. Environmental Microbiology 11: 2136-2147.

Strous, M., Pelletier, E., Mangenot, S., Rattei, T., Lehner, A., Taylor, M.W. et al. (2006) Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. Nature 440: 790-794.

Suzuki, Y., Inagaki, F., Takai, K., Nealson, K., and Horikoshi, K. (2004) Microbial diversity in inactive chimney structures from deep-sea hydrothermal systems. Microbial Ecology 47: 186-196.

Swerdlow, H., Zhang, J.Z., Chen, D.Y., Harke, H.R., Grey, R., Wu, S. et al. (1991) Three DNA sequencing methods using capillary gel electrophoresis and laser-induced fluorescence. Analytical chemistry 63: 2835-2841.

T

Tabita, F.R. (1988) Molecular and cellular-regulation of autotrophic carbon-dioxide fixation in microorganisms. Microbiological Reviews 52: 155-189.

Tabita, F.R. (1999) Microbial ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: A different perspective. Photosynthesis Research 60: 1-28.

Tabita, F.R., Satagopan, S., Hanson, T.E., Kreel, N.E., and Scott, S.S. (2008) Distinct form I, II, III, and IV Rubisco proteins from the three kingdoms of life provide clues about Rubisco evolution and

structure/function relationships. Journal of Experimental Botany 59: 1515-1524.

Tagu, D., Risler, J.-L., Aubourg, S., Aude, J.-C., Calevro, F., Carpentier, A.-S. et al. (2010) Bio-informatique - Principes d'utilisation des outils. Savoir Faire - Ed Quae.

Takai, K., and Horikoshi, K. (1999) Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. Genetics 152: 1285-1297.

Takai, K., Moser, D.P., DeFlaun, M., Onstott, T.C., and Fredrickson, J.K. (2001) Archaeal diversity in waters from deep South African gold mines. Appl Environ Microbiol 67: 5750-5760.

Tamaki, H., Wright, C.L., Li, X., Lin, Q., Hwang, C., Wang, S. et al. (2011) Analysis of 16S rRNA Amplicon Sequencing Options on the Roche/454 Next-Generation Titanium Sequencing Platform. Plos One 6: e25263.

Tebbe, C.C., and Vahjen, W. (1993) Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. Applied and Environmental Microbiology 59: 2657-2665.

Tedersoo, L., Nilsson, R.H., Abarenkov, K., Jairus, T., Sadam, A., Saar, I. et al. (2010) 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. New Phytologist 188: 291-301.

Terwilliger, R., Terwilliger, N., and Arp, A. (1983) Thermal vent clam (Calyptogena-Magnifica) hemoglobin. Science 219: 981 - 983.

Teske, A., and Sorensen, K.B. (2008) Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? Isme Journal 2: 3-18.

Teske, A., Edgcomb, V., Rivers, A.R., Thompson, J.R., Gomez, A.d.V., Molyneaux, S.J., and Wirsen, C.O. (2009) A molecular and physiological survey of a diverse collection of hydrothermal vent Thermococcus and Pyrococcus isolates. Extremophiles 13: 905-915.

Teske, A., Hinrichs, K.U., Edgcomb, V., Gomez, A.D., Kysela, D., Sylva, S.P. et al. (2002) Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: Evidence for anaerobic methanotrophic communities. Applied and Environmental Microbiology 68: 1994-2007.

Teske, A., Sogin, M.L., Nielsen, L.P., and Jannasch, H.W. (1999) Phylogenetic Relationships of a Large Marine Beggiatoa. Systematic and Applied Microbiology 22: 39-44.

Teske, A.P. (2006) Microbial communities of deep marine subsurface sediments: molecular and cultivation surveys. Geomicrobiology Journal 23: 357-368.

Thayer, C.W. (1979) Biological bulldozers and the evolution of marine benthic communities. Science 203: 458-461.

Thurber, A.R., Kröger, K., Neira, C., Wiklund, H., and Levin, L.A. (2010) Stable isotope signatures and methane use by New Zealand cold seep benthos. Marine Geology 272: 260-269.

Treude, T., Niggemann, J., Kallmeyer, J., Wintersteller, P., Schubert, C.J., Boetius, A., and Jørgensen, B.B. (2005) Anaerobic oxidation of methane and sulfate reduction along the Chilean continental margin. Geochimica Et Cosmochimica Acta 69: 2767-2779.

Trotsenko, Y.A., and Murrell, J.C. (2008) Metabolic Aspects of Aerobic Obligate Methanotrophy⋆. Advances in applied microbiology 63: 183-229.

Tryon, M.D., and Brown, K.M. (2001) Complex flow patterns through Hydrate Ridge and their impact on seep biota. Geophysical Research Letters 28: 2863-2866.

Tyler, P., Paterson, G., Sibuet, M., Murton, B., and Segonzac, M. (1995) A new genus of ophiuroid (Echinodermata: Ophiuroidea) from hydrothermal mounds along the Mid-Atlantic Ridge. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 75: 977-986.

Tyler, P.A. (2003) Ecosystems of the deep oceans: Elsevier Science.

V

Vahjen, W., Pieper, R., and Zentek, J. (2010) Bar-Coded Pyrosequencing of 16S rRNA Gene Amplicons Reveals Changes in Ileal Porcine Bacterial Communities Due to High Dietary Zinc Intake. Applied and Environmental Microbiology 76: 6689-6691.

Valentine, D.L. (2007) Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. Nature Reviews Microbiology 5: 316-323.

Van de Peer, Y., Chapelle, S., and DeWachter, R. (1996) A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. Nucleic Acids Research 24: 3381-3391.

Van Dover, C. (2000) The ecology of deep-sea hydrothermal vents: Princeton University Press.

Van Dover, C.L., German, C.R., Speer, K.G., Parson, L.M., and Vrijenhoek, R.C. (2002) Evolution and Biogeography of Deep-Sea Vent and Seep Invertebrates. Science 295: 1253-1257.

Van Niel, C.B. (1949) The comparative biochemistry of photosynthesis. American Scientist 37: 371-383.

Vandover, C.L., Szuts, E.Z., Chamberlain, S.C., and Cann, J.R. (1989) A novel eye in eyeless shrimp from hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. Nature 337: 458-460.

Vetriani, C., Jannasch, H.W., MacGregor, B.J., Stahl, D.A., and Reysenbach, A.L. (1999) Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments. Applied and Environmental Microbiology 65: 4375-4384.

Vetriani, C., Tran, H.V., and Kerkhof, L.J. (2003) Fingerprinting microbial assemblages from the oxic/anoxic chemocline of the Black Sea. Applied and Environmental Microbiology 69: 6481-6488.

Větrovský, T., and Baldrian, P. (2013) The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. Plos One 8: e57923.

Vetter, R.D. (1985) Elemental sulfur in the gills of three species of clams containing chemoautotrophic symbiotic bacteria: a possible inorganic energy storage compound. Marine Biology 88: 33-42.

Vetter, R.D., Powell, M.A., and Somero, G.N. (1991) Metazoan adaptations to hydrogen sulphide. Metazoan life without oxygen (Bl)'ant, C; editor) Chapman and Ha/I: 109-128.

Vigneron, A. (2012) Diversité phylogénétique et fonctionnelle des communautés microbiennes incultivées des sédiments marins de la Marge de Sonora, Bassin de Guaymas (Golfe de Californie). Thèse.

Vigneron, A., Cruaud, P., Pignet, P., Caprais, J.-C., Cambon-Bonavita, M.-A., Godfroy, A., and Toffin, L. (2013) Archaeal and anaerobic methane oxidizer communities in the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin (Gulf of California). ISME J.

Vigneron, A., Cruaud, P., Pignet, P., Caprais, J.C., Gayet, N., Cambon-Bonavita, M.A. et al. (2014) Bacterial communities and syntrophic associations involved in anaerobic oxidation of methane process of the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin. Environmental Microbiology.

Von Damm, K.L., Edmond, J.M., Measures, C.I., and Grant, B. (1985) Chemistry of submarine hydrothermal solutions at Guaymas Basin, Gulf of California. Geochimica Et Cosmochimica Acta 49: 2221-2237.

Vrijenhoek, R.C., Schutz, S.J., Gustafson, R.G., and Lutz, R.A. (1994) Cryptic species of deep-sea clams (Mollusca: Bivalvia: Vesicomyidae) from hydrothermal vent and cold-water seep environments. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers 41: 1171-1189.

W

Wagner, M., and Horn, M. (2006) The Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlamydiae and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance. Current Opinion in Biotechnology 17: 241-249.

Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H.-P., and Schleifer, K.-H. (1995) In situ Identification of Ammonia-oxidizing Bacteria. Systematic and Applied Microbiology 18: 251-264.

Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., and Cole, J.R. (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Applied and Environmental Microbiology 73: 5261-5267.

Wang, Y., and Qian, P.-Y. (2009) Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. Plos One 4.

Wankel, S.D., Adams, M.M., Johnston, D.T., Hansel, C.M., Joye, S.B., and Girguis, P.R. (2012) Anaerobic methane oxidation in metalliferous hydrothermal sediments: influence on carbon flux

and decoupling from sulfate reduction. Environmental Microbiology 14: 2726-2740.

Waren, A., and Bouchet, P. (2009) New gastropods from deep-sea hydrocarbon seeps off West Africa. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography 56: 2326-2349.

Watanabe, W., Kano, T., Suzuki, S., and Ishiguro, A. (2012) A decentralized control scheme for orchestrating versatile arm movements in ophiuroid omnidirectional locomotion. Journal of The Royal Society Interface 9: 102-109.

Weber, A., and Jorgensen, B.B. (2002) Bacterial sulfate reduction in hydrothermal sediments of the Guaymas Basin, Gulf of California, Mexico. Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers 49: 827-841.

Webster, G., Parkes, R.J., Cragg, B.A., Newberry, C.J., Weightman, A.J., and Fry, J.C. (2006) Prokaryotic community composition and biogeochemical processes in deep subseafloor sediments from the Peru Margin. FEMS Microbiol Ecol 58: 65-85.

Webster, G., Parkes, R.J., Fry, J.C., and Weightman, A.J. (2004) Widespread occurrence of a novel division of bacteria identified by 16S rRNA gene sequences originally found in deep marine sediments. Appl Environ Microbiol 70: 5708-5713.

Webster, G., Yarram, L., Freese, E., Koester, J., Sass, H., Parkes, R.J., and Weightman, A.J. (2007) Distribution of candidate division JS1 and other Bacteria in tidal sediments of the German Wadden Sea using targeted 16S rRNA gene PCR-DGGE. Fems Microbiology Ecology 62: 78-89.

Wegener, G., Shovitri, M., Knittel, K., Niemann, H., Hovland, M., and Boetius, A. (2008) Biogeochemical processes and microbial diversity of the Gullfaks and Tommeliten methane seeps (Northern North Sea). Biogeosciences Discussions 5: 971-1015.

Welhan, J., and Lupton, J. (1987) Light hydrocarbon gases in Guaymas Basin hydrothermal fluids: thermogenic versus abiogenic origin. Am Assoc Petrol Geol Bull 71: 215-223.

Whiticar, M.J., Hovland, M., Kastner, M., and Sample, J.C. (1995) 26. Organic geochemistry of gases, fluids, and hydrates at the cascadia accretionary margin. In Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results.

Whitman, W., Boone, D., Koga, Y., and Keswani, J. (2001) Taxonomy of methanogenic Archaea. Bergey's manual of systematic bacteriology, Springer Verlag, New York: 211-213.

Willerslev, E., and Cooper, A. (2005) Review Paper. Ancient DNA. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 272: 3-16.

Williams, A.B., and Rona, P.A. (1986) Two New Caridean Shrimps (Bresiliidae) from a Hydrothermal Field on the Mid-Atlantic Ridge. Journal of Crustacean Biology 6: 446-462.

Woese, C.R., and Fox, G.E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. Proceedings of the National Academy of Sciences 74: 5088-5090.

Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms - Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87: 4576-4579.

Wyville Thomson, C. (1878) Voyage of the "Challenger", The Atlantic. A preliminary account of the general results of the exploring voyage of HMS "Challenger" during the year 1873 and the early part of the year 1876 (Vol II, pp. 1–396). In: London: MacMillan and Co.

Y

Yamamoto, M., Nakagawa, S., Shimamura, S., Takai, K., and Horikoshi, K. (2010) Molecular characterization of inorganic sulfur-compound metabolism in the deep-sea epsilonproteobacterium Sulfurovum sp. NBC37-1. Environmental Microbiology 12: 1144-1153.

Yoshinaga, I., Amano, T., Yamagishi, T., Okada, K., Ueda, S., Sako, Y., and Suwa, Y. (2009) Distribution and diversity of anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria in the sediment of a eutrophic freshwater lake, Lake Kitaura, Japan. Microbes and environments: 1105060298.

Yu, Y., Lee, C., Kim, J., and Hwang, S. (2005) Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative

real-time polymerase chain reaction. Biotechnology and bioengineering 89: 670-679.

Yu, Z.T., and Morrison, M. (2004) Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology 70: 4800-4806.

Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H.D., and Noller, H.F. (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 angstrom resolution. Science 292: 883-896.

Z

Zal, F., Leize, E., Oros, D.R., Hourdez, S., Van Dorsselaer, A., and Childress, J.J. (2000) Haemoglobin structure and biochemical characteristics of the sulphide-binding component from the deep-sea clam Calyptogena magnifica. Cahiers De Biologie Marine 41: 413-423.

Zbinden, M., and Cambon-Bonavita, M.A. (2003) Occurrence of Deferribacterales and Entomoplasmatales in the deep-sea Alvinocarid shrimp Rimicaris exoculata gut. Fems Microbiology Ecology 46: 23-30.

Zeikus, J., and Wolee, R. (1972) Methanobacterium thermoautotrophicus sp. n., an anaerobic, autotrophic, extreme thermophile. Journal of Bacteriology 109: 707-713.

Zellner, G., Stackebrandt, E., Kneifel, H., Messner, P., Sleytr, U.B., de Macario, E.C. et al. (1989) Isolation and Characterization of a Thermophilic, Sulfate Reducing Archaebacterium,< i> Archaeoglobus fulgidus</i> Strain Z. Systematic and Applied Microbiology 11: 151-160.

Zhang, H.S. (2011) Using pyrosequencing and quantitative PCR to analyze microbial communities. Frontiers of Environmental Science & Engineering in China 5: 21-27.

Zhou, J., Bruns, M., and Tiedje, J. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. Appl Environ Microbiol 62: 316-322.

Annexes

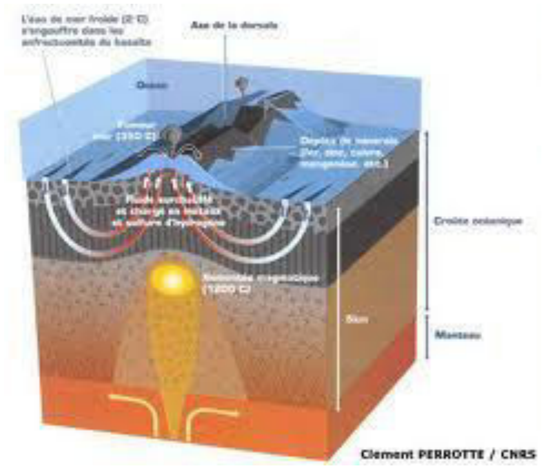
Campagne BIG

Biodiversité et Interactions à Guaymas

La campagne **BIG** (Biodiversité et Interactions à Guaymas) s'est déroulée à bord du navire L'**Atalante** du 30 mai au 9 juillet 2010, dans le bassin de **Guaymas**, situé dans le golfe de Californie, au large du Mexique (chef de mission : Anne Godfroy).
Le bassin de Guaymas se caractérise par la présence d'une activité hydrothermale dans un contexte de marge, d'où la présence à quelques dizaines de kilomètres de distance, de sites hydrothermaux et de zones d'émission de fluides froids. De part la présence simultanée, dans un environnement sédimentaire, de sites hydrothermaux et de zones d'émission de fluides froids, le bassin de Guaymas est un lieu unique propice à l'étude comparative, en l'absence de barrière biogéographique, de ces écosystèmes basés tous deux sur la chimiosynthèse microbienne. L'objectif de BIG est de **décrire et de comparer les communautés microbiennes et animales de ces deux écosystèmes en milieu marin profond.**

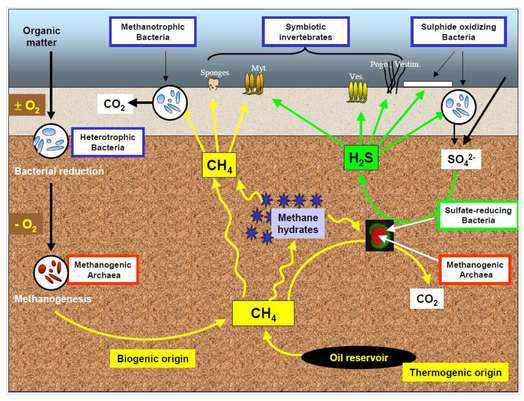
La découverte des sources hydrothermales océaniques dans le Pacifique oriental, il y a plus de 30 ans, puis celle des zones d'émission de fluides froids dans le golfe du Mexique quelques années plus tard, a profondément modifié la vision des océanographes sur la biologie de l'océan profond : le plus vaste écosystème de la planète ne se limite pas à de vastes habitats froids et obscurs. Le long des dorsales océaniques, sur les arcs volcaniques, dans les zones de subduction, et sur les marges continentales passives, des "oasis de vie" existent, grâce à la chimiosynthèse bactérienne.

Comment fonctionne un système hydrothermal ?

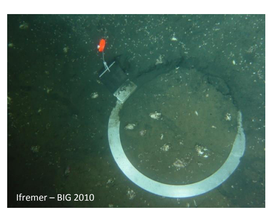


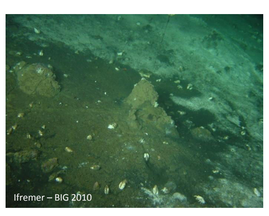
Les dorsales océaniques, lieu d'écartement des plaques et de formation de la croûte océanique, sont le siège d'une intense activité tectonique, volcanique et hydrothermale. Dans ces zones, l'eau de mer s'infiltre dans les fractures du plancher océanique et se réchauffe rapidement en approchant des chambres magmatiques. L'eau de mer ainsi chauffée, réagit fortement avec les roches traversées et se charge de minéraux variés.
Plus chaude, elle remonte et jaillit sur le fond à des températures pouvant atteindre plus de 400°C. Le mélange de ce fluide chaud et réduit avec l'eau de mer froide et oxygénée se traduit par des précipitations minérales qui forment des cheminées hydrothermales autour desquelles vit une faune luxuriante.

Qu'est qu'une zone d'émission de fluides froids ?

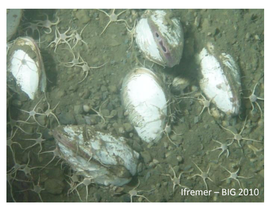


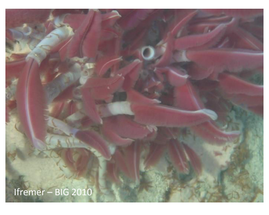
Les marges continentales constituent des zones majeures d'accumulation de sédiments. Ces sédiments, riches en matière organique, sont enfouis et sont dégradés au fil du temps, formant des réservoirs d'hydrocarbure. Différents processus contribuent à la résurgence, à la surface des sédiments marins, de ces fluides chargés en hydrocarbures (pression des sédiments accumulés, processus de subduction). Ces émissions sont appelées "émissions de fluides froids" par opposition aux fluides chauds des sources hydrothermales. Les fluides émis sont généralement riches en hydrocarbures légers dont le méthane, qui est l'une des principales sources d'énergie des micro-organismes chimiosynthétiques. Ces derniers vont permettre l'installation de riches communautés animales.

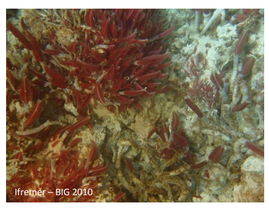


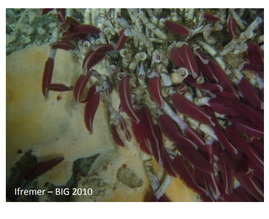


Vésicomyidés

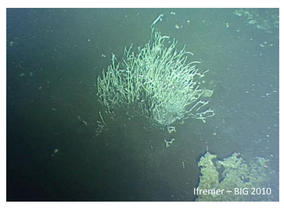


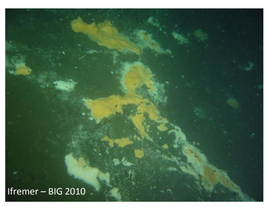


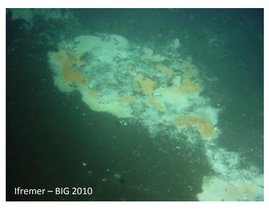


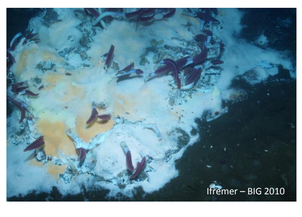


Siboglinidés

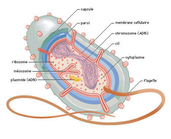


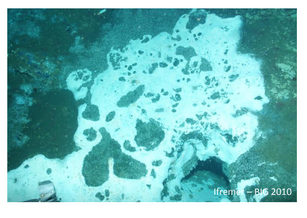


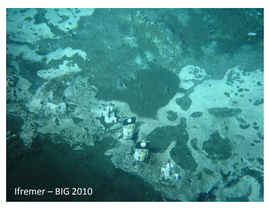


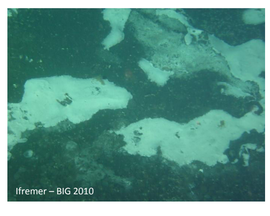


Tapis microbien



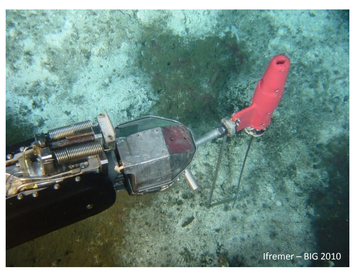




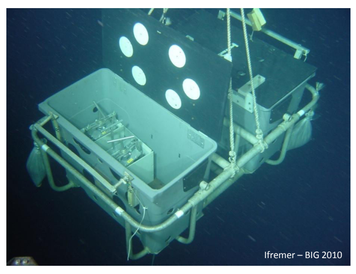


La campagne s'est déroulée en 4 grandes étapes:
-Exploration des sites : acquisition de données bathymétriques, cartographie des zones, etc.
- Caractérisation de l'environnement des deux écosystèmes : prélèvements d'eau, analyses chimiques in situ, mesures de débits, réalisation de profils sédimentaires (température, pH, oxygène et sulfures), carottages dans le sédiment.
- Étude des communautés animales et microbiennes : observation et échantillonnage.
- Conditionnement à bord du bateau des échantillons pour les travaux ultérieurs en laboratoire, tels que des cultures de micro-organismes.

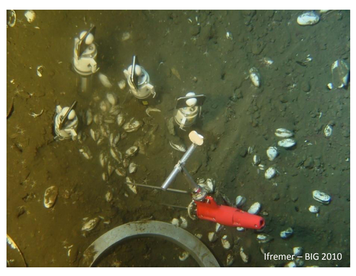
Prélèvement de Vésicomyidés au filet



Mesure de la température à l'aide d'une sonde thermique



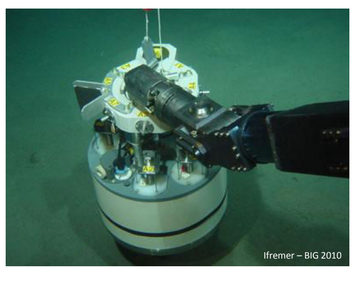
L'ascenceur



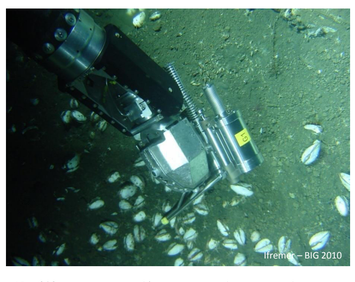
Carottier planté au niveau des Vésicomyidés (prélèvement de sédiments – Carottier tube)

Carottier tube rempli au laboratoire du navire océanographique

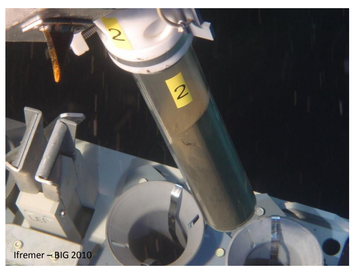
Prélèvement de sédiments avec un grand carottier lame



Dépôt d'un appareil de mesures des gaz émis



Prélèvement d'eau au dessus des Vésicomyidés



Carottier tube rempli de sédiments

Poster 1 : Présentation de la campagne BIG aux portes ouvertes du NO Pourquoi Pas? (Brest - Août 2011)

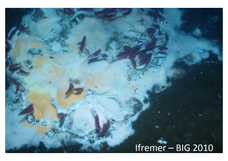
Analyse des données de Pyroséquençage

Vers une identification optimale des microorganismes présents

P. Cruaud, A. Vigneron, M.A. Cambon-Bonavita, A. Godfroy

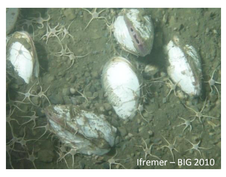
Contexte

Le Bassin de Guaymas : *Site de l'étude*



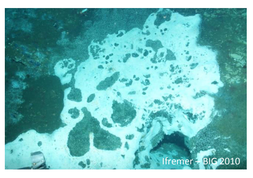
Sites hydrothermaux et zones d'émissions de fluides froids

➔ Conditions de vie particulières, nombreux **microorganismes incultivés, nouveaux groupes découverts**



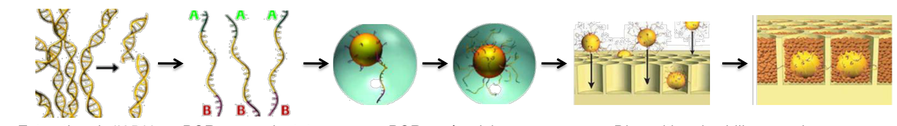
Différents habitats étudiés par l'identification des communautés microbiennes sédimentaires

➔ Beaucoup d'échantillons à traiter, diversité globale des microorganismes présents, approche par séquençage haut-débit entreprise

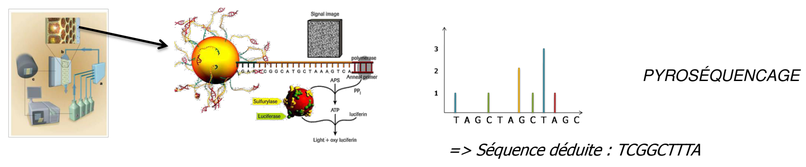


Technologie 454 : *Technique de l'étude*

Intégration de plusieurs techniques dont la PCR en émulsion, les plaques en fibres optiques picotitrées (PicoTiterPlate) et le pyroséquençage



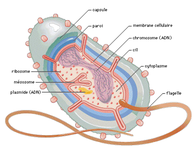
Extraction de l'ADN *PCR avec adaptateur* *PCR en émulsion* *Disposition des billes sur plaques*



PYROSÉQUENCAGE

=> Séquence déduite : TCGGCTTTA

Identification des microorganismes: *But de l'étude*



Microorganisme à identifier

➔ 5' - ATTCTGTCGAATACAT….AAGTGGTTCT – 3'

Extraction et Séquençage du gène codant l'ARNr 16S (marqueur moléculaitre)

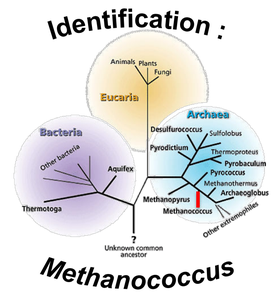
➔

Banque de données

Desulfurococcus	5' - ATTGTGTCGATTACGT….AAGTGGTTCT – 3'
Sulfolobus	5' - GTTCTGCCGAATAGAT….AACTCGTTCT – 3'
Pyrococcus	5' - GTACTGGCGAATAGAT….GACTCGATCT – 3'
Methanococcus	5' - ATTCTGTCGAATACAT….AAGTGGTTCT – 3'
Methanopyrus	5' - GTAATGCCGACTAGAT….GACTCCATCT – 3'
Archaeoglobus	5' - CGTTTGTCAGCTAGAT….GACTCCGTTCT – 3'

Comparaison de la séquence avec celles de bases de données

➔



Problématique

PCR **clonage** Séquençage

Obtention d'une **centaine** de séquences

Groupement des séquences similaires

Comparaison avec les bases de données

Approche classique
Séquençage Sanger

Échantillon complexe à étudier

Extraction

PCR, **PCR par émulsion,** Pyroséquençage

Obtention de **milliers** de séquences

Groupement des séquences similaires

Très grand nombre de séquences
➔ **AUTOMATISATION**

Comparaison avec les bases de données

Approche haut-débit
Séquençage 454

*Choix **manuel** des séquences appropriées*

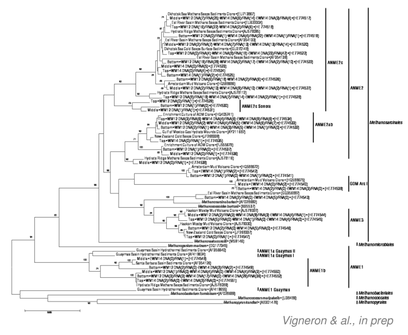
IDENTIFICATION

Accession	Description	Max ident	
HE774542.1	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ARN G14 S1 49	100%	➔ *Archaea*
FJ264712.1	Uncultured archaeon clone OrigSedA100 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	
GQ356864.1	Uncultured archaeon clone FeSO4_A_127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	
GQ356844.1	Uncultured archaeon clone FeSO4_A_106 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	
GQ356818.1	Uncultured archaeon clone Fe_A_30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	
GQ356802.1	Uncultured archaeon clone Fe_A_15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	
AB240733.1	Uncultured Methanomethylovorans sp. gene for 16S rRNA, partial sequence, clone	99%	➔ *Methanomethylovorans*
AF354128.1	Uncultured archaeon isolate Eel-36a2A4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	
AY323225.1	Uncultured Methanosarcinales archaeon clone AMOS1B_4113_H12 16S ribosomal	99%	➔ *Methanosarcinales*
FN421287.1	Uncultured euryarchaeote partial 16S rRNA gene, clone GoM156_Arch212	99%	
HE774541.1	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone 2ARN W14 S5 46	99%	
AF354135.1	Uncultured archaeon isolate SB-24a1H2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	
AB240732.1	Uncultured Methanosaeta sp. gene for 16S rRNA, partial sequence, clone:ANT06-01	98%	➔ *Methanosaeta*
AB214522.1	Uncultured archaeon gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: KM-r-0.25	99%	
AY542581.1	Uncultured Methanosarcinales archaeon clone GoM GB425 02A-3 16S ribosomal RNA	99%	➔ *Methanosarcinales*
AY542591.1	Uncultured Methanosarcinales archaeon clone GoM GB425 12A-22 16S ribosomal RN	99%	
AB461391.1	Uncultured archaeon gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: ANME2bPC	98%	

Exemple de résultats sur une séquence de Methanosarcinales (Archaea)

Recherche d'informations sur les séquences de banque dans la littérature (ici, notre séquence appartient au groupe des *Methanosarcinales*).

Construction d'arbres phylogénétiques
Pour accéder à la diversité microbienne



Vigneron & al., in prep

*Choix **automatique** des 1ères séquences*

IDENTIFICATION

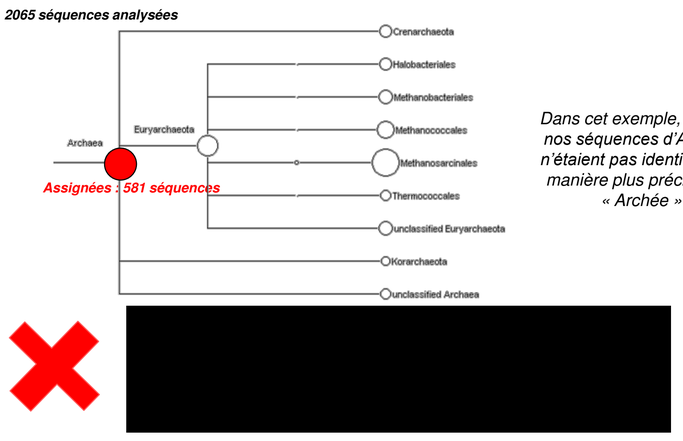
Accession	Description	Max ident	
HE774542.1	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ARN G14 S1 49	100%	➔ *Archaea*
FJ264712.1	Uncultured archaeon clone OrigSedA100 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	➔ *Archaea*
GQ356864.1	Uncultured archaeon clone FeSO4_A_127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	➔ *Archaea*
GQ356844.1	Uncultured archaeon clone FeSO4_A_106 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	➔ *Archaea*
GQ356818.1	Uncultured archaeon clone Fe_A_30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	➔ *Archaea*
GQ356802.1	Uncultured archaeon clone Fe_A_15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	
AB240733.1	Uncultured Methanomethylovorans sp. gene for 16S rRNA, partial sequence, clone:A	99%	
AF354128.1	Uncultured archaeon isolate Eel-36a2A4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	
AY323225.1	Uncultured Methanosarcinales archaeon clone AMOS1B_4113_H12 16S ribosomal RN	99%	
FN421287.1	Uncultured euryarchaeote partial 16S rRNA gene, clone GoM156_Arch212	99%	
HE774541.1	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone 2ARN W14 S5 46	99%	
AF354135.1	Uncultured archaeon isolate SB-24a1H2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	
AB240732.1	Uncultured Methanosaeta sp. gene for 16S rRNA, partial sequence, clone:ANT06-01	98%	
AB214522.1	Uncultured archaeon gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: KM-r-0.25	99%	
AY542581.1	Uncultured Methanosarcinales archaeon clone GoM GB425 02A-3 16S ribosomal RNA	99%	
AY542591.1	Uncultured Methanosarcinales archaeon clone GoM GB425 12A-22 16S ribosomal RN	99%	
AB461391.1	Uncultured archaeon gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: ANME2bPC	98%	

Exemple de résultats sur la même séquence de Methanosarcinales (Archaea)

➔ Groupe commun à ces 5 premières séquences : *ARCHAEA*

Notre séquence reçoit un numéro d'identification correspondant au groupe trouvé (ici *Archaea*, *ID Taxon : 2157*)

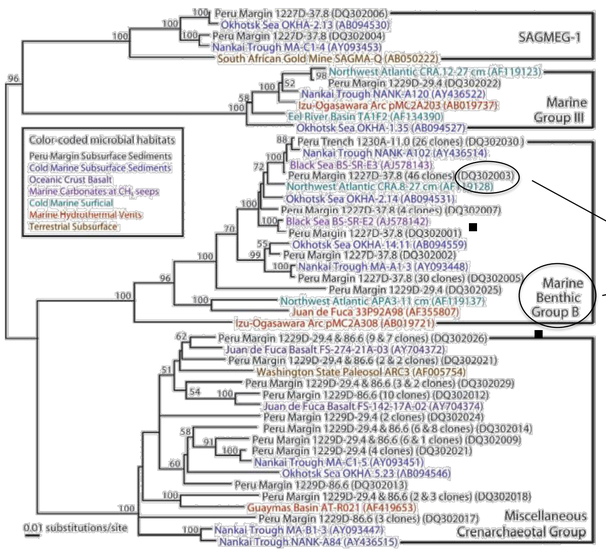
Ce numéro d'identification permet au logiciel de replacer notre séquence dans son groupe selon la **taxonomie définie de NCBI**



Dans cet exemple, 30% de nos séquences d'Archées n'étaient pas identifiées de manière plus précise que « Archée »

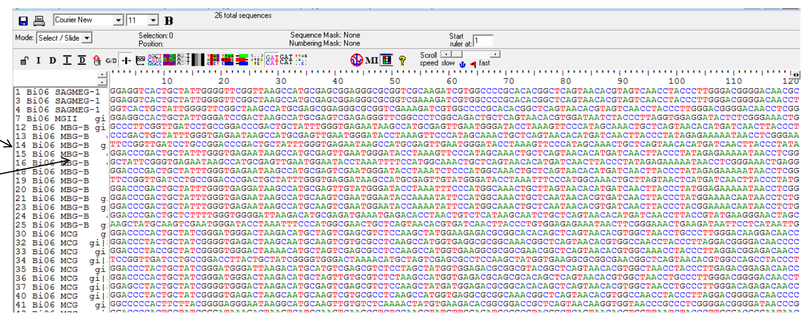
Solutions envisagées

Création d'une banque de données adaptée à partir de la littérature



Biddle& al., 2006

Récupération des séquences et des assignements des arbres publiés



Vérifications des identifications

1) Groupement de toutes les séquences récupérées,
2) Alignement (MAFFT 6.864 (Katoh et al., 2005)),
3) Reconstruction phylogénétiques par analyses de distance (*Neighbor-Joining (Saitou and Nei 1987) correction Kimura-2-parameter (Kimura 1980))* et maximum de vraisemblance (*MPI-parallelized RAxML 7.2.8-ALPHA software (Stamatakis, 2006)*)
4) Assignement des groupes définitifs aux séquences de banques et définition des nouveaux groupes et des identifiants correspondants (ID Taxon)

Définition d'une taxonomie mise à jour, prenant en compte les nouveaux groupes microbiens

N° Accession	Classification NCBI	Classification littérature	Classification finale	ID Taxon
DQ302006	Non définie	>1_Bi06_SAGMEG_1	SAGMEG	SAGMEG
DQ302004	Non définie	>3_Bi06_SAGMEG_1	SAGMEG	SAGMEG
AY093453	Non définie	>4_Bi06_SAGMEG_1	SAGMEG	SAGMEG
DQ302022	Non définie	>7_Bi06_Mg2	MBG-D	MBGD
DQ302030	Non définie	>12_Bi06_MBG_B	MBG-B	MBGB
AY436514	Non définie	>13_Bi06_MBG_B	MBG-B	MBGB
AJ578143	Non définie	>14_Bi06_MBG_B	MBG-B	MBGB
DQ302003	Non définie	>15_Bi06_MBG_B	MBG-B	MBGB
AF119128	Non définie	>16_Bi06_MBG_B	MBG-B	MBGB
AF356644	Non définie	>37_Bi12_ANME1a_GuII	ANME-1	ANME1
FR682490	Non définie	>38_Bi12_ANME1a_GuII	ANME-1	ANME1
JF937719	Non définie	>39_Bi12_ANME1_Gu	ANME-1 Guaymas	ANME1Gu
JF937715	Non définie	>40_Bi12_ANME1_Gu	ANME-1 Guaymas	ANME1Gu
JF937746	Non définie	>41_Bi12_ANME1_Gu	ANME-1 Guaymas	ANME1Gu
X99555	P. fumarius	>75Dh05_Desulfurococcales	Pyrolobus	54251
X99559	P. abyssi	>76Dh05_Desulfurococcales	Pyrodictium	2308
AY835410	Non définie	>78Dh05_MBG_B	MBG-B	MBGB
AY835407	Non définie	>84Dh05_MBG_B	MBG-B	MBGB
AY835409	Non définie	>86Dh05_MBG_B	MBG-B	MBGB
AF419636	Non définie	>88Dh05_MG_1	MG-1	MG1
FJ560326	Non définie	>1_Kubo12_MCG	MCG	MCG
DQ301972	Non définie	>6_Tesk08_TMEG	Thermoplasmatales	2301
AB050225	Non définie	>8_Tesk08_TMEG	Thermoplasmatales	2301
AB177097	Non définie	>11_Tesk08_Mg2	MG-2	MG2
AF119139	Non définie	>13_Tesk08_MBGE	MBG-E	MBGE
AB019756	Non définie	>14_Tesk08_DHVE_6	DHVE-6	DHVE6

Références :

Biddle, J.F., Cardman, Z., Mendlovitz, H., Albert, D.B., Lloyd, K.G., Boetius, A., Teske, A., 2012. Anaerobic oxidation of methane at different temperature regimes in Guaymas Basin hydrothermal sediments. Isme Journal 6, 1018-1031. **Biddle**, J.F., Lipp, J.S., Lever, M.A., Lloyd, K.G., Sørensen, K.B., Anderson, R., Fredricks, H.F., Elvert, M., Kelly, T.J., Schrag, D.P., Sogin, M.L., Brenchley, J.E., Teske, A., House, C.H., Hinrichs, K.-U., 2006. Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 3846-3851. **Brochier-Armanet**, C., Boussau, B., Gribaldo, S., Forterre, P., 2008. Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. Nat Rev Microbiol 6, 245-252. **Brochier-Armanet**, C., Gribaldo, S., Forterre, P., 2012. Spotlight on the Thaumarchaeota. Isme Journal 6, 227-230. **Cambon-Bonavita**, M.A., Nadalig, T., Roussel, E., Delage, E., Duperron, S., Caprais, J.C., Boetius, A., Sibuet, M., 2009. Diversity and distribution of methane-oxidizing microbial communities associated with different faunal assemblages in a giant pockmark of the Gabon continental margin. Deep-Sea Research Part Ii-Topical Studies in Oceanography 56, 2248-2258. **Dang**, H., Luan, X.-W., Chen, R., Zhang, X., Guo, L., Klotz, M.G., 2010. Diversity, abundance and distribution of amoA-encoding archaea in deep-sea methane seep sediments of the Okhotsk Sea. Fems Microbiology Ecology 72, 370-385. **Dhillon**, A., Lever, M., Lloyd, K.G., Albert, D.B., Sogin, M.L., Teske, A., 2005. Methanogen diversity evidenced by molecular characterization of methyl coenzyme M reductase A (mcrA) genes in hydrothermal sediments of the Guaymas Basin. Applied and Environmental Microbiology 71, 4592-4601. **Kubo**, K., Lloyd, K.G., F Biddle, J., Amann, R., Teske, A., Knittel, K., 2012. Archaea of the Miscellaneous Crenarchaeotal Group are abundant, diverse and widespread in marine sediments. ISME J. **Lloyd**, K.G., Lapham, L., Teske, A., 2006. Anaerobic methane-oxidizing community of ANME-1b archaea in hypersaline Gulf of Mexico sediments. Applied and Environmental Microbiology 72, 7218-7230. **Lloyd**, K.G., MacGregor, B.J., Teske, A., 2010. Quantitative PCR methods for RNA and DNA in marine sediments: maximizing yield while overcoming inhibition. Fems Microbiology Ecology 72, 143-151. **Pachiadaki**, M.G., Lykousis, V., Stefanou, E.G., Kormas, K.A., 2010. Prokaryotic community structure and diversity in the sediments of an active submarine mud volcano (Kazan mud volcano, East Mediterranean Sea). Fems Microbiology Ecology 72, 429-444. **Pester**, M., Schleper, C., Wagner, M., 2011. The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. Current Opinion in Microbiology 14, 300-306. **Sorensen**, K.B., Teske, A., 2006. Stratified communities of active archaea in deep marine subsurface sediments. Applied and Environmental Microbiology 72, 4596-4603. **Teske**, A., Hinrichs, K.U., Edgcomb, V., Gomez, A.D., Kysela, D., Sylva, S.P., Sogin, M.L., Jannasch, H.W., 2002. Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: Evidence for anaerobic methanotrophic communities. Applied and Environmental Microbiology 68, 1994-2007. **Teske,** A., Sorensen, K.B., 2008. Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? Isme Journal 2, 3-18.

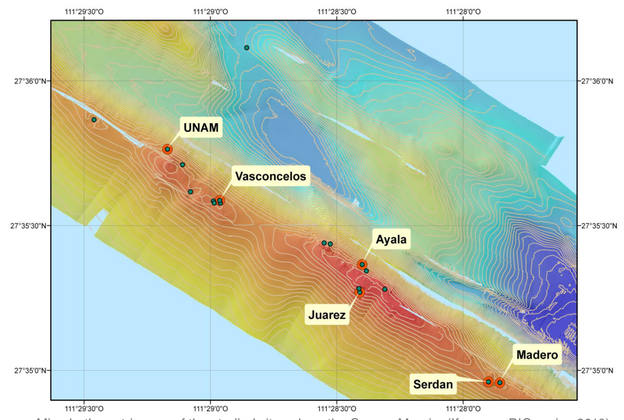
Diversity and distribution of microbial communities associated with various biological assemblages in the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin (Gulf of California)

P. Cruaud, A. Vigneron, P. Pignet, JC. Caprais, A. Godfroy and MA. Cambon-Bonavita

Laboratory of Microbiology of Extreme Environments, UMR6197, Ifremer, France

perrine.cruaud@ifremer.fr

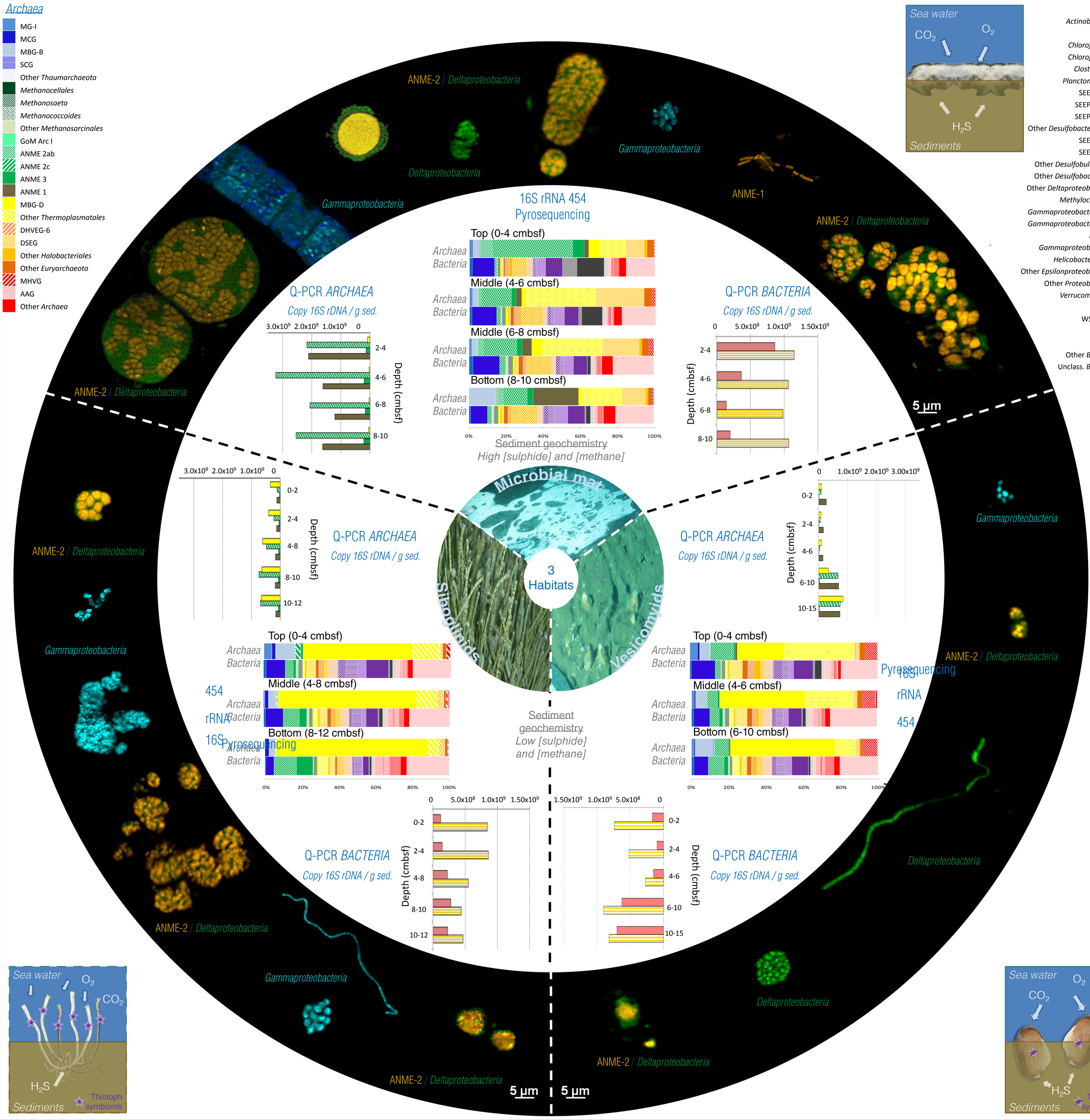
The newly explored **Sonora margin cold seeps** are characterized by a mosaic of different **faunal assemblages** such as *Vesicomyidae* and *Siboglinidae* and **white *Beggiatoa* mats**, both fuelled by fluid seepage and high sedimentary rates (2mm/y)



Microbathymetric map of the studied sites along the Sonora Margin (Ifremer – BIG cruise 2010)

Objectives:

- Explore the **microbial diversity and distribution** (16S rRNA gene 454 Pyrosequencing) in sediments underlying **a siboglinids bush** (Juarez site), **a vesicomyids field** (Vasconcelos site) and **a white *Beggiatoa* mat** (Vasconcelos site)
- Assess the **spatial organizations** and the **relative abundance of** dominant microbial groups (16S Q-PCR and FISH)
- Determine the relationship between microbial communities and the observed sediments surface colonizers



Conclusions and hypothesis …

- The microbial communities in the Sonora Margin correspond to those usually found in other cold seep ecosystems
- The microbial diversity and distribution are different according to the habitat
- Anaerobic methanotrophs (ANME) are numerous and dominant archaeal populations in sediments underlying microbial mat while few ANME are found in sediments colonized by vesicomyids and siboglinids

Sediment geochemistry (*i.e.* available substrates) could drive the distribution of microbial communities and of sediment surface colonizers. Microbial communities and assemblage structuring organisms could also influence each other

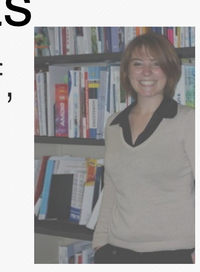
Poster 3 : Congrès FEMS (Leipzig, Allemagne - Juillet 2013)

Étude comparative des communautés de vésicomyidés et de leurs symbiontes, associées aux suintements froids et aux sources hydrothermales du bassin de Guaymas

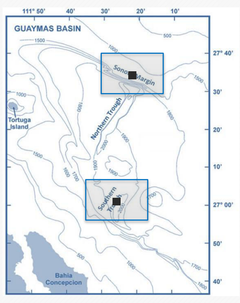
P. Cruaud, C. Decker, K. Olu-Le Roy, S. Arnaud-Haond, C. Papot, A. Vigneron, A. Khripounoff, N. Gayet, A. Godfroy and MA. Cambon-Bonavita

Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, Ifremer, France

perrine.cruaud@ifremer.fr



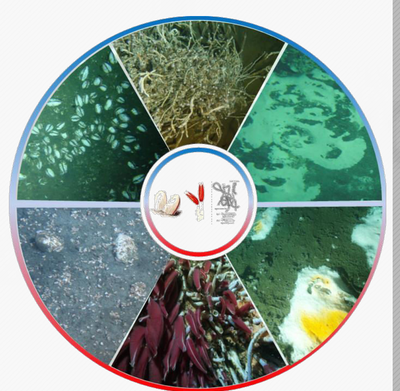
Les sources hydrothermales et les suintements froids:



Carte du Bassin de Guaymas, *d'après Otera et al., 2003*

Les **sources hydrothermales** et les **suintements froids** sont des sources sous-marines libérant des fluides réduits au niveau du plancher océanique. Ces sources sont présentes au niveau de contextes géologiques variés (marges, dorsales…) et génèrent des écosystèmes aux réseaux trophiques complexes, basés sur la chimiosynthèse microbienne. Une faune luxuriante peut être associée à ces émissions, comme des bivalves *Vesicomyidae*, des moules *Mytilidae*, des vers *Siboglinidae* ou encore des tapis microbiens composés de bactéries filamenteuses géantes, les *Beggiatoa.*

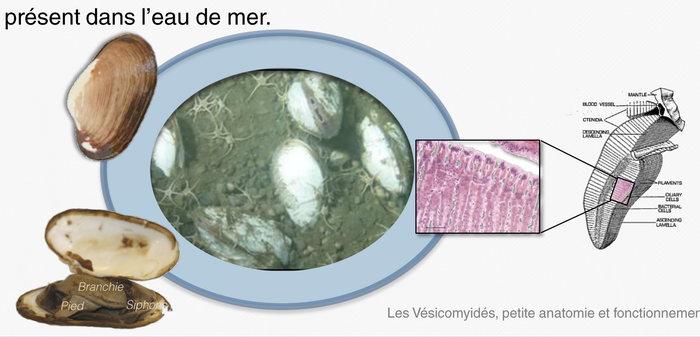
Le **bassin de Guaymas** est un site idéal pour l'étude comparative de ces 2 écosystèmes puisqu'il présente une zone de suintements froids (marge de Sonora) et une zone hydrothermale (Southern Trough), sans barrière physique les séparant.



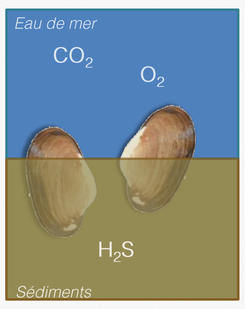
Faune associée aux suintements froids et aux sources hydrothermales du Bassin de Guaymas (Ifremer – BIG 2010)

Les Vésicomyidés:

Les **bivalves vésicomyidés** sont des composants importants des écosystèmes chimiosynthétiques. Ils vivent partiellement enfouis dans le sédiment ou dans des crevasses de la croûte océanique. Alors qu'ils n'ont qu'un système digestif très réduit, leurs branchies abritent de nombreuses bactéries symbiotiques sulfo-oxydantes. Ces bactéries fournissent la majorité de l'énergie nécessaire à la croissance et au métabolisme de leur hôte, le vésicomyidé. En échange, l'invertébré leur facilite l'accès aux substrats nécessaires à leur métabolisme. Ainsi, le pied du vésicomyidé puise les sulfures (H_2S) dans le sédiment alors que les siphons puisent l'oxygène présent dans l'eau de mer.



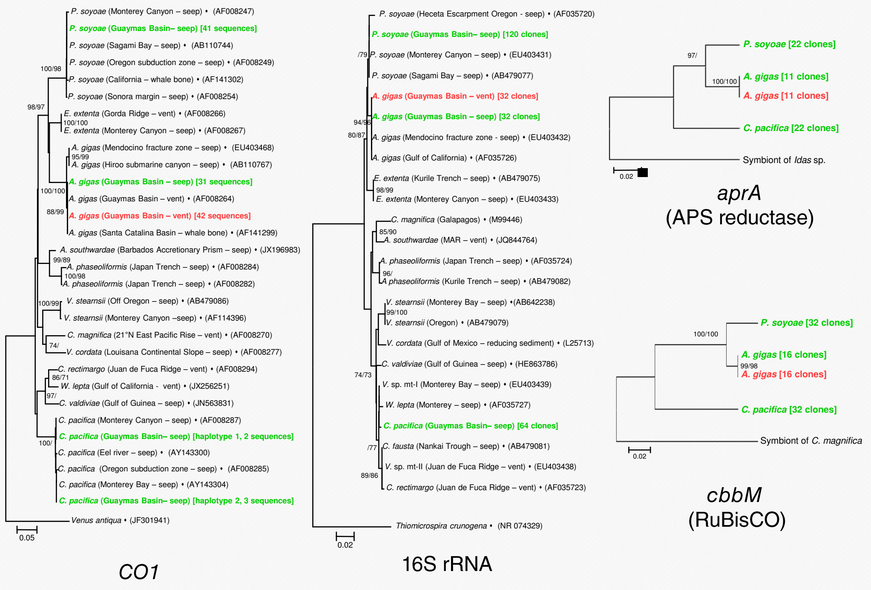
Les Vésicomyidés, petite anatomie et fonctionnement de base



Problématiques de l'étude:

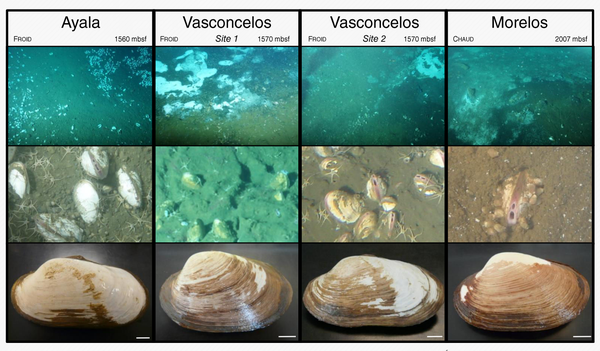
- Les **suintements froids** et les **sources hydrothermales** sont-ils colonisés par des espèces différentes de vésicomyidés ?
- Des échanges sont-ils possibles entre ces 2 écosystèmes ?
- La répartition des espèces de vésicomyidés entre les sites est-elle due à l'existence de symbiontes différents? de métabolismes bactériens particuliers? d'une variabilité dans l'écophysiologie de l'hôte ?

Composition des communautés de Vésicomyidés / Symbiontes:

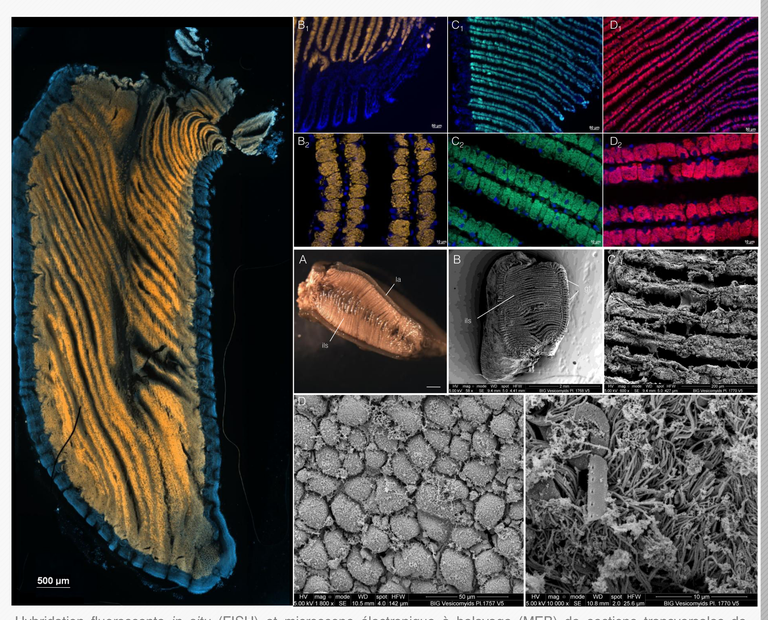


Arbres phylogénétiques en Neighbor-Joining (NJ). Pour chaque ensemble de données, les topologies obtenues en matrices de distances (NJ correction Kimura-2-parameter) et en maximum de vraisemblance (ML avec RAxML 7.2.8) étaient similaires. Les bootstraps (>70) obtenus NJ/ML ont été reportés sur les nœuds des arbres (1000 réplicats). Nos clones figurent en vert quant ils proviennent des sites de suintements froids et en rouge pour les sources hydrothermales.

- **207 vésicomyidés** ont été échantillonnés au niveau de 3 sites de suintements froids et 1 site de sources hydrothermales
- Identification morphologique et moléculaire de 3 espèces de vésicomyidés : ***Phreagena soyoae***, ***Calyptogena pacifica*** et ***Archivesica gigas***
- Un symbionte identifié par espèce de vésicomyidés (ARNr 16S, *aprA*, *cbbM* et FISH). **Thiotrophie** et **autotrophie** confirmées (RuBisCO forme II)
- Confirmation de la **transmission verticale** et de la **co-évolution** hôte / symbiontes



Sites échantillonnés et espèces dominantes de Vésicomyidés (Échelle = 1 cm)



Hybridation fluorescente *in situ* (FISH) et microscope électronique à balayage (MEB) de sections transversales de branchies de vésicomyidés. En FISH, chaque couleur représente un symbionte correspondant à 1 espèce de vésicomyidés (en orange les symbiontes de *P. soyoae*, en vert les symbiontes de *C. pacifica* et en rouge les symbiontes de *A. gigas*). En bleu, marquage au DAPI des cellules eucaryotes. Barres d'échelles 50 µm pour B_1, C_1 et D_1 et 10 µm pour B_2, C_2 et D_2. En MEB, la = lamelle branchiale, ils = septum interlamellaire, gf = filament branchial et ba = bactériocytes. Barres d'échelles = 1 mm.

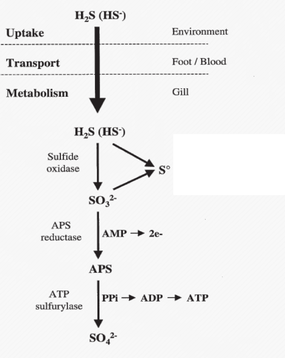
Lien entre composition des communautés et biologie / écophysiologie de l'hôte

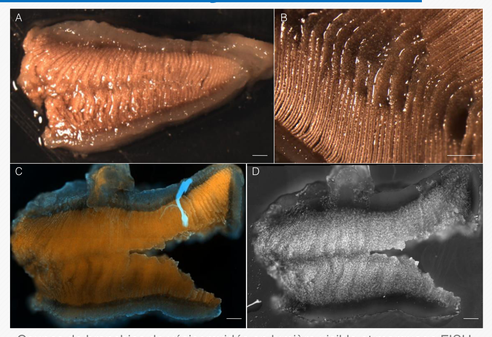
Site		Profondeur	Type d'écosystèmes	Texture du sédiment	Sulfate	Sulfure	Espèces échantillonnées		
							P. soyoae (syn. *kilmeri*)	*C. pacifica*	*A. gigas*
Ayala		1560 m	Suintements froids	Granuleux	Constant *(28 mM)*	Non détecté	62 / 77 *81%*	10 / 77 *13%*	5 / 77 *6%*
Vasconcelos	Site 1	1570 m	Suintements froids	Liquide et mou	Constant *(28 mM)*	Non détecté	1 / 44 *2%*	-	43 / 44 *98%*
	Site 2	1575 m	Suintements froids	Mou et riche en carbonates	Diminue avec la profondeur *(11.5 mM at 15 cmbsf)*	Augmente avec la profondeur après 4 cmbsf *(10.85 mM at 15 cmbsf)*	9 / 12 *75%*	3 / 12 *25%*	-
Morelos		2007 m	Sources hydrothermales	Liquide et mou	Diminue avec la profondeur après 5 cmbsf *(18.5 mM at 15 cmbsf)*	Augmente avec la profondeur après 5 cmbsf *(9.85 mM at 15 cmbsf)*	-	-	74 / 74 *100%*

- ***P. soyoae*** a été observée moins enfouie dans le sédiment que ***A. gigas***
- Nombreuses traces de déplacements de vésicomyidés au niveau des sites colonisés par ***A. gigas***
- Variabilité importante au niveau des flux de fluides pour le site Vasconcelos
- ***A. gigas*** aurait une plus grande capacité à se déplacer que ***P. soyoae***
- ***P. soyoae*** pourrait être plus compétitive que ***A. gigas*** dans un environnement caratérisé par des conditions favorables à son établissement

Traces de déplacements de vésicomyidés sur le site Vasconcelos BIG13 (Ifremer – BIG 2010)

Lien entre composition des communautés et métabolisme des symbiontes





Coupes de branchies de vésicomyidés en lumière visible et marquage FISH (en orange, les symbiontes)

- Présence de cristaux de soufre dans les branchies, au niveau des bactériocytes
- Stockage possible de l'énergie sous forme de soufre, par les symbiontes
- Plus grande proportion de soufre mesurée chez ***A. gigas*** que chez ***P. soyoae***
- Éventuelle plasticité plus importante chez les symbiontes de ***A. gigas*** que chez ceux de ***P. soyoae***

Proportions de soufre mesurées dans les branchies des vésicomyidés

Conclusions et hypothèses…

- Une **plus grande diversité** de vésicomyidés a été observée au niveau des suintements froids (3 espèces : *P. soyoae, C. pacifica* et *A. gigas)* qu'au niveau des sources hydrothermales (1 seule espèce : *A. gigas*)
- La caractérisation moléculaire des hôtes et des symbiontes confirme les hypothèses **de transmission verticale** des symbiontes et de **co-évolution**
- La distribution des vésicomyidés révèlerait l'existence de **niches écologiques** qui pourraient dépendre du vésicomyidé, de ces symbiontes ou des deux partenaires
- *A. gigas* a été obervée **plus enfoncée** dans le sédiment que *P. soyoae* et pourrait ainsi accéder à du sulfide présent plus profondément dans le sédiment
- *A. gigas* aurait une plus **grande capacité à se déplacer**, ce qui lui permettrait d'exploiter plus facilement des sources transitoires et ponctuelles de sulfure
- L'hypothèse d'une plus **grande plasticité** des symbiontes d'*A. gigas* a été avancée suite à la découverte d'une grande capacité à stocker le soufre élémentaire
- Ces propriétés pourraient permettre à ***A. gigas*** de coloniser à la fois les sites de suintements froids et de sources hydrothermales

Poster 4 : Colloque de l'AFEM (Clermont-Ferrand - Octobre 2013)

Influence des communautés microbiennes sédimentaires sur la répartition faunistique dans les zones d'émissions de fluides froids du bassin de Guaymas

P. Cruaud, A. Vigneron, P. Pignet, JC. Caprais, A. Godfroy and MA. Cambon-Bonavita

Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, Ifremer, France
perrine.cruaud@ifremer.fr

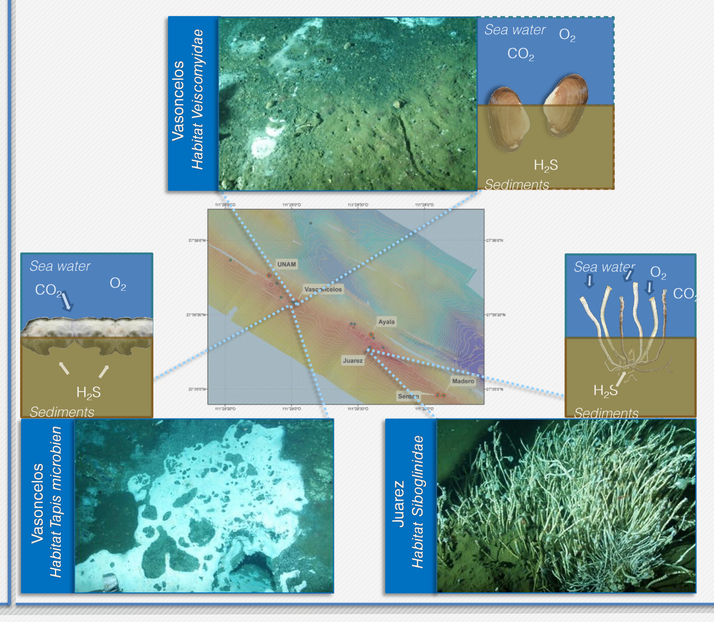
Les **suintements froids** sont localisés le long des marges continentales dans des contextes géologiques favorisant l'expulsion de fluides enrichis en méthane. L'apport de composés chimiques réduits, comme le méthane, est à l'origine du développement de communautés riches et diverses. La production primaire dans les sources froides est assurée par des microorganismes chimiolithoautotrophes libres ou associés en symbiose avec des invertébrés.

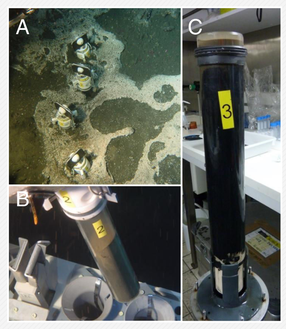
Les suintements froids présents sur la **Marge de Sonora**, située dans le Bassin de Guaymas dans le Golfe de Californie (Mexique), se caractérisent par une mosaïque d'assemblages faunistiques comme les *Vesicomyidae* et les *Siboglinidae* et des tapis microbiens blancs composés de *Thiotrichales* géantes filamenteuses.

Problématiques de l'étude:

- La **diversité microbienne** associée aux suintements froids de la marge de Sonora correspond-elle à celle habituellement retrouvée dans ces écosystèmes ?
- Les communautés microbiennes sédimentaires sont-elles différentes en fonction des **colonisateurs** présents en surface ?
- Ces communautés varient-elles en fonction de la **profondeur** du sédiment ?
- La distribution des communautés microbiennes est-elle liée à la **chimie** des fluides ?
- Existe-t-il des **interactions** entre les différents groupes microbiens présents ?
- Les communautés microbiennes sédimentaires influencent-elles la **répartition** des différents assemblages faunistiques au niveau de la marge de Sonora ?

L'échantillonnage et les sites étudiés:





Les sédiments ont été prélevés sur chacun des sites étudiés grâce à des **carottiers** d'environ 30 cm de long (A)

Les carottiers ont été récupérés puis remontés à la surface (B)

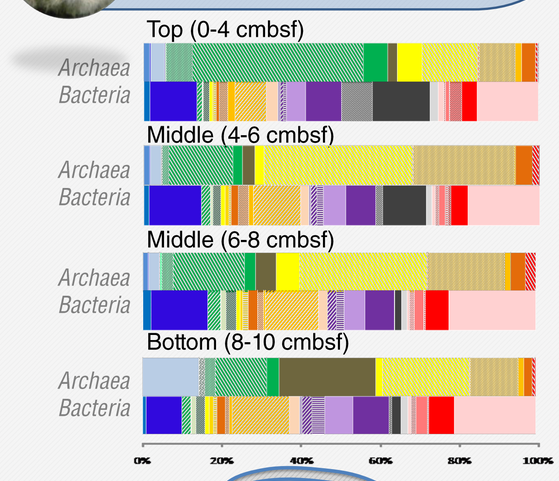
A bord, les carottes des sédiments (C) sont **divisées en tronçons** de 2 cm d'épaisseur, conditionnés pour les différentes analyses (séquençage, FISH, Q-PCR)

Pour chaque site, 2 carottes de sédiments ont été prélevées pour la microbiologie et 2 autres pour les analyses chimiques des eaux interstitielles.

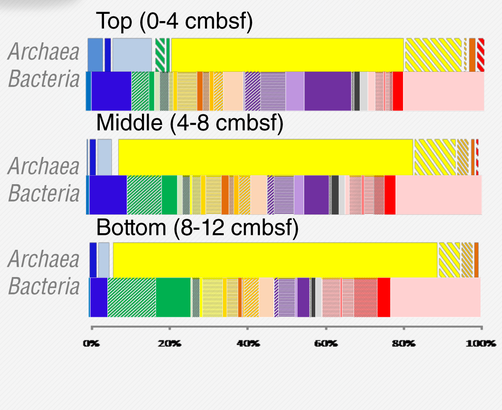
Pyroséquençage 454:

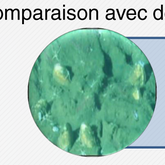
- **Extraction de l'ADN** suivant 2 protocoles (Méthode Zhou (Zhou et al., 1996) et kit commercial FastDNA® Kit for Soil (Qbiogene)), puis purification et poolage des extraits
- Utilisation d'un couple **d'amorces PCR** spécifique *Bacteria* et un autre *Archaea*. **Multiplexage** des échantillons sur un run de 454 (4 régions sur GS – FLX + , séquençage par la plateforme génomique de Rennes)
- **Filtration** des reads et **démultiplexage** sur *Mothur*. **Affiliation** des séquences sur *Mothur* (Classifier) sur la base de données *Silva* (Août 2013) et comparaison avec des bases de données personnelles

Habitat *Tapis Microbiens*

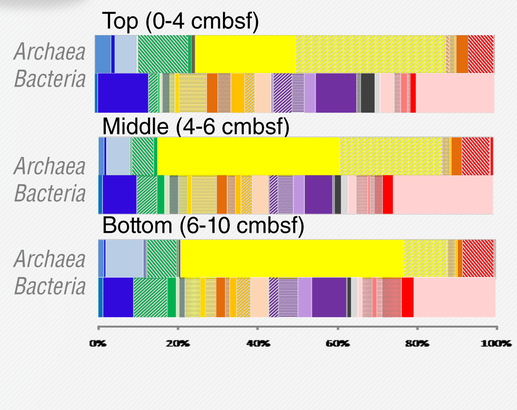


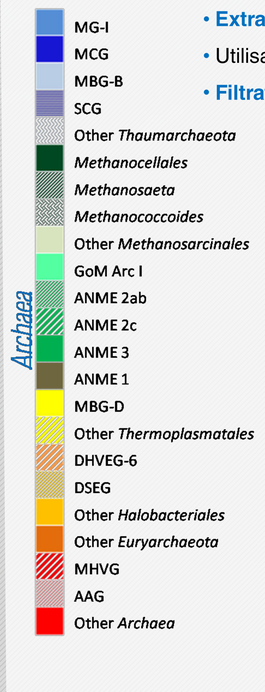
Habitat *Siboglinidés*

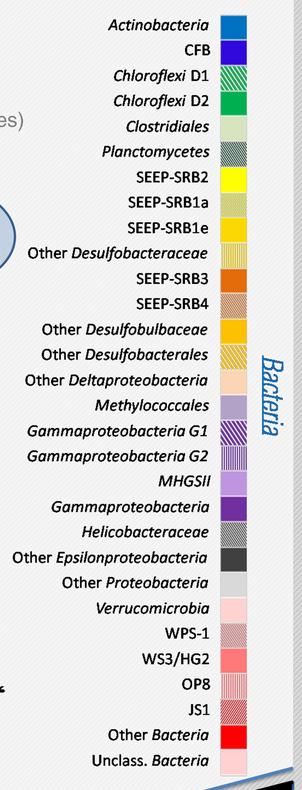




Habitat *Vésicomyidés*

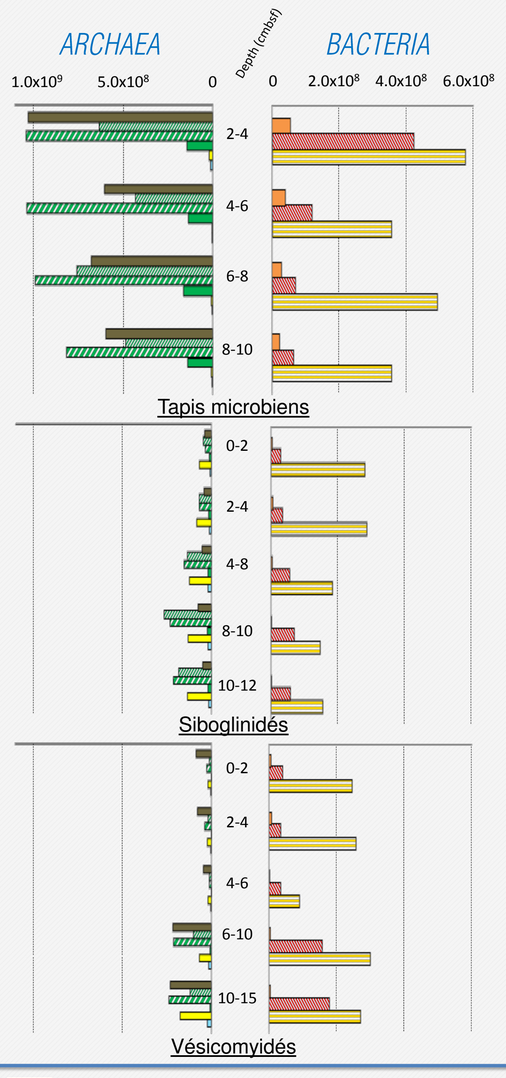




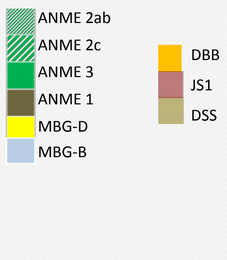


- Globalement, les **mêmes groupes microbiens** sont retrouvés dans tous les échantillons. Cependant, les proportions de séquences varient en fonction du site échantillonné et de la profondeur
- Les **groupes microbiens** dominants sont les Thermoplasmatales (MBG-D) et les ANME chez les *Archaea*. Les différences sont moins marquées chez les bactéries.

Q-PCR:

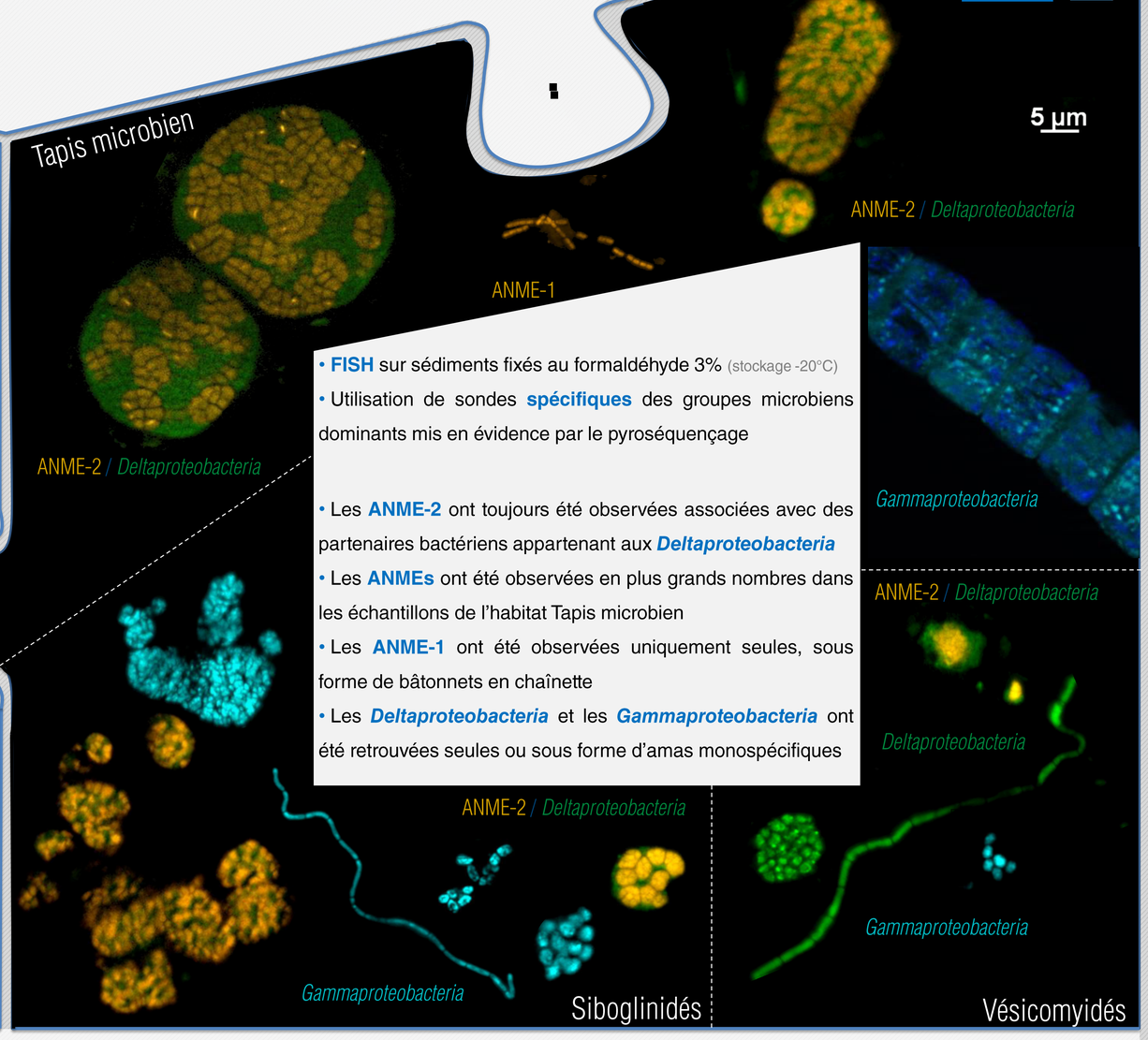


- **Q- PCR** sur ADN extrait par la méthode Zhou
- Utilisation de couples d'**amorces spécifiques** des groupes microbiens dominants mises en évidence par le pyroséquençage
- Efficacité supérieure à 85%
- Unité : nombre de copies d'ARNr 16S par gramme de sédiments



- Les **ANME-2 et -1** semblent plus nombreuses sous les tapis microbiens que sous les animaux.
- Comme l'indiquent les résultats de pyroséquençage, les **MBG-D** semblent être plus nombreuses sous les animaux que sous les tapis microbiens. Cependant, la proportion **ANME** / **MBG-D** obtenue en pyroséquençage sous les animaux n'est pas retrouvée en Q-PCR.
- Les **groupes bactériens** analysés semblent être globalement plus nombreux sous les tapis microbiens que sous les animaux

FISH



- **FISH** sur sédiments fixés au formaldéhyde 3% (stockage -20°C)
- Utilisation de sondes **spécifiques** des groupes microbiens dominants mis en évidence par le pyroséquençage

- Les **ANME-2** ont toujours été observées associées avec des partenaires bactériens appartenant aux ***Deltaproteobacteria***
- Les **ANMEs** ont été observées en plus grands nombres dans les échantillons de l'habitat Tapis microbien
- Les **ANME-1** ont été observées uniquement seules, sous forme de bâtonnets en chaînette
- Les ***Deltaproteobacteria*** et les ***Gammaproteobacteria*** ont été retrouvées seules ou sous forme d'amas monospécifiques

Conclusions et hypothèses…

- La **distribution** des communautés microbiennes est différente selon l'habitat considéré
- Les **méthanotrophes anaérobies** (ANME) sont plus nombreux au niveau des sédiments de l'habitat tapis microbien par rapport aux sédiments colonisés par les siboglinidés et les vésicomyidés
- A l'opposé, les **MBG-D** semblent être plus nombreuses sous les animaux que sous les tapis microbiens
- Les concentrations en méthane et en sulfure sont plus élevées sous le tapis microbien. La **composition des fluides** va ainsi influencer la distribution des **communautés microbiennes**.
- Les **communautés microbiennes** vont aussi modifier la **composition des fluides** (en produisant par exemple des sulfures grâce à l'AOM) et alimenter les **colonisateurs de surface**.
- Les **colonisateurs de surface** vont également influencer la **composition des fluides** et la distribution des **communautés microbiennes**, en consommant certains substrats (ex. sulfure), et en perturbant la surface des sédiments (bioturbation).

Poster 5 : Colloque de l'AFEM (Clermont-Ferrand - Octobre 2013)

Combining 454-Pyrosequencing, Q-PCR and FISH to characterize deep-sea sediment microbiomes

P. Cruaud, A. Vigneron, P. Pignet, JC. Caprais, A. Godfroy and MA. Cambon-Bonavita

Laboratory of Microbiology of Extreme Environments, UMR6197, Ifremer, France
perrine.cruaud@ifremer.fr

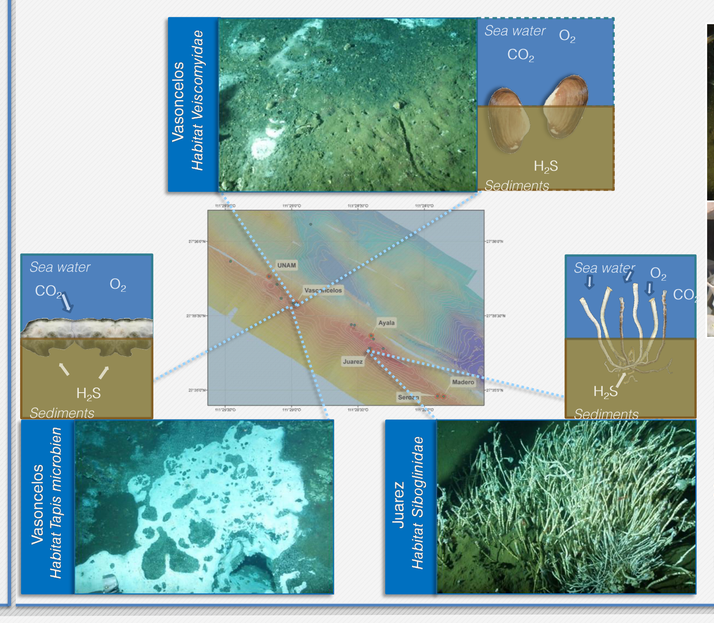
Continental margins accumulate large amounts of sedimented organic matter that are progressively degraded and transformed into deeply buried hydrocarbons, such as methane. In specific areas, named **cold seeps**, these hydrocarbons rise to the seafloor and fuel microbial communities and various faunal assemblages.

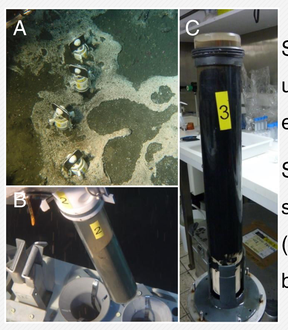
The **Sonora Margin** cold seeps, located in the Guaymas Basin (Gulf of California), harbour microbial mats and different faunal assemblages, such as *Vesicomyidae* and *Siboglinidae*.

Problematic :

- Is the **microbial diversity** of the Sonora Margin cold seeps similar to those usually found in these type of ecosystems ?
- Are there differences between microbial communities according to the type of **surface colonizers** ?
- How do they interact with each other?
- How does the microbial communities vary with **depth** and **geochemical gradients** ?
- Are there some **interactions** beween the different microbial groups ?

Sampling :





Sediments were sampled using **push cores** at each habitat (A)

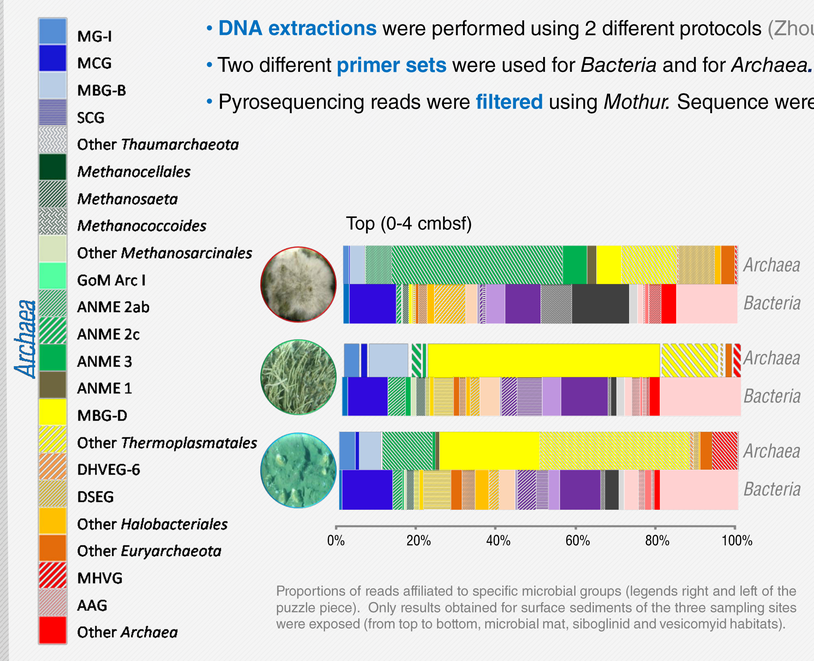
Sediment push core samples were collected (B) and transferred on board (C).

For each habitat, 2 sediment push cores were sampled for microbiology and 2 other for porewater analyses.

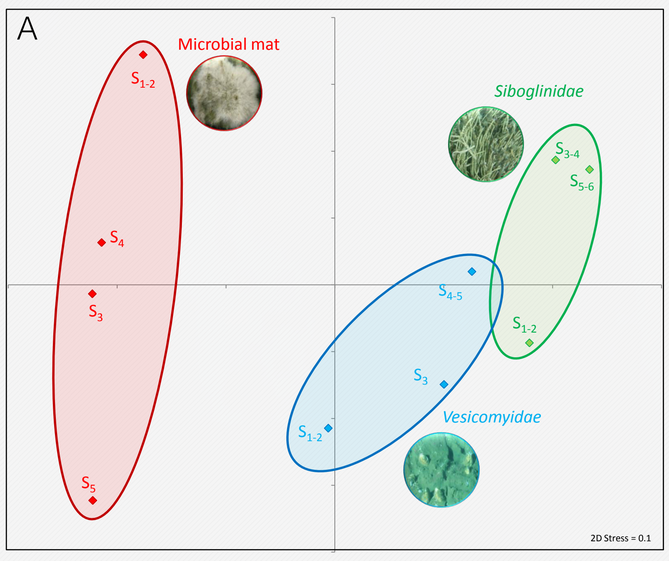
For microbiology, sediment cores were **subsampled in 2 cm thick layers**. Subsamples were then frozen for nucleid acid extraction or fixed with formaldehyde for fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

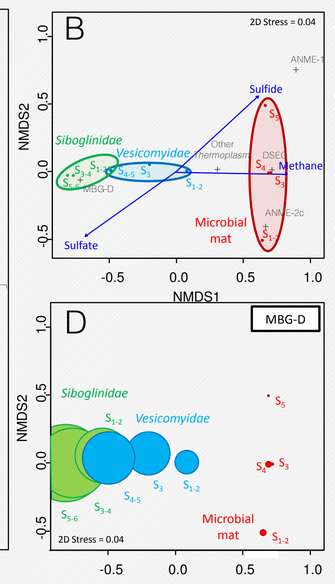
454-Pyrosequencing :

- **DNA extractions** were performed using 2 different protocols (Zhou method (Zhou et al., 1996) and commercial kit FastDNA® Kit for Soil (Qbiogene))
- Two different **primer sets** were used for *Bacteria* and for *Archaea.* All samples were sequenced on a same run using **multiplexing** (4 regions on GS – FLX + , sequencing by the genomics plateform of Rennes 1)
- Pyrosequencing reads were **filtered** using *Mothur.* Sequence were **affiliated** by *Classifier* with *Silva* database (August 2013) and then compared to personal databases

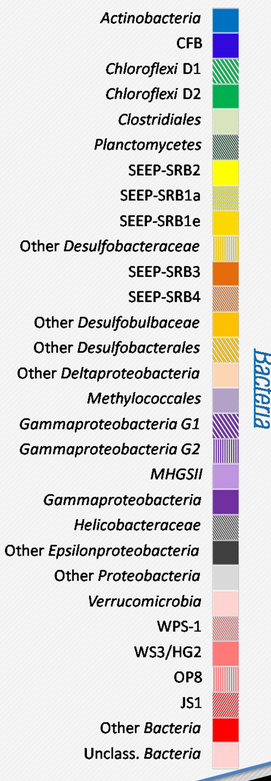


Proportions of reads affiliated to specific microbial groups (legends right and left of the puzzle piece). Only results obtained for surface sediments of the three sampling sites were exposed (from top to bottom, microbial mat, siboglinid and vesicomyid habitats).



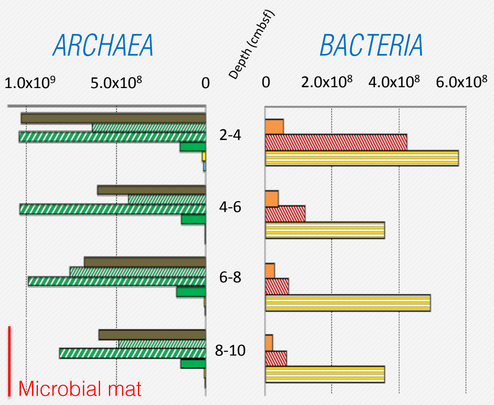


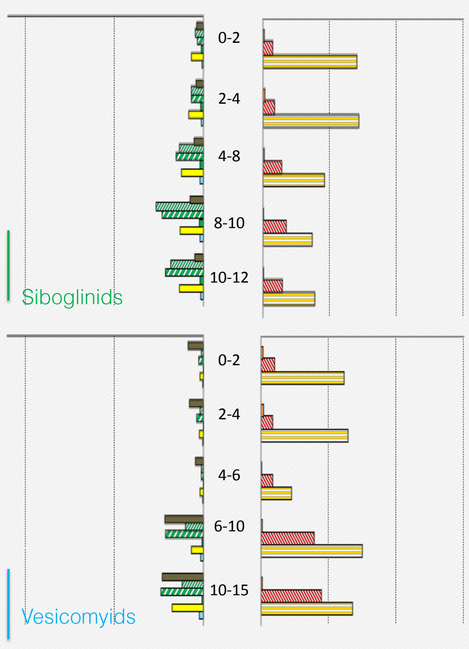
Statistical analyses of pyrosequencing results concerning *Archaea* for the three sampling habitats (S = Section). (A) Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS) using Mothur pipeline with OTUs defined at 10% dissimilarity and Bray-Curtis dissimilarity index. Spatial separations are statistically significant (AMOVA). (B), (C) and (D) NMDS using R software with microbial group datasets (Bray-Curtis); (B) using environmental variables and microbial groups which contribute most to the dissimilarity between samples (SIMPER). (C) and (D) Dot sizes are proportional to read numbers affiliated to ANME-2c and MBG-D respectively.

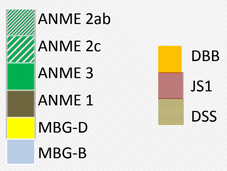


Q-PCR:

- The **same microbial groups** were found in all samples. However, sequence proportions vary according to sampling site and depth.
- The dominant archaeal groups were *Thermoplasmatales* (MBG-D) and ANME depending on the sampling site. Differences between samples were less pronounced for *Bacteria*.



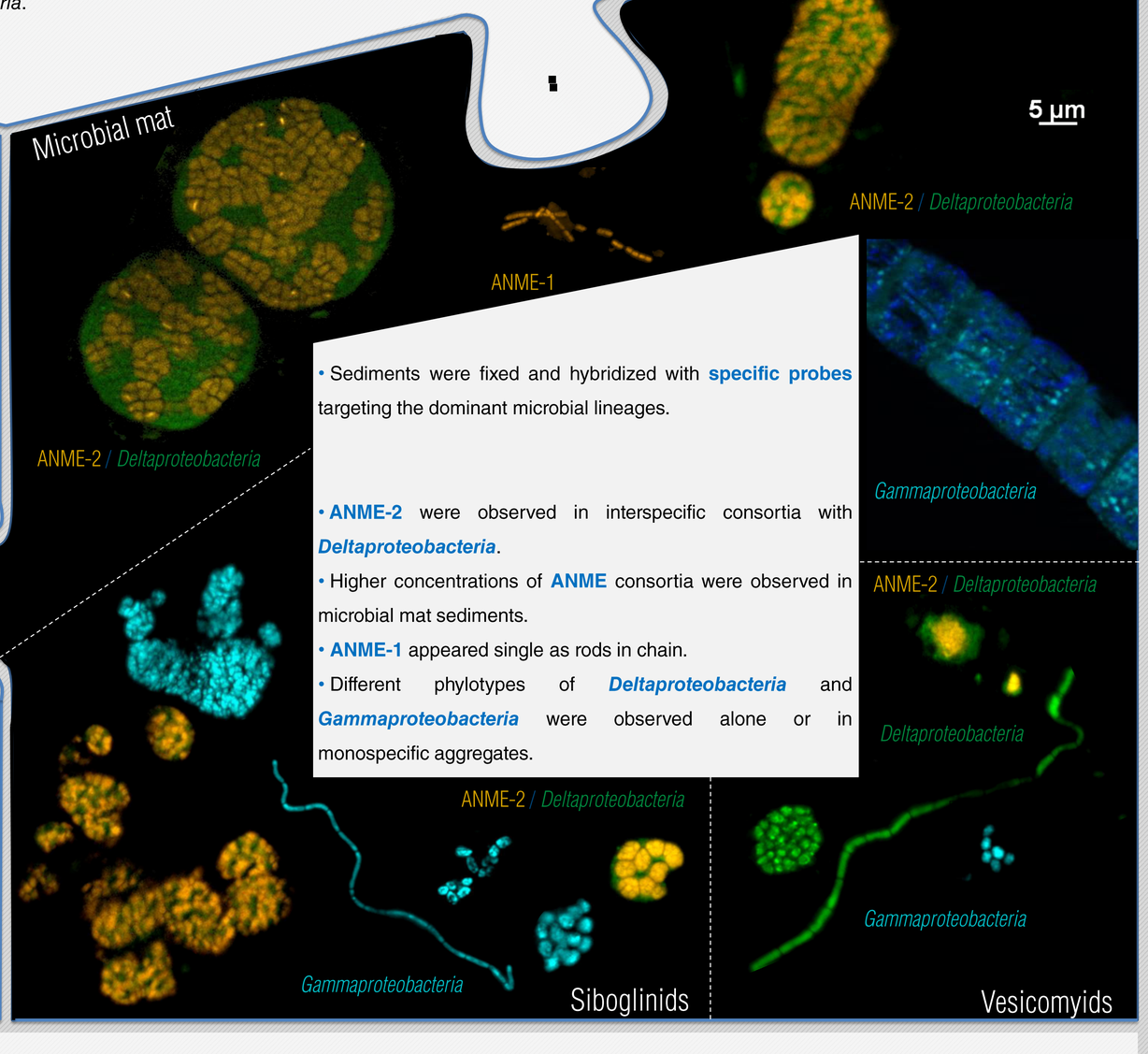




- **Specific primer sets** were used to target dominant microbial groups highlighted by pyrosequencing
- Unit : 16S rRNA copies per gram of sediments

- Higher relative abundance was detected in microbial mat habitats.
- **ANME-2 and -1** seemed to be more abundant in sediment underlying microbial mat than below the faunal assemblages.
- In contrast, **MBG-D** appeared to be more abundant in sediment underlying vesicomyids and siboglinids.
- These results were congruent with pyrosequencing analyses except for ANME / MBG-D proportions in sediments underlying animals.

FISH



- Sediments were fixed and hybridized with **specific probes** targeting the dominant microbial lineages.
- **ANME-2** were observed in interspecific consortia with ***Deltaproteobacteria***.
- Higher concentrations of **ANME** consortia were observed in microbial mat sediments.
- **ANME-1** appeared single as rods in chain.
- Different phylotypes of ***Deltaproteobacteria*** and ***Gammaproteobacteria*** were observed alone or in monospecific aggregates.

Conclusions et hypothesis…

- Microbial communities **distribution** varied significantly according to the sampling habitat
- **Anaerobic methanotrophs** (ANME) were more abundant in sediments underlying microbial mats whereas **MBG-D** lineages were more abundant below animal clonizers
- Higher methane and sulfide concentrations were measured in microbial mat sediments. **Geochemical composition** of the up-raising fluid could impact on the microbial community structure, distribution and abundance
- Microbial comunities could also influence **the fluid chemical composition** (sulfate reduction, methane oxidation) and fuel the **surface colonizers**
- **Surface colonizers** could modify the **sediment geochemistry** (oxygen, sulfur oxidation, bioturbation) and thus impact the microbial community distribution, diversity and abundance

Poster 6 : Colloque de Génomique Environnementale (Rennes – Novembre 2013)

Article 4

Archaeal and anaerobic methane oxidizer communities in the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin (Gulf of California)

Adrien Vigneron, Perrine Cruaud, Patricia Pignet, Jean-Claude Caprais, Marie-Anne Cambon-Bonavita, Anne Godfroy and Laurent Toffin

The ISME Journal (2013), 1–14
© 2013 All rights reserved 1751-7362/13
www.nature.com/ismej

ORIGINAL ARTICLE

Archaeal and anaerobic methane oxidizer communities in the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin (Gulf of California)

Adrien Vigneron[1,2,3], Perrine Cruaud[1,2,3], Patricia Pignet[1], Jean-Claude Caprais[4], Marie-Anne Cambon-Bonavita[1,2,3], Anne Godfroy[1,2,3] and Laurent Toffin[1,2,3]

[1]*DEEP/LM2E, IFREMER, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, Technopôle Brest Iroise, Plouzané, France;* [2]*Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, IUEM UMR6197, Université de Bretagne Occidentale, Plouzané, France;* [3]*CNRS, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, Technopôle Brest Iroise, Plouzané, France and* [4]*IFREMER, Laboratoire Environnements Profonds, UMR6197, Technopôle Brest Iroise, Plouzané, France*

Cold seeps, located along the Sonora Margin transform fault in the Guaymas Basin, were extensively explored during the 'BIG' cruise in June 2010. They present a seafloor mosaic pattern consisting of different faunal assemblages and microbial mats. To investigate this mostly unknown cold and hydrocarbon-rich environment, geochemical and microbiological surveys of the sediments underlying two microbial mats and a surrounding macrofaunal habitat were analyzed in detail. The geochemical measurements suggest biogenic methane production and local advective sulfate-rich fluxes in the sediments. The distributions of archaeal communities, particularly those involved in the methane cycle, were investigated at different depths (surface to 18 cm below the sea floor (cmbsf)) using complementary molecular approaches, such as Automated method of Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA), 16S rRNA libraries, fluorescence *in situ* hybridization and quantitative polymerase chain reaction with new specific primer sets targeting methanogenic and anaerobic methanotrophic lineages. Molecular results indicate that metabolically active archaeal communities were dominated by known clades of anaerobic methane oxidizers (archaeal anaerobic methanotroph (ANME)-1, -2 and -3), including a novel 'ANME-2c Sonora' lineage. ANME-2c were found to be dominant, metabolically active and physically associated with syntrophic *Bacteria* in sulfate-rich shallow sediment layers. In contrast, ANME-1 were more prevalent in the deepest sediment samples and presented a versatile behavior in terms of syntrophic association, depending on the sulfate concentration. ANME-3 were concentrated in small aggregates without bacterial partners in a restricted sediment horizon below the first centimetres. These niche specificities and syntrophic behaviors, depending on biological surface assemblages and environmental availability of electron donors, acceptors and carbon substrates, suggest that ANME could support alternative metabolic pathways than syntrophic anaerobic oxidation of methane.

The ISME Journal advance online publication, 28 February 2013; doi:10.1038/ismej.2013.18
Subject Category: Microbial ecology and functional diversity of natural habitats
Keywords: ANME; AOM; *Archaea*; FISH; Q-PCR; Sonora Margin

Introduction

At continental margins, large amounts of sedimented organic matter are progressively degraded and transformed into deeply buried hydrocarbons, such as methane. In localized areas, named cold seeps, these hydrocarbons rise in a fluid to the seafloor and form oases of elevated microbial biomass and various faunal assemblages (Jorgensen and Boetius, 2007). According to recent estimates, more than 90% of the emitted methane is metabolized by chemosynthetic archaeal anaerobic methanotroph (ANME) and bacterial sulfate reducer consortia during sulfate reduction coupled to anaerobic oxidation of methane (AOM) in sediments (see Knittel and Boetius (2009) and references therein). ANME clades are phylogenetically divided into three distinct lineages (ANME-1, ANME-2 and ANME-3) affiliated to the Methanosarcinales and Methanomicrobiales orders (Knittel and Boetius, 2009). Metagenomic and metaproteomic studies of ANME communities support the existence of a reverse methanogenesis metabolic pathway for AOM (Meyerdierks *et al.*, 2005, 2010). The products

Correspondence: L Toffin, DEEP/LM2E, IFREMER, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extremes, UMR6197, Technopole Brest Iroise, BP70, Plouzan 29280, France.
E-mail: laurent.toffin@ifremer.fr
Received 17 September 2012; revised 8 January 2013; accepted 10 January 2013

of these anaerobic microbial metabolisms (sulfide or incompletely oxidized organic compounds) are assimilated by mat-forming giant sulfide-oxidizing *Bacteria*, such as *Beggiatoa* spp. (Lloyd *et al.*, 2010; Grünke *et al.*, 2011; McKay *et al.*, 2012) or invertebrate symbiosis-involved microorganisms (Cambon-Bonavita *et al.*, 2009). However, much remains to be understood about the AOM mediated by ANME. For instance, the diversity and habitat preference of involved microorganisms or the environmental parameters that impact on these archaeal groups' distribution need to be defined.

The methane-rich hydrothermal sediments of Guaymas Basin, with a high sedimentation rate (2.7 mm per year), were the first hydrothermal vent habitats in which AOM was demonstrated and have since been studied extensively (Simoneit *et al.*, 1996; Teske *et al.*, 2002; Dhillon *et al.*, 2003, 2005; Page *et al.*, 2008; Holler *et al.*, 2011; Biddle *et al.*, 2012; McKay *et al.*, 2012). In contrast, a nearby cold seep area, which harbors local patches of microbial mats and various faunal assemblages (clams, tubeworms), was observed few kilometers away from hydrothermal sites on a transform fault located on the Sonora Margin (Simoneit *et al.*, 1990; Paull *et al.*, 2007), but remains unsampled for microbiology.

To characterize for the first time microbial communities on the Sonora Margin and to understand the structure and function of the observed microbial ecosystems (two microbial mats and surrounding macrofauna), phylogenetic, microscopic and quantitative analyses of archaeal communities involved in methane cycling and in cold seep processes were undertaken and completed using geochemical analyses.

Materials and methods

Site description and sampling

Sediment push core samples were collected in triplicate at cold hydrocarbon-rich seeps from the Sonora Margin using the manned submersible *Nautile* on dives 1755-11, 1756-12 and 1758-14 at 1574 m depth during the cruise 'BIG' (RV *L'Atalante*, June 2010). The sediments, located near marker BIG18 at 'Vasconcelos' site (27°35.5770N; 111°28.9840W) (Supplementary Material and Figure 1), highly supplied by visible sinking organic matter, were covered with patchy thick white *Beggiatoa* mats occasionally surrounded by grey mat-like macrofauna assemblage. Four different sampling locations were included in this study: (i) White MAT 12 (WM12), a sediment covered with a white microbial mat <1 m wide; (ii) White MAT 14 (WM14), a larger white microbial mat area where gas bubbles and fluids were expelled through a hole; (iii) the Edge of White MAT 14 (EWM14), colonized by dense populations of grey polychaetes and gastropods (M Rabillier and K Olu, personal communications) assumed to be, respectively, deposit feeders and grazers (Fauchald and Jumars, 1979; Waren and Ponder, 1991) (Supplementary Material and Figure 2); and (iv) outside of the active area, that is, the reference site (27°25.483N; 111°30.0759W). At each location, except for WM12 due to its narrow diameter, additional cores were collected on each habitat for methane and sulfide analyses (Supplementary Material and Figure 1). Autonomous temperature sensors (T-Rov; NKE Electronics, Hennebont, France) indicated *in situ* temperatures around 3 °C from the surface water to the 40 cm below the sea floor (cmbsf) on each habitat before sampling.

On board, sediment cores were immediately transferred to the cold room. Sediments recovered from WM14 and EWM14 consisted of a dark olive-green ooze in the upper 5 cm and color became lighter with depth. In contrast, sediments color from WM12 was black throughout the core. Gas bubbles were noted immediately after recovery. Sediment cores were subsampled aseptically for molecular analyses in 2- or 5-cm-thick layers using 2 ml cutoff syringes. Sediment subsamples were then frozen at -80 °C for nucleic acid extractions. Sediments (2 g) were collected from each layer and fixed for 4 h in phosphate-buffered saline/formaldehyde (3% final) at 4 °C, washed two times with phosphate-buffered saline and stored in an ethanol/phosphate-buffered saline (1:1, vol vol^{-1}) buffer at -20 °C until analysis by fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

Porewater analyses

Sediment samples were processed on board for porewater chemical analyses. Porewater for sulfate analysis was obtained by spinning down 10 cm^3 of sediments per horizon or using Rhizon samplers on closest geochemical cores for hydrogen sulfide and methane (Supplementary Material and Figure 1). Porewater samples were fixed with: zinc chloride (1:1, vol vol^{-1}) for sulfide and 50 µl of sodium azide for methane analyses and nitric acid for sulfate. Sulfate concentrations were measured by ion exchange chromatography as described previously (Lazar *et al.*, 2012). Hydrogen sulfide concentrations were determined by colorimetry (Fonselius *et al.*, 2007). Methane concentrations were quantified by using the headspace technique (HSS 86.50, Dani Instruments, Milan, Italy) and a gas chromatograph (Perichrom 2100, Alpha MOS, Toulouse, France) equipped with flame-ionization detector (Sarradin and Caprais, 1996).

The stable isotope composition of methane was measured by ISOLAB b.v. company (Neerijnen, The Netherlands) in the deepest sediment section (12–17 cmbsf) of the WM14 core CT4 using a MAT Finnigan delta S mass spectrometer (San Jose, CA, USA) coupled to a gas chromatograph by a GC/C II interface.

RNA and DNA extractions from sediments, PCR and RT-PCR amplifications, cloning and sequencing

Total nucleic acids (DNA and RNA) were directly extracted in duplicate from 2.5 g of sediments (Zhou

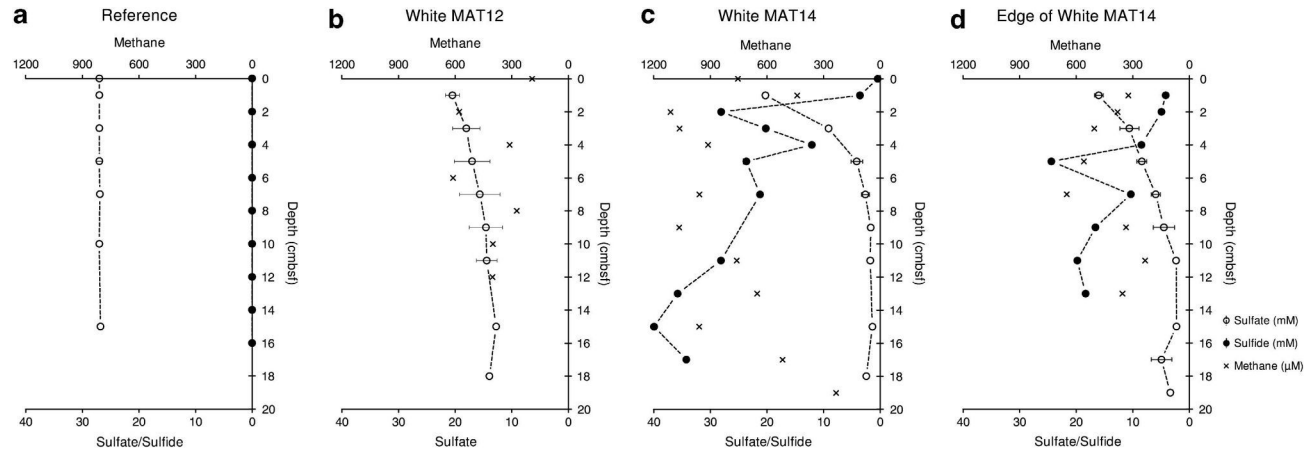


Figure 1 Geochemical profiles in cold seep sediments of Sonora Margin, Guaymas Basin. Dissolved methane (cross), sulfate (open circle) and sulfide (black circle) concentrations in porewaters. Sediment cores were from (**a**) Reference, (**b**) White MAT12, (**c**) White MAT14 and (**d**) the Edge of White MAT14.

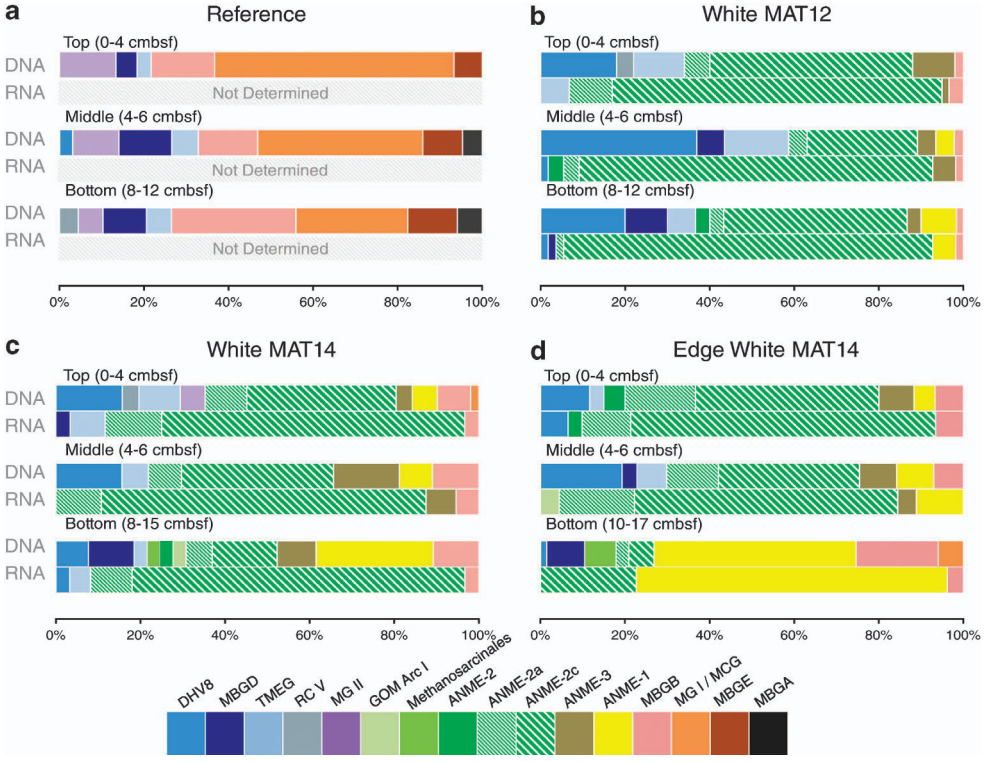


Figure 2 Phylogenetic affiliations of archaeal 16S rRNA genes and 16S rRNA-derived sequences at different depths for cold seep sediments of the Sonora Margin: (**a**) Reference, (**b**) White MAT12, (**c**) White MAT14 areas and (**d**) the Edge of White MAT 14. Shades of green, brown and yellow denote putative methane-oxidizing or methane-producing groups. 'Not determined' means that no amplification was obtained. DHVE8, Deep-Sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotal Group 8; MBG-D, -A, -E, -B Marine Benthic Group-D, -A, -E, -B; MCG, Miscellaneous Crenarchaeotic Group; MG II/I, Marine Group II/I; RCV, Rice Cluster V; TMEG, Terrestrial Miscellaneous Euryarcheotal Group; ANME, Anaerobic Methanotrophs; GOM Arc I, Golf of Mexico Archaea group I.

et al., 1996) with modifications, pooled and purified (Lazar *et al.*, 2010). Total RNA were purified using Nucleospin RNA II Kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) before reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR). Aliquots of rRNA were reverse transcribed using the Quanta qScript Kit according to the manufacturer's protocol (Quanta Bioscience, Gaithersburg, MD, USA). All PCR reactions were monitored as detailed previously (Lazar *et al.*, 2010), with appropriate annealing temperature for primers listed in Table 1. Gene libraries from 16S rRNA genes (named 16S rDNA in the text) and crDNA templates (named 16S rRNA and used as a proxy for the detection of metabolically active populations) were constructed from pooled and gel-purified triplicate reactions into TOPO XL PCR Cloning Kit

Table 1 PCR primers used for PCR, ARISA and real-time PCR of 16S rDNA genes

Name	*Function*	*Target group*	*Sequence (5′—3′)*	*Amplicon size (bp)*	*Annealing temp. (°C)*	*Primer conc. (mM)*	*Ref.*
A8F	Cloning	Most of *Archaea*	CGG-TTG-ATC-CTG-CCG-GA	900	57	0.4	Teske *et al.* (2002)
A915R	Sequencing		GTG-CTC-CCC-CGC-CAA-TTC-CT				
A915F	ARISA	ITS of *Archaea*	AAA-GGA-ATT-GGC-GGG-GGA-GCA-C	Variable	55	0.4	Casamayor *et al.* (2002)
A71R (23S)			TCG-GYG-CCG-AGC-CGA-GCC-ATC-C				
Mcc495F	Q-PCR	*Methanococcales*	TAA-GGG-CTG-GGC-AAG-T	186	61	1.1	Yu *et al.* (2005)
McocR			GGA-TCA-ACA-CAT-TTC-ACC-GC				This study
MBT857F	Q-PCR	*Methanobacteriales*	CGW-AGG-GAA-GCT-GTT-AAG-T	343	60	0.3	Yu *et al.* (2005)
MBT1196R			TAC-CGT-CGT-CCA-CTC-CTT				Yu *et al.* (2005)
MmicF	Q-PCR	*Methanomicrobiales*	GTG-ATA-AGG-GAA-CCY-CGA-G	126	61	0.9	This study
MmicR			GCT-ACG-RAC-GCT-TTA-AGC-C				This study
MsarF	Q-PCR	*Methanosarcinales*	GTA-CCT-ACT-AGC-CDA-CRA-CGG	244	64	0.9	This study
Msar2R			GCT-ACR-GAC-CCT-TTA-GAC-CC				This study
MpyrF	Q-PCR	*Methanopyrales*	GGC-TAA-TCC-CCG-ATA-GGC	151	61	0.8	This study
MpyrR			CTT-GTC-TCA-GTC-CCC-GTC-TC				This study
ANME-1F	Q-PCR	ANME-1	GCT-TTC-AGG-GAA-TAC-TGC	200	60	1.1	Lloyd *et al.* (2011)
ANME-1R			TCG-CAG-TAA-TGC-CAA-CAC				Lloyd *et al.* (2011)
ANME-2aF	Q-PCR	ANME-2a	ACG-GAT-ACG-GGT-TGT-GAG-AG	151	60	1.1	This study
ANME-2aR			CTT-GTC-TCA-GTC-CCC-GTC-TC				This study
ANME-2cR	Q-PCR	ANME-2c	TCC-TCT-GGG-AAA-TCT-GGT-TG	224	60	1.1	This study
ANME-2cF			TCG-TTT-ACG-GCT-GGG-ACT-AC				This study
ANME-3F	Q-PCR	ANME-3	GGA-TTG-GCA-TAA-CAC-CGG	234	60	1.1	This study
ANME-3R			TAT-GCT-GGC-ACT-CAG-TGT-CC				This study
ARC787F	Q-PCR	*Archaea*	ATT-AGA-TAC-CCS-BGT-AGT-CC	273	60	0.5	Yu *et al.* (2005)
ARC1059R			GCC-ATG-CAC-CWC-CTC-T				
BACT1369F	Q-PCR	*Bacteria*	CGG-TGA-ATA-CGT-TCY-CGG	142	58	0.6	Suzuki *et al.* (2000)
BACT1492R			GGW-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T				

Abbreviations: ANME, archaeal anaerobic methanotroph; ARISA, Automated method of Ribosomal Intergenic Spacer Analysis; ITS, Intergenic Transcribed Spacer; Q-PCR, quantitative polymerase chain reaction.

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA). Sequencing was performed on an ABI3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using M13 universal primers by GATC Biotech (Constance, Germany). Sequences were analyzed using the NCBI BLASTn search program GenBank (Altschul *et al*., 1990) and aligned with the closest representative sequences using ClustalW function within BioEdit v.7.1 program (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA). Sequences data were analyzed with the MEGA4.0.2 program (Tamura *et al*., 2007) and checked manually for chimera. Phylogenic trees were calculated by neighbor-joining analysis (Saitou and Nei, 1987) using the Kimura two-parameter correction matrix (Kimura, 1980) and pairwise deletion parameter. The robustness of inferred topology was tested by boostrap resampling (1000) (Felsenstein, 1985). Sequences have been deposited in the EMBL database under the following accession numbers: HE774517–HE774603.

ARISA

An Automated method of Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA) was carried out for a rapid monitoring of microbial diversity and community composition in all sediment samples (Fisher and Triplett, 1999). ARISA-PCR was performed with primers targeting the archaeal 16S–23S intergenic spacer region (Table 1). PCR conditions were as follows: denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s and extension for 1 min 20 s at 72 °C for 35 cycles, followed by a final extension step at 72 °C for 15 min. A measure of 1 μM of each PCR reaction mixture was analyzed according to the manufacturer's protocol on a DNA 7500 Chip with an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA). All data were recovered and analyzed using the R Software with the ade4TkGUI package (Thioulouse and Dray, 2007).

Quantitative real-time PCR

Quantitative measurements were duplicated for each cores. Amplifications were performed with a 7300 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a final volume of 25 μl using PerfeCTa SYBR Green SuperMix ROX (Quanta Bioscience), 1 ng of crude DNA template and primers with appropriate concentrations and annealing temperatures (Table 1) according to the manufacturer's

instructions. Primer concentrations were optimized to minimize the secondary structure formations and to maximize the reaction efficiency. Annealing temperatures were adjusted for amplification specificity. As published primer pairs appeared inefficient for quantitative (Q-PCR), new primer sets specific for methanogenic and anaerobic methanotrophic communities, were designed using ARB package (Ludwig *et al*., 2004) and web-based application Primaclade (Gadberry *et al*., 2005) (Table 1). Primers were checked for specificity using *Oligocheck* software (Cardiff University, Cardiff, UK) and tested by PCR. Standard curves were obtained in triplicate with dilutions ranging from 0.001 to 100 nM of DNA extracted from pure cultures of representative groups (Supplementary Materials and Table 1). As no pure culture is available for ANME, standards were made from 10-fold serial dilutions (10^5–10^9 copies per μl) of plasmids containing environmental 16S rRNA genes of anaerobic methanotrophs. The R^2 of standard curves obtained by real-time PCR were up to 0.997 and efficiency of the reaction up to 90%. Samples were diluted until the crossing point decreased log-linearly with sample dilution, indicating the absence of inhibition effect. The specificity of the primer sets was confirmed by control sequencing of the amplification products. Q-PCR results were expressed in copy number per gram of sediment.

Fluorescence in situ hybridization

A measure of 20 μl of a 100-fold dilution of fixed sediment subsamples were immobilized on 0.22 μm GTTP polycarbonate filters (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Hybridization conditions were optimized to maximize fluorescence signal and probe specificity. Filters were incubated for 3 h at 44 °C, with hybridization buffer containing 40% formamide and labeled probes (Table 2) before washing at 46 °C for 20 min (Snaidr *et al*., 1997). Finally, filters were fixed on slides and treated with antifading/ 4′,6-diamidino-2-phenylindole solution (SlowFade Gold; Invitrogen). Observations and imaging were performed using an epifluorescence microscope Apotome with Axio Imager Z2 equipped with a COLIBRI system (Zeiss, Göttingen, Germany)

Results

Geochemical characterization

In WM14 and EWM14 sediments, porewater sulfate concentrations decreased rapidly from 22 mM in the surface layer to 2 and 5 mM respectively, at 5 cmbsf (Figures 1c and d), corresponding to the observed sediment color change. In contrast, WM12 sulfate concentrations decreased slightly from 22 mM at the surface to 12 mM by 18 cmbsf (Figure 1b). Sulfate concentrations in reference sediments remained constant to 28 mM with analyzed depth (Figure 1a).

Porewater sulfide concentrations increased quickly with depth and reached 40 mM in the WM14 core and 20 mM in the EWM14 core at the deepest sediment layers (Figure 1c). Peaks of sulfide (28 and 25 mM) were measured at 2 and 5 cmbsf for WM14 and EWM14, respectively (Figures 1c and d). Reference core sulfide concentrations remained under the detection limit (Figure 1a).

Methane porewater concentrations might have been underestimated owing to outgassing during core retrieval. Therefore, no clear methane profiles representing a 'sulfate-methane transition' could be inferred. The highest methane concentrations (almost 1.2 mM) were measured in WM14 cores, probably influenced by proximity to the fluid seep hole (Supplementary Material and Figure 1). Methane concentrations in the EWM14 were lower (0.7 mM) and varied according to depth (Figure 1d). Methane was not detected in the reference sediment core.

At the bottom (15–17 cmbsf) of WM14, δ^{13}C-CH_4 signature was −63‰, which could be interpreted as a dominant proportion of biogenic methane, mixed with abiotic and thermogenic methane (Damm and Budeus, 2003).

ARISA fingerprints

ARISA was used as a rapid method to compare archaeal community structure across the different samples. ARISA fingerprints displayed up to 10 different archaeal phylotypes throughout WM12, WM14 and EWM14 sediment cores, suggesting a low archaeal diversity. In all the sediment cores, community patterns were similar, with an observable shift in archaeal population composition at 4 cmbsf

Table 2 Oligonucleotide probes used for fluorescence *in situ* hybridization

Name	*Target group*	*Sequence (5′–3′)*	*Ref.*
ARCH915	Most of *Archaea*	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	Amann *et al.* (1990)
EUB338	Most of *Bacteria*	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Amann *et al.* (1990)
ANME-1-350	ANME-1	AGTTTTCGCGCCTGATGC	Boetius *et al.* (2000)
ANME-2-712	ANME-2	TTCGCCACAGATGGTCCC	Knittel and Boetius (2009)
ANME-3-1249	ANME-3	TCGGAGTAGGGACCCATT	Losekann *et al.* (2007)
ANME-3-1249H3	ANME-3 helper	GTCCCAATCATTGTAGCCGGC	Losekann *et al.* (2007)
ANME-3-1249H5	ANME-3 helper	TTATGAGATTACCATCTCCTT	Losekann *et al.* (2007)

Abbreviation: ANME, archaeal anaerobic methanotroph.

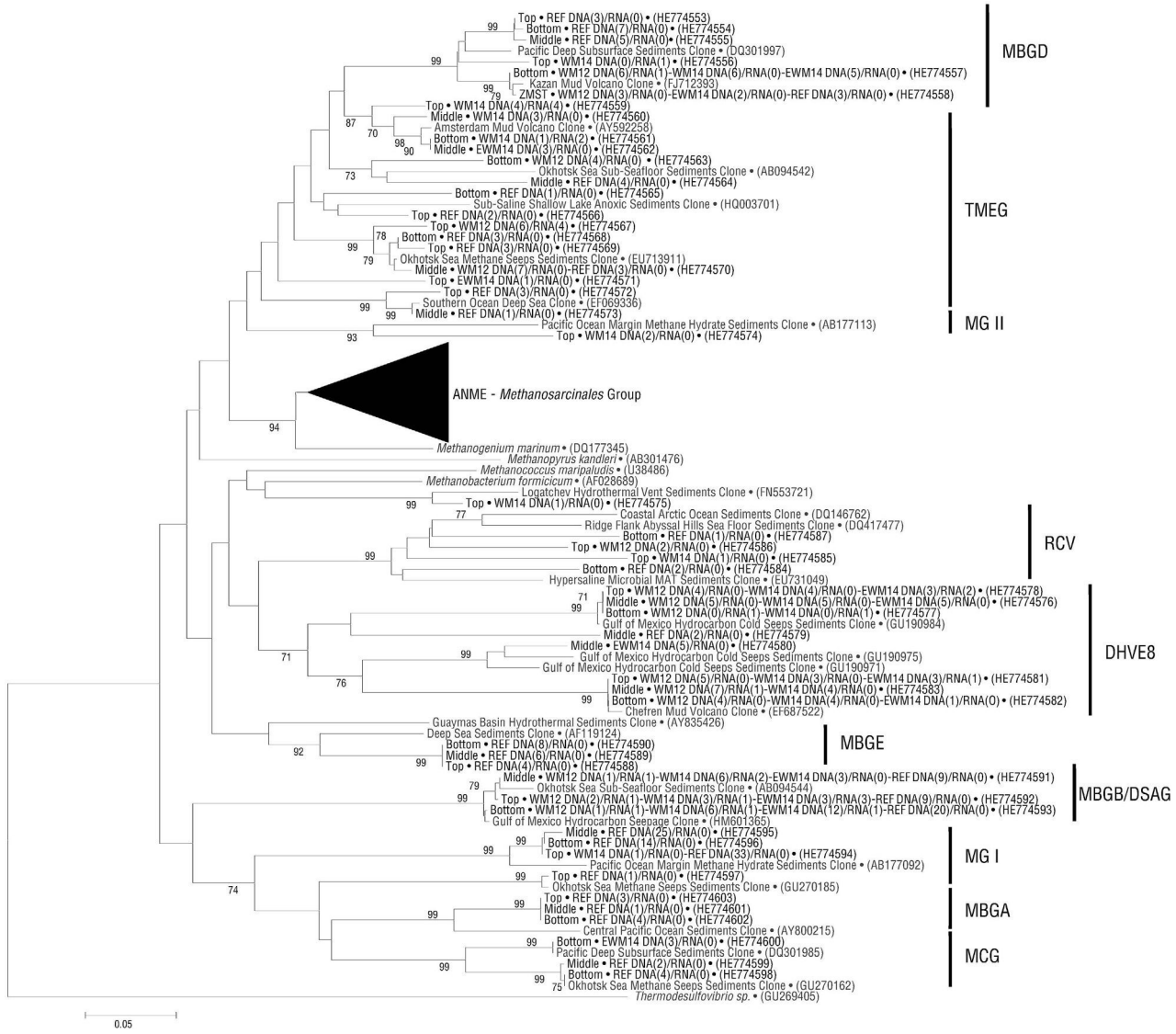


Figure 3 Neighbor-joining distance phylogeny of the archaeal 16S rRNA genes and rRNA-derived sequences in sediments of the Sonora Margin cold seeps based on the Kimura 2 parameters method with 1000 replicates, including 825 homologous positions. Only bootstrap values up to 70% are shown. The scale bar indicates five substitutions per 100 nucleotides. Sequences amplified from sections 0 to 4 cmbsf are labeled 'Top', sequences from 4 to 6 cmbsf are 'Middle' and sequences from 8 cmbsf to end are tagged 'Bottom'. Only one representative sequence (>97% identical) is shown. Number within parantheses show the number of clones analyzed from RNA or DNA clone libraries. DHVE8, Deep-Sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotal Group 8; EWM14, Edge of White MAT14; MBG-D/E/B/C, Marine Benthic Group D/E/B/C; MCG, Miscellaneous Crenarchaeotic Group; MG II/I, Marine Group II/I; RCV, Rice Cluster V; TMEG, Terrestrial Miscellaneous Euryarcheotal Group; ANME, Anearobic Methanotrophs; REF, Reference site; WM12, White MAT12;WM14, White MAT14.

as shown in Supplementary Material and Figure 3a for WM12. Reconstructed ARISA electrophoregrams, compared using principal component analysis (Supplementary Material and Figure 3b), highlighted a very low archaeal community structure evolution between 6 and 22 cmbsf EWM14 sediment layers and a close archaeal communities composition in the deepest sediment layers of each habitat. Principal component analysis revealed a relatively low variability between replicate cores for each habitat. Therefore, only one sediment core was selected per habitat to construct 16S rRNA gene libraries from RNA and DNA.

Also based on both ARISA analysis and geochemical data, six 16S rRNA gene libraries (from DNA and cDNA) of pooled sediment layers (top, middle and bottom) were constructed for each habitat.

Phylogenetic diversity of metabolically active Archaea
A total of 1204 partial archaeal 16S rRNA sequences were obtained. Archaeal 16S rRNA gene libraries showed a relative low diversity (that is, 5–6 phylogenetic lineages for rRNA and 7–11 for rDNA) (Figures 2 and 3). The most frequently retrieved sequences were affiliated to uncultured ANME.

Most of these sequences belonged to ANME-2 subdivisions a and c; these groups occurred in all sediment layers, with the exception of the reference site where no rRNA amplification was obtained. ANME-1-related sequences increased proportionally with depth in rDNA sequence libraries and were dominant in both rRNA and rDNA sequence libraries obtained from the deepest EWM14 sediments (10–17 cmbsf). ANME-3 cluster-related sequences were retrieved in 16S rRNA gene libraries from all cold seep habitats, except for the deepest layer of EWM14. In contrast, rRNA sequences were only detected in the intermediate layers (4–6 cmbsf; Figure 2). Representative sequences of the ANME clusters matched with sequences currently found at Mediterranean Sea mud volcanoes, Gulf of Mexico and Eel River cold seeps (Beal *et al.*, 2009; Lloyd *et al.*, 2010; Pachiadaki *et al.*, 2010, 2011) (Figure 3). However, phylogenetic analysis of 16S rRNA sequences revealed a monophyletic distinct subgroup of ANME-2c with no previous related sequences (Figure 4) named 'ANME-2c Sonora' and was found exclusively in the WM12 sulfate-rich sediments both in rRNA and rDNA libraries.

Also, a significant number of sequences was affiliated to other uncultivated *Archaea* belonging to members of the Deep Sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotal Group 8 (DHVE-8) detected in hydrocarbon-rich cold seeps (Lloyd *et al.*, 2010). Other sequences closely related to the Marine Benthic Groups D and B, Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotal Group and Marine Group II, commonly observed in deep marine sediments (Teske and Sorensen, 2008), were found not only in sediment cores underlying microbial mat but also in the reference core. Sequences affiliated to Marine Benthic Group E and Marine Group I dominated in

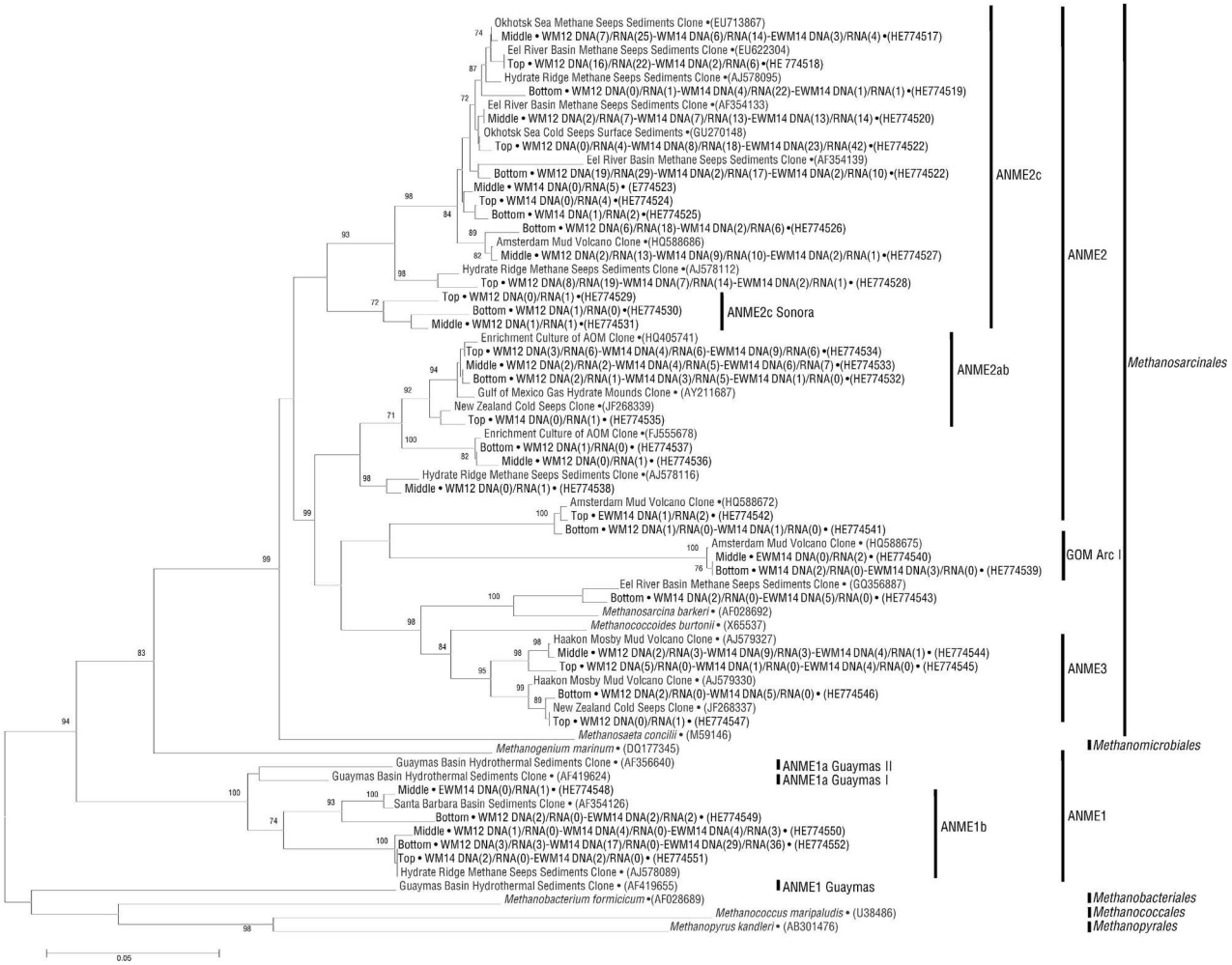


Figure 4 Neighbor-joining distance phylogeny of the archaeal 16S rRNA sequences and rRNA-derived sequences for ANME-methanogens clusters from sediment of Sonora Margin cold seeps based on the Kimura 2 parameters method with 1000 replicates, including 825 homologous positions. Only bootstrap values up to 70% are shown. Only one representative sequence (>97% identical) is shown. Number within parantheses show the number of clones analyzed from RNA or DNA clone libraries. ANME, Anaerobic Methanotrophs; GOM Arc I, Golf of Mexico Archaea group I; WM12, White MAT12;WM14, White MAT14; EWM14, Edge of White MAT14; REF, reference site.

samples from the reference site but were rarely detected in the cold seep habitats (Figures 2 and 3). Finally, only seven sequences affiliated to the *Methanoarchaea* genus *Methanosarcina* were found in the deepest layers of WM14 and EWM14, where sequences related to the emergent group of GOM Arc I were also detected (Figure 4).

Quantitative real-time PCR

Owing to the very few data available on microorganisms from cold seeps (pure culture or metagenomic analysis), the number of 16S rRNA genes (rDNA) copy per cell remains undetermined. To compare microbial populations abundance in our samples, we postulated a single 16S rRNA gene copy number for each quantified population.

Archaeal and bacterial abundance obtained by Q-PCR suggested an overall dominance of bacterial communities in sediment cores excepted in EWM14 sediments (Figure 5). In the first WM (WM12 and WM14) sediment layers (0–2 cmbsf), *Bacteria* were almost 20-fold more abundant than *Archaea* with $\sim 5 \times 10^8$ and $\sim 9 \times 10^9$ 16S rDNA copies per g of sediment, respectively. In WM14, archaeal 16S rDNA copy numbers increased with depth ($\sim 3.4 \times 10^9$ copies per g at the WM14 deepest layers), while *Bacteria* 16S rDNA copy numbers decreased ($\sim 3.8 \times 10^9$ copies per g). In contrast, in EWM14 sediments, *Archaea* gene copies remained constant ($\sim 2 \times 10^8$ copies per g) and *Bacteria* concentration decreased rapidly to non-active site bacterial concentration. *Archaea* abundance was twofold higher in WM12 than in other habitats and increased to 7.8×10^9 16S rDNA copies per g with depth. At the reference site, *Bacteria* 16S rDNA copies were 10-fold more abundant than archaeal gene copies throughout the entire sediment core and never exceed 2.2×10^9 and 2.9×10^8 16S rDNA copies per g for *Bacteria* and *Archaea*, respectively.

The *Methanosarcinales*, which include the ANME-2 and -3 phylogenetic clusters, dominated the archaeal community in WM sediments by rRNA gene copy abundance (10^9 16S rDNA copies per g). In EWM14 sediments, the *Methanosarcinales* remained the most abundant methanogenic order, representing 75% of *Archaea* in the upper layer (6.7×10^8 copies per g) and 30% below 8 cmbsf (2×10^8 copies per g). 16S rDNA genes copy numbers of *Methanococcales* and *Methanomicrobiales* orders were close to 10^7 copies per g without significant changes. 16S rDNA copy numbers of *Methanobacteriales*, close to the Q-PCR detection limit in the upper sediment section, increased with depth but remained low (4.8×10^6 copies per g). *Methanopyrales* representatives, previously isolated in the Guaymas Basin hydrothermal fields, were not detected in cold seep sediments.

Owing to the difference in the standard calibration process (plasmid and/or genomic DNA dilutions), 16S rRNA gene copy numbers of ANMEs could not be directly compared with previous quantifications. However, we were able to compare depth distribution of ANME representative sequences throughout the sediment cores. Quantifications highlighted ANME community concentrations fivefold more elevated in WM12 sediment cores, strongly dominated by ANME-2c (4.9×10^{11} 16S rDNA copies per g). ANME-2c representatives also dominated WM14 surface and intermediate sediment layers (0–8 cmbsf) and EWM14 surface layers (0–4 cmbsf) with a maximum of 1.5×10^{11} and 8.5×10^{10} 16S rDNA copies per g, respectively (Figure 5). ANME-1 16S copy numbers significantly increased with depth ($\sim 1.3 \times 10^{11}$ copies per g for WM14 and EWM14 and 2.35×10^{11} for WM12), dominating the WM14 bottom sediment ANME communities and appeared to be the unique ANME population below 8 cmbsf in EWM14. ANME-2a quantifications showed a similar depth distribution as those of ANME-2c but with lower concentrations. Specific DNA sequences of ANME-3 were also present in the intermediate sediment layers of all cold seep samples with a maximum of 5×10^{10} and 4×10^{10} 16S rDNA copies per g for WM14 and EWM14 sediments and 9.5×10^{10} 16S rDNA copies per g for WM12 cores.

Structure and morphologies of ANME aggregates

FISH observations using archaeal and bacterial probes revealed a high diversity of cell aggregates in size (5–50 μm in diameter), form (regular and irregular balls, chains, and so on) and organization (proportion and/or localization of *Archaea* and *Bacteria*) (Figure 6). Using more specific probes, ANME-2/*Bacteria*-labeled aggregates were found to be dominant in the surface and middle sediment horizons of WM14 and throughout WM12. Microscopic observations of ANME-2/bacterial aggregates showed a wide range of spatial organization, including mixed, concentric or intermediate aggregates (Figure 6D_1–D_3). Archaeal cells hybridized with ANME-1 probes were detected in the deeper sediment layers of WMs and seemed to be widely dominant in the deeper sediment layers of EWM14. ANME-1 were observed in EWM14 and WM14 as rod chains without detectable bacterial partner either as a single chain or in unstructured heaps (Figure 6B_1). In contrast, in WM12 deepest sediments, ANME-1 have also been observed in straight aggregates with bacterial partners (Figure 6B_2). Cells labeled with ANME-3 probes were detected in small aggregates (<10 μm) without any detectable bacterial partner in intermediate sediment layers (Figure 6C).

Discussion

The occurrence of dominant populations of ANME clusters, detected by FISH, Q-PCR and gene

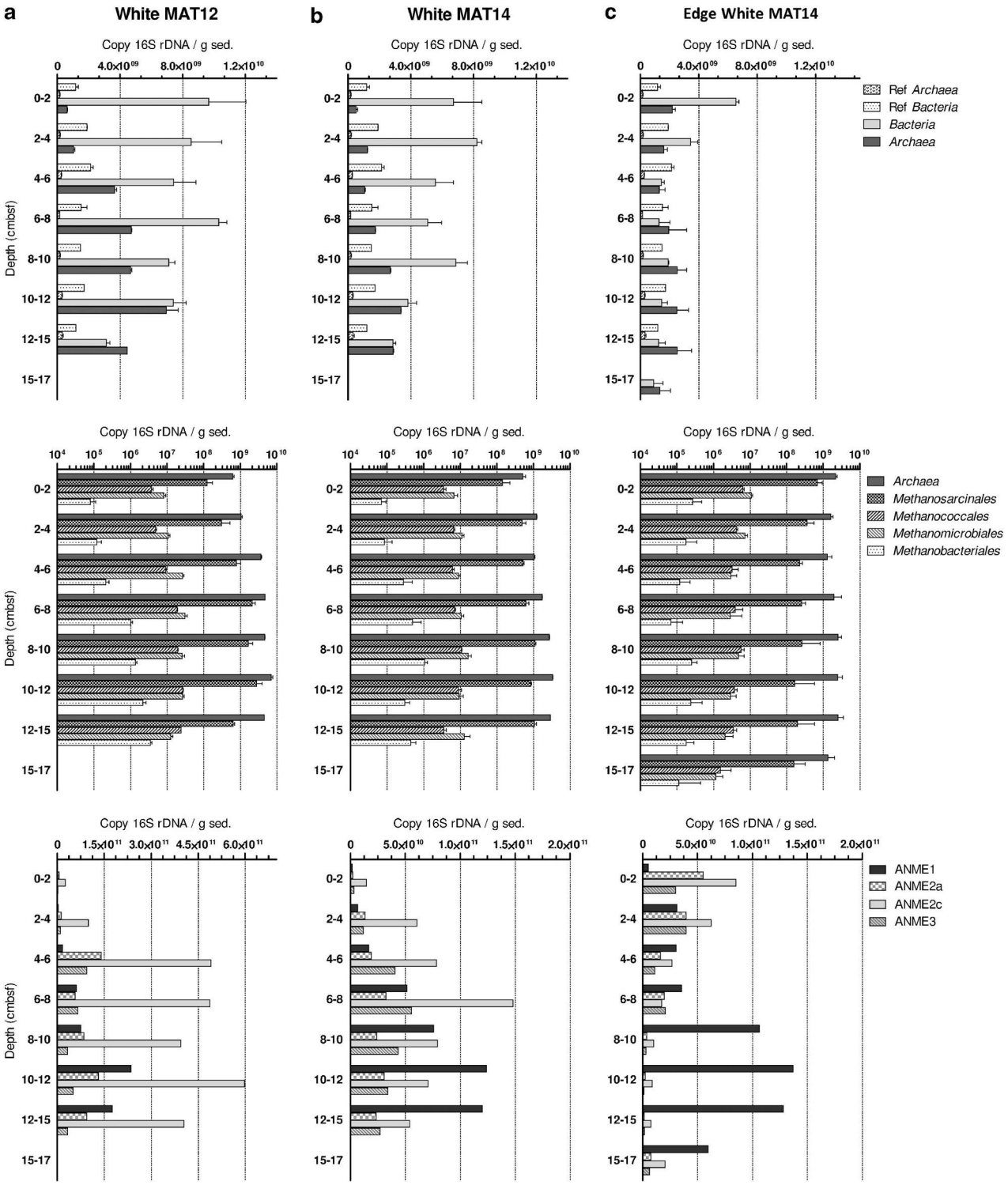


Figure 5 DNA copy numbers of the 16S rDNA gene per gram of sediment for *Bacteria*, *Archaea*, methanogens and anaerobic methanotrophs, from cores of (**a**) White MAT12, (**b**) White MAT14 and (**c**) Edge White MAT14 in function of depth (0–17 cmbsf) in cold seep sediments of the Sonora Margin. Quantification of specific DNA sequences of methanogenic populations are in logarithmic scale.

libraries, combined with geochemical gradients, is the first evidence that AOM represented a major microbial process on the Sonora Margin cold seeps. ANME-1, -2 and -3, anaerobic methane-oxidizing populations commonly retrieved in the active microbial cold seep communities (see Knittel and Boetius (2009) and reference therein), were metabolically active in our samples, as indicated by their

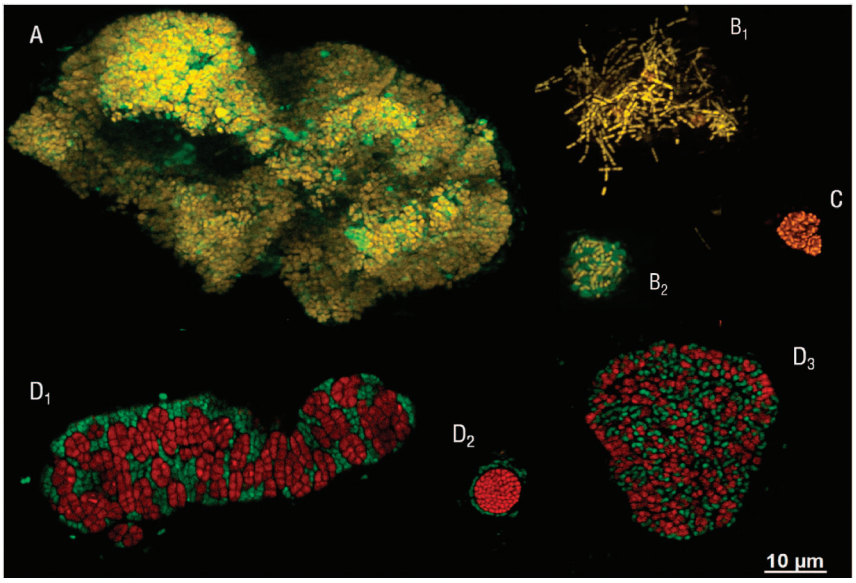


Figure 6 Individual cells and cell aggregates of *Archaea*, *Bacteria* and ANMEs visualized with fluorescent-labeled oligonucleotide probes. Each aggregates shown were taken from different pictures. (A, B_1 and B_2) are maximal image projection pictures, which superposed several stacks in a same representation. (A) Large Archaeal/Bacterial aggregate labeled with ARC915 (yellow) and EUB338 (green) probes observed in the deepest sediment layer of the White MAT14. (B_1) Heap of monospecific and single ANME-1 archaeal rods in chain labeled with ANME-1-350 (yellow) probe visualized at the deepest sediment layer of the Edge White MAT14. (B_2) Straight aggregate of ANME-1 (ANME-1-350 (yellow)) and *Bacteria* (EUB338 (green)). (C) Tightly associated cluster of ANME-3 cells, stained with the ANME-3-1249 (orange) obtained from White MAT14. (D_1–D_3) Various ANME-2/*Bacteria* aggregates labeled with ANME-2-712 (red) and EUB338 (green) probes. Scale is 10 µm.

16S rRNA detection, and represented almost the whole active archaeal diversity. This co-occurrence of the three ANME clades has only been reported in few studies (Heijs *et al.*, 2005; Pernthaler *et al.*, 2008; Lloyd *et al.*, 2010). However, ANME populations presented different distributions according to the visual and geochemical patterns of the sampled habitats.

Diversity and distribution of ANMEs

ANME-2c dominated both 16S libraries (rRNA and rDNA), quantifications and FISH observations in sediments characterized by higher sulfate concentrations (first sediment layers of WM14 and EWM14; the entire sulfate-rich WM12 sediment cores), suggesting a major role of these ANME representatives in AOM processes at the Sonora Margin. All ANME-2 observed by FISH formed morphologically diverse (size, form and spatial organization) aggregates with *Bacteria*, as previously reported for AOM (Knittel and Boetius, 2009). This apparently obligatory association of ANME-2c with presumably sulfate-reducing *Bacteria* gains metabolic energy for both partners (metabolic exchanges improvement due to cell proximity; Stams and Plugge, 2009). However, this obligatory relationship would also restrict those consortia to a specific ecological niche where both electron acceptors and carbon sources for consortia partners were available. If methane was available throughout the sediment cores, sulfate could be limiting (only detected in the WM14 and EWM14 upper sediments layers and in the entire WM12 cores). The observed ANME-2c consortia distribution in WMs could thereby be explained by the bacterial partner requirement for sulfate. Thus, the dense populations of sulfate-dependent ANME-2c consortia, observed throughout WM12 sediments, could be linked to the advective import of seawater sulfate as previously suggested for the Guaymas Basin (Biddle *et al.*, 2012). These particular environmental conditions also seemed to allow the development of the new 'ANME-2c Sonora' representatives below 4 cmbsf. However, in EWM14 sediments, ANME-2c were restricted to the upper sediment layers despite a slightly deeper penetration of sulfate. This ANME-2c sulfate-independent distribution in EWM14 sediments indicated that other parameters, such as non-methane hydrocarbon degradation (Orcutt *et al.*, 2008), fluid flow regimen (Niemann *et al.*, 2006; Losekann *et al.*, 2007) or a sediment perturbation by surface assemblages could be involved in ANME-2 distribution. Here, surface colonizers (*Beggiatoa* mats and macraufona) could be considered as influent factor. *Beggiatoa* mats, by their gliding mobility through the sediment, could micro-oxygenate the first sediment layers and then inhibit the ANME-2 consortia or be competitive, such as DHVE-8 with ANME-2 bacterial partners, for substrates, such as acetate in the shallow sediment layers. Otherwise, the EWM14 surface deposit feeders probably modified the structure and/or the composition of the underlying sediments (organic matter

degradation, substrate availabilities, for instance) and then vertically changed the ANME-2 ecological niche.

Molecular data also highlighted the presence and activity of ANME-1 relatives in each core, in increasing proportion with depth as observed previously (Knittel *et al.*, 2005; Yanagawa *et al.*, 2011). ANME-1 were detected in larger proportion in WM12 sediments and as unique ANME community in EWM14 deepest sediment layers. Moreover, FISH observations highlighted a versatile ANME-1 behavior in terms of bacterial association. The EWM14 and WM14 ANME-1 communities were detected as single or heaps of rods-in-chain. In contrast, ANME-1 were also observed in straight aggregates with bacteria in WM12 deepest sediments. Combined with geochemical data, these results confirmed that ANME-1 preferred completely anoxic and highly sulfidic sediments (Biddle *et al.*, 2012) and suggested that ANME-1 ecophysiology could depend on environmental conditions and more particularly on sulfate concentrations. In sulfate-poor and methane-rich EWM14 sediments, ANME-1 could support a bacterial-independent AOM as suggested previously (Orphan *et al.*, 2002; Maignien *et al.*, 2012), using a different metabolic pathway providing terminal electron acceptors for AOM, such as the use of extracellular proteins, as mentioned by recent metaproteomic analyses (Stokke *et al.*, 2012). Such metabolism, independent of bacterial association and then metabolic bacterial requirements, could occur and be more competitive than syntrophic AOM in EWM14 sediments. ANME-1 metabolism could also persist in sulfate-depleted WM14 sediments, perhaps by switching to methanogenesis, as suggested previously (Meyerdierks *et al.*, 2010; Lloyd *et al.*, 2011; Stokke *et al.*, 2012). In contrast, advective sulfate inputs in WM12 deepest sediments could induce another ANME-1 metabolic shift to a bacterial-dependent AOM in straight consortia as previously observed in sulfate-rich cold seeps (Orcutt *et al.*, 2005), which could be more energetically effective.

ANME-3-related sequences were present throughout the entire sediment cores with a slight increase of 16S copy numbers restricted to the 4–8 cmbsf sediment horizon. Furthermore, ANME-3 communities were shown to be active only in this sediment layer. This suggests that ANME-3 might be restricted to this sediment horizon, as previously reported in submarine mud volcano (Losekann *et al.*, 2007), just below the surface layers influenced by surface communities. ANME-3 were previously detected in syntrophic consortia with sulfate-reducer *Bacteria* (Niemann *et al.*, 2006; Losekann *et al.*, 2007). However, our FISH observations with the same probe highlighted some unstructured aggregates with no direct contact with bacterial partners, which is consistent with the support of another metabolism independent of bacterial association for ANME-3 (Losekann *et al.*, 2007; Omoregie *et al.*, 2008). Again, another metabolic pathway other than syntrophic AOM, such as methanogenesis or use of metabolic products from the surface layers as substrates or electrons acceptors, could be considered for ANME-3 aggregates in Sonora Margin sediments.

Methane hypothetical origins

As we mentioned above, methanogenesis was often suggested for single ANME, due to their phylogenetic proximity with methanogens and recent metagenomic studies. In cold seep sediments, methane is a preponderant factor, fueling the AOM aggregates, and its origin in the sediments also remained misunderstood.

Methane isotopic ratio suggested a dominant biogenic methane origin, involving methanogens populations. However, abiotic and thermogenic methane origin from deeper sediment layers could not be excluded. Confirming a biogenic origin, sequences relatives to methanogenic *Archaea* were detected in gene libraries. *Methanosarcinales* gene copy numbers were high, but anaerobic methanotrophs (ANME-2 and ANME-3) are affiliated to the *Methanosarcinales* group and could represent most of this population rather than the true methanogens. Nevertheless, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales* and *Methanobacteriales* 16S rDNA gene numbers were detected by Q-PCR in the sediment. Even if methanogen 16S rDNA concentrations were low, methanogenic enrichments (culture conditions as described in Lazar *et al.*, 2011b) also confirmed the presence of active methanogen communities (data not shown). Taken together, these results suggest that AOM fueling methane could be produced by small phylogenetically diverse populations of methanogens, eventually supplemented by other unknown or poorly understood microbial populations involved in methane production, such as ANME-1 in the shallow sediment layers. Alternatively, methane could also be produced by larger methanogenic populations in much deeper sediments.

Conclusion

In the anoxic sediments of cold seep environments, the geochemically rich emitted fluids coupled with surface inputs (sulfate and organic carbon) allow the development of complex microbial ecosystems mainly based on methane and sulfur cycles (methanogenesis, AOM, sulfate reduction). If ANME communities were frequently detected and appeared to be ubiquitous in cold seep environments (Knittel and Boetius, 2009), their distributions and their precise functions remained misunderstood. The Sonora Margin cold seeps, by their visually and/or geochemically different habitats, presented a unique opportunity to access the environmental parameters and key factors involved in archaeal distribution and ecophysiology. On the basis of our sampling

strategy and detailed microbiological characterizations, we initially confirmed that known methanogens represent only a small proportion of the microbial biomass in the shallow sediments (Lazar *et al.*, 2011a). Indeed, such as for other sedimentary cold seep environments (Gulf of Mexico mats, Mediterranean mud volcanoes or gas hydrate mats), archaeal communities were dominated by ANMEs in the shallow sediment layers (Knittel *et al.*, 2005; Niemann *et al.*, 2006; Lloyd *et al.*, 2010). ANME groups were commonly linked to AOM metabolism; however, the previously reported and the presently observed ANME differences in vertical niche distribution (Knittel *et al.*, 2005; Niemann *et al.*, 2006; Losekann *et al.*, 2007; Yanagawa *et al.*, 2011) and in consortia formation (Orphan *et al.*, 2002; Knittel *et al.*, 2005; Orcutt *et al.*, 2005; Losekann *et al.*, 2007) clearly indicate different ecophysiology. These data suggest that ANME distributions and metabolisms could be directly or indirectly (through bacterial partner requirements) related to flux rate-dependent geochemical gradients (methane, sulfate and sulfide) and substrate availabilities (organic carbon). In addition, these microbiological processes lead to various surface community settlements, such as microbial mats and diverse macrofauna, depending on fluid flux and composition, probably affecting in return the underlying microbial communities by modifying the sediment structure and composition. Depending on these environmental factors, ANME subgroups could have different functions in cold seep environments, such as methanogenesis, and could not be restricted to methane oxidation. Interestingly, ANMEs were also detected in hydrothermal underlying *Beggiatoa* mat sediments of the Guaymas Basin, monitoring AOM from 15 °C to 95 °C; comparative analyses between those geographically close ecosystems would be needed to discuss on AOM mechanisms and settlement worldwide in sediments.

Acknowledgements

We are indebted to the crews of the research vessel *L'Atalante* and the submersible *Nautile* of the cruise 'BIG' and the scientific team for their help on board. This cruise was funded by IFREMER (France) and has benefited from a work permit in Mexican waters (DAPA/2/281009/3803, 28 October 2009). We thank Stéphane L'Haridon, Gordon Webster and Catherine Larose for very helpful scientific discussions and comments. This study was supported by an IFREMER PhD grant.

References

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410.

Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* **56**: 1919–1925.

Beal EJ, House CH, Orphan VJ. (2009). Manganese- and iron-dependent marine methane oxidation. *Science* **325**: 184–187.

Biddle JF, Cardman Z, Mendlovitz H, Albert DB, Lloyd KG, Boetius A *et al.* (2012). Anaerobic oxidation of methane at different temperature regimes in Guaymas Basin hydrothermal sediments. *ISME J* **6**: 1018–1031.

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

Cambon-Bonavita MA, Nadalig T, Roussel E, Delage E, Duperron S, Caprais JC *et al.* (2009). Diversity and distribution of methane-oxidizing microbial communities associated with different faunal assemblages in a giant pockmark of the Gabon continental margin. *Deep-Sea Res Part I* **56**: 2248–2258.

Casamayor EO, Massana R, Benlloch S, Ovreas L, Diez B, Goddard VJ *et al.* (2002). Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environ Microbiol* **4**: 338–348.

Damm E, Budeus G. (2003). Fate of vent-derived methane in seawater above the Hakon Mosby mud volcano (Norwegian Sea). *Mar Chem* **82**: 1–11.

Dhillon A, Lever M, Lloyd KG, Albert DB, Sogin ML, Teske A. (2005). Methanogen diversity evidenced by molecular characterization of methyl coenzyme M reductase A (mcrA) genes in hydrothermal sediments of the Guaymas Basin. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4592–4601.

Dhillon A, Teske A, Dillon J, Stahl DA, Sogin ML. (2003). Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2765–2772.

Fauchald K, Jumars PA. (1979). The diet of worms: a study of polychaete feeding guilds. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* **17**: 193–284.

Felsenstein J. (1985). Confidence-limits on phylogenies—an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783–791.

Fisher MM, Triplett EW. (1999). Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4630–4636.

Fonselius S, Dyrssen D, Yhlen B. (2007). Determination of hydrogen sulphide. In: Grasshoff K, Kremling K and Ehrhardt M (eds). *Methods of Seawater Analysis, 3rd edition*. Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, Germany, pp 91–100.

Gadberry MD, Malcomber ST, Doust AN, Kellogg EA. (2005). Primaclade—a flexible tool to find conserved PCR primers across multiple species. *Bioinformatics* **21**: 1263–1264.

Grünke S, Felden J, Lichtschlag A, Girnth AC, De Beer D, WenzhÖFer F *et al.* (2011). Niche differentiation among mat-forming, sulfide-oxidizing bacteria at cold seeps of the Nile Deep Sea Fan (Eastern Mediterranean Sea). *Geobiology* **9**: 330–348.

Heijs SK, Damste JS, Forney LJ. (2005). Characterization of a deep-sea microbial mat from an active cold seep at the Milano mud volcano in the Eastern Mediterranean Sea. *FEMS Microbiol Ecol* **54**: 47–56.

Holler T, Widdel F, Knittel K, Amann R, Kellermann MY, Hinrichs KU *et al.* (2011). Thermophilic anaerobic oxidation of methane by marine microbial consortia. *ISME J* **5**: 1946–1956.

Jorgensen BB, Boetius A. (2007). Feast and famine–microbial life in the deep-sea bed. *Nat Rev Microbiol* **5**: 770–781.

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.

Knittel K, Boetius A. (2009). Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annu Rev Microbiol* **63**: 311–334.

Knittel K, Losekann T, Boetius A, Kort R, Amann R. (2005). Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Appl Environ Microbiol* **71**: 467–479.

Lazar CS, Dinasquet J, Pignet P, Prieur D, Toffin L. (2010). Active archaeal communities at cold seep sediments populated by Siboglinidae tubeworms from the Storegga Slide. *Microb Ecol* **60**: 516–527.

Lazar CS, John Parkes R, Cragg BA, L'Haridon S, Toffin L. (2012). Methanogenic activity and diversity in the centre of the Amsterdam Mud Volcano, Eastern Mediterranean Sea. *FEMS Microbiol Ecol* **81**: 243–254.

Lazar CS, L'Haridon S, Pignet P, Toffin L. (2011a). Archaeal populations in hypersaline sediments underlying orange microbial mats in the Napoli mud volcano. *Appl Environ Microbiol* **77**: 3120–3131.

Lazar CS, Parkes RJ, Cragg BA, L'Haridon S, Toffin L. (2011b). Methanogenic diversity and activity in hypersaline sediments of the centre of the Napoli mud volcano, Eastern Mediterranean Sea. *Environ Microbiol* **13**: 2078–2091.

Lloyd KG, Albert DB, Biddle JF, Chanton JP, Pizarro O, Teske A. (2010). Spatial structure and activity of sedimentary microbial communities underlying a *Beggiatoa* spp. mat in a Gulf of Mexico hydrocarbon seep. *PLoS One* **5**: e8738.

Lloyd KG, Alperin MJ, Teske A. (2011). Environmental evidence for net methane production and oxidation in putative ANaerobic MEthanotrophic (ANME) archaea. *Environ Microbiol* **13**: 2548–2564.

Losekann T, Knittel K, Nadalig T, Fuchs B, Niemann H, Boetius A *et al.* (2007). Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea. *Appl Environ Microbiol* **73**: 3348–3362.

Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar *et al.* (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**: 1363–1371.

Maignien L, Parkes RJ, Cragg B, Niemann H, Knittel K, Coulon S *et al.* (2012). Anaerobic oxidation of methane in hypersaline cold seep sediments. *FEMS Microbiol Ecol* **83**: 214–231.

McKay LJ, MacGregor BJ, Biddle JF, Albert DB, Mendlovitz HP, Hoer DR *et al.* (2012). Spatial heterogeneity and underlying geochemistry of phylogenetically diverse orange and white *Beggiatoa* mats in Guaymas Basin hydrothermal sediments. *Deep Sea Res Part I* **67**: 21–31.

Meyerdierks A, Kube M, Kostadinov I, Teeling H, Glockner FO, Reinhardt R *et al.* (2010). Metagenome and mRNA expression analyses of anaerobic methanotrophic archaea of the ANME-1 group. *Environ Microbiol* **12**: 422–439.

Meyerdierks A, Kube M, Lombardot T, Knittel K, Bauer M, Glockner FO *et al.* (2005). Insights into the genomes of archaea mediating the anaerobic oxidation of methane. *Environ Microbiol* **7**: 1937–1951.

Niemann H, Losekann T, de Beer D, Elvert M, Nadalig T, Knittel K *et al.* (2006). Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. *Nature* **443**: 854–858.

Omoregie EO, Mastalerz V, de Lange G, Straub KL, Kappler A, Roy H *et al.* (2008). Biogeochemistry and community composition of iron- and sulfur-precipitating microbial mats at the Chefren mud volcano (Nile Deep Sea Fan, Eastern Mediterranean). *Appl Environ Microbiol* **74**: 3198–3215.

Orcutt B, Boetius A, Elvert M, Samarkin V, Joye SB. (2005). Molecular biogeochemistry of sulfate reduction, methanogenesis and the anaerobic oxidation of methane at Gulf of Mexico cold seeps (vol 69, pg 4267, 2005). *Geochim Cosmochim Acta* **69**: 5633–5633.

Orcutt B, Samarkin V, Boetius A, Joye S. (2008). On the relationship between methane production and oxidation by anaerobic methanotrophic communities from cold seeps of the Gulf of Mexico. *Environ Microbiol* **10**: 1108–1117.

Orphan VJ, House CH, Hinrichs KU, McKeegan KD, DeLong EF. (2002). Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proc Natl Acad Sci USAm* **99**: 7663–7668.

Pachiadaki MG, Kallionaki A, Dahlmann A, De Lange GJ, Kormas KA. (2011). Diversity and spatial distribution of prokaryotic communities along a sediment vertical profile of a deep-sea mud volcano. *Microb Ecol* **62**: 655–668.

Pachiadaki MG, Lykousis V, Stefanou EG, Kormas KA. (2010). Prokaryotic community structure and diversity in the sediments of an active submarine mud volcano (Kazan mud volcano, East Mediterranean Sea). *FEMS Microbiol Ecol* **72**: 429–444.

Page A, Tivey MK, Stakes DS, Reysenbach AL. (2008). Temporal and spatial archaeal colonization of hydrothermal vent deposits. *Environ Microbiol* **10**: 874–884.

Paull CK, Ussler W, Peltzer ET, Brewer PG, Keaten R, Mitts PJ *et al.* (2007). Authigenic carbon entombed in methane-soaked sediments from the northeastern transform margin of the Guaymas Basin, Gulf of California. *Deep Sea Res Part I* **54**: 1240–1267.

Pernthaler A, Dekas AE, Brown CT, Goffredi SK, Embaye T, Orphan VJ. (2008). Diverse syntrophic partnerships from deep-sea methane vents revealed by direct cell capture and metagenomics. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 7052–7057.

Saitou N, Nei M. (1987). The neighbor-joining method—a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406–425.

Sarradin P-M, Caprais J-C. (1996). Analysis of dissolved gases by headspace sampling gas chromatography with column and detector switching. Preliminary results. *Anal Commun* **33**: 371–373.

Simoneit BR, Leif RN, Ishiwatari R. (1996). Phenols in hydrothermal petroleums and sediment bitumen from Guaymas Basin, Gulf of California. *Organic Geochem* **24**: 377–388.

Simoneit BRT, Lonsdale PF, Edmond JM, Shanks WC. (1990). Deep-water hydrocarbon seeps in Guaymas Basin, Gulf of California. *Appl Geochem* **5**: 41–49.

Snaidr J, Amann R, Huber I, Ludwig W, Schleifer KH. (1997). Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2884–2896.

Stams AJM, Plugge CM. (2009). Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* **7**: 568–577.

Stokke R, Roalkvam I, Lanzen A, Haflidason H, Steen IH. (2012). Integrated metagenomic and metaproteomic analyses of an ANME-1-dominated community in marine cold seep sediments. *Environ Microbiol* **14**: 1333–1346.

Suzuki MT, Taylor LT, DeLong EF. (2000). Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5′-nuclease assays. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4605–4614.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**: 1596–1599.

Teske A, Hinrichs KU, Edgcomb V, Gomez AD, Kysela D, Sylva SP *et al.* (2002). Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1994–2007.

Teske A, Sorensen KB. (2008). Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? *ISME J* **2**: 3–18.

Thioulouse J, Dray S. (2007). Interactive multivariate data analysis in R with the ade4 and ade4TkGUI packages. *J Statist Softw* **22**: 1–14.

Waren A, Ponder WF. (1991). New species, anatomy, and systematic position of the hydrothermal vent and hydrocarbon seep Gastropod Family Provannidae Famn (Caenogastropoda). *Zool Scr* **20**: 27–56.

Yanagawa K, Sunamura M, Lever MA, Morono Y, Hiruta A, Ishizaki O *et al.* (2011). Niche separation of methanotrophic archaea (ANME-1 and -2) in methane-seep sediments of the Eastern Japan Sea Offshore Joetsu. *Geomicrobiol J* **28**: 118–129.

Yu Y, Lee C, Kim J, Hwang S. (2005). Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng* **89**: 670–679.

Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* **62**: 316–322.

Article 5

Bacterial communities and syntrophic associations involved in anaerobic oxidation of methane process of the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin

Adrien Vigneron, Perrine Cruaud, Patricia Pignet, Jean-Claude Caprais, Nicolas Gayet, Marie-Anne Cambon-Bonavita, Anne Godfroy and Laurent Toffin

environmental microbiology

Environmental Microbiology (2013) doi:10.1111/1462-2920.12324

Bacterial communities and syntrophic associations involved in anaerobic oxidation of methane process of the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin

Adrien Vigneron,[1,2,3] Perrine Cruaud,[1,2,3] Patricia Pignet,[1,2,3] Jean-Claude Caprais,[4] Nicolas Gayet,[4] Marie-Anne Cambon-Bonavita,[1,2,3] Anne Godfroy[1,2,3] and Laurent Toffin[1,2,3]*

[1]*Ifremer, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes,* [2]*Université de Bretagne Occidentale,* [3]*CNRS, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes,* [4]*Ifremer, Laboratoire Etude des Environnements Profonds, Technopôle Brest Iroise, Plouzané, France.*

Summary

The Sonora Margin cold seeps present on the seafloor a patchiness pattern of white microbial mats surrounded by polychaete and gastropod beds. These surface assemblages are fuelled by abundant organic inputs sedimenting from the water column and upward-flowing seep fluids. Elevated microbial density was observed in the underlying sediments. A previous study on the same samples identified anaerobic oxidation of methane (AOM) as the potential dominant archaeal process in these Sonora Margin sediments, probably catalysed by three clades of archaeal anaerobic methanotrophs (ANME-1, ANME-2 and ANME-3) associated with bacterial syntrophs. In this study, molecular surveys and microscopic observations investigating the diversity of *Bacteria* involved in AOM process, as well as the environmental parameters affecting the composition and the morphologies of AOM consortia in the Sonora Margin sediments were carried out. Two groups of *Bacteria* were identified within the AOM consortia, the *Desulfosarcina/Desulfococcus* SEEP SRB-1a group and a *Desulfobulbus*-related group. These bacteria showed different niche distributions, association specificities and consortia architectures, depending on sediment surface communities, geochemical parameters and ANME-associated phylogeny. Therefore, the syntrophic AOM process appears to depend on sulphate-reducing bacteria with different ecological niches and/or metabolisms, in a biofilm-like organic matrix.

Received 14 January, 2013; accepted 31 October, 2013. *For correspondence. E-mail laurent.toffin@ifremer.fr; Tel. (+33) 2 98 22 43 96; Fax (+33) 2 98 22 47 57.

Introduction

The cold seeps of the Guaymas Basin, located along a transform fault of the Sonora Margin, present different faunal assemblages (Simoneit *et al.*, 1990; Paull *et al.*, 2007) and white microbial mats (Vigneron *et al.*, 2013). The development of these communities at the cold seep water-sediment interface is supported by methane and sulphide-rich up-flowing fluids, and by seep-fuelled active methanogens and anaerobic methanotrophs (Boetius *et al.*, 2000; Jorgensen and Boetius, 2007). Archaeal anaerobic methanotrophs (ANME-1, ANME-2a, ANME-2c and ANME-3), distantly related to the orders *Methanosarcinales* and *Methanomicrobiales* (Orphan *et al.*, 2002; Knittel and Boetius, 2009), and probably involved in anaerobic oxidation of methane (AOM), have been found to be dominant in the shallow (0 to 17 cmbsf) Sonora Margin cold seep sediments (Vigneron *et al.*, 2013). ANME clades presented different distributions throughout these sediments. In sediments underlying two visible microbial mats called White Mat 12 (WM12) and White Mat 14 (WM14) (Fig. S1), ANME-2c were predominant in shallow sulphate-rich sediments, while ANME-1 dominated the deepest sulphate-depleted sediment layers and ANME-3 were restricted to a specific horizon below the first 4 cm of sediments (Fig. 3). ANME communities appeared to be favoured in sulphate-enriched sediments throughout sediment core WM12. Elsewhere, sulphate and methane porewater concentration profiles in sediments underlying macrofauna at the edge of WM14 (called EWM14) were similar to those found in sediments underlying microbial mats. However, in EWM14 sediment core, ANME-2c were restricted to the first sediment layers, while increasing population of ANME-1 appeared to be the sole ANME community in the deepest sediment layers (Fig. 3). These ANME lineages are differently associated with syntrophic bacteria, depending on their phylogenetic affiliation and the environmental conditions. In the Sonora

© 2013 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd

Margin sediments, ANME-2a and ANME-2c were always observed forming aggregates with bacteria, whereas ANME-1 formed tight associations with bacteria exclusively in sulphate-rich sediments of WM12 and ANME-3 were observed without bacterial partners. Previous studies indicated that such syntrophic relationship between ANME and bacterial partners, mainly affiliated with sulphate-reducing *Bacteria* (SRB), linked AOM and seawater sulphate reduction in archaeal/bacterial consortia (Orphan *et al*., 2002; Knittel *et al*., 2005; Niemann *et al*., 2006; Pernthaler *et al*., 2008; Knittel and Boetius, 2009; Schreiber *et al*., 2010; Schubert *et al*., 2011). The SRB, affiliated to the *Deltaproteobacteria* (Knittel *et al*., 2003) form a large and diverse physiological group capable of degrading a wide range of organic and hydrocarbon-derived substrates (Dhillon *et al*., 2003; Kniemeyer *et al*., 2007), resulting in elevated sulphate reduction rates in cold seep sediments (Bowles *et al*., 2011). To date, only four phylogenetic clusters were observed in AOM consortia from cold seeps: the two *Desulfobulbus*-related organism groups (Losekann *et al*., 2007; Pernthaler *et al*., 2008), the SEEP SRB-1a subgroup belonging to the *Desulfosarcina/Desulfococcus* group (DSS) (Boetius *et al*., 2000; Knittel *et al*., 2003; Schreiber *et al*., 2010) and recently, the previously described group SEEP SRB-2 (Knittel *et al*., 2003; Kleindienst *et al*., 2012). Additionally, another deltaproteobacterial group, the Hotseep-1 cluster, was observed in ANME-1 consortia in the hydrothermal sediments of the Guaymas Basin (Holler *et al*., 2011). However, other unidentified *Bacteria* have been observed using direct cell capture experimentation (Pernthaler *et al*., 2008), and AOM has been demonstrated to be coupled with other metabolisms than sulphate reduction, such as iron, manganese or nitrate reduction (Raghoebarsing *et al*., 2006; Beal *et al*., 2009). Although these findings have led to the description of the AOM-driving and denitrifying bacteria *Candidatus Methylomirabilis oxyfera* (Ettwig *et al*., 2010), these results demonstrated that the diversity of AOM bacterial partners still needs to be completed. Furthermore, the ecophysiology of AOM-involved *Bacteria* and the exact mechanisms of this syntrophic association remain unclear. For example, the vertical distribution and the metabolic specificities of each bacterial partner in the sediments are poorly explored. In this study, we focused on unexplored bacterial communities of the Sonora Margin cold seep sediments and more particularly on *Bacteria* involved in AOM. The identity and distribution of active bacterial communities involved in AOM were studied using complementary phylogenetic, microscopic and quantitative analyses in conjunction with a previous molecular survey on archaeal communities and geochemical analyses (Vigneron *et al*., 2013).

Results

Phylogenic diversity of metabolically active Bacteria

A total of 658 RNA-derived bacterial sequences were analysed from the sediments underlying two white microbial mats (WM12, a thick mat harbouring elevated sulphate concentrations throughout the sampled sediments and WM14, an extended mat surrounding a visible fluid output), and the edge of WM14 (EWM14) colonized by macrofauna. Bacterial diversity was high in the 16S rRNA clone libraries (Simpson indexes: 1-*H*Simpson = 0.9 ± 0.05), with more than 27 phylogenetic lineages, mainly distributed among the *Epsilon*, *Delta* and *Gammaproteobacterial* groups (Fig. 1 and Fig. S2). The number of sequences related to the *Epsilonproteobacteria*, and particularly affiliated to the *Sulfurovum* genus encompassing sulphur- and thiosulphate-oxidizers bacterium (Inagaki *et al*., 2004), decreased with depth. The *Deltaproteobacteria* represented about a third of analysed sequences in WM12, WM14 and EWM14 sediment cores. The *Deltaproteobacteria* sequences were composed of diverse phylogenetic lineages (Fig. 2), including the known AOM-associated sulphate-reducing bacterial groups such as the DSS group (SEEP SRB-1a-f) (Schreiber *et al*., 2010) and SEEP SRB groups (SRB-2, SRB-3, SRB-4) (Knittel *et al*., 2003). SEEP SRB-1a were detected throughout the WM12 sediment core, in the middle (4–6 cmbsf) and bottom sediment layers of WM14 and only in the EWM14 surface sediment layer. In contrast, SEEP SRB-1b were only detected in the deepest sediment layers of EWM14. The syntrophic AOM partners within the family *Desulfobulbaceae*, previously described from mud volcano sediments (Losekann *et al*., 2007), were detected throughout WM sediments and in higher proportion in core WM12. In contrast, in EWM14, *Desulfobulbus*-related sequences were only detected in the surface and middle sediment layers. SEEP SRB-2 sequences were detected in the deepest layers of WM12 and in higher proportion in EWM14 intermediate and deeper sediment layers. Sequences related to *Gammaproteobacteria*, previously detected in hydrocarbon-rich environments, were also found in high proportion in WM14 sediments and from 0 to 6 cmbsf in EWM14. Sequences related to the *Candidatus Maribeggiatoa* genus were found in the first centimetres of the WMs (WM14 and WM12) sediments, as well as in dominant proportion in the microbial mats themselves. Additionally, sequences related to uncultured bacterial candidate division Japan Sea 1 were only detected in the deepest sediment layers of EWM14 that was not covered by microbial mats. Finally, sequences affiliated to several groups of candidate divisions, *Bacteroidetes, Spirochaetes, Actinobacterium, Acidobacterium, Chloroflexi* and *Verrucomicrobia*

© 2013 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd, *Environmental Microbiology*

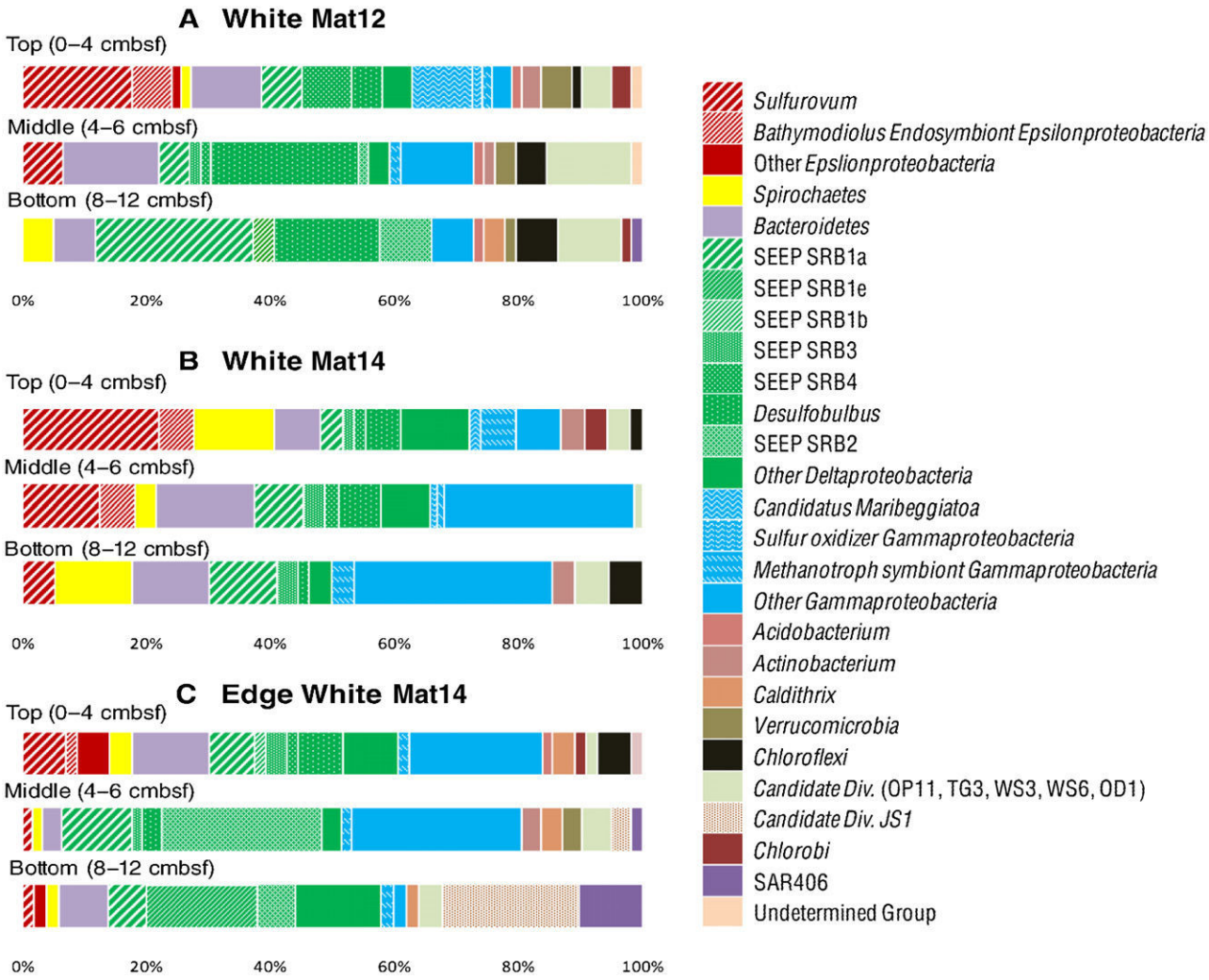


Fig. 1. Phylogenetic affiliations of bacterial 16S cDNA sequences for cold seep sediments of the Sonora Margin from Top (0 to 4 cmbsf), Middle (4 to 6 cmbsf) and Bottom (8 to 12 mbsf). Shades of red, green and blue denote putative *Proteobacteria* (Epsilon, Delta and Gamma respectively). A, B and C correspond to the three selected habitats: White Mat 12, White Mat 14 and Edge of White Mat 14.

were also detected in all samples in lower proportions (Fig. 1 and Fig. S2).

Real-time PCR quantification of AOM bacterial partners

DSS, *Desulfobulbus* (DBB), SEEP SRB-2 and JS1 abundances were estimated by real-time polymerase chain reaction (PCR) every 2 cm from the water-sediment interface to 15 cmbsf (core length). These quantifications, targeting previously observed or suspected AOM-involved *Bacteria* (Losekann *et al.*, 2007; Cambon-Bonavita *et al.*, 2009; Harrison *et al.*, 2009; Knittel and Boetius, 2009; Schreiber *et al.*, 2010; Kleindienst *et al.*, 2012), highlighted significant differences between microbial lineage distributions within each habitat [one-way analysis of variance (ANOVA); for WM12, $P < 0.01$; WM14, $P < 0.01$; EWM14, $P < 0.01$] (Fig. 3). Overall, DSS members were the dominant SRB, as previously reported in other cold seep environments (Kniemeyer *et al.*, 2007; Schreiber *et al.*, 2010). SRB-related 16S rDNA copies were more abundant in WM12 sediments (4.52×10^9 16S rDNA copies g^{-1}) where sulphate concentrations were high (22–13 mM). Significant differences in DBB and DSS depth distributions were also detected between the habitats (one-way ANOVA; for DSS, $P < 0.01$; DBB, $P < 0.01$). The number of DBB-related 16S rDNA copies increased with depth in WM12 and WM14 sediment cores, reaching a maximum of 2×10^9 16S rDNA copies g^{-1} of sediment around 6–10 cmbsf in WM12 and 5×10^8 copies g^{-1} in the 4–6 cmbsf WM14, then decreased deeper in the sediment. DBB 16S rDNA copy number was high (7.8×10^8 copies g^{-1}) in the first EWM14 sediment layers and then decreased with depth (1.2×10^7 copies g^{-1} in the bottom of the core) (Fig. 3). DSS 16S rDNA copy number in WMs

© 2013 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd, *Environmental Microbiology*

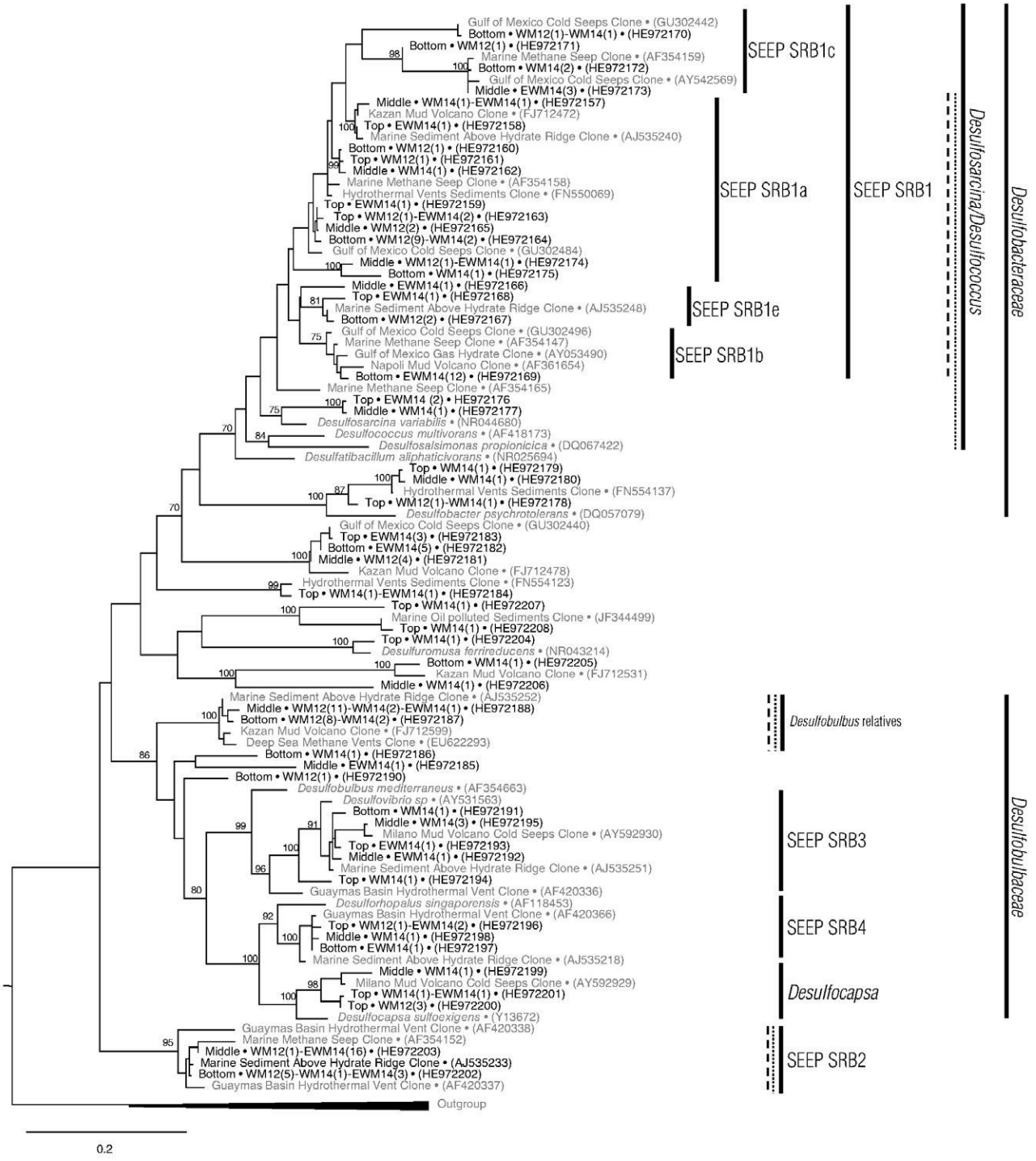


Fig. 2. Maximum likelihood phylogenetic tree of the bacterial *Deltaproteobacteria* 16S cDNA sequences in sediments of the Sonora Margin cold seeps performed using RAxML 7.2.8 and GTRCAT model approximation with 1,000 replicates. Only bootstrap values up to 70% are shown. Sequences amplified from sections 0 to 4 cmbsf are labelled 'Top', sequences from 4 to 6 cmbsf are 'Middle' and sequences from 8 cmbsf to end are tagged 'Bottom'. Only one representative sequence (> 97% identical) is shown. Number in brackets shown the number of clones analysed from RNA clone libraries. Dotted lines and dashes indicate sequences matching with corresponding Q-PCR primers and FISH probes respectively. WM12 = White Mat 12; WM14 = White Mat 14; EWM14 = Edge of White Mat 14.

© 2013 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd, *Environmental Microbiology*

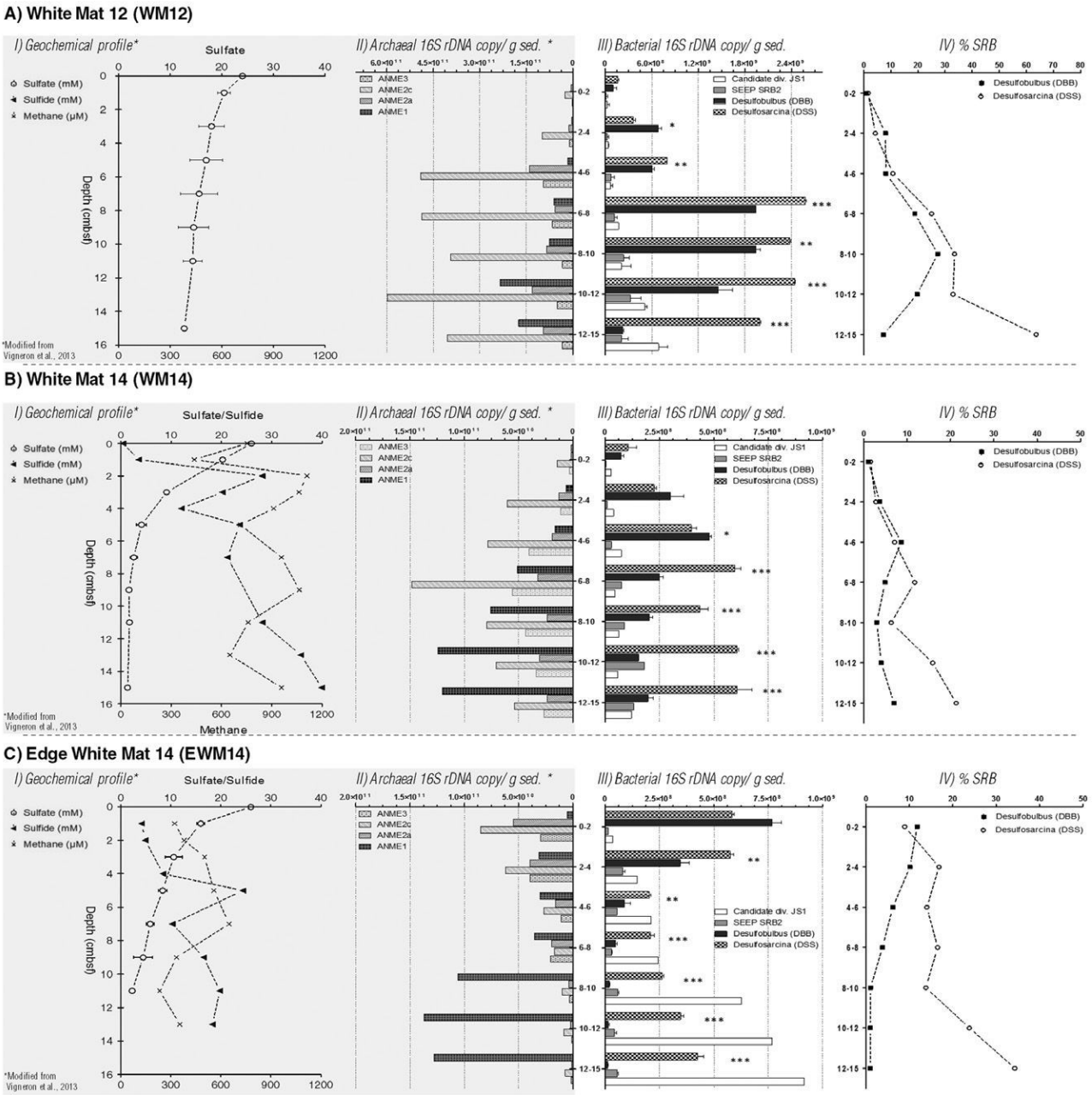


Fig. 3. (i) Geochemical description of the three selected habitats (A) White Mat 12 (WM12), (B) White Mat 14 (WM14) and (C) Edge White Mat 14 (EWM14). Dissolved methane (cross), sulphate (open square) and sulphide (black square) concentrations in porewaters. (ii) DNA copy numbers of the 16S rDNA gene per gram of sediment for ANME groups previously observed on the same samples in the Sonora Margin sediments (Vigneron *et al.*, 2013). (iii) DNA copy numbers of the 16S rDNA gene per gram of sediment for bacterial groups *Desulfosarcina/Desulfococcus*, *Desulfobulbus*, SEEP SRB-2 and candidate division JS1 in function of depth (0 to 15 cmbsf) in cold seep sediments of the Sonora Margin. Differences between DSS and DBB abundances were tested with *t*-test and labelled with $^{***}P < 0.0001$, $^{**}P < 0.001$ and $^{*}P < 0.01$. (iv) Proportion of sulphate-reducing bacteria to total bacterial community previously estimated by Q-PCR.

increased with depth until 6 cmbsf, reaching 2.6×10^9 and 6×10^8 copies g^{-1} in WM12 and WM14, respectively, then were fairly constant in the underlying sediment layers. However, in EWM14 sediments, DSS 16S rDNA copy numbers were high (5.8×10^8 copies g^{-1}) in the surface sediment layers (0–4 cmbsf) then fell to 2×10^8 copies g^{-1} after 4 cmbsf and then increased slightly with depth (4×10^8 copies at the bottom of the core). In contrast to DSS and DBB, SEEP SRB-2 16S rDNA copy numbers were low in all samples (maximum of 3×10^8 copies g^{-1} in the bottom of WM12) (Fig. 3). SEEP SRB-2 16S rDNA concentrations increased slowly with depth in WMs,

© 2013 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd, *Environmental Microbiology*

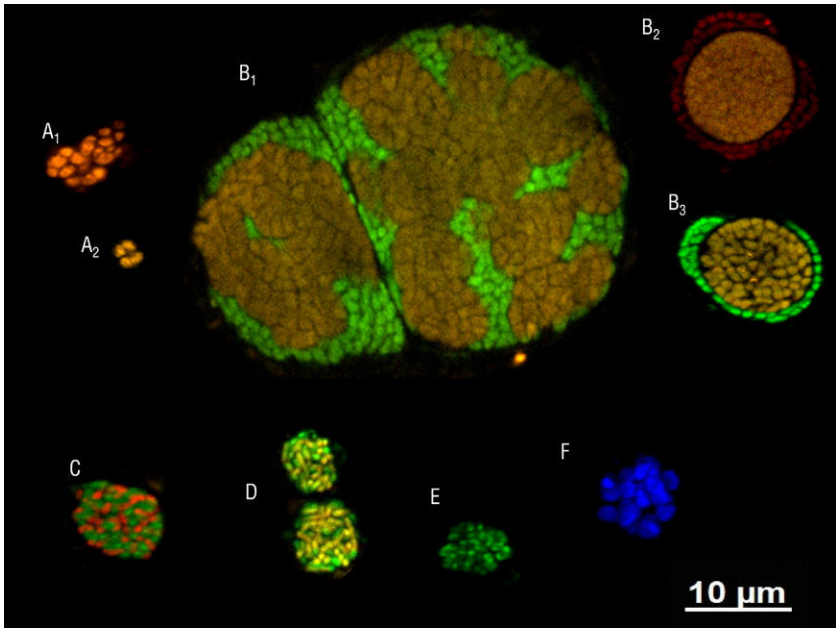


Fig. 4. Individual cells and cell aggregates of ANMEs and bacterial partners visualized with fluorescent-labelled oligonucleotide probes. Each presented aggregate was taken from different pictures. A_1 and A_2) Monophyletic aggregate and single tetrad of SEEP SRB-2 labelled with SEEP2-658 (orange). B) Aggregates of ANME-2c (ANME-2c-622 Yellow) and *DSS* cells (B1 and B3) or *DBB* cells (B2). C) Mixed aggregate of ANME-2a [ANME-2a-647/*DSS* (DSS-658 green)]. D) Tight aggregates of ANME-1 (ANME-1-350 Yellow) and *DSS* (DSS-658 Green). E) Homogeneous aggregate of *DSS* cells labelled with DSS-658 probe (Green). F) Monospecific clusters of *Gammaproteobacteria* cells labelled with GAM42a probe (blue). Scale is 10 µm. A, B and F were from WM14 middle sediment layer, C from WM12 middle sediment layer, D from the bottom sediment layer of WM12 and E from the deepest sediment layer of EWM14.

reaching 2×10^8 copies g^{-1} in WM14 and fluctuated around 5×10^7 copies g^{-1} throughout EWM14. However, no significant difference of SEEP SRB-2 distributions was detected between habitats (one-way ANOVA, $P = 0.088$). Quantification of candidate division JS1 16S rRNA gene copies indicated another population dynamic. JS1 16S rDNA copies in the sediment underlying WMs were low but increased with depth until reaching 6.9×10^8 copies g^{-1} for WM12 and 1.2×10^8 copies g^{-1} for WM14. In contrast, in EWM14 sediments, JS1 16S rDNA copy numbers increased rapidly with depth, from 3.3×10^7 copies g^{-1} in the surface sediment layer to 9×10^8 copies g^{-1} at 15 cmbsf (Fig. 3) and were higher than potential sulphate reducers-related copy numbers.

FISH visualization of bacterial partners in AOM consortia

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) observations revealed a high diversity of ANME-2/*Bacteria* consortia in size, shape and organization (Fig. 4B). In order to identify bacterial partners involved in the AOM process in Sonora Margin sediments and to observe the distribution of presumed SRB cells inside the aggregates according to the ANME phylogenetic affiliation, FISH experiments were carried out using specific probes targeting SRB (DSS685, DBB660, SEEP2-658, Table S2). SEEP SRB-2 *Bacteria*, previously reported as syntrophic AOM involved bacteria (Kleindienst *et al*., 2012), were observed as single tetrads or in monospecific clusters but did not show direct physical association with ANME cells (Fig. 4A). Nevertheless, SEEP SRB-2 monospecific heaps were occasionally observed in proximity with ANME-1 clusters, probably because of the experimental procedure. SEEP SRB-4 cells were observed as free-living bacteria. ANME-2c *Archaea* were associated with both DSS-hybridized and DBB-hybridized cells, and no clear relationship between SRB partner affiliation and morphological appearances of ANME-2c aggregates was observed (Fig. 4B). In contrast, ANME-2a formed exclusively intermingled aggregates with DSS-hybridized bacteria ($n = 124$) (Fig. 4C). Tight aggregates of ANME-1 were also observed exclusively associated with DSS-hybridized bacterial cells in WM12 deep sediment layers ($n = 74$) (Fig. 4D). Clusters of monospecific DSS-hybridized cells (Fig. 4E) were observed in EWM14 deep sediment layers when DBB-hybridized cells were only found associated with ANME-2c. Because only one SRB group per aggregate was detected, DSS and DBB appeared to be exclusive in a given aggregate. Additionally, no other eubacteria-labelled or unlabelled but DAPI-stained cells were detected in physical proximity of ANME consortia. *Gammaproteobacteria* were observed as large single cells clustered in heaps (Fig. 4F) without relationship with ANME.

SEM observations, microanalysis

In order to investigate the physical interaction between ANME and SRB during AOM association, AOM consortia previously localized by FISH (using ANME-2c and bacterial probes, Table S2) were observed using scanning electron microscopy (SEM) (Fig. 5). Sediments of WM12 harbouring higher numbers of ANME-2 and sulphate-reducer aggregates were observed. A high amount of sedimented broken diatoms and aggregate-like structures

© 2013 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd, *Environmental Microbiology*

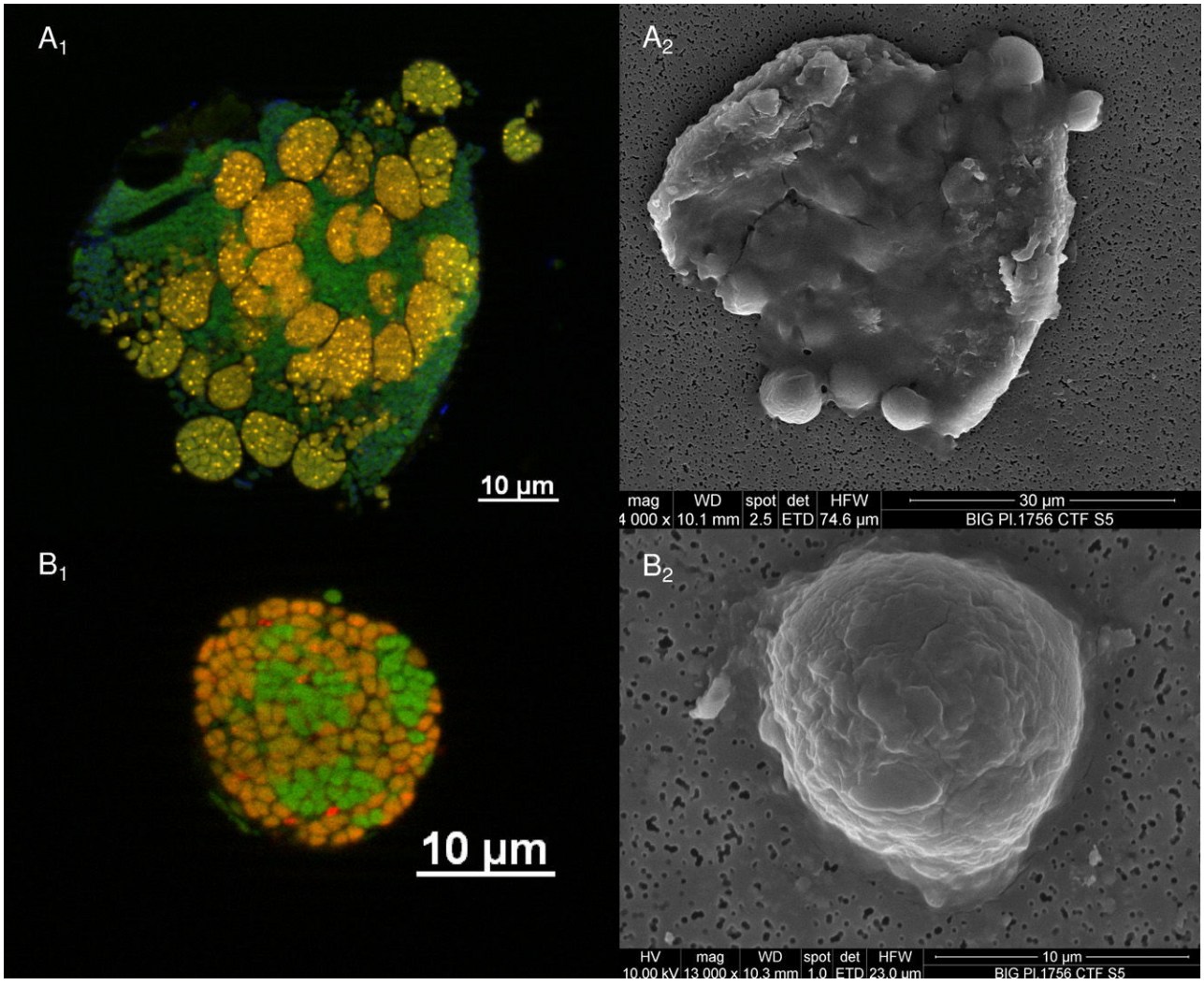


Fig. 5. FISH (A_1 and B_1) and SEM (A_2 and B_2) observations of ANME-2c/*Bacteria* aggregates on WM12 bottom sediment layers.

were detected. ANME-2c/bacterial aggregates appeared to be included in a complex and compact matrix. No individual cells or extracellular structures were detected. Microanalysis of these aggregate-like structures revealed a high proportion of organic compounds (55% C, 30% O, 0.39% K).

Discussion

Overall bacterial diversity at Sonora Margin sediments

Using quantitative PCR (Q-PCR) analysis, *Bacteria* have been shown to dominate microbial communities in WMs sediments (Vigneron *et al*., 2013). 16S rRNA gene libraries also demonstrated a higher diversity among *Bacteria* in the sediment, as previously observed in similar cold seep ecosystems (Lloyd *et al*., 2010; Orcutt *et al*., 2010), probably corresponding to the wide range of metabolic functions assumed by *Bacteria* in ecosystems (Pace, 1997). Indeed, bacterial populations were diverse in the Sonora Margin sediments, with sequences affiliated to *Deltaproteobacteria* likely involved in sulphate reduction coupled to the degradation of hydrocarbons or methane in cold seep ecosystems (Dhillon *et al*., 2003; Knittel *et al*., 2003; Pereyra *et al*., 2010); *Epsilonproteobacteria* (*Sulfurovum*) and *Gammaproteobacteria* such as *Candidatus Maribeggiatoa*, potentially involved in sulphide oxidation (Crepeau *et al*., 2011; Grünke *et al*., 2011; McKay *et al*., 2012) and other uncultured lineages, were previously detected in oil-impacted sediments (Head and Swannell, 1999; Orcutt *et al*., 2010; Pachiadaki *et al*., 2010; 2011). Additionally, *Spirochaetes*, *Firmicutes*, *Acidobacteria, Actinobacteria* and diverse candidate

© 2013 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd, *Environmental Microbiology*

divisions with undetermined metabolic roles in seep environments or potentially involved in organic matter degradation (Rappé and Giovannoni, 2003; Stevens *et al*., 2005; Pachiadaki *et al*., 2011) were detected.

Bacterial communities involved in syntrophic AOM

The diversity of bacteria involved in syntrophic AOM with ANME appeared to represent only a third of the total community. Indeed, uncultured lineages of *Gammaproteobacteria*, detected as predominant in gene libraries, were observed as monospecific clusters without any relationship to ANME, suggesting that they were likely not related to the AOM process. The distribution of bacterial lineages, previously suspected to be involved in AOM, was observed throughout the sediment cores in a centimetre scale. Thus, the candidate division JS1, previously detected in deep marine sediments, tidal flat sediments and hydrothermal vents (Webster *et al*., 2004; 2007; Biddle *et al*., 2012), and proposed as a possible partner in AOM (Cambon-Bonavita *et al*., 2009; Harrison *et al*., 2009; Roalkvam *et al*., 2011) or in hydrocarbon-degrading and sulphate-reducing consortia (Phelps *et al*., 1998), was detected in the EWM14 deepest sediment horizons. Specific quantifications of JS1 16S rDNA highlighted increasing 16S rDNA copy numbers with depth, confirming their strictly anoxic ecological niche (Webster *et al*., 2004). The distribution of candidate division JS1 appeared to mirror the ANME-1 distribution, particularly in EWM14 sediments ($r = 0.98$, $P < 0.0001$) (Fig. 3). However, FISH observations could not validate any bacterial relationship with ANME-1 in EWM14 sediments. These similar distributions of candidate division JS1 and ANME-1 could be due to similar environmental needs/restrictions (methane-rich and reduced environments) rather than to a strict relationship between these microorganisms. The SRB *Deltaproteobacteria* group of SEEP SRB-2, recently observed as an AOM partner in the Black Sea microbial mats and in the Gulf of Mexico hydrocarbon seeps (Kleindienst *et al*., 2012), was detected as metabolically active in our samples and quantified in low abundance throughout sediment cores without vertical zonation, as previously observed by FISH in the Tommeliten and Gulf of Mexico seeps and in the Guaymas hydrothermal sediments (Kleindienst *et al*., 2012). However, our FISH observations could not confirm the physical association with ANMEs. Indeed, SEEP SRB-2 were only observed as single tetrads or monospecific clusters, suggesting that, in the Sonora Margin sediments, SEEP SRB-2 could assume another metabolism, as previously proposed (Kleindienst *et al*., 2012). Likewise, by using previously designed SRB group-specific probes (Knittel *et al*., 2003), the *Deltaproteobacteria* SEEP SRB-4 group was observed as free-living single cells, as previously reported (Orcutt *et al*., 2010). This would suggest that SEEP SRB-4 groups are more likely involved in hydrocarbon degradation than in AOM process, as previously suggested (Kleindienst *et al*., 2012). Presence and metabolic activity of such AOM-independent sulphate reducers could thereby explain the higher sulphate reduction rates compared with the AOM rates, constantly measured in hydrocarbon-rich cold seeps (Bowles *et al*., 2011). In contrast, our FISH observations showed that both DSS and DBB relatives were strongly associated in consortia with ANMEs, confirming previous studies (Losekann *et al*., 2007; Pernthaler *et al*., 2008). While the DSS/ANME-2 associations are ubiquitously detected in cold seep sediments (Knittel and Boetius, 2009), the Sonora Margin is only the second AOM environment after the Eel River seeps to harbour DBB/ANME-2 consortia (Pernthaler *et al*., 2008). However, physical associations of other *Bacteria* than *Deltaproteobacteria* within AOM consortia, previously observed by Pernthaler *et al*., 2008, could not be demonstrated in our samples. In sediments underlying WM14, the proportion of AOM-involved sulphate reducers relative to the total bacterial community, previously estimated by Q-PCR (Vigneron *et al*., 2013), increased from 2% at the surface layers to 30% at the core bottom. These results are consistent with previous estimates of sulphate-reducer abundance in marine sediments and sulphate-methane transition zone, which ranged from 2% to 35% (Leloup *et al*., 2007; 2009). Moreover, high sulphate concentrations throughout WM12 sediments seemed to enhance the relative SRB populations with proportions of up to 70% of the total bacterial community in the core bottom, resulting in an increase in associated ANME abundance. DSS and DBB abundances were comparable in sulphate-rich shallow sediments (0–6 cmbsf) (Fig. 3), as previously observed by FISH in Eel River cold seeps (Pernthaler *et al*., 2008). However, quantification of 16S rDNA gene copy numbers, targeting the DSS and DBB groups, also highlighted significant differences in depth distribution below 6 cmbsf (Fig. 3), as previously presumed in a similar environment (Lloyd *et al*., 2010). This difference in depth distribution might suggest that SRB involved in AOM could have different ecological niches and/or metabolisms despite the apparent same environmental function, as previously suggested (Pernthaler *et al*., 2008).

DBB *Bacteria*, strictly observed in syntrophic relationship with ANME-2c, were restricted to the sulphate-rich surface sediment layers, except in the microbial mat-sediment interface layer, as previously observed in other underlying mat sediments of cold seep ecosystems (Losekann *et al*., 2007; Pernthaler *et al*., 2008; Lloyd *et al*., 2010). Indeed, in EWM14 (without surficial microbial mat), DBB colonized the upper sediment layers,

© 2013 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd, *Environmental Microbiology*

water-sediment interface included, and a significant correlation was observed between DBB distribution and sulphate porewater concentrations ($r = 0.964$, $P = 0.0028$). This correlation was also observed in WM14 sediments when omitting the surface layer ($r = 0.886$, $P = 0.03$). This result, confirming the sulphate-dependent metabolism of DBB bacteria, would also suggest a probable interference between DBB and the microbial mat. Regarding these results, we hypothesize that DBB bacteria could require an organic carbon source, which could also be coveted by *Maribeggiatoa* mats. This carbon source, probably derived from surface inputs, would limit the DBB abundance in the deepest WM12 sediment horizons despite the high sulphate concentrations. Thus, DBB bacteria could support a heterotrophic carbon metabolism, as previously observed in other *Desulfobulbus* family (Sorokin *et al*., 2012), and participate in the AOM process by reducing the seawater sulphate. Alternatively, the giant filamentous *Maribeggiatoa* from the surface mats, by their movements or activities, could alter the shallow sediment layers and thereby modify the DBB vertical distribution (Salman *et al*., 2013). The DBB requirements could partially explain the ANME-2c repartition observed in the Sonora Margin sediments, in particular in EWM14 sediments, where ANME-2c mirror the DBB distributions ($r = 0.967$, $P = 0.0004$) (Fig. 3). However, ANME-2c have also been observed in consortia with DSS bacteria.

The DSS group presented a higher diversity in the gene libraries, and at least three of the six previously described SEEP SRB-1 groups (Schreiber *et al*., 2010) were detected. In EWM14 deep sediments, where no DSS/ANME aggregate was observed, DSS formed monospecific clusters, as previously observed (Omoregie *et al*., 2008), and gene libraries indicated metabolically active members of the SEEP SRB-1b group, previously suggested as hydrocarbon degraders (Kniemeyer *et al*., 2007; Schreiber *et al*., 2010). The DSS 16S rDNA quantifications included the total SEEP SRB-1 (Fig. 2), thus the elevated DSS 16S rDNA concentrations in the deepest EWM14 sediment layers could correspond to the SEEP SRB-1b, independent of ANME, as observed by FISH. In contrast, in WMs, a majority of sequences were affiliated to SEEP SRB-1a, known to be involved in AOM (Schreiber *et al*., 2010), and FISH observations highlighted DSS-related bacteria in consortia with both ANME-2a, ANME-2c and ANME-1. If sulphate-rich inputs explained a higher DSS abundance throughout WM12 sediments, metabolically active DSS was also detected and quantified in significant proportion (21%) in the deep sulphate-depleted sediments of WM14, which was previously observed in other marine sediments (Leloup *et al*., 2007; 2009; Lloyd *et al*., 2010). Even if we could not exclude that DSS bacteria could require lower sulphate concentrations, previous authors suggested that DSS bacteria might switch to a fermentative process or could benefit from a cryptic sulphate formation (Leloup *et al*., 2007; Lloyd *et al*., 2010). Indeed, in marine sediments, sulphide could be re-oxidized to sulphate by abiotic reactions with Fe^{3+} (Yao and Millero, 1996). This sulphate formation would be masked by the DSS sulphate reduction activity at similar rates. Alternatively, DSS, observed within ANME-2c aggregates, could use by disproportionation the intracellular zero-valent sulphur stored in ANME-2c cells, which forms polysulphides with environmental sulphide, as previously demonstrated in ANME-2c/DSS enrichments (Milucka *et al*., 2012). Such metabolism, observed by Milucka *et al*. at low sulphate concentrations (~3 mM), would allow the development of these ANME-2c/DSS consortia in sulphate-depleted sediments and thus explain the predominance of DSS and AOM aggregates throughout the WM14 sediment core. Additionally, in contrast to DBB, DSS could use a carbon source available throughout the sediments such as hydrocarbon-derived compounds, as supported by previous DSS enrichments (Dhillon *et al*., 2003; Kniemeyer *et al*., 2007), or more likely be lithoautotrophs and assimilate inorganic carbon as recently observed by NanoSIMS analysis of AOM communities (Kellermann *et al*., 2012; Milucka *et al*., 2012). Different sulphate requirements, carbon sources and/or environmental interactions for DBB and DSS would account for a distinct distribution of the sulphate-reducing populations and the bacterial partner involved in ANME-2c AOM consortium. The identity of the ANME-2c SRB partners may be dependent on SRB environmental requirements or fluid flow preferences in the sediment. Furthermore, the bacterial partner phylotype did not seem to affect the aggregate morphology (Fig. 4). This apparently unspecific and opportunistic association in AOM consortium for ANME-2c could provide a metabolic benefit for ANME-2c, allowing them to colonize a wide range of environmental niches in seep habitats, as compared with ANME-2a (Knittel and Boetius, 2009). This probably also explains the higher ANME-2c abundance estimated by Q-PCR in the Sonora Margin sediments (Fig. 3). Indeed, ANME-2a were observed in mixed and intermingled aggregates exclusively with DSS members, as previously observed (Knittel *et al*., 2003; 2005; Schreiber *et al*., 2010) (Fig. 4). This bacterial partner restriction could limit the distribution and abundance of ANME-2a in the Sonora Margin sediments. Likewise, ANME-1 were observed in tight associations only with DSS, as already reported (Orcutt *et al*., 2005; Maignien *et al*., 2012). ANME-1 aggregate formation, which we previously suggested to be dependent on a sulphate concentration threshold (Vigneron *et al*., 2013), could also be limited by the specificity of their bacterial association. However, the absence of association between ANME-1 and DBB could also be due to

© 2013 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd, *Environmental Microbiology*

antagonist environmental requirements and therefore different distributions of ANME-1 and DBB. These specificities of partners in AOM consortia as well as the detection of only one SRB group per aggregate could indicate that recognition and control mechanisms exist during the setting up of the relationship between AOM partners. Processes remained unexplained but might potentially involve surface proteins and lipids detection, because different lipid compositions have recently been detected between ANME lineage cell membranes (Rossel *et al*., 2011). Likewise, the electron, zero-valent sulphur (Milucka *et al*., 2012), nitrogen (Dekas *et al*., 2009) and/or potential nutrient transfers between the two microbial partners involved in syntrophic AOM remain enigmatic. Different mechanisms have been proposed such as cell-to-cell contacts (Meyerdierks *et al*., 2010), use of extracellular proteins such as nanowires or interspecies electron shuttles (Knittel and Boetius, 2009; Stams and Plugge, 2009). SEM visualization of ANME-2c/*Bacteria* aggregates showed that AOM consortia appeared to be included in a complex organic matrix as previously described (Knittel *et al*., 2005) (Fig. 5), probably produced by the consortia themselves. Indeed, the production of extracellular polymers by SRB was previously observed in marine sediments (Zinkevich *et al*., 1996). As in microbial multi-species biofilms, this organic matrix could protect the microorganisms from environmental stress (oxygen), thus forming a propitious microniche for ANME and SRB, which favours cell-to-cell communications as well as electron or nutrient exchanges (Rickard *et al*., 2003). This matrix was observed on both large and small aggregates (Fig. 5), suggesting a production in the earlier stage in the setting up of the association. This organic boundary could, by the confinement of the first AOM partners, explain the exclusivity of the partnership observed inside aggregates and conserve along the maturation of the aggregate (Nauhaus *et al*., 2007). Enclosed ANME and SRB would syntrophically grow together inside the matrix, protected from environmental variations or competitive bacterial populations.

Conclusion

With its geochemically diverse habitats, the Sonora Margin cold seeps are an appropriate area to explore microbiological processes occurring in surface sediments percolated by methane and sulphide-rich fluids. While ANME populations were shown to dominate archaeal communities, bacteria involved in AOM did not seem to be dominant in Sonora Margin cold seep sediments. A wide diversity of active bacteria was observed. However, only two SRB groups, DSS (probably SEEP SRB-1a) and DBB, appear to be exclusively associated with ANME in the Sonora Margin cold seeps. This AOM-involved SRB study highlighted different centimetre scale SRB distributions in cold seep sediments. These SRB appear to exhibit specific habitat preference and spatial configuration with archaeal partners in syntrophic AOM, suggesting that these SRB represent unique ecotypes. Different carbon and sulphate metabolisms (sulphate reduction, zero-valent sulphur disproportionation) coupled to AOM might occur, depending on SRB phylogeny and probably involving different electron transfer pathways or intermediate and partner recognition mechanisms. Comparative genome analysis of the different ANME partners and NanoSims analysis on enrichments of stable ANME-DBB aggregates might lead to a better understanding of biochemical processes involved in the different AOM consortia.

Experimental procedures

Sample description

The sediment push cores were sampled at Sonora Margin cold seep Vasconcelos site during the 'BIG' cruise in June 2010. Three different habitats were sampled in the Sonora Margin cold seeps (Fig. S1). Sediments of WM12 and WM14 were covered by white bacterial mats, while the water sediment interface of the edge of WM14 (EWM14) were colonized by grey polychaetes and gastropods (Vigneron *et al*., 2013). An autonomous temperature sensor (T-Rov, NKE Electronics, Hennebont, France) indicated *in situ* temperatures of 3°C from the surface water to 50 cmbsf in each habitat before sampling. Immediately after recovery, sediment cores were transferred into a cold room, then aseptically subsampled in 2 cm thick layers and conditioned for molecular and FISH experiments. The sampling strategy and experimental procedures used in this study were detailed in a previous work based on an archaeal survey (Vigneron *et al*., 2013). Detailed geochemical measurements and ANME concentrations are provided in Fig. 3.

Sediment RNA extractions, cDNA clone libraries and sequencing

16S rRNA amplification was used as a proxy for the detection of active microbial populations (Lloyd *et al*., 2010). RNA was extracted using the Zhou protocol (Zhou *et al*., 1996) with modifications (Lazar *et al*., 2010) and purified using Nucleospin® RNA II kit (Macherey Nagel, Düren, Germany). Absence of residual DNA contamination was verified by PCR. Reverse transcription PCR of 16S rRNA was carried out by a two-step protocol with a preliminary reverse transcription step using Quanta qScript® kit (Quanta Bioscience, Gaithersburg, MD, USA). PCR reactions contained 10 ng of reverse transcribed RNA template, 1 X PCR Buffer, 2 nM $MgCl_2$, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 mM of each primer (E338f 5′-ACT CCT ACG GGA GGC AGC-3′ and U1407r 5′-GAC GGG CGG TGW GTR CAA-3′) and 0.6 U *GoTaq* DNA polymerase (Promega BioSciences, San Luis Obispo, CA, USA). Amplifications were carried out using the GeneAmp PCR 9700 System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as

© 2013 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd, *Environmental Microbiology*

follows: denaturation step at 94°C for 1 min, annealing for 1 min 30 s at 54°C and extension step for 2 min at 72°C for 30 cycles. For gene library construction, the 16S rRNA was reverse transcribed, amplified in triplicate and pooled before gel purification. Purified amplification products were cloned into TOPO® XL PCR Cloning Kit and transformed into *Escherichia coli* TOP10 cells (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. 16S rRNA gene sequences were determined on an ABI3730xl – genetic analyser using M13 universal primers (GATC Biotech, Germany). Sequences were analysed using the NCBI BLASTn search program within GenBank (Altschul *et al*., 1990). Sequences were aligned with closest representative sequences from GenBank using MAFFT 6.903 (Katoh *et al*., 2005) and checked manually for chimera. Phylogenetic trees were estimated with maximum likelihood methods, using MPI-parallelized RAxML 7.2.8. (Stamatakis, 2006) on the CIPRES Science Gateway (Miller *et al*., 2011). GTRCAT approximation of models was used for ML bootstrapping (1,000). Simpson indexes were calculated using DOTUR as previously detailed (Guri *et al*., 2012). Sequences from cDNA libraries affiliated to the *Deltaproteobacteria* were deposited in the EMBL database under accession numbers HE972157-HE972208 and other *Bacteria* under HF545525-HF545595.

Quantitative real-time PCR

Real-time PCR amplifications were performed in triplicate using Perfecta® SYBR® Green SuperMix ROX (Quanta Bioscience) according to the manufacturer's recommendations. Amplifications followed a two-step PCR (40 cycles) with 15 s denaturation (95°C) and 1 min annealing/elongation step at 60°C. Primer concentrations were optimized, as recommended by the manufacturer, to minimize the formation of secondary structure and to maximize the efficiency of the reaction. New primer sets, specific for SRB groups and candidate division JS1, were designed using the ARB package (Ludwig *et al*., 2004) and web-based application Primaclade (Gadberry *et al*., 2005) and are listed in Table S1. Primers were checked for specificity by using OLIGOCHECK software (School of Biosciences, Cardiff University, UK) and tested by PCR on various environmental clones from the Sonora Margin sediments. Triplicate standard curves were obtained with 10-fold serial dilutions of plasmids containing environmental 16S rRNA sequences relative to DSS, DBB, SEEP SRB-2 or JS1 and ranged from 10^4 to 10^8 copies/μL of 16S rDNA. The R^2 of standard curves obtained by real-time PCR were up to 0.997 and efficiency of the reaction up to 98%. The primer set specificity was confirmed by control sequencing of amplification products. Samples were diluted to a concentration for which no inhibitory effect was observed. Correlation factors and statistical tests on the microbial distribution were achieved using GRAPHPAD PRISM Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

FISH

Immediately after the core recovery, 2 g of sediment collected from each layer were fixed in phosphate-buffered saline (PBS) (1×)/formaldehyde (3% final) at 4°C for 4 h then washed twice with PBS(1×) and stored in PBS(2×)/ethanol (1:1, vol/vol) buffer at –20°C. Twenty microlitres of a 100-fold dilution of the sample were immobilized on 0.22 μm GTTP polycarbonate filters (Merck Milipore, Darmstadt, Germany) for FISH observations. For filters observed by SEM after FISH, fixed sediments were sonicated (40-fold 1 s, 40% intensity, Vibra Cell, Bioblock Scientific, Illkirch, France) before immobilization on fine-tipped pen squared filters. Hybridization was carried out for 3 h at 46°C in formamide buffer with labelled probes (Table S2). After 20 min in washing buffer at 48°C, filters were fixed on slides and covered with an antifade/DAPI solution (SlowFade® Gold, Invitrogen). As cross-hybridization between DSS and SEEP SRB-2 probes was recently observed (Kleindienst *et al*., 2012), detection of AOM-involved SRB was monitored combining the three SRB probes with 50% formamide and no co-localized signal was detected. In order to conclude on the aggregate morphologies and partnership specificities, two replicate filters (each harbouring over 100 aggregates) were fully explored for each sediment layer previously analysed by gene libraries. Observations and imaging were performed using an epifluorescence Axio Imager Z2 microscope equipped with the Apotome® system and the COLIBRI® technology (Zeiss, Jena, Germany). ANME/*Bacteria* aggregate location was noted in order to be observed by SEM.

SEM

Immediately after FISH observations, filters were completely dried at room temperature and then directly metalized with gold and palladium (60/40) using a high-resolution Sputter Coater (Quorum Technologies, Guelph, Canada). SEM observations and imaging were performed using a FEI Quanta 200 microscope (FEI, Hillsboro, Oregon, USA) and microanalyses were performed with EDX microelectrode (Oxford Instruments, Abingdon, UK).

Acknowledgements

We are indebted to the crews of the research vessel *L'Atalante* and the submersible *Nautile* of the cruise 'BIG' and the scientific team for their contribution in sampling on board. This cruise and work was funded by IFREMER (France) and has benefited from a work permit in Mexican waters (DAPA/2/281009/3803, 28 October 2009).

References

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215:** 403–410.

Beal, E.J., House, C.H., and Orphan, V.J. (2009) Manganese- and iron-dependent marine methane oxidation. *Science* **325:** 184–187.

Biddle, J.F., Cardman, Z., Mendlovitz, H., Albert, D.B., Lloyd, K.G., Boetius, A., and Teske, A. (2012) Anaerobic oxidation of methane at different temperature regimes in Guaymas Basin hydrothermal sediments. *ISME J* **6:** 1018–1031.

Boetius, A., Ravenschlag, K., Schubert, C.J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., *et al*. (2000) A marine microbial

© 2013 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd, *Environmental Microbiology*

consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407:** 623–626.

Bowles, M.W., Samarkin, V.A., Bowles, K.M., and Joye, S.B. (2011) Weak coupling between sulfate reduction and the anaerobic oxidation of methane in methane-rich seafloor sediments during ex situ incubation. *Geochim Cosmochim Acta* **75:** 500–519.

Cambon-Bonavita, M.A., Nadalig, T., Roussel, E., Delage, E., Duperron, S., Caprais, J.C., *et al*. (2009) Diversity and distribution of methane-oxidizing microbial communities associated with different faunal assemblages in a giant pockmark of the Gabon continental margin. *Deep-Sea Res Part II-Top Stud Oceanogr* **56:** 2248–2258.

Crepeau, V., Bonavita, M.A.C., Lesongeur, F., Randrianalivelo, H., Sarradin, P.M., Sarrazin, J., and Godfroy, A. (2011) Diversity and function in microbial mats from the lucky strike hydrothermal vent field. *FEMS Microbiol Ecol* **76:** 524–540.

Dekas, A.E., Poretsky, R.S., and Orphan, V.J. (2009) Deep-sea archaea fix and share nitrogen in methane-consuming microbial consortia. *Science* **326:** 422–426.

Dhillon, A., Teske, A., Dillon, J., Stahl, D.A., and Sogin, M.L. (2003) Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin. *Appl Environ Microbiol* **69:** 2765–2772.

Ettwig, K.F., Butler, M.K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M.M.M., *et al*. (2010) Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* **464:** 543–551.

Gadberry, M.D., Malcomber, S.T., Doust, A.N., and Kellogg, E.A. (2005) Primaclade–a flexible tool to find conserved PCR primers across multiple species. *Bioinformatics* **21:** 1263–1264.

Grünke, S., Felden, J., Lichtschlag, A., Girnth, A.C., De Beer, D., WenzhÖFer, F., and Boetius, A. (2011) Niche differentiation among mat-forming, sulfide-oxidizing bacteria at cold seeps of the Nile deep sea fan (Eastern Mediterranean Sea). *Geobiology* **9:** 330–348.

Guri, M., Durand, L., Cueff-Gauchard, V., Zbinden, M., Crassous, P., Shillito, B., and Cambon-Bonavita, M.A. (2012) Acquisition of epibiotic bacteria along the life cycle of the hydrothermal shrimp rimicaris exoculata. *ISME J* **6:** 597–609.

Harrison, B.K., Zhang, H., Berelson, W., and Orphan, V.J. (2009) Variations in archaeal and bacterial diversity associated with the sulfate-methane transition zone in continental margin sediments (Santa Barbara Basin, California). *Appl Environ Microbiol* **75:** 1487–1499.

Head, I.M., and Swannell, R.P.J. (1999) Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Curr Opin Biotechnol* **10:** 234–239.

Holler, T., Widdel, F., Knittel, K., Amann, R., Kellermann, M.Y., Hinrichs, K.U., *et al*. (2011) Thermophilic anaerobic oxidation of methane by marine microbial consortia. *ISME J* **5:** 1946–1956.

Inagaki, F., Tsunogai, U., Suzuki, M., Kosaka, A., Machiyama, H., Takai, K., *et al*. (2004) Characterization of C1-metabolizing prokaryotic communities in methane seep habitats at the Kuroshima Knoll, southern Ryukyu Arc, by analyzing pmoA, mmoX, mxaF, mcrA, and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* **70:** 7445–7455.

Jorgensen, B.B., and Boetius, A. (2007) Feast and famine–microbial life in the deep-sea bed. *Nat Rev Microbiol* **5:** 770–781.

Katoh, K., Kuma, K., Toh, H., and Miyata, T. (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res* **33:** 511–518.

Kellermann, M.Y., Wegener, G., Elvert, M., Yoshinaga, M.Y., Lin, Y.-S., Holler, T., *et al*. (2012) Autotrophy as a predominant mode of carbon fixation in anaerobic methane-oxidizing microbial communities. *PNAS* **109:** 19321–19326.

Kleindienst, S., Ramette, A., Amann, R., and Knittel, K. (2012) Distribution and in situ abundance of sulfate-reducing bacteria in diverse marine hydrocarbon seep sediments. *Environ Microbiol* **14:** 2689–2710.

Kniemeyer, O., Musat, F., Sievert, S.M., Knittel, K., Wilkes, H., Blumenberg, M., *et al*. (2007) Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. *Nature* **449:** 898–901.

Knittel, K., and Boetius, A. (2009) Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annu Rev Microbiol* **63:** 311–334.

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

Knittel, K., Losekann, T., Boetius, A., Kort, R., and Amann, R. (2005) Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Appl Environ Microbiol* **71:** 467–479.

Lazar, C.S., Dinasquet, J., Pignet, P., Prieur, D., and Toffin, L. (2010) Active archaeal communities at cold seep sediments populated by Siboglinidae tubeworms from the Storegga Slide. *Microb Ecol* **60:** 516–527.

Leloup, J., Loy, A., Knab, N.J., Borowski, C., Wagner, M., and Jorgensen, B.B. (2007) Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, black sea. *Environ Microbiol* **9:** 131–142.

Leloup, J., Fossing, H., Kohls, K., Holmkvist, L., Borowski, C., and Jorgensen, B.B. (2009) Sulfate-reducing bacteria in marine sediment (Aarhus Bay, Denmark): abundance and diversity related to geochemical zonation. *Environ Microbiol* **11:** 1278–1291.

Lloyd, K.G., Albert, D.B., Biddle, J.F., Chanton, J.P., Pizarro, O., and Teske, A. (2010) Spatial structure and activity of sedimentary microbial communities underlying a Beggiatoa spp. mat in a Gulf of Mexico hydrocarbon seep. *PLoS ONE* **5:** e8738.

Losekann, T., Knittel, K., Nadalig, T., Fuchs, B., Niemann, H., Boetius, A., and Amann, R. (2007) Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby mud volcano, Barents Sea. *Appl Environ Microbiol* **73:** 3348–3362.

Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, *et al*. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32:** 1363–1371.

© 2013 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd, *Environmental Microbiology*

McKay, L.J., MacGregor, B.J., Biddle, J.F., Albert, D.B., Mendlovitz, H.P., Hoer, D.R., *et al*. (2012) Spatial heterogeneity and underlying geochemistry of phylogenetically diverse orange and white Beggiatoa mats in Guaymas Basin hydrothermal sediments. *Deep Sea Res Part I: Oceanogr Res Pap* **67:** 21–31.

Maignien, L., Parkes, R.J., Cragg, B., Niemann, H., Knittel, K., Coulon, S., *et al*. (2012) Anaerobic oxidation of methane in hypersaline cold seep sediments. *FEMS Microbiol Ecol* **83:** 214–231.

Meyerdierks, A., Kube, M., Kostadinov, I., Teeling, H., Glockner, F.O., Reinhardt, R., and Amann, R. (2010) Metagenome and mRNA expression analyses of anaerobic methanotrophic archaea of the ANME-1 group. *Environ Microbiol* **12:** 422–439.

Miller, M.A., Pfeiffer, W., and Schwartz, T. (2011) The CIPRES science gateway: a community resource for phylogenetic analyses. In *Proceedings of the 2011 TeraGrid Conference: Extreme Digital Discovery*. Salt Lake City, UT, USA: ACM, pp. 1–8.

Milucka, J., Ferdelman, T.G., Polerecky, L., Franzke, D., Wegener, G., Schmid, M., *et al*. (2012) Zero-valent sulphur is a key intermediate in marine methane oxidation. *Nature* **491:** 541–546.

Nauhaus, K., Albrecht, M., Elvert, M., Boetius, A., and Widdel, F. (2007) In vitro cell growth of marine archaeal-bacterial consortia during anaerobic oxidation of methane with sulfate. *Environ Microbiol* **9:** 187–196.

Niemann, H., Losekann, T., de Beer, D., Elvert, M., Nadalig, T., Knittel, K., *et al*. (2006) Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. *Nature* **443:** 854–858.

Omoregie, E.O., Mastalerz, V., de Lange, G., Straub, K.L., Kappler, A., Roy, H., *et al*. (2008) Biogeochemistry and community composition of iron- and sulfur-precipitating microbial mats at the Chefren mud volcano (Nile deep sea fan, Eastern Mediterranean). *Appl Environ Microbiol* **74:** 3198–3215.

Orcutt, B., Boetius, A., Elvert, M., Samarkin, V., and Joye, S.B. (2005) Molecular biogeochemistry of sulfate reduction, methanogenesis and the anaerobic oxidation of methane at Gulf of Mexico cold seeps. *Geochim Cosmochim Acta* **69:** 4267–4281.

Orcutt, B.N., Joye, S.B., Kleindienst, S., Knittel, K., Ramette, A., Reitz, A., *et al*. (2010) Impact of natural oil and higher hydrocarbons on microbial diversity, distribution, and activity in Gulf of Mexico cold-seep sediments. *Deep Sea Res Part II: Top Stud Oceanogr* **57:** 2008–2021.

Orphan, V.J., House, C.H., Hinrichs, K.U., McKeegan, K.D., and DeLong, E.F. (2002) Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proc Natl Acad Sci USA* **99:** 7663–7668.

Pace, N.R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276:** 734–740.

Pachiadaki, M.G., Lykousis, V., Stefanou, E.G., and Kormas, K.A. (2010) Prokaryotic community structure and diversity in the sediments of an active submarine mud volcano (Kazan mud volcano, East Mediterranean Sea). *FEMS Microbiol Ecol* **72:** 429–444.

Pachiadaki, M.G., Kallionaki, A., Dahlmann, A., De Lange, G.J., and Kormas, K.A. (2011) Diversity and spatial distribution of prokaryotic communities along a sediment vertical profile of a deep-sea mud volcano. *Microb Ecol* **62:** 655–668.

Paull, C.K., Ussler, W., Peltzer, E.T., Brewer, P.G., Keaten, R., Mitts, P.J., *et al*. (2007) Authigenic carbon entombed in methane-soaked sediments from the northeastern transform margin of the Guaymas Basin, Gulf of California. *Deep-Sea Res Part II-Top Stud Oceanogr* **54:** 1240–1267.

Pereyra, L.P., Hiibel, S.R., Riquelme, M.V.P., Reardon, K.F., and Pruden, A. (2010) Detection and quantification of functional genes of cellulose-degrading, fermentative, and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. *Appl Environ Microbiol* **76:** 2192–2202.

Pernthaler, A., Dekas, A.E., Brown, C.T., Goffredi, S.K., Embaye, T., and Orphan, V.J. (2008) Diverse syntrophic partnerships from deep-sea methane vents revealed by direct cell capture and metagenomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105:** 7052–7057.

Phelps, C.D., Kerkhof, L.J., and Young, L.Y. (1998) Molecular characterization of a sulfate-reducing consortium which mineralizes benzene. *FEMS Microbiol Ecol* **27:** 269–279.

Raghoebarsing, A.A., Pol, A., van de Pas-Schoonen, K.T., Smolders, A.J.P., Ettwig, K.F., Rijpstra, W.I.C., *et al*. (2006) A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* **440:** 918–921.

Rappé, M.S., and Giovannoni, S.J. (2003) The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol* **57:** 369–394.

Rickard, A.H., Gilbert, P., High, N.J., Kolenbrander, P.E., and Handley, P.S. (2003) Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol* **11:** 94–100.

Roalkvam, I., Jorgensen, S.L., Chen, Y.F., Stokke, R., Dahle, H., Hocking, W.P., *et al*. (2011) New insight into stratification of anaerobic methanotrophs in cold seep sediments. *FEMS Microbiol Ecol* **78:** 233–243.

Rossel, P.E., Elvert, M., Ramette, A., Boetius, A., and Hinrichs, K.-U. (2011) Factors controlling the distribution of anaerobic methanotrophic communities in marine environments: evidence from intact polar membrane lipids. *Geochim Cosmochim Acta* **75:** 164–184.

Salman, V., Bailey, J.V., and Teske, A. (2013) Phylogenetic and morphologic complexity of giant sulphur bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **104:** 169–186.

Schreiber, L., Holler, T., Knittel, K., Meyerdierks, A., and Amann, R. (2010) Identification of the dominant sulfate-reducing bacterial partner of anaerobic methanotrophs of the ANME-2 clade. *Environ Microbiol* **12:** 2327–2340.

Schubert, C.J., Vazquez, F., Losekann-Behrens, T., Knittel, K., Tonolla, M., and Boetius, A. (2011) Evidence for anaerobic oxidation of methane in sediments of a freshwater system (Lago di Cadagno). *FEMS Microbiol Ecol* **76:** 26–38.

Simoneit, B.R.T., Lonsdale, P.F., Edmond, J.M., and Shanks, W.C. (1990) Deep-water hydrocarbon seeps in Guaymas Basin, Gulf of California. *Applied Geochemistry* **5:** 41–49.

Sorokin, D.Y., Tourova, T.P., Panteleeva, A.N., and Muyzer, G. (2012) Desulfonatronobacter acidivorans gen. nov., sp. nov. and Desulfobulbus alkaliphilus sp. nov.,

© 2013 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd, *Environmental Microbiology*

haloalkaliphilic heterotrophic sulfate-reducing bacteria from soda lakes. *Int J Syst Evol Microbiol* **62:** 2107–2113.

Stamatakis, A. (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22:** 2688–2690.

Stams, A.J.M., and Plugge, C.M. (2009) Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* **7:** 568–577.

Stevens, H., Stübner, M., Simon, M., and Brinkhoff, T. (2005) Phylogeny of proteobacteria and bacteroidetes from oxic habitats of a tidal flat ecosystem. *FEMS Microbiol Ecol* **54:** 351–365.

Vigneron, A., Cruaud, P., Pignet, P., Caprais, J.-C., Cambon-Bonavita, M.-A., Godfroy, A., and Toffin, L. (2013) Archaeal and anaerobic methane oxidizer communities in the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin (Gulf of California). *ISME J.* **7:** 1595–1608.

Webster, G., Parkes, R.J., Fry, J.C., and Weightman, A.J. (2004) Widespread occurrence of a novel division of bacteria identified by 16S rRNA gene sequences originally found in deep marine Sediments. *Appl Environ Microbiol* **70:** 5708–5713.

Webster, G., Yarram, L., Freese, E., Koster, J., Sass, H., Parkes, R.J., and Weightman, A.J. (2007) Distribution of candidate division JS1 and other bacteria in tidal sediments of the German Wadden Sea using targeted 16S rRNA gene PCR-DGGE. *FEMS Microbiol Ecol* **62:** 78–89.

Yao, W., and Millero, F.J. (1996) Oxidation of hydrogen sulfide by hydrous Fe(III) oxides in seawater. *Mar Chem* **52:** 1–16.

Zhou, J., Bruns, M.A., and Tiedje, J.M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* **62:** 316–322.

Zinkevich, V., Bogdarina, I., Kang, H., Hill, M.A.W., Tapper, R., and Beech, I.B. (1996) Characterisation of exopolymers produced by different isolates of marine sulphate-reducing bacteria. *Int Biodeterior & Biodegradation* **37:** 163–172.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Fig. S1. Schematic view of sampling sites around markers BIG18 (N 27°35.5781; W 111°28.9848) with *Nautile* dive areas (PL), relative position of push cores (CT, diameter 5 cm, length 30 cm) and their geochemical measurements (CH_4 for methane concentrations, SO_4 for sulphate and H_2S for sulphide) and microbiological analysis (M). Scale is 1 m. Modified from Vigneron *et al*., 2013.

Fig. S2. Maximum likelihood phylogenetic tree of the bacterial 16S cDNA sequences in the Guaymas Basin cold seep sediments, performed using RAxML 7.2.8 and GTRCAT model approximation with 1,000 replicates. Only bootstrap values above 70% are shown. Sequences amplified from sections 0 to 4 cmbsf are labelled 'Top', sequences from 4 to 6 cmbsf are 'Middle' and sequences from 8 cmbsf to the end of the core are tagged 'Bottom'. Only one representative sequence is shown. Number in brackets indicate the number of similar clones (above 97% similarity). WM12 = White Mat 12; WM14 = White Mat 14; EWM14 = Edge of White Mat 14.

Table S1. PCR primers used for real-time PCR of 16S rDNA genes.

Table S2. Oligonucleotide probes used for fluorescence *in situ* hybridization.

© 2013 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd, *Environmental Microbiology*

Article 6

Metabolic potential for hydrocarbon and detrital organic matter degradation in sedimentary microbial communities of the Sonora Margin, Guaymas Basin

Adrien Vigneron, Perrine Cruaud, Patricia Pignet, Jean-Claude Caprais, Nolwenn Callac, Maria-Cristina Ciobanu, Anne Godfroy, Erwan G. Roussel, Barry A. Cragg, R. John Parkes, Joy D. Van Nostrand, Zhili He, Jizhong Zhou and Laurent Toffin

Soumis au journal *Environmental Microbiology*

Broad metabolic potential for detrital organic matter and hydrocarbon degradation in sedimentary microbial communities of the Sonora Margin, Guaymas Basin

Adrien Vigneron[123], Perrine Cruaud[123], Patricia Pignet[123], Jean-Claude Caprais[4], Nolwenn Callac[1235], Maria Ciobanu[6], Anne Godfroy[123], Erwan G. Roussel[7], Barry A. Cragg[7], R. John Parkes[7], Joy D. Van Nostrand[8], Zhili He[8], Jizhong Zhou[8], and Laurent Toffin[123]

[1]*Ifremer, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, ZI de la pointe du Diable, CS10070, Plouzané, France.*

[2]*Université de Bretagne Occidentale, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, ZI de la pointe du Diable, CS10070, Plouzané, France.*

[3]*CNRS, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, ZI de la pointe du Diable, CS10070, Plouzané, France.*

[4]*Ifremer, Laboratoire Etude des Environnements Profonds, UMR6197, ZI de la pointe du Diable, CS10070, Plouzané, France.*

[5]*Université de Brest, Domaines Océaniques IUEM, UMR6538, Place Nicolas Copernic 29280 Plouzané, France*

[6]*Ifremer, Géosciences Marines, Laboratoire des Environnements Sédimentaires, ZI de la pointe du Diable, CS10070, Plouzané, France.*

[7]*School of Earth and Ocean Sciences, Cardiff University, Cardiff CF10 3AT, United Kingdom*

[8]*Institute for Environmental Genomics, University of Oklahoma, Norman, Oklahoma, USA*

Running Title: Metabolic potential of subsurface communities

Key words: Detrital / Hydrocarbon / Geochip / Guaymas / subsurface / communities

Corresponding author:

Laurent Toffin

Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, Technopôle Brest Iroise 29280 Plouzané, France.

02.98.22.43.96 / Laurent.Toffin@ifremer.fr

Abstract

Marine subsurface sediments are one of the most extensive biospheres colonized by microorganisms. Considering the large global volume of marine sediments and the microbial abundances within this ecosystem, microbial activities in the subsurface are predicted to have a substantial impact on global biogeochemical cycles. However, survival and sometimes thriving of these microbial communities in sub-seafloor sediments are poorly understood. Here we describe the microbial diversity and abundance in subsurface sediments of the Sonora Margin and correlate this to comprehensive geochemical data. We also identify microbial metabolic potentials and functional traits that drive the community composition, using the GeoChip functional gene microarray. Active microbial community structure in the Sonora Margin sediments was related to deep subsurface ecosystems and remained relatively constant throughout the sediments, despite the presence of geochemical gradients. However, we show significant correlations between relative abundances of bacterial and archaeal dominant lineages and organic carbon quantity and quality. Congruently, relevant major metabolic pathways for the degradation and assimilation of this organic carbon were detected. Thus, the capacity of microbial community to colonize Sonora Margin subsurface sediments appears to involve an important reservoir of genes for the transformation of detrital organic carbon and hydrocarbons as well as recalcitrant substrates.

Introduction

Deep marine subsurface sediments are one of the most extensive microbial habitats on Earth, covering more than two-thirds of the Earth's surface and reaching maximal thickness of more than 10 km at some locations (Divins, 2003). Microbial populations are widespread in these sediments as far as temperatures permit (Roussel et al., 2008) and cell numbers vary consistently ranging from 10^{10} to 10^{3} cells per cm^{3} of sediments according to their proximity from land, sedimentary rates and depth (Kallmeyer et al., 2012). In general, microbial abundance in subsurface sediments decreases exponentially with depth, likely due

to the decreasing organic carbon quality and availability (Parkes et al., 2000). Recent investigations based on NanoSIMS monitoring (Morono et al., 2011) or intact ribosomal RNA (Biddle et al., 2006) and membrane lipid detection (Biddle et al., 2006; Lipp et al., 2008) demonstrate that this sedimentary microbial community is alive and can respond to and incorporate organic additions. However, overall metabolic rates are very slow, with biomass turnovers ranging from years to millennia (Jørgensen, 2011). Extensive researches have focused on elucidating the microbial diversity of subsurface sediments (Inagaki et al., 2003; D'Hondt et al., 2004; Newberry et al., 2004; Webster et al., 2004; Biddle et al., 2006; Inagaki et al., 2006). Specific lineages of *Bacteria* (for e.g. *Chloroflexi*, Candidate division JS1) and *Archaea* (for e.g. Miscellaneous Crenarchaeotal Group (MCG), Marine Benthic Group D (MBGD), South African Goldmine Euryarchaeotal Group (SAGMEG) (Teske and Sorensen, 2008; Orcutt et al., 2011), distinct from the surface biospheres, appear to occur consistently in marine subsurface sediments. However identification of the metabolism of these microbial populations remains challenging. Implication in methane cycle has been considered for some of these communities but their widespread distribution without correlating with methane gradients weakened this hypothesis (Biddle et al., 2006; Kubo et al., 2012). In contrast, isotopic signatures of lipid membrane suggested that heterotrophic strategies dominated in these ecosystems (Biddle et al., 2006; Lipp et al., 2008). Metagenomic and metatranscriptomic analyzes of subsurface sediments from the deep biosphere of the Peru Margin indicated metabolisms based on lipids, carbohydrates and amino acids utilization. However detected genes and transcripts were mainly affiliated to *Firmicutes*, *Actinobacteria*, and *Alpha-* and *Gammaproteobacteria* rather than *Archaea*, *Chloroflexi* and candidate divisions (Biddle et al., 2008; Orsi et al., 2013). Finally, recent single cell genomic approaches indicated the capacity of peptides degradation for members of MCG and MBGD archaeal lineages (Lloyd et al., 2013b). Despite these recent advances it remains unclear how microbial life is sustained in subsurface sediments. Here we performed an extended comparison of the geochemical composition, microbial taxonomic diversity and abundance, and the GeoChip-based metagenome of the Sonora Margin subsurface sediments to

establish the phylogenetic and functional biodiversity in this biosphere. We investigated a ten metre long sediment core from the Sonora Margin in the Guaymas Basin. The Guaymas Basin sediments are well known to harbor both cold seep and hydrothermal vent ecosystems which are microbially highly active and based on methane cycling (Teske et al., 2002; Dhillon et al., 2003; Biddle et al., 2012; Vigneron et al., 2013). However, the subsurface microbial communities and processes that occur in the deeper sediments of the Basin have not been explored. We analyzed the archaeal and bacterial diversity, abundance and distribution in correlation with geochemical gradients and elementary composition of the sediments. Then we identified the metabolic processes and the functional potential in term of carbon utilization for both bacterial and archaeal communities. We present insights into the microorganisms adaptability and capacity to use various carbon substrates in marine subsurface sediments and highlight that the nitrogen cycle could represent an important energetic process for sub-seafloor microorganisms.

Results

Sediments description

The BCK1 core, sampled in the Sonora Margin sediments, showed a characteristic signature of margin sediment porewater geochemistry (Figure 1a), with a sulfate to methane transition zone (SMTZ) located around 5 mbsf. Sulfate porewater concentrations decreased from 25 mM at the sediment-water interface down to 2 mM at 5.5 mbsf. Hydrogen sulfide concentrations were only detected in the deeper sediment layers with a maximum of 32 mM at 5 mbsf decreasing to around 8 mM at 8mbsf. Methane porewater concentrations increased with depth and reached 500 µM at the bottom of the sediment core (8.5 mbsf). Isotopic signature of methane was -97.3‰ at the bottom of the core (9mbsf) and -82‰ at 1mbsf, indicating that a large proportion of the methane was biogenic and that a methane oxidation potentially occurred towards the sediment surface. These results were congruent with the low methane production activity rates (<45 pmol/cm^3/d) measured in the bottom

sediments of the core (SM Figure 1). Total organic carbon (TOC) content varied between 3.1 and 4.3% (w/w) throughout the sediment with peaks at 3.5, 5 and 7.5 mbsf (Figure 1c). Analyze of the element composition of the porewater highlighted both a manganese reduction zone in the first meter of sediment and specific horizons (3.5, 5-6, 7 and 8 mbsf) with significant enrichment of metallic elements (Fe, Al, Si, Mn, Ti) (SM Figure 2). These increases in porewater metal concentrations in margin ecosystems are probably indicative of detrital terrigeneous inputs in the sediment layers, as previously detected in the Guaymas Basin (Cheshire et al., 2005). Ammonium concentrations, likely resulting of organic matter degradation, increased with depth until reaching 2.5 mM at 5 mbsf (Figure1b).

Active microbial communities

A total of 560 partial 16S rRNA sequences, used as a proxy for active microbial communities, were obtained from 1, 4, 5, 7 and 8 mbsf sediment layers. Overall, statistical analysis of the microbial community structure of the samples indicated that the microbial community was nearly constant throughout the sediment core (SIMPER : 74.05 % of similarity).

Archaeal 16S rRNA libraries highlighted a very limited diversity throughout the sediment core ($1\text{-}H_{Simpson}$ = 0.615±0.08 ; Figure 2, SM Figure 3, SM Figure 4), including three uncultivated phylotypes, mainly found in the deep biosphere: the Marine Benthic Groups B and D (MBGB, MBGD) and the Miscellaneous Crenarchaeotal Group (MCG), mainly represented by the MCG-8 and MCG-10 sub-groups (Kubo et al., 2012). Other groups such as South Africa Gold Mine Euryarchaeotal Group (SAGMEG), Marine Hydrothermal Vent Group (MHVG) and Terrestrial Miscellaneous Euryaechaeotal group (TMEG) were also detected in lower proportions in the deepest sediment layers.

In contrast, the bacterial 16S rRNA libraries indicated a larger diversity ($1\text{-}H_{Simpson}$ = 0.712±0.06), dominated by *Chloroflexi* and diverse bacterial candidate divisions including JS1, OP11, OP1, OP8 and OP3 (Figure 2, SM Figure 3, SM Figure 5). The *Chloroflexi* lineage included different sub-groups and most of the amplified sequences were relatives to

Dehalococcoidetes or subphylum IV groups. A few *Deltaproteobacteria*, usually related to sulfate-reducers and hydrocarbon degraders in cold seep sediments were detected in 4, 5 and 7 meters depth sediment horizons.

Microbial 16S rRNA gene abundance and distributions

Depth distributions and relative abundance of microorganisms were analyzed every 50 cm by real-time PCR (Figure 3). 16S rRNA gene abundance of *Bacteria* was around 10 fold higher than *Archaea* throughout the sediment core, and decreased with depth from $4x10^9$ 16S rRNA gene copies per gram of sediment in the top of the core to $2.8x10^8$ copies at the bottom. Bacterial relative abundance showed elevated concentrations in particular at 5, 7 and 8 meters below the seafloor with $1.95x10^9$, $1.45x10^9$ and $1.1x10^9$ 16S rRNA gene copies g^{-1} respectively. Bacterial groups affiliated with *Chloroflexi* and candidate division JS1, detected as dominant bacterial populations in the 16S rRNA gene libraries were specifically targeted and quantified. *Chloroflexi* 16S rRNA gene abundance, estimated by subtracting JS1 16S rRNA gene copy numbers from quantifications with JS1 and *Chloroflexi* groups specific primers (Blazejak and Schippers, 2010), appeared to mirror the bacterial distribution profile (Pearson r=0.914, P<0.0001) and strongly dominated the bacterial community throughout the sediment core. In contrast, JS1 16S rRNA gene copy numbers increased with depth until reaching maximum values between 2.5 and 5 mbsf with $4.62x10^8$ copies g^{-1}.

Total archaeal 16S rRNA gene copy numbers, represented 4-10% of the total number of 16S rRNA gene and decreased with depth, with $1.9x10^8$ 16S rRNA gene copies g^{-1} in the shallow sediment and $2.67x10^7$ 16S rRNA gene copies at the bottom of the sediment core. However, specific horizons (1 mbsf, 5 mbsf, 7 and 8 mbsf) showed peaks of elevated 16S rRNA gene *Archaea* concentrations with $4.8x10^8$, $1x10^8$, $1.1x10^8$ and $6.8x10^7$ 16S rRNA gene copies respectively. Within the *Archaea*, uncultivated groups MBGD, MBGB and MCG were detected throughout the sediment core. Their distributions mirrored the archaeal distribution (Pearson r=0.98, P<0.0001) and no specific niche repartition was detected along the sulfate

and methane concentration gradients. Assuming the same 16S rRNA copy number for each microbial lineage, MCG were fivefold less numerous than marine benthic groups except at 7 mbsf with $4.8x10^7$ 16S rRNA gene copies g^{-1}. Confirming 16S rRNA libraries, ANME lineages were below the detection limit ($<10^4$ 16S rRNA gene copies g^{-1}) and methanogens were only represented by Methanosarcinales at 1 mbsf with $2.4x10^6$ 16S rRNA gene copies g^{-1}.

Functional diversity and GeoChip array

In order to investigate the ecophysiology of the detected microbial community, a functional array approach was used for sediments collected at selected depths (1, 2.5, 5, 7 and 8 mbsf). The microarray analyzes indicated a slight but significant variation between the functional potential from each sediment horizons (ANOVA: F= 5.64, *P*= 0.0002). Similarity percentage (SIMPER) and clustering analyses highlighted that the 2.5 and 5 mbsf sediment horizons and the two deeper sediment horizons (7 and 8 mbsf) shared the greatest similarity in term of functional gene detection (93.3% and 91.92 % respectively) and that divergence between the functional potentials of the microbial community increased with sediment depth. These analyzes indicated that this divergence was mainly due to the highest presence, in deepest sediment layer communities, of pathways involved in hydrocarbon degradation (13% of variation) and the predominance of pathways involved in cellulose degradation (6.79% of variation) in the upper sediment layers (Figure 4). Using the taxonomic nature of the GeoChip probes (He et al., 2010), data were sorted according to *Archaea* (3% of the total prokaryotic signal) or *Bacteria* (97%) super kingdoms and *Euryarchaeota* or *Crenarchaeota* phyla. *Crenarchaeota* phylum was recently revised to include only thermophilic lineages, excluding lineages such as MCG and MBGB (Guy and Ettema, 2011). However, GeoChip array was designed on the former phylogeny, thus the crenarchaeotal metabolic pathways detected in this study are likely to include MCG and MBGB lineages.

Carbon metabolism

A large variety of bacterial metabolic pathways for carbon utilization were identified (Figure 4). Genes coding for the RuBisCo, the propionyl-CoA/acetyl-CoA carboxylase (*ppc*), the ATP citrate lyase (*aclB*) and the carbon-monoxide dehydrogenase (CODH) were detected throughout the sediment core, indicating an autotrophic carbon fixation potential for both bacterial and archaeal lineages. Heterotrophic metabolic pathways were also detected, indicating an important potential to transform a large variety of organic compounds. Bacterial metabolic pathways for carbohydrates degradation (starch, cellulose, hemicellulose, chitin and pectin degradation), notably with extracellular enzyme genes, were detected in slightly higher proportion in the surface sediments. Hydrocarbon degradation pathway genes such as *chnA*, involved in ethylphenol and ethylbenzen catabolism, the *tut* operon, involved in toluene degradation and *alk* genes in the alkane degradation pathway (Carmona et al., 2009) were also detected in increasing proportion with depth. The ability to degrade chlorinated, aromatic, polycyclic and xenobiotic compounds were also detected for bacteria, particularly with genes involved in the superpathway of aromatic compound degradation *via* 2-oxopent-4enoate and in the metaclivage of aromatic compounds (Arensdorf and Focht, 1995). Finally, the bacterial potential to use methylamine compounds was also identified throughout the sediment core. Regarding the archaeal metabolic potential, their ability to degrade carbohydrates and complex organic matter were also indicated along the autotrophic metabolism for both *Euryarchaeota* and *Crenarchaeota*-related lineages. Finally, *mcrA* euryarchaeotal genes, involved in both methane production and anaerobic oxidation (Knittel and Boetius, 2009) were detected in increasing proportion with depth.

Sulfate and Nitrogen metabolisms

The elevated ammonium concentrations measured in the sediments suggested that nitrogen cycle might be important in the Sonora Margin sediments. Analyses of the functional array highlighted the presence of genes critical to all of the major pathways of the nitrogen cycle (Figure 5). Potentials for nitrogen fixation and mineralization, allowing nitrogen input to the microbial ecosystem were observed in both bacterial and euryarchaeotal lineages, while

nitrification genes were detected in *Bacteria* and *Crenarchaeota*. Denitrification potential was identified in *Bacteria* and in higher proportion in *Archaea*. Finally, genes involved in the anaerobic oxidation of ammonium (anammox) were detected throughout the sediment core and in higher proportion at 5 mbsf. Regarding the sulfur cycle, genes involved in sulfate-reduction (*dsrAB, aprAB*) were identified throughout the sediments and in higher intensity at 2.5 and 5 mbsf sediment horizons, corresponding to the sulfate decrease (SM Figure 6).

Discussion

In this study we document the taxonomic and functional diversity of the microbial community in the Sonora Margin subsurface sediments. In such subsurface ecosystems, it remains unclear which microbial domain of life predominate (Schippers et al., 2005; Biddle et al., 2006; Inagaki et al., 2006; Lipp et al., 2008; Lloyd et al., 2013a). In Sonora Margin sediments, Q-PCR indicated that *Bacteria* community predominates over *Archaea* throughout the core. This bacterial community was strongly dominated by members of *Chloroflexi* and candidate division phyla (JS1, OP8, etc.), while MCG, MBGB (also known as DSAG (Vetriani et al., 2003)) and MBGD constituted the major archaeal lineages. All these microbial populations have been frequently inventoried in margin sediments and in the deep subsurface marine biosphere (Inagaki et al., 2003; Newberry et al., 2004; Inagaki et al., 2006), but only in minor proportion in highly active ecosystems (hydrothermal vent, cold seeps) (Lloyd et al., 2010; Vigneron et al., 2013) and in low carbon environments (open ocean sediments) (Durbin and Teske, 2011). Interestingly, no significant variation of the microbial community structure nor difference of vertical zonation, excepted for the candidate division JS1, was detected throughout the sediment core, despite the presence of marked geochemical gradients (sulfate, methane). These results suggest that dominant microbial lineages were likely not directly involved in these biogeochemical cycles. Estimated abundance of the microbial community globally decreased with depth as commonly observed in marine sediments (Parkes et al., 2000; Kallmeyer et al., 2012). However, specific sediment horizons (5, 7 and 8 mbsf) harbored peaks of elevated cell density. In the Sonora Margin,

elevated amounts of organic matter, derived from both marine production and continental inputs, sedimented in the seafloor with an estimated rate of 2 mm/y (Simoneit et al., 1990), leading to an elevated sedimentary TOC content (3.5~4%). This high percentage of TOC could be responsible for the high cellular abundance detected in the sediments. Indeed, a common assumption is that proximity with the lands, geochemical gradient and organic carbon quality and abundance regulate the microbial community structure and abundance in marine sediments (Lipp et al., 2008; Orcutt et al., 2011; Kallmeyer et al., 2012). Elevated Q-PCR cell abundance estimations in the first metres of sediment could probably be due to the availability of various electron acceptors (oxygen, nitrate, manganese and sulfate). Furthermore, significant correlations were found between TOC percentage and total *Bacteria*, *Chloroflexi*, candidate division JS1 and MBGD cell abundance estimations below 1.5 mbsf (r=0.58, 0.66, 0.75 and 0.66 respectively; P<0.04), which is consistent with recent reports of correlation between TOC and subsurface microbial biomass (Lipp et al., 2008; Jorgensen et al., 2012). Likewise, fluctuations below 3 mbsf of all microbial lineage cell abundances, appeared to be positively correlated with the local elementary composition of the sediments (Fe, Ti, Al ; r for each element >0.736, >0.70, >0.703 for *Bacteria*, JS1, *Chloroflexi* respectively; P<0.02 and r>0.748, >0.67, 0.736 and 0.68, for *Archaea*, MCG, MBGB and MBGD respectively; P<0.04). These results clearly indicate that in subsurface margin sediments microbial communities are likely influenced by the geochemical composition of the porewater. Thereby, the microbial abundance in margin ecosystems might be enhanced by the continental detrital inputs rather than by oceanic production, as indicated the correlations with terrigeneous-derived metallic elements. This result is congruent with recent model calculations in subsurface sediments, indicating that buried organic carbon is sufficient to fuel microbial communities over turnover of millions of years (Lomstein et al., 2012).

Based on single cell genomics, it has been recently proposed that archaeal MCG and MBGD lineages could degrade detrital organic matter (Lloyd et al., 2013b). Likewise, genes and

transcripts, involved in anaerobic metabolism of amino acids, carbohydrates and lipids have been previously detected in the deep subsurface biosphere (Biddle et al., 2008; Orsi et al., 2013). However, it remains unclear how the microbial community is organized to degrade the detrital inputs and which microbial processes are involved. Using the GeoChip array, we identified a broad range of metagenomic potential involved in organic matter degradation which would lead to the high ammonium concentrations measured in the sediments. Indeed, the bacterial community appeared to possess various metabolic pathways for the transformation and the anaerobic degradation of simple and complex organic matter. Metabolic pathways, including extracellular and intracellular enzymes for degradation and assimilation of decaying wood have been detected, confirming the previous hypothesis by Lipp et al. (Lipp et al., 2008), notably with enzymatic pathways for starch and plant cell walls degradation. Pathways for transformation of lignin-like, complex organic aromatic substrates was also identified, notably with the super-pathway of the aromatic compound cleavage, indicating that even the more recalcitrant wood particles could potentially be degraded by the bacterial community in the Sonora Margin. This wood-based degradation metabolism appeared to be predominant in the upper sediment layers while hydrocarbon catabolism predominated the deeper sediment horizons. The Guaymas Basin sediments are well known to harbor various C_1 to C_8 hydrocarbon compounds such as ethane, butane, pentane and other alkanes (Simoneit et al., 1979). Thus the bacterial community may be able to degrade this upward migrating organic carbon source as well as sedimented particles. Other metabolic pathways have been identified, indicating that different strategies for carbon assimilation occur amongst the different bacterial lineages. Potential for degradation of chlorinated compounds was present, which is congruent with previous detection of dehalogenase enzymes and dehalogenation activities in similar deep biosphere sediments dominated by *Chloroflexi* lineages (Futagami et al., 2009). Degradation potential for such carbon sources, derived from decaying marine phytoplankton pigments (Roy, 2010), indicated that in addition to terrestrial input the bacterial community, such as some *Chloroflexi* members, could catabolize marine production and phytoplankton, as previously

observed (Löffler et al., 2012). This metabolic specialization, energetically more favorable than sulfate reduction, may also explain the overall abundance of *Chloroflexi* representatives in marine sediments (Durbin and Teske, 2011). Additionally, part of the bacterial community could also decompose decaying macrofauna with enzymatic pathways involved in chitin and methylamine degradation. Finally, enzymatic potential for autotrophic metabolism was identified in both *Bacteria* and *Archaea* domains, indicating that carbon dioxide could also been assimilated by parts of the microbial community to mitigate potential episodes of low organic availability, and that some subsurface microorganisms might eventually be facultative heterotrophs, as recently suggested by Morono et al. (Morono et al., 2011). In contrast to bacterial lineages, the detected metabolic potential of *Archaea* phyla appeared to be more limited, maybe due to the lower number of genes targeted by the GeoChip. Even if we could not exclude that our representation of the archaeal metabolic potential may be biased by unknown or non-targeted archaeal genes that escape to the microarray detection, various archaeal functional genes were identified. Crenarchaeotal-related lineages, likely including MCG and MBGB phyla, appeared to have the metabolic potential for complex organic carbon degradation (cellulose and aromatic polymers). This result is supported by the recent studies of single cell MCG genomes (Lloyd et al., 2013b) and distribution (Kubo et al., 2012) indicating an heterotrophic metabolism and metagenome of MCG from estuarine and mangrove environments stating the potential for aromatic compounds degradation (Meng et al., 2013). Likewise, Euryarchaeotal lineages, dominated by MBGD (95% based on Q-PCR estimations), appeared to have mainly the potential to degrade wood detrital polymers like starch, cellulose and aromatic compounds. This result confirms that MBGD members could be anaerobic and heterotrophic degraders of complex organic matter, as previously proposed (Lloyd et al., 2013b). Resulting peptides from enzymatic degradations could be further assimilated by MBGD cells *via* peptidases and oligopeptide transporters, recently detected in their genome (Lloyd et al., 2013b).

Interestingly, the *mcrA* gene, involved in methane production and anaerobic oxidation (Knittel and Boetius, 2009) have been identified with the GeoChip approaches and in higher proportion in the deepest sediment horizons where methane concentrations and methanogenesis activity rates were mainly measured (Figure 1, SM Figure 1). However, methanogens and anaerobic methanotrophs were not detected in the sediments using the other molecular approaches, excepted at 1 mbsf where *mcrA* gene library (data not shown) and Q-PCR quantification highlighted a small population of the Methanosarcinales-affiliated lineage *Methanococcoides.* Identification of this methylamine-based methanogens (Sowers and Ferry, 1983) is consistent with the detection of methylamine-based methanogenesis activity and the GeoChip array detection of euryarchaeotal genes involved in methylamine degradation. However these results also indicated that in deeper sediments with low methanogenic activity (10-100 fold lower than in cold seeps (Parkes et al., 2007)), relative abundances of known methanogens are below the PCR and Q-PCR detection limits (<1000 16S rRNA gene copy per gram of sediment) or escape the amplification due to primer deficiencies, as previously suggested (Newberry et al., 2004). Likewise anaerobic methanotrophs in extremely low abundance (Parkes et al., 2005) or with altered key genes that escape molecular detection could occur in the sediments as indicated by the variation of the methane isotopic ratio. These methanotrophs might be coupled directly or indirectly with sulfate-reducing *Deltaproteobacteria*, detected between 4 and 7 mbsf by 16S rRNA libraries and *dsrAB AprAB* GeoChip probes and thereby, lead to the formation of the SMTZ in these sediments (Figure 1).

With this microarray approach, we clearly identified that different strategies for carbon utilization were present in the Sonora Margin sediments. Furthermore, the GeoChip array highlighted that a complete bacterial pathway for nitrogen metabolism, from nitrogen fixation to denitrification and anammox, occurs in the Sonora Margin sediments. Moreover, enzymatic potential for an euryarchaeotal nitrogen fixation was identified. Nitrogen assimilation is an important process for cell viability and metabolism and has been recently

observed in deep subsurface sediment communities (Morono et al., 2011). Various members of the *Euryachaeota* such as methanogenic lineages (Leigh, 2000; Raymond et al., 2004) and recently ANME-2 (Dekas et al., 2009) and ANME-1 (Meyerdierks et al., 2010) have been previously found to anaerobically fix nitrogen. The detection of nitrogen fixation genes in our results suggested that members of MBGD could also be diazotrophic *Archaea*. Nitrification (ammonium oxidation) genes (*amoA*) were identified as a potential metabolism in crenarchaeotal-related lineages. Although ammonium is abundant in the sediments probably due to organic matter microbial degradation, and could be used as electron donor, the presence of such oxygenase enzymes in this anoxic environment, as previously observed (Jorgensen et al., 2012) remains enigmatic. The use of an alternative electron acceptor for ammonium oxidation (Jorgensen et al., 2012) or an alternative function for *amo* genes in anoxic environments have been proposed (Mussmann et al., 2011). Finally, denitrification pathways for both archaeal and bacterial phyla were present throughout the sediment core, which could participate to the elevated ammonium concentrations below 5 mbsf. This result is consistent with the previous detection of *nar* transcripts in deep marine sediments (Orsi et al., 2013). Anaerobic ammonium oxidation was previously suggested for the nitrate origin in the deepest sediment and would be consistent with the detection of the *hzo* genes by the GeoChip probes as well as the previously report of anammox process in the Sonora Margin sediments (Russ et al., 2013).

Conclusion

In this study we have presented complementary profiles of geochemical parameters, taxonomic diversity and functional potentiality, which clearly identify that Sonora Margin sediment microbial communities are composed of deep biosphere-related organisms and have a broad potential for the catabolism of complex organic matters (decaying wood, macrofauna, phytoplankton and hydrocarbon), relevant to the impact of these compounds to the sediment. Significant correlations have been observed between 16S rRNA gene copy numbers of the microbial lineages and the quality and quantity of the organic carbon,

suggesting that in these margin sediment ecosystems microbial abundance is probably shaped by terrigeneous inputs. Finally and interestingly, this study also highlighted a functional potential for degradation of xenobiotic and nitoaromatic compounds, indicative of the capacity of marine sediments to respond to human impacts and anthropogenic pollutions.

Materials and Methods

Core sampling and abiotic variables

Sediment samples were collected from Sonora Margin cold seeps in the Guaymas Basin, during the Ifremer "BIG" cruise on the research vessel L'*Atalante* in June 2010. Gravity core BCK1 (N 27°35.804, W 111°28.697), 10 meters in length, was recovered from an observed gas depression in methane plume fields, a few meters distant from visible active cold seeps, at 1723 meters water depth. *In situ* temperatures, measured using thermal sensors (THP, Micrel) attached to the core, increased gradually from 3.5°C at the water-sediment interface to 5°C in the bottom of the core (9 mbsf). Immediately after retrieval, BCK1 core was sectioned in 1 meter long sections and transferred into the cold room. The plastic core liner was opened every 50 cm for sub-sampling. Samples for molecular analysis were collected aseptically using cut-off sterile 5 mL syringes, and frozen at -80°C. Sediment samples for activity rate estimations were taken using five cut-off sterile 5 mL syringes per section. These syringes were hermetically and anaerobically sealed with nitrogen in aluminum bags (Grüber-Folien, Germany) and stored at 4°C for processing back to laboratory.

Porewater was obtained by spinning down approximately 10g of crude sediment then was fixed as previously described (Vigneron et al., 2013). Sulfate concentrations were determined by ion exchange chromatography as previously described (Lazar et al., 2011). Hydrogen sulfide and ammonium concentrations were measured by colorimetry (Fonselius et al., 2007). Methane concentrations were quantified by using the headspace technique (HSS Dani 86.50) and a gas chromatograph (Perichrom 2100) equipped with flame-ionization detector (Sarradin and Caprais, 1996). Total organic carbon (TOC) of the sediments were

measured by combustion in a LECO CS 125 carbon analyzer, as previously described (Ciobanu et al., 2012). Quantitative elemental chemical compositions of unfiltered porewaters were measured using Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrophotometry (ICP-AES, Ultima 2, Horiba, JobinYvon), as previously detailed (Callac et al., 2013). Effect of eventual particle contaminations was limited by normalization of the elemental concentrations by conservative element (Na) concentrations. The stable isotope composition of methane was measured by ISOLAB b.v. company (Neerijen, The Netherlands) in the first meter deep section (0.5 mbsf) and in the deepest sediment layer (8.5 mbsf) as previously described (Vigneron et al., 2013).

DNA extraction and amplification

Total nucleic acids (DNA and RNA) were directly extracted in duplicate from 2.5 grams of sediments (Zhou et al., 1996), then pooled and purified (Lazar et al., 2010). Total RNA was purified from crude nucleic acids using Nucleospin RNA II Kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) prior to RT-PCR. Aliquots of rRNA were reverse transcribed using Quanta qScript® kit according to manufacturer's protocol (Quanta Bioscience, Gaithersburg, MD, USA). All PCR reactions were monitored as previously detailed (Vigneron et al., 2013) with appropriate annealing temperatures for primers listed in Supplementary Table 1. As control for DNA contamination, no amplification was obtained by PCR on RNA aliquots. Gene libraries from 16S rRNA templates were constructed from pooled and gel purified triplicate reactions in TOPO® XL PCR Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's recommendations. Sequencing was done on an ABI3730xl - genetic Analyzer using M13 universal primers by GATC Biotech (Germany). Sequences were analyzed using NCBI BLAST search program GenBank and aligned with the closest representative sequences using MAFFT 6.903 (Katoh et al., 2005) and checked manually for chimera. Phylogenetic trees were estimated with maximum likelihood method, using MPI-parallelized RAxML 7.2.8 (Stamatakis, 2006) on the CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2011). GTRCAT approximation of models was used for ML bootstrapping (1000 replicates).

Rarefaction curves and diversity indices were performed using MOTHUR for all libraries (Schloss et al., 2009). Sequences have been deposited in the EMBL database under the following accession numbers : HF543837-HF543861 for archaeal, HF545450-HF545524 for bacterial 16S rRNA sequences and HF935025-HF935037 for *mcrA* gene sequences.

Real-time (q)PCR

Triplicate quantitative measurements were monitored on every sample with a Step One instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a final volume of 25 µL by using Perfecta® SYBR® Green SuperMix ROX (Quanta Bioscience), template and optimal primer concentrations (Supplementary Table 1) according to manufacturer instructions. Amplifications of crude DNA samples indicated presence of inhibitors in the samples, then Q-PCR reactions were performed on purified samples. Purified samples were diluted until Cp decreased log-linearly with dilutions, indicating the absence of inhibition. Primer sets, listed in Table 1, targeting *Archaea* and *Bacteria* previously found in the Sonora Margin sediments were completed with new primer sets for uncultivated *Archaea* of the MBGB and MBGD designed using ARB package (Ludwig et al., 2004) and web-based application Primaclade (Gadberry et al., 2005). For calibrations, environmental 16S rRNA gene representatives for the quantified uncultured microorganisms were inserted into plasmids. Standard curves were obtained by triplicate amplifications of plasmid dilutions ranging from 10^3 to 10^8 copies/µL. Resulted R^2 of standard curves were up to 0.997 and efficiency of the reaction above 94 %. Primer sets specificity was confirmed by amplification products sequencing. Q-PCR results were expressed in 16S rRNA gene copy number per gram of sediment. Correlation factors with geochemical parameters and statistical tests on the microbial distribution were achieved using Graph Pad Prism Software.

GeoChip array

The GeoChip 4.0 microarray, containing 83992 oligonucleotide probes and targeting 152414 gene variants in 401 categories for different microbial functional and biogeochemical

processes was monitored as previously detailed (Lu et al., 2012). Although the GeoChip was initially based on the genome of cultured microorganisms, the new generation of GeoChip has been extensively enriched with metagenome from various environments and contains now an important number of relevant probes targeting genes from cultured and uncultured microorganisms involved in key biogeochemical cycles. Total purified DNA were labeled then hybridized on GeoChip slides. Signal intensities were scanned and spots with signal-to-noise ratios lower than 2 were removed before analyses. The phylogenetic design of the data acquisition enabled confident assignment of metabolic capabilities to bacterial and archaeal phyla (Zhou, 2009), thus dataset were sorted to *Bacteria, Euryarchaeota* and *Crenarchaeota* genes. Output was analyzed using the GeoChip 4.0 data analysis pipeline (He et al., 2010) and tested using the statistical software PAST (Hammer et al., 2001). Relative signal intensity was normalized by the number of the probes for each indicated metabolic pathway. List of targeted genes for each category are provided in SM Table 2. Visualization of the bacterial and archaeal functional potential was achieved using spider dendrograms, where each arm of the plot corresponded to a metabolic pathway. The raw GeoChip dataset is available at http://ieg.ou.edu/4download/.

Acknowledgements

We would like to thank the crew of *L'Atalante* for their help on core preparation, François Harmegnies for temperature gradient recovery and Olivier Rouxel for geochemical interpretation. This cruise was funded by IFREMER (France) and has benefited from a work permit in Mexican waters (DAPA/2/281009/3803, October 28th, 2009). This study was supported by IFREMER Ph.D grant.

References

Arensdorf, J.J., and Focht, D.D. (1995) A meta cleavage pathway for 4-chlorobenzoate, an intermediate in the metabolism of 4-chlorobiphenyl by Pseudomonas cepacia P166. *Appl Environ Microbiol* **61**: 443-447.

Biddle, J.F., Fitz-Gibbon, S., Schuster, S.C., Brenchley, J.E., and House, C.H. (2008) Metagenomic signatures of the Peru Margin subseafloor biosphere show a genetically distinct environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 10583-10588.
Biddle, J.F., Cardman, Z., Mendlovitz, H., Albert, D.B., Lloyd, K.G., Boetius, A., and Teske, A. (2012) Anaerobic oxidation of methane at different temperature regimes in Guaymas Basin hydrothermal sediments. *Isme Journal* **6**: 1018-1031.
Biddle, J.F., Lipp, J.S., Lever, M.A., Lloyd, K.G., Sorensen, K.B., Anderson, R. et al. (2006) Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 3846-3851.
Blazejak, A., and Schippers, A. (2010) High abundance of JS-1-and Chloroflexi-related Bacteria in deeply buried marine sediments revealed by quantitative, real-time PCR. *FEMS Microbiol Ecol* **72**: 198-207.
Callac, N., Rommevaux-Jestin, C., Rouxel, O., Lesongeur, F., Liorzou, C., Bollinger, C. et al. (2013) Microbial colonization of basaltic glasses in hydrothermal organic-rich sediments at Guaymas Basin. *Frontiers in Microbiology* **4**.
Carmona, M., Zamarro, M.T., Blázquez, B., Durante-Rodríguez, G., Juárez, J.F., Valderrama, J.A. et al. (2009) Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **73**: 71-133.
Cheshire, H., Thurow, J., and Nederbragt, A.J. (2005) Late Quaternary climate change record from two long sediment cores from Guaymas Basin, Gulf of California. *Journal of Quaternary Science* **20**: 457-469.
Ciobanu, M.C., Rabineau, M., Droz, L., Révillon, S., Ghiglione, J.F., Dennielou, B. et al. (2012) Paleoenvironmental imprint on subseafloor microbial communities in Western Mediterranean Sea Quaternary sediments. *Biogeosciences Discuss* **9**: 253-310.
D'Hondt, S., Jørgensen, B.B., Miller, D.J., Batzke, A., Blake, R., Cragg, B.A. et al. (2004) Distributions of Microbial Activities in Deep Subseafloor Sediments. *Science* **306**: 2216-2221.
Dekas, A.E., Poretsky, R.S., and Orphan, V.J. (2009) Deep-sea archaea fix and share nitrogen in methane-consuming microbial consortia. *Science* **326**: 422-426.
Dhillon, A., Teske, A., Dillon, J., Stahl, D.A., and Sogin, M.L. (2003) Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2765-2772.
Divins, D.L. (2003) Total Sediment Tchickness of the World's Oceans & Marginal Seas. *NOAA National Geophysical Data Center, Boulder CO*.
Durbin, A.M., and Teske, A. (2011) Microbial diversity and stratification of South Pacific abyssal marine sediments. *Environ Microbiol* **13**: 3219-3234.
Fonselius, S., Dyrssen, D., and Yhlen, B. (2007) Determination of hydrogen sulphide. In *Methods of Seawater Analysis*: Wiley-VCH Verlag GmbH, pp. 91-100.
Futagami, T., Morono, Y., Terada, T., Kaksonen, A.H., and Inagaki, F. (2009) Dehalogenation Activities and Distribution of Reductive Dehalogenase Homologous Genes in Marine Subsurface Sediments. *Appl Environ Microbiol* **75**: 6905-6909.
Gadberry, M.D., Malcomber, S.T., Doust, A.N., and Kellogg, E.A. (2005) Primaclade--a flexible tool to find conserved PCR primers across multiple species. *Bioinformatics* **21**: 1263-1264.
Guy, L., and Ettema, T.J.G. (2011) The archaeal TACK superphylum and the origin of eukaryotes. *Trends Microbiol* **19**: 580-587.
Hammer, Ø., DA, T.H., and PD, R. (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* **4**.
He, Z.L., Deng, Y., Van Nostrand, J.D., Tu, Q.C., Xu, M.Y., Hemme, C.L. et al. (2010) GeoChip 3.0 as a high-throughput tool for analyzing microbial community composition, structure and functional activity. *Isme Journal* **4**: 1167-1179.
Inagaki, F., Suzuki, M., Takai, K., Oida, H., Sakamoto, T., Aoki, K. et al. (2003) Microbial communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the Sea of Okhotsk. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 7224-7235.

Inagaki, F., Nunoura, T., Nakagawa, S., Teske, A., Lever, M., Lauer, A. et al. (2006) Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments, on the Pacific Ocean Margin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2815-2820.
Jørgensen, B.B. (2011) Deep subseafloor microbial cells on physiological standby. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 18193-18194.
Jorgensen, S.L., Hannisdal, B., Lanzen, A., Baumberger, T., Flesland, K., Fonseca, R. et al. (2012) Correlating microbial community profiles with geochemical data in highly stratified sediments from the Arctic Mid-Ocean Ridge. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: E2846-2855.
Kallmeyer, J., Pockalny, R., Adhikari, R.R., Smith, D.C., and D'Hondt, S. (2012) Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
Katoh, K., Kuma, K., Toh, H., and Miyata, T. (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research* **33**: 511-518.
Knittel, K., and Boetius, A. (2009) Anaerobic Oxidation of Methane: Progress with an Unknown Process. *Annual Review of Microbiology* **63**: 311-334.
Kubo, K., Lloyd, K.G., J, F.B., Amann, R., Teske, A., and Knittel, K. (2012) Archaea of the Miscellaneous Crenarchaeotal Group are abundant, diverse and widespread in marine sediments. *ISME J*.
Lazar, C.S., L'Haridon, S., Pignet, P., and Toffin, L. (2011) Archaeal populations in hypersaline sediments underlying orange microbial mats in the Napoli mud volcano. *Appl Environ Microbiol* **77**: 3120-3131.
Lazar, C.S., Dinasquet, J., Pignet, P., Prieur, D., and Toffin, L. (2010) Active archaeal communities at cold seep sediments populated by Siboglinidae tubeworms from the Storegga Slide. *Microb Ecol* **60**: 516-527.
Leigh, J.A. (2000) Nitrogen fixation in methanogens: the archaeal perspective. *Curr Issues Mol Biol* **2**: 125-131.
Lipp, J.S., Morono, Y., Inagaki, F., and Hinrichs, K.U. (2008) Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments. *Nature* **454**: 991-994.
Lloyd, K.G., May, M.K., Kevorkian, R., and Steen, A.D. (2013a) Meta analysis of quantification methods shows archaea and bacteria to be similarly abundant in the subseafloor. *Appl Environ Microbiol*.
Lloyd, K.G., Albert, D.B., Biddle, J.F., Chanton, J.P., Pizarro, O., and Teske, A. (2010) Spatial structure and activity of sedimentary microbial communities underlying a Beggiatoa spp. mat in a Gulf of Mexico hydrocarbon seep. *PLoS One* **5**: e8738.
Lloyd, K.G., Schreiber, L., Petersen, D.G., Kjeldsen, K.U., Lever, M.A., Steen, A.D. et al. (2013b) Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins. *Nature*.
Löffler, F.E., Yan, J., Ritalahti, K.M., Adrian, L., Edwards, E.A., Konstantinidis, K.T. et al. (2012) Dehalococcoides mccartyi gen. nov., sp. nov., obligate organohalide-respiring anaerobic bacteria, relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, Dehalococcoidetes classis nov., within the phylum Chloroflexi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
Lomstein, B.A., Langerhuus, A.T., D'Hondt, S., Jorgensen, B.B., and Spivack, A.J. (2012) Endospore abundance, microbial growth and necromass turnover in deep sub-seafloor sediment. *Nature* **484**: 101-104.
Lu, Z.M., He, Z.L., Parisi, V.A., Kang, S., Deng, Y., Van Nostrand, J.D. et al. (2012) GeoChip-Based Analysis of Microbial Functional Gene Diversity in a Landfill Leachate-Contaminated Aquifer. *Environmental Science & Technology* **46**: 5824-5833.
Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar et al. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**: 1363-1371.
Meng, J., Xu, J., Qin, D., He, Y., Xiao, X., and Wang, F. (2013) Genetic and functional properties of uncultivated MCG archaea assessed by metagenome and gene expression analyses. *ISME J*.

Meyerdierks, A., Kube, M., Kostadinov, I., Teeling, H., Glockner, F.O., Reinhardt, R., and Amann, R. (2010) Metagenome and mRNA expression analyses of anaerobic methanotrophic archaea of the ANME-1 group. *Environ Microbiol* **12**: 422-439.
Miller, M.A., Pfeiffer, W., and Schwartz, T. (2011) The CIPRES science gateway: a community resource for phylogenetic analyses. In *Proceedings of the 2011 TeraGrid Conference: Extreme Digital Discovery*. Salt Lake City, Utah: ACM, pp. 1-8.
Morono, Y., Terada, T., Nishizawa, M., Ito, M., Hillion, F., Takahata, N. et al. (2011) Carbon and nitrogen assimilation in deep subseafloor microbial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 18295-18300.
Mussmann, M., Brito, I., Pitcher, A., Sinninghe Damste, J.S., Hatzenpichler, R., Richter, A. et al. (2011) Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express amoA but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 16771-16776.
Newberry, C.J., Webster, G., Cragg, B.A., Parkes, R.J., Weightman, A.J., and Fry, J.C. (2004) Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough, Ocean Drilling Program Leg 190. *Environmental Microbiology* **6**: 274-287.
Orcutt, B.N., Sylvan, J.B., Knab, N.J., and Edwards, K.J. (2011) Microbial ecology of the dark ocean above, at, and below the seafloor. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 361-422.
Orsi, W.D., Edgcomb, V.P., Christman, G.D., and Biddle, J.F. (2013) Gene expression in the deep biosphere. *Nature* **499**: 205-208.
Parkes, R.J., Cragg, B.A., and Wellsbury, P. (2000) Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: A review. *Hydrogeology Journal* **8**: 11-28.
Parkes, R.J., Webster, G., Cragg, B.A., Weightman, A.J., Newberry, C.J., Ferdelman, T.G. et al. (2005) Deep sub-seafloor prokaryotes stimulated at interfaces over geological time. *Nature* **436**: 390-394.
Parkes, R.J., Cragg, B.A., Banning, N., Brock, F., Webster, G., Fry, J.C. et al. (2007) Biogeochemistry and biodiversity of methane cycling in subsurface marine sediments (Skagerrak, Denmark). *Environ Microbiol* **9**: 1146-1161.
Raymond, J., Siefert, J.L., Staples, C.R., and Blankenship, R.E. (2004) The natural history of nitrogen fixation. *Molecular Biology and Evolution* **21**: 541-554.
Roussel, E.G., Bonavita, M.A., Querellou, J., Cragg, B.A., Webster, G., Prieur, D., and Parkes, R.J. (2008) Extending the sub-sea-floor biosphere. *Science* **320**: 1046.
Roy, R. (2010) Short-term variability in halocarbons in relation to phytoplankton pigments in coastal waters of the central eastern Arabian Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **88**: 311-321.
Russ, L., Kartal, B., Op Den Camp, H.J.M., Sollai, M., Le Bruchec, J., Caprais, J.-C. et al. (2013) Presence and diversity of anammox bacteria in cold hydrocarbon-rich seeps and hydrothermal vent sediments of the Guaymas Basin. *Frontiers in Microbiology* **4**.
Sarradin, P.-M., and Caprais, J.-C. (1996) Analysis of dissolved gases by headspace sampling gas chromatography with column and detector switching. Preliminary results. *Analytical Communications* **33**.
Schippers, A., Neretin, L.N., Kallmeyer, J., Ferdelman, T.G., Cragg, B.A., Parkes, R.J., and Jorgensen, B.B. (2005) Prokaryotic cells of the deep sub-seafloor biosphere identified as living bacteria. *Nature* **433**: 861-864.
Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B. et al. (2009) Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* **75**: 7537-7541.
Simoneit, B.R.T., Lonsdale, P.F., Edmond, J.M., and Shanks, W.C. (1990) Deep-Water Hydrocarbon Seeps in Guaymas Basin, Gulf of California. *Applied Geochemistry* **5**: 41-49.
Simoneit, B.R.T., Mazurek, M.A., Brenner, S., Crisp, P.T., and Kaplan, I.R. (1979) Organic geochemistry of recent sediments from Guaymas Basin, Gulf of California. *Deep Sea Research Part A Oceanographic Research Papers* **26**: 879-891.
Sowers, K.R., and Ferry, J.G. (1983) Isolation and Characterization of a Methylotrophic Marine Methanogen, Methanococcoides methylutens gen. nov., sp. nov. *Appl Environ Microbiol* **45**: 684-690.

Stamatakis, A. (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**: 2688-2690.
Teske, A., and Sorensen, K.B. (2008) Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? *Isme Journal* **2**: 3-18.
Teske, A., Hinrichs, K.U., Edgcomb, V., Gomez, A.D., Kysela, D., Sylva, S.P. et al. (2002) Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: Evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1994-2007.
Vetriani, C., Tran, H.V., and Kerkhof, L.J. (2003) Fingerprinting microbial assemblages from the oxic/anoxic chemocline of the Black Sea. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6481-6488.
Vigneron, A., Cruaud, P., Pignet, P., Caprais, J.-C., Cambon-Bonavita, M.-A., Godfroy, A., and Toffin, L. (2013) Archaeal and anaerobic methane oxidizer communities in the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin (Gulf of California). *ISME J*.
Webster, G., Parkes, R.J., Fry, J.C., and Weightman, A.J. (2004) Widespread occurrence of a novel division of bacteria identified by 16S rRNA gene sequences originally found in deep marine Sediments. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5708-5713.
Zhou, J. (2009) GeoChip: A high throughput genomics technology for characterizing microbial functional community structure. *Phytopathology* **99**: S164-S164.
Zhou, J., Bruns, M.A., and Tiedje, J.M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* **62**: 316-322.

Legends for Tables and Figures

Figure 1 : Geochemical description of the sediment core BCK1. 1a) Dissolved methane (grey square, µM), sulfate (white circle, mM) and sulfide (grey cross, mM) concentrations in porewaters. 1b) Dissolved ammonium concentrations (µM) in porewaters and 1c) Total organic carbon (TOC) content in the sediment (% w/w).

Figure 2 : Phylogenetic affiliations of a) bacterial and b) archaeal 16S rRNA-derived sequences at different depths for BCK1 sediment core. TMEG, Terrestrial Miscellaneous Euryarcheotal Group; MBGD/B, Marine Benthic Group D/B; MG I, Marine Group I; MCG, Miscellaneous Crenarchaeotic Group; MHVG, Marine Hydrothermal Vent Group; Hua1, Huasco archaeal group 1; DHVE3, Deep-Sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotal Group 3; SAGMEG, South Africa Gold Mine Euryarchaeotal Group.

Figure 3 : Q-PCR estimation of 16S rRNA gene copy numbers per gram of sediment for a) total *Archaea* and archaeal groups of Marine Benthic Group B (MBGB), D (MBGD), Miscellaneous Crenarchaeotal Group (MCG) and b) total *Bacteria* and bacterial groups of *Chloroflexi*, candidate division JS1, from BCK1 sediment core. Methanosarcinales were only detected at 1 mbsf with 2.4×10^6 16S rRNA gene copies g^{-1} but were not represented in the figure. ANaerobic MEthanotrophs (ANME), *Desulfosarcina*/*Desulfococcus (*DSS), *Desulfobulbus* (DBB) and other methanogens orders were not detected in analyzed samples.

Figure 4 : Carbon-cycling metabolic pathways identified for a) *Bacteria* and b) Archaeal *Euryarchaeota* and *Crenarchaeota*-related lineages at different depths for BCK1 sediment core. Relative signal intensity was normalized by the number of the probes for each indicated metabolic pathway. List of targeted genes for each category are provided in supplementary material.

Figure 5 : Nitrogen-cycling metabolic pathways identified at different depths for BCK1 sediment cores. Bacterial metabolic pathways are indicated in green while *Euryarchaeota* and *Crenarchaeota*-related pathways are in blue and red respectively. Relative signal intensity was normalized by the number of the probes for each indicated metabolic pathway. List of targeted genes for each category are provided in supplementary data.

Figure 1

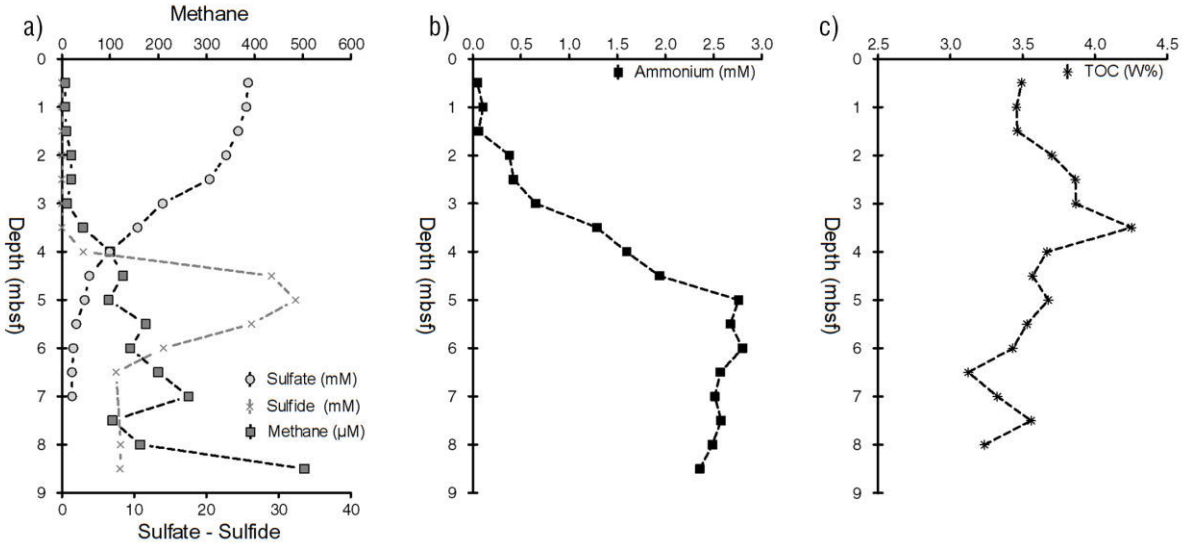


Figure 2

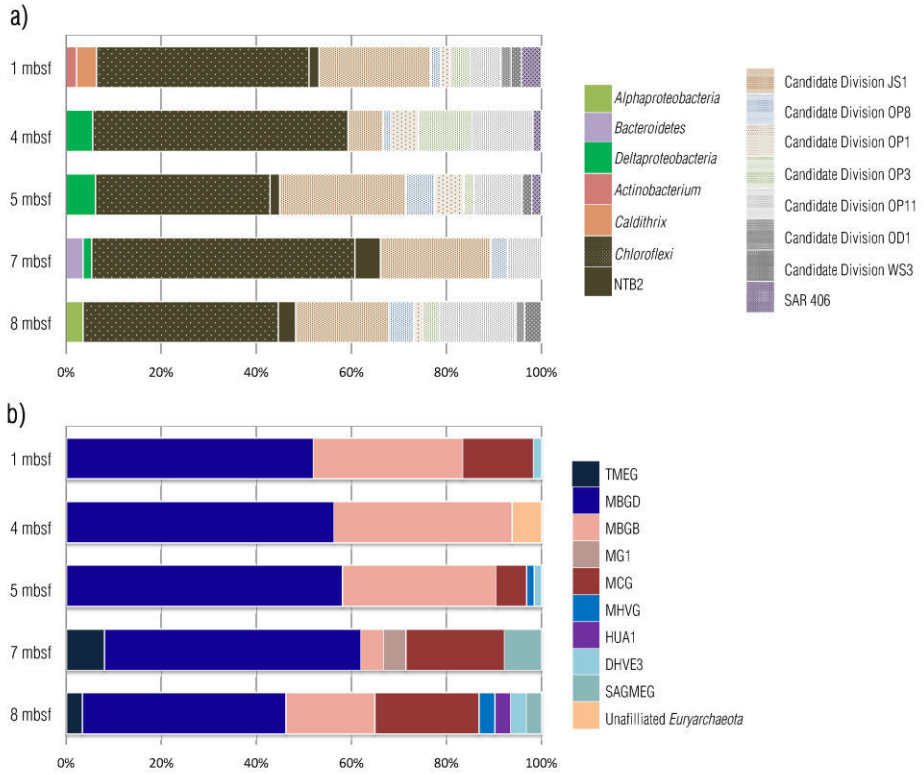


Figure 3

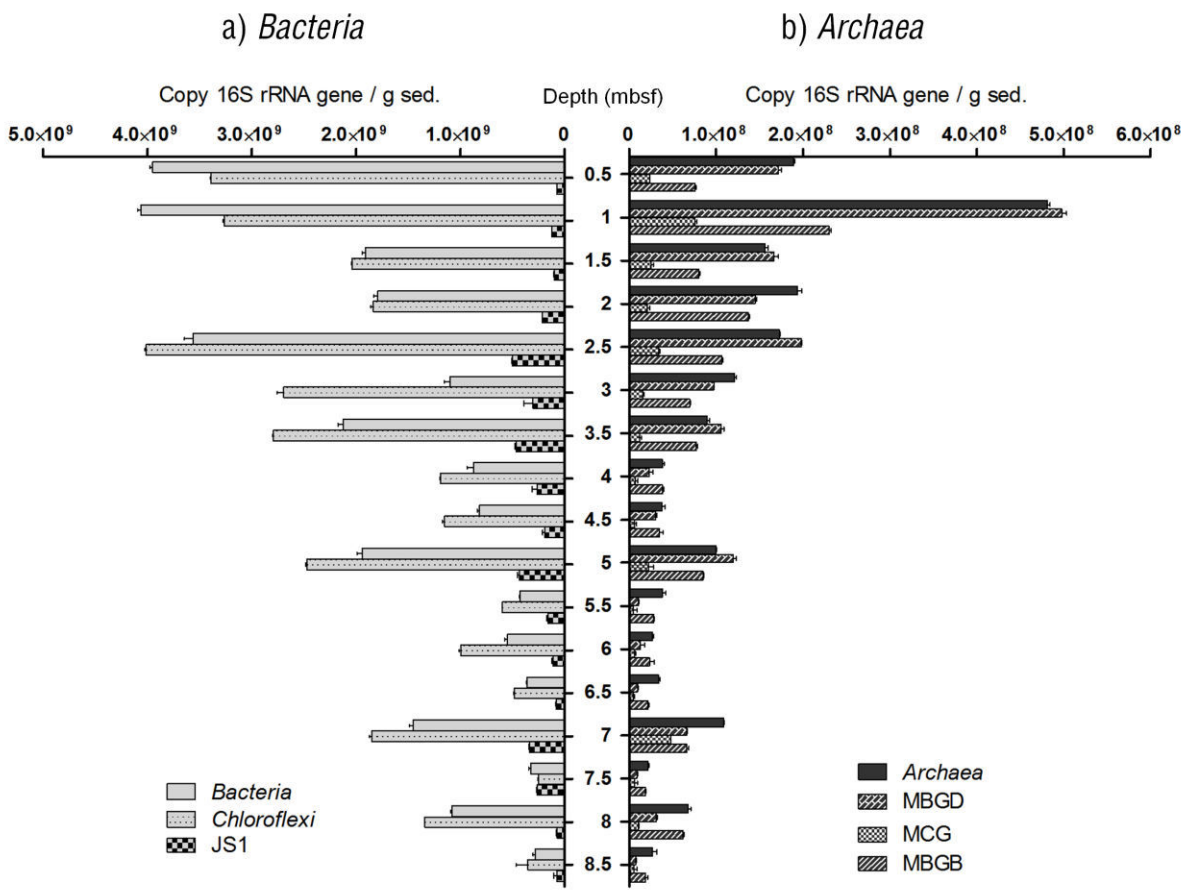


Figure 4

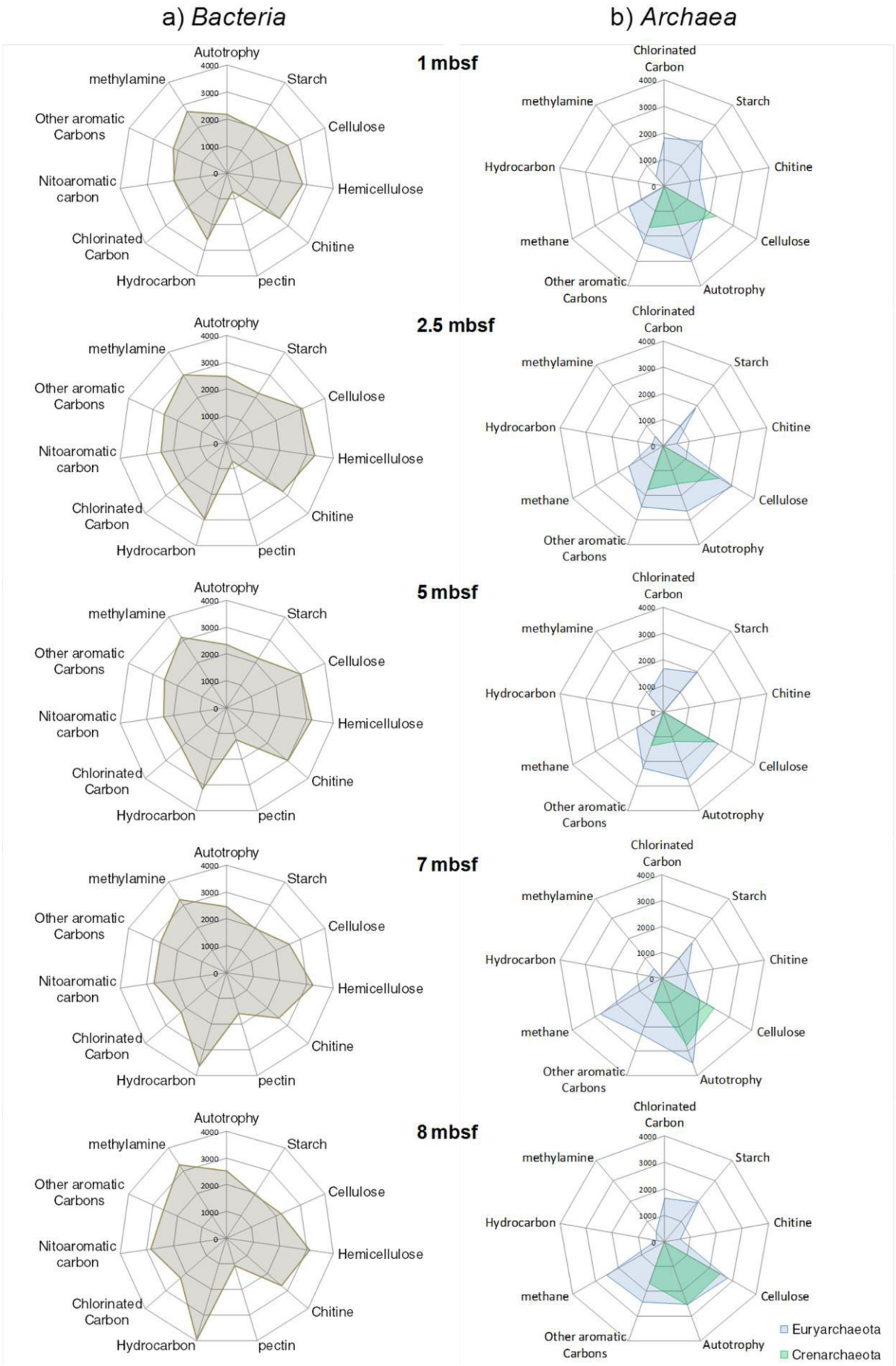
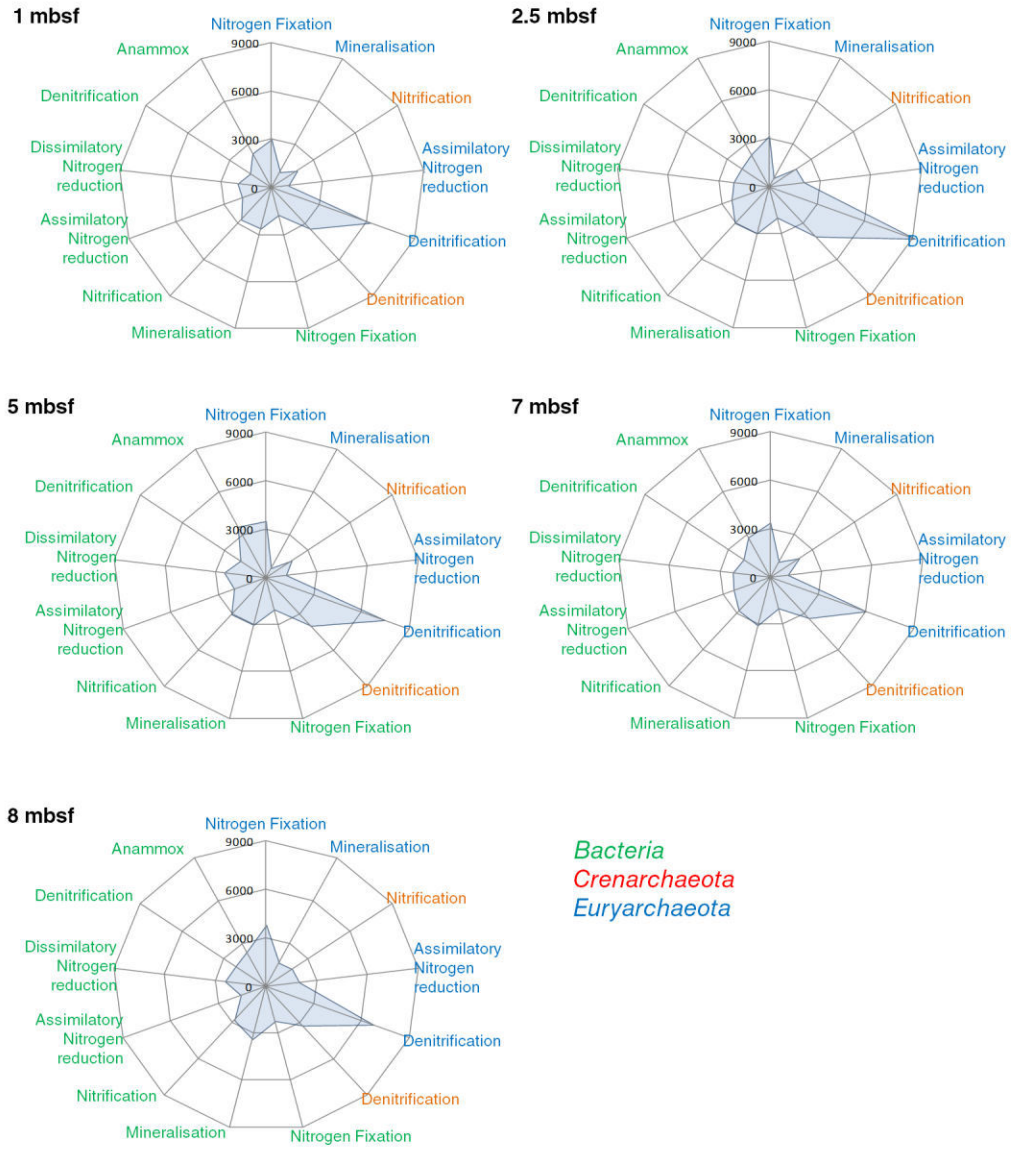

a) Bacteria
b) Archaea
1 mbsf
2.5 mbsf
5 mbsf
7 mbsf
8 mbsf
Autotrophy
Starch
Cellulose
Hemicellulose
Chitine
pectin
Hydrocarbon
Chlorinated Carbon
Nitoaromatic carbon
Other aromatic Carbons
methylamine
Chlorinated Carbon
Starch
Chitine
Cellulose
Autotrophy
Other aromatic Carbons
methane
Hydrocarbon
methylamine
4000
3000
2000
1000
0
Euryarchaeota
Crenarchaeota

Figure 5


1 mbsf
2.5 mbsf
5 mbsf
7 mbsf
8 mbsf
Nitrogen Fixation
Mineralisation
Nitrification
Assimilatory Nitrogen reduction
Denitrification
Denitrification
Nitrogen Fixation
Mineralisation
Nitrification
Assimilatory Nitrogen reduction
Dissimilatory Nitrogen reduction
Denitrification
Anammox
9000
6000
3000
0
Bacteria
Crenarchaeota
Euryarchaeota

Remerciements

Et voilà, le point final est posé. Il vient clore trois années de vie jalonnées de réussites, d'échecs, de tristesse et de joies… Il est maintenant temps de me prêter au jeu des remerciements…

Je tiens tout d'abord à remercier Anne Godfroy, directrice du laboratoire et directrice de thèse, pour m'avoir permis de réaliser ce travail au Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes. Merci aussi de m'avoir donné l'opportunité de participer à deux campagnes océanographiques, de m'avoir fait découvrir le monde fabuleux des fonds marins, de m'avoir fait évoluer sur ma vision des rapports humains et de m'avoir accordé sa confiance tout au long de ma thèse. Je tiens également à faire part de ma reconnaissance à Marie-Anne Cambon-Bonavita, directrice de thèse, pour avoir toujours été là dans les moments difficiles, pour m'avoir soutenu et appris tant de choses sur la biologie moléculaire et le FISH.

Je remercie également tous les membres de mon jury de thèse, les rapporteurs Pierre Galand et Roberto Geremia ainsi que les examinateurs Thierry Nadalig, Gwenaelle Le Blay et Vianney Pichereau pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Revenons maintenant au tout début, quand tout a commencé… (Attention, certains points sont à prendre au second degré alors, on (désolé Christine) garde le sourire, tous les noms qui figurent ici sont les noms des gens qui ont participé, de près ou de loin, à rendre ma thèse telle qu'elle est aujourd'hui et que je tiens sincèrement à remercier. En plus, au bout de 339 pages d'écriture, avec beaucoup de photos, certes, je fatigue un peu…). Si je suis là aujourd'hui, à écrire ces lignes, c'est un peu grâce à Mathieu, alors il faut quand même que je lui exprime toute ma gratitude ! Il y a quatre ans, lorsque je suis venue pour la première fois à Brest, c'était pour mon stage de Master 2 sur la fameuse crevette *Rimicaris exoculata*, qui était alors son sujet de thèse. C'est un peu lui qui m'a permis d'entrer dans ce monde merveilleux, de connaître le laboratoire, de faire mes premiers pas en biologie moléculaire… C'est en partie grâce à ses bons conseils et son bon encadrement que j'ai pris la décision de faire une thèse ici. Merci d'avoir supporté toutes mes questions et merci de m'avoir soutenue et accompagnée. Merci aussi à Sarah d'avoir été là et de m'avoir donné tous ses bons conseils sur le pyroséquençage et merci à la petite Elsa, sans son arrivée je ne serais peut-être jamais partie sur un bateau au mois de février 2011 ! Quand j'ai commencé mon stage, Mathieu m'a fait faire un tour des bureaux pour me présenter à tout le monde. Il y a d'abord eu Christine, qui aura bien mis 4 (pardon quatre sinon cela bloque la lecture…) bonnes années à retenir mon nom. En tous cas, ton nom, je le retiendrais bien moi, sois en sûr ! Je te remercie très chaleureusement d'avoir toujours été là, pour m'aider, pour m'apprendre à écrire, pour me dire que mes posters étaient laids (non je rigole…), pour avoir bu des litres et des litres de café avec moi à tomber malade par le froid glacial de la Bretagne ! Merci d'avoir été là jusqu'au bout (enfin je compte sur toi pour la soutenance hein !) et de m'avoir remonté le moral même quand tu étais à des milliers de kilomètres ! Venait après le bureau de Josiane et de Valérie. Merci à toutes les deux pour votre gentillesse. Josiane, je te remercie d'avoir toujours remis mes petits objets « PC » sur ma paillasse, tu n'en verras plus maintenant (sauf si quelqu'un décide de faire perdurer le mythe…tiens moi au courant !)… Garde ton sourire et le moral, le vent tournera ! Valérie, merci pour ta sympathie, toute l'aide que tu m'as apportée et ton soutien dans les moments difficiles (merci aussi à Nico pour les saucisses rougailles improvisées et tout le reste). Nous arrivons maintenant au bureau de « ceux qui ont le labo vue mer »… Ghislaine, Didier, Pierre-François, Audrey, merci pour votre bonne humeur ! Ghislaine, il faut vraiment que je te rapporte la recette de la tourte à la mimolette que tu m'as demandé il y a trois ans, j'y pense ne t'inquiètes pas… Didier merci pour les commandes d'oligos et merci d'avoir gérer ma venue sur le centre à la fin de mon contrat ! Audrey, merci pour les petites pauses café terrasse qui m'ont bien aérée en fin de thèse ! Ensuite arrivait le bureau de Laurent et Stéphane, retour sur la microbio avec l'équipe « Marges ». Merci à Stéphane pour sa joie de vivre et ses questions pertinentes. Merci à Laurent pour m'avoir

écouté et conseillé quand j'en avais besoin, merci pour tous ces déjeuners à la cantine de l'Ifremer animés de discussions acharnées sur la politique française (non mais si elle est jolie quand même J. Gayet), la mode (les skylanders, c'est trop bien… mais c'est un peu l'arnaque, ils sont doués quand même !) et j'en passe et des meilleures ! Après cela (et après le bureau de Marie-Anne, dont j'ai déjà parlé, merci encore pour tout), le bureau d'Adrien et de Marie. Adrien, merci pour tous ces kilomètres, miles, mètres de dénivelé et aventures parcourus ensemble (à charge de revanche, mais bon quand même, j'y serais jamais arrivée sans toi… merci). Marie R., toutes mes félicitations pour avoir supporté Adrien dans ton bureau (non je plaisante… enfin si quand même un peu), merci pour ta bonne humeur. On passait ensuite aux présentations de Françoise et Nolwenn. Françoise qui m'aura accompagné dans mes premières manips et dans mes premières campagnes, cela m'a beaucoup aidé et j'ai apprécié partagé cela avec toi, merci. Nolwenn, merci pour ton dévouement au travail, pour m'avoir aidé à sauver un échantillon d'un mauvais tube et m'avoir accompagné à la clinique voir l'horrible patient à la patte cassée ! Après cela, le bureau de Patricia et du « roi des moules », mystérieux être légendaire… Merci à Patricia pour son franc parlé et pour avoir fait toutes les nombreuses analyses des eaux interstitielles de ma thèse ! Quant au « roi des moules »… absent le jour de mon arrivée, Mathieu et Adrien auront construit un mythe autour de toi durant ton absence… Je me souviendrais toute ma vie du gâteau écrasé, du téléphone raccroché, des nombreuses pommes ouvertes, des mandarines dans les verres d'eau et de toutes ces choses qui m'auront traumatisées, mais aussi des bonnes choses comme… ah bah non y en n'a pas…gardes la pêche, t'es un mec SALE^3 !!!! (faut que je te rendes ton vinyle, j'ai encore oublié… je dois aussi avoir des jeux game boy à toi…). Enfin, au bout du couloir, le bureau de Sébastien (et puis ensuite le labo vue mer…). Merci à toi pour tes conseils et tous ces déjeuners à la cantine de l'Ifremer ! Et voilà pour le premier tour du labo ! A l'époque, nous étions dans les algecos (là où je finirais plus tard ma thèse et où je suis en train d'écrire ces quelques lignes… déjà une page…impressionnant !) avec Mathieu. Il y avait aussi notre voisine, Cyrielle, qui travaillait également sur *Rimicaris*. Merci pour ta sympathie. Et puis de temps en temps, Benjamin nous rejoignait dans notre bureau (Ca te dérange pas si je te pique ton ordi ? …Euh bah non, fait comme chez toi…). Un énorme merci à Angélique et à toi pour tout ce que vous avez fait pour moi, pour toujours avoir été là pour me remonter le moral et pour, souvent, tous nous supporter à votre table ! (il faut vraiment que je vienne voir ton bougainvillier…). Et puis un grand merci à une personne qui était sur le départ lors de mon arrivée, mais qui est revenue parmi nous un petit peu plus tard pour mon plus grand bonheur : Lucile ! Merci à toi, pour ton aide, tes conseils, ta gentillesse, ta bonne humeur, toutes tes questions, critiques, ton perfectionnisme, tes remises en questions, histoires drôles, ton rire (les mignons, les mignons !!) et pour m'avoir secoué le cerveau quand j'en avais besoin, ne changes surtout pas !

Voilà, c'est avec toutes ces personnes que j'ai commencé à faire ma petite vie au LMEE ! Et puis certaines personnes sont arrivées plus tard au laboratoire… Mon ptit Gayot déjà ! Arrivé quelques jours après (ou avant, enfin en mars 2010 en tous cas) au LEP. Ah mon ptit gayot, qu'est ce qu'on en a passé des bons moments ensemble… le foie gras sur le bateau (ah non t'étais pas là désolé, n'empêche, il était bon quand même ce foie gras…). En tous cas, je te remercie chaleureusement de tout ce que tu auras fait pour moi, que ça soit au labo, dans ma vie perso ou sur le bateau (quelle poète…oui ça fait des rimes !). Merci d'être comme tu es (enfin pas trop quand même), tu me manqueras… (enfin avant, j'attends le repas de noël et la crémaillère hein !). Ensuite, Aline, d'abord en stage, en même temps que le mien puis technicienne bioch. Merci pour ta gentillesse et pour nous avoir si talentueusement et rapidement appris la deuxième choré (faut dire que les élèves étaient très douées, tu n'as pas beaucoup de mérite finalement !!). J'espère que tu retiendras debout d'ici la soutenance, je compte sur toi pour faire la fête ! Et puis, ma partenaire de thèse, Céline, je n'oublierais jamais tout les excellents moments que nous avons passé toutes les deux, ton rire, ta tristesse, tes

explosions de joies, je n'aurais jamais cru vivre de si belles choses… Et puis arrive la première campagne en mer… Départ pour le Gabon avec Françoise et Anne, et tous pleins de biologistes quasiment inconnus pour moi… L'occasion de faire de très belles rencontres qui auront pas mal modifiées le cours de ma thèse ! Merci à Karine de m'avoir fait découvrir les campagnes en mer et la passion de la Sciences. Merci à Sébastien pour ses grandes discussions passionnantes sur le pont arrière du Pp ? Merci à Olivier pour nos discussions qui m'auront beaucoup appris et pour m'avoir appris à pêcher le calamar ! Merci à Carole d'avoir été un peu ma tutrice pendant cette campagne et la suivante, merci pour ta gentillesse et ton aide sur les vésicomyidés. Merci à Jean-Claude, Alexis et Richard pour les discussions, scientifiques ou pas, pour les quarts ROV en leurs compagnies et les manips autour de ma thèse. Merci aussi à Sophie pour sa bonne humeur et son soutien pour les vésicomyidés ! Merci à tous les autres qui auront partagé cette campagne avec moi et qui auront participé à la rendre si extraordinaire ! Merci aussi à tout l'équipage et aux marins, qui m'auront tant appris sur un monde que je ne connaissais pas du tout (notamment Julien, merci pour tout).

Et me voilà de retour à terre en février 2011, l'occasion de découvrir de nouvelles têtes et pas des moindres. Marine déjà (il est 15h07 à l'heure où j'écris ces mots, plus que 23 minutes et je viens te chercher pour le café… délivrance !!!!), qui a commencé sa thèse sous la neige de Bretagne ! Sans te connaître tu auras un peu changé ma vie (oui enfin aider à changer, te sens pas non plus responsable de tout hein !!). Merci pour ton sourire, ton excellente humeur (décidemment tout le monde est d'excellent humeur dans ce labo !), les poses café-terrasse, et les joggings du mercredi midi (bon une fois, ça compte quand même non ?). Gardes courage pour la rédaction, t'en verras bientôt le bout (ou pas !) ! J'en profite pour remercier également Sophie pour sa joie de vivre et Christophe pour sa sympathie ! Il y a aussi eu Marie P., qui est arrivée en stage sur BIG et qui n'arrêtait pas de poser des questions improbables auxquelles on ne sait pas répondre (et les bactéries que tu as dans les sédiments, elles consomment quoi exactement ?…euh…). Merci pour ta bonne humeur, ton intérêt pour la science et j'espère qu'on pourra travailler ensemble sur nos perspectives BIG d'ici peu !

Nous voilà maintenant arrivés à la deuxième campagne. Et là, je tiens à remercier mon extraordinaire partenaire de cabine, Manuella, j'ai vraiment passé des moments formidables et très forts avec toi et je te remercie pour toutes ces discussions, confidences et ce foie gras (hahaha…) qu'on aura partagé toutes les deux, que ce soit à bord ou à terre ! Promis, bientôt je descends à Nantes ! Merci aussi à toutes les autres personnes qui auront partagé cette mission de noël avec moi et notamment Nico, Olivier et Romain.

Et la roue tourne, de nouveaux thésards arrivent… Sandrine, qui aura partagée mon bureau durant presqu'un an. Merci pour ta gentillesse et ta bienveillance et merci de m'avoir toujours tirer vers l'avant. Nos discussions sur le séquençage haut-débit m'auront beaucoup aidé ! J'espère que tu prendras autant de plaisirs que moi à traiter toutes tes nouvelles données ! J'ai beaucoup aimé partager mon bureau avec toi, gardes courage, je suis sûre que pleins de belles choses t'attendent, les lobes du Congo ont l'air de cacher mille et une choses plus intéressantes les unes que les autres… Merci aussi à Gaëlle pour sa gentillesse ! Merci à Maria pour tous ses conseils et ses amorces de pyroséquençage ! Merci aussi pour le déménagement mémorable (mais si ça tient dans une remorque ! Pas la peine de démonter les meubles !...) que vous nous aurez offert et pour ta bonne humeur et ton côté toujours hyper positif, maintenant que j'ai fini le manuscrit, promis je donne des nouvelles plus souvent ! Et puis les petits derniers, Simon, merci d'avoir supporté Lucile avec autant de calme (Méli-mélo il est trop beau !). En espérant que la campagne en mer est été une aussi bonne expérience pour toi que pour moi, je te souhaite pleins de bonnes choses pour la suite ! Erwan, je suis très heureuse d'avoir pu te connaître pendant ma thèse, j'ai beaucoup apprécié nos discussions (longues, mais c'est parce que t'es trop bavard… bon avec toi, je précise parce que sinon tu vas le prendre mal : je plaisante !!!!!), et

j’espère que nous garderons le contact par la suite ! Et enfin Vincent, qui aura supporter mon dernier mois de thèse, rédaction de manuscrit, en pensant à tous les autres travailleurs en plein milieu d’un océan Atlantique très agité ! Bon traitement de séquences !

Et à tous les autres qui auront rendu cette thèse agréable, Mathieu (Oui, oui c’est bon, je viendrais plus après 9h30 et je partirais avant 20h30… tiens au fait y a des moustiques qui tombent du plafond…), B2O (tu ferais mieux de baisser la tête), les Philippes, Jean-Pierre, Laurence (pour toutes ces petites pauses de 17h30, promis je baisse le chauffage… ah bah non je suis malade maintenant, courage pour l’opération), à tous les membres de l’autres côté de la barrière (oh aller, on vous aime quand même !! et le bon fromage de Clermont-Ferrand !), Ronan, Elsa (merci de supporter Nico…), Alexandra, Céline et toute l’équipe de Genostar (merci pour votre très bon accueil).

Enfin, merci à toute ma famille, pour avoir toujours été là. Merci à ma très très chère sœur Astrid, sans qui je ne serais rien de ce que je suis aujourd’hui… Merci de m’avoir toujours montré le bon chemin et de continuer à être à mes côtés (et merci à Jean-Yves aussi pour son aide !). Merci à ma mère pour avoir toujours été là et de toujours s’inquiéter pour moi. Merci à mon père d’avoir supporté mes rares coups de fils (désolé, j’appellerais maintenant) et de m’avoir toujours remonté le moral dans les moments difficiles. Merci à Mami Odette d’avoir toujours été si gentille et compréhensive avec moi (une grosse pensée aussi pour toi Papi Pierre). Merci aussi à Sonia et à Monique pour avoir supporter mes longues périodes de rédaction difficiles… Merci aussi à Jacqueline, Pascal, Céline (et toute sa ptite famille), Florian, Spouki, Pamplemousse… Merci enfin à mes deux grands parents Mami Colette et Papi Marcel, qui s’en sont tous les deux allés pendant ma thèse. Merci pour tous ce que vous avez fait pour moi, je ne l’oublierais jamais.

Résumé

Au niveau des fonds océaniques, souvent considérés comme des déserts aux conditions de vie extrêmes, des oasis luxuriants de vie existent pourtant. Les sources hydrothermales et les suintements froids, principalement localisés au niveau des dorsales océaniques et des marges continentales, vont permettre le développement de communautés microbiennes et animales très particulières. Le Bassin de Guaymas, situé dans le Golfe de Californie (Mexique) présente la particularité de regrouper à la fois une zone de sources hydrothermales et une zone de suintements froids, situées à une soixantaine de kilomètres l'une de l'autre, et toutes deux recouvertes par une épaisse couche sédimentaire. Ces deux zones sont également colonisées par des étendues de bivalves, des buissons de vers tubicoles ainsi que de tapis microbiens blancs ou colorés comparables.

Afin de mieux comprendre le fonctionnement global de ces deux types d'écosystèmes et notamment le rôle structurant des communautés microbiennes sédimentaires sur la répartition des différents assemblages de surface, les travaux entrepris dans cette thèse se proposaient d'étudier les communautés microbiennes sédimentaires associés à la zone de suintements froids (Marge de Sonora) et la zone de sources hydrothermales (Southern Trough) du Bassin de Guaymas. Pour cela, la diversité des communautés microbiennes (*Bacteria* et *Archaea*) de différents habitats caractérisés par une faune et des profils géochimiques particuliers, a été étudiée grâce à l'utilisation d'une technique de séquençage haut-débit, le pyroséquençage par la technique du 454, combinée à d'autres techniques comme le FISH ou la PCR quantitative.

Cette étude a permis de déterminer que la structure et la diversité des communautés microbiennes dans ces sédiments étaient très spécifiques de ces environnements. Par ailleurs, les colonisateurs présents en surface des sédiments reflétaient des profils géochimiques et des communautés microbiennes très différentes au sein des sédiments. Dans les sédiments colonisés par les tapis microbiens, riches en méthane, les communautés microbiennes dominantes (ANME, *Deltaproteobacteria*…) utiliseraient notamment les émissions de méthane des couches sédimentaires profondes et produiraient d'importantes concentrations de sulfures, nécessaires à l'installation des communautés microbiennes thiotrophes de surface formant les tapis. Ces fortes concentrations en sulfure excluraient en revanche les communautés animales de ce périmètre. *A contrario,* dans les sédiments présentant de faibles concentrations en méthane et en sulfure, permettant l'installation d'assemblages faunistiques variés, les communautés microbiennes méthanotrophes anaérobies et productrices de sulfure étaient minoritaires. L'activité et le métabolisme de ces colonisateurs de surface pourraient par ailleurs permettre le développement des lignées microbiennes détectées dans ces habitats (MBG-D, Chloroflexi…). L'analyse des larges jeux de donnés obtenus au cours de cette étude nous a donc permis de mettre en évidence un système dynamique complexe fonctionnant en équilibre entre les communautés microbiennes sédimentaires, les organismes colonisant la surface du sédiment et la composition géochimique des eaux interstitielles.

Mots clefs : Bassin de Guaymas, suintements froids, sources hydrothermales, communautés microbiennes sédimentaires, colonisateurs de surface, pyroséquençage, Q-PCR, FISH