



HAL
open science

Dynamique spatiale et temporelle des communautés microbiennes dans les édifices hydrothermaux actifs

David François

► **To cite this version:**

David François. Dynamique spatiale et temporelle des communautés microbiennes dans les édifices hydrothermaux actifs. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2021. Français. NNT : 2021BRES0021 . tel-03609599

HAL Id: tel-03609599

<https://theses.hal.science/tel-03609599v1>

Submitted on 15 Mar 2022

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ECOLE DOCTORALE N° 598
Sciences de la Mer et du littoral
Spécialité : Microbiologie

Par

David FRANÇOIS

Dynamique spatiale et temporelle des communautés microbiennes dans les édifices hydrothermaux actifs

Thèse présentée et soutenue à Plouzané, le 17/03/2021

Unité de recherche : Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (UMR6197)

Rapporteurs avant soutenance :

James F. HOLDEN, Professor, University of
Massachusetts, Amherst, USA

François GUYOT, Professeur, MNHN Paris

Composition du Jury :

James F. HOLDEN
Professor, U. Massachusetts, Amherst, USA

François GUYOT
Professeur, MNHN Paris

Céline ROMMEVAUX
Chargée de recherche, CNRS Marseille

Patricia BONIN
Directrice de recherche, CNRS Marseille

Mohamed JEBBAR (Président du jury)
Professeur, U. Bretagne Occidentale, Brest

Anne GODFROY (Directrice de thèse)
Cadre de recherche, Ifremer Plouzané



Remerciements

Beaucoup de personnes méritent ma gratitude pour m'avoir aidé, encadré, conseillé ou soutenu pendant ma thèse. Grâce à vous tous j'ai pu passer ces trois années dans les meilleures conditions, malgré les péripéties que l'on rencontre dans toute thèse qui se respecte.

Bien sûr, en premier, merci à Anne qui m'a encadré depuis mon stage de Master 2, pour sa disponibilité constante et sa confiance à toute épreuve. Merci à Erwan, qui mérite le titre de « co-encadrant de l'ombre ».

Mon aventure au LM2E n'a pas commencé au début de ma thèse, mais presque deux ans plus tôt. Je tiens donc à remercier Marie-Anne, Valérie et Vincent grâce à qui j'ai pu faire mes premiers pas dans la recherche durant mon stage de Master 1.

Merci également à tous les membres du laboratoire, qui m'ont accueilli chaleureusement. Parmi eux je remercie les membres de la célèbre Team K-You, les doctorants (les « vieux » que j'ai croisés à mes débuts, mes contemporains, et les jeun's), les collègues qui m'ont aidé à la paillasse ou avec leurs précieux conseils : Françoise, Xavier, Sébastien, Elodie, Clémentine, Johanne, Stéphane, Lourdes, et ceux que j'oublie sûrement. Merci à Christine, Annaïg, Christel et Anne-Laure pour leur aide dans les dédales administratifs des laboratoires.

Je tiens à remercier les collègues des autres laboratoires avec qui j'ai eu la chance de collaborer : Ewan, Sandrine, Cécile et Christophe. Merci aussi aux personnes que j'ai rencontrées durant les deux campagnes Momarsat, pour la pêche en haute-mer et les barbecues (et la science quand-même).

Un grand merci à ma famille et à Charlotte qui me soutiennent depuis le début de ma thèse, ainsi que dans tous mes projets. Je remercie aussi les personnes (et animaux) qu'on m'ont soutenu pendant la rédaction : mes deux toutous qui m'ont apporté leurs jouets en pensant que je m'ennuyais devant mon écran, Queen pour l'ambiance, et les courageux skippers virtuels du Vendée Globe (surtout ceux qui sont arrivés après moi).

Finally, I would like to thank the members of my thesis committee who gave me the benefit of their experience to successfully complete my project, and the members of the jury who agreed to evaluate my work.

Valorisation des travaux

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont été valorisés lors de présentations orales et dans un article publié dans la revue *Systematic and Applied Microbiology* :

➤ Présentations orales

Temporal dynamics of microbial communities in hydrothermal vents : first insights into colonization processes

David François, Françoise Lesongeur, Sandrine Cheron, Ewan Pelleter, Erwan Roussel, Anne Godfroy - *Journées du GDR Archaea, 17-19 octobre 2018, Plouzané, France*

Dynamique spatiale et temporelle des communautés microbiennes dans les édifices hydrothermaux actifs

David François, Françoise Lesongeur, Sandrine Cheron, Ewan Pelleter, Erwan Roussel, Anne Godfroy - *IX^{ème} colloque de l'AFEM, 5-8 novembre 2019, Bussang, France*

➤ Publication

Persephonella atlantica sp. nov.: How to adapt to physico-chemical gradients in high temperature hydrothermal habitats

David X. François, Anne Godfroy, Clémentine Mathien, Johanne Aubé, Cécile Cathalot, Françoise Lesongeur, Stéphane L'Haridon, Xavier Philippon, Erwan G. Roussel

Systematic and Applied Microbiology - accepté le 18/12/2020

Table des matières

CHAPITRE I - SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	11
1) SYSTEMES HYDROTHERMAUX Océaniques PROFONDS	11
1) <i>Les dorsales océaniques</i>	11
2) <i>Formation du fluide hydrothermal</i>	13
3) <i>Les cheminées hydrothermales</i>	15
1) Généralités sur les cheminées hydrothermales	15
2) Formation des cheminées de type fumeur noir	17
3) Influence du substrat rocheux	20
4) Le gradient hydrothermal, base d'un écosystème	21
5) La faune hydrothermale	24
2) MICROBIOLOGIE DES ECOSYSTEMES HYDROTHERMAUX	26
1) <i>Diversité phylogénétique et physiologique</i>	26
1) Diversité des <i>Bacteria</i> cultivées	26
2) Diversité des <i>Archaea</i> cultivées	28
3) Lignées de microorganismes incultivés	29
4) Adaptation aux conditions de fortes pression et température	32
2) <i>Diversité métabolique</i>	33
1) Présentation des différents types métaboliques	33
2) Les cycles biogéochimiques	40
3) Un exemple d'adaptation métabolique et physiologique : les <i>Aquificota</i> et le genre <i>Persephonella</i>	50
3) ETUDE DES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES DES ECOSYSTEMES HYDROTHERMAUX	52
1) <i>Méthodes in situ et méthodes culturales</i>	52
1) Colonisateurs <i>in situ</i>	52
2) Méthodes culturales	57
2) <i>Etudes moléculaires</i>	61
3) <i>Interactions entre les microorganismes et leur environnement</i>	67
1) Influence de l'environnement sur les communautés microbiennes	67
2) Interactions entre les microorganismes et les minéraux	75
CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	78
4) CONTEXT AND OBJECTIVES OF THE STUDY	83

CHAPITRE II - MATÉRIEL ET MÉTHODES

87

1) SITES D'ÉTUDE	87
1) <i>Ride médio-Atlantique</i>	87
2) <i>Le champ hydrothermal Lucky Strike</i>	88
3) <i>L'observatoire EMSO-Açores</i>	92
2) PRÉLEVEMENT DES ÉCHANTILLONS	94
1) <i>Campagnes océanographiques</i>	94
2) <i>Prélèvement des échantillons</i>	95
1) Échantillons de cheminées hydrothermales et de panache proximal	95
2) Échantillons de panache hydrothermal proximal dans le gradient thermique	97
3) <i>Conditionnement des échantillons</i>	101

3)	CARACTERISATION MINERALOGIQUE DES ECHANTILLONS DE CHEMINEES HYDROTHERMALES	102
1)	<i>Analyse par diffraction aux rayons X</i>	102
1)	Principe de l'analyse par XRD	102
2)	Protocole de l'analyse par XRD	103
2)	<i>Classification ascendante hiérarchique</i>	104
3)	<i>Sections polies</i>	105
4)	ENRICHISSEMENT ET CARACTERISATION DE NOUVEAUX PHYLOTYPES	105
1)	<i>Préparation des milieux de culture</i>	105
2)	<i>Enrichissement et isolement de Bacteria sulfo-oxydantes</i>	107
1)	Cultures d'enrichissement et isolement	107
2)	Identification des phylotypes enrichis et isolés	107
3)	<i>Description de la souche Persephonella MO1340</i>	109
1)	Préparation du milieu de culture	109
2)	Caractéristiques morphologiques	110
3)	Caractéristiques physiologiques et métaboliques	111
4)	Caractérisation phylogénétique et génomique.....	114
5)	Analyses chimiques	115
6)	Calculs d'enthalpie libre	118
5)	ETUDE DE LA COLONISATION MICROBIENNE DES CHEMINEES HYDROTHERMALES PAR APPROCHE MOLECULAIRE 120	
1)	<i>Extractions d'ADN</i>	120
1)	Echantillons de cheminées	120
2)	Echantillons de panache hydrothermal proximal dans le gradient thermique.....	121
3)	Echantillons de cultures en continu en bioréacteur	122
2)	<i>Choix des amorces de séquençage</i>	122
1)	Analyse <i>in silico</i>	122
2)	Test des couples d'amorces sélectionnées <i>in silico</i>	124
3)	<i>Séquençage haut-débit</i>	124
4)	<i>Traitement bioinformatique</i>	126
1)	Traitement des données de séquençage	126
2)	Analyse des données avec l'outil phyloseq	129
6)	ETUDE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DES CHEMINEES HYDROTHERMALES PAR DES APPROCHES CULTURALES	130
1)	<i>Cultures en bioréacteur</i>	130
1)	Bioréacteur Gas-lift	130
2)	Conditions de culture	132
3)	Conditionnement des échantillons et analyses.....	133
2)	<i>Enrichissements MPN</i>	134
1)	Mise en place des enrichissements MPN.....	134
2)	Protocoles expérimentaux	135
3)	<i>Mesures d'activités métaboliques grâce à utilisation de substrats radiomarqués</i>	140
1)	Principe des mesures d'activité et plan expérimental	140
2)	Détermination des temps d'incubation	140
3)	Mesure d'activité sur des cultures en point final.....	142
4)	Traitement des données	143

CHAPTER III - MINERALOGICAL CHARACTERIZATION OF HYDROTHERMAL CHIMNEY SAMPLES 145

1)	HYDROTHERMAL CHIMNEYS SAMPLING	145
2)	MINERALOGICAL CHARACTERIZATION OF HYDROTHERMAL CHIMNEY SAMPLES	153

1) X-Ray Diffraction analysis	153
2) Microscopic observation of thin sections	159
3) DISCUSSION	160

CHAPTER IV - PHYLOGENETIC DIVERSITY OF MICROBIAL COMMUNITIES IN HYDROTHERMAL VENTS

1) CHOICE OF THE SEQUENCING PRIMERS	165
1) <i>In silico analysis of theoretical primers coverage</i>	165
2) <i>Comparison of the sequencing results</i>	166
2) VALIDATION OF THE IMPLEMENTED METHODS, IDENTIFICATION OF BIASES AND THE SOLUTIONS PROVIDED	169
3) MICROBIAL COMMUNITIES IN ACTIVE HYDROTHERMAL CHIMNEYS	172
4) MICROBIAL COMMUNITIES IN THE PROXIMAL HYDROTHERMAL PLUME	182
5) COMPARISON OF MICROBIAL COMMUNITIES OF HYDROTHERMAL CHIMNEYS AND PROXIMAL PLUME	185
6) ENRICHMENT OF MICROBIAL COMMUNITIES IN BIOREACTORS	189
7) DISCUSSION	198

CHAPTER V - FUNCTIONAL DIVERSITY OF MICROBIAL COMMUNITIES FROM DEEP SEA HYDROTHERMAL CHIMNEYS

1) MPN ENRICHMENTS	203
1) <i>Microbial concentration in hydrothermal chimney samples</i>	207
2) <i>Taxonomic identification of enriched microorganisms</i>	210
3) <i>Substrates consumption and metabolites production</i>	212
4) <i>Correlation between culture conditions, taxonomic diversity and metabolism data</i>	213
5) <i>Discussion</i>	220
2) ACTIVITY MEASUREMENTS	227
1) <i>Determination of the optimal incubation time</i>	227
2) <i>Autotrophic and heterotrophic carbon fixation rates</i>	228
3) <i>Carbon fixation rates and cell concentration</i>	232
4) <i>Discussion</i>	234

CHAPITRE VI - ENRICHISSEMENT ET CARACTERISATION DE NOUVEAUX PHYLOTYPES

1) ENRICHISSEMENT ET ISOLEMENT DE <i>BACTERIA</i> SULFO-OXYDANTES	237
1) <i>Contexte de l'étude</i>	237
2) <i>Identification des phylotypes cultivés</i>	239
1) Cultures d'enrichissement	239
2) Cultures d'isolement	242
2) DESCRIPTION DE LA SOUCHE <i>PERSEPHONELLA</i> MO1340	245
1) <i>Caractéristiques morphologiques</i>	245
2) <i>Caractéristiques physiologiques et métaboliques</i>	246
1) Détermination des conditions optimales de croissance	246
2) Caractéristiques métaboliques	248
3) Caractéristiques phylogénétiques et génomiques	253
3) <i>Physiologie de la souche MO1340 et implications écologiques</i>	259
1) Température optimale de croissance	259
2) Concentration optimale en oxygène	267

3) Implications écologiques.....	267
3) CONCLUSIONS	273
4) VALORISATION DES TRAVAUX DE CARACTERISATION DE LA SOUCHE <i>PERSEPHONELLA ATLANTICA</i> MO1340	274
CHAPTER VII - DISCUSSION, PERSPECTIVES AND CONCLUSION.....	289
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	305
APPENDIX	330
1) APPENDIX 1	330
2) APPENDIX 2	331
3) APPENDIX 3	332

Liste des figures et des tables

Figure 1 : Représentation schématique du principe de convection mantellique	12
Figure 2 : Représentation schématique de de la circulation hydrothermale dans la croûte océanique..	14
Figure 3 : Carte localisant les sites hydrothermaux référencés	15
Figure 4 : Photographies de cheminées hydrothermales de type « flange » ou « ruche ».....	16
Figure 5 : Photographie et schéma de la phase « sulfate-dominant » lors de la formation d’une cheminée de type fumeur noir.....	17
Figure 6 : Schémas représentant le remplacement progressif des sulfates par les sulfures lors de la formation d’une cheminée de type fumeur noir.....	19
Figure 7 : Photographie et schéma de la phase « sulfure-dominant » lors de la formation d’une cheminée de type fumeur noir.....	20
Figure 8 : Représentation schématique des gradients physico-chimiques créés par le mélange entre le fluide hydrothermal et l’eau de mer.....	22
Figure 9 : Photographies de la macrofaune des écosystèmes hydrothermaux.....	25
Figure 10 : Image de microscopie en fluorescence de la co-culture de <i>Nanoarchaeum equitans</i> et <i>Ignicoccus</i> sp	29
Figure 11 : Réactions métaboliques du cycle du carbone	41
Figure 12 : Réactions métaboliques du cycle du soufre	45
Figure 13 : Réactions métaboliques du cycle du fer.....	46
Figure 14 : Réactions métaboliques du cycle de l’azote	48
Figure 15 : Représentation schématique du Vent Cap	53
Figure 16 : Représentation graphique de l’énergie maximale produite par des métabolismes chimiolithoautotrophes	69
Figure 17 : Photographie et schémas présentant le sous-échantillonnage réalisé sur la cheminée étudiée par Li <i>et al.</i>	73
Figure 18 : Photographies en microscopie électronique à transmission présentant la production de greigite par des <i>Thermococcales</i>	76
Figure 19 : Résumé graphique de la méthodologie appliquée durant la présente étude.....	82
Figure 20 : Graphical summary of the methodology applied during this study	86
Figure 21 : Localisation géographique des sites hydrothermaux de la ride médio-Atlantique	87
Figure 22 : Carte bathymétrique du site Lucky Strike	89
Figure 23 : Carte bathymétrique haute-résolution du site Lucky Strike.....	90
Figure 24 : Schéma de la circulation hydrothermale en subsurface dans le site Lucky Strike.....	91
Figure 25 : Schéma de l’organisation des principaux éléments du réseau EMSO-Açores.....	93
Figure 26 : Photographie du déploiement du colonisateur CISICS sur la cheminée Aisics.....	94
Figure 27 : Photographies des navires et engins sous-marins	95
Figure 28 : Prélèvement de la cheminée Aisics.....	97
Figure 29 : Photographie de la canule de prélèvement du fluide hydrothermal.....	98
Figure 30 : Photographie de l’échantillon M18 WC 2	101
Figure 31 : Diffractogramme obtenu lors de l’analyse par XRD de l’échantillon M17 Ais 2.	104
Figure 32 : Photographie du bioréacteur Gas-lift	131
Figure 33 : Picture of hydrothermal chimney Aisics in 2017.....	146
Figure 34 : Picture of hydrothermal chimney Montserrat in 2019	147
Figure 35 : Picture of hydrothermal chimney Cypres in 2018	148
Figure 36 : Picture of hydrothermal chimney White Castle in 2018.....	150
Figure 37 : Picture of hydrothermal chimney Y3 in 2018.....	151
Figure 38 : Picture of hydrothermal chimney Capelinhos in 2018.....	152

Figure 39 : Mineralogical composition of the hydrothermal chimney samples and hierarchical clustering of the samples	155
Figure 40 : Schematic representation of the spatial position of mineralogical classes in chimneys ...	157
Figure 41 : Photomicrographs of thin sections of hydrothermal chimney samples	159
Figure 42 : Barplots showing the relative abundance of <i>Archaea</i> , <i>Bacteria</i> and <i>Campylobacteria</i> in hydrothermal chimney samples.	175
Figure 43 : Boxplots presenting the alpha-diversity in hydrothermal chimney samples	177
Figure 44 : Principal Components Analysis (PCA) plots of archaeal and bacterial communities	179
Figure 45 : Barplots showing the relative abundance of <i>Archaea</i> and <i>Bacteria</i> in hydrothermal chimney samples	181
Figure 46 : Barplots showing the relative abundance of <i>Archaea</i> , <i>Bacteria</i> and <i>Campylobacteria</i> in hydrothermal plume samples.....	184
Figure 47 : Heatmap presenting the relative abundance of <i>Archaea</i> and <i>Bacteria</i> in hydrothermal chimneys or proximal plume samples.	186
Figure 48 : Boxplots presenting the alpha-diversity of <i>Archaea</i> and <i>Bacteria</i> in hydrothermal chimneys and proximal plume samples.	188
Figure 49 : Barplots presenting the relative abundance of <i>Archaea</i> and <i>Bacteria</i> enriched in the continuous cultures in bioreactor.....	191
Figure 50 : Principal Components Analysis (PCA) plots of archaeal and bacterial communities from enrichments in bioreactor	196
Figure 51 : Boxplots of the decimal logarithm of culturable cell concentration estimated by MPN enrichments.....	208
Figure 52 : Taxonomic affiliation of microorganisms enriched in last positive dilutions.....	211
Figure 53 : Biplot of canonical correspondence analyses (CCA) of substrates consumption and metabolites production in MPN enrichments	212
Figure 54 : Biplot of canonical correspondence analyses (CCA) of taxonomic diversity and culture conditions in MPN enrichments	214
Figure 55 : Schematic representation of significant correlations observed between the enriched taxa and culture conditions	215
Figure 56 : Autotrophic and heterotrophic carbon fixation rates and culturable cell concentration in chimney samples estimated by MPN enrichments	229
Figure 57 : Arbre phylogénétique des phylotypes proches du genre <i>Thiomicrospira</i>	238
Figure 58 : Photographie d'un gel d'électrophorèse	240
Figure 59 : Photographie d'un gel d'électrophorèse	241
Figure 60 : Arbre phylogénétique des phylotypes enrichis	244
Figure 61 : Cellules de la souche MO1340 observées au microscope électronique à transmission....	246
Figure 62 : Cinétique de croissance de la souche <i>Persephonella hydrogeniphila</i> 29W ^T	253
Figure 63 : Arbre phylogénétique de l'ordre des <i>Aquificales</i>	254
Figure 64 : Voie d'oxydation du thiosulfate et d'autres composés soufrés.....	256
Figure 65 : Schéma de la réaction de clivage d'une molécule de Citrate par le cycle rTCA	258
Figure 66 : Effet de la température sur le taux de croissance de la souche MO1340.....	260
Figure 67 : Effet de la température sur le taux de croissance des souches de <i>P. hydrogeniphila</i> , <i>P. marina</i> et <i>P. guaymasensis</i>	261
Figure 68 : Courbes d'Arrhenius de <i>Thermus aquaticus</i> , <i>Bacillus coagulans</i> et <i>Bacillus stearothermophilus</i>	262
Figure 69 : Courbes d'Arrhenius réalisées à partir des données expérimentales sur le taux de croissance de la souche MO1340	263
Figure 70 : Courbe d'Arrhenius de <i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	264
Figure 71 : Représentation schématique des données obtenues sur les températures et concentration en oxygène optimales de la souche MO1340	268

Figure 72 : Valeurs de DeltaGr calculées pour les réactions métaboliques réalisées par la souche MO1340 dans le gradient thermique du mélange entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer.	270
Figure 73 : Comparaison des données de concentration en sulfates dans le gradient thermique, données simulées et des valeurs mesurées in situ durant la campagne MOMARSAT 2015.....	272
Figure 74 : Schematic summary of the model of spatial and temporal dynamics of microbial communities in active hydrothermal vents	300
Tableau 1 : Donneurs et accepteurs d'électrons utilisés par les genres isolés de sources hydrothermales..	36
Tableau 2 : Echantillons de cheminées hydrothermales utilisés durant l'étude	99
Tableau 3 : Echantillons de panache hydrothermal proximal utilisés durant l'étude.....	100
Tableau 4 : Liste des couples d'amorces spécifiques au genre <i>Thiomicrospira</i>	109
Tableau 5 : Caractéristiques des couples d'amorces testés <i>in silico</i>	123
Tableau 6 : Détail des échantillons de cheminées hydrothermales et de panache proximal utilisés comme milieu de culture et inoculum durant les incubations en bioréacteurs	133
Tableau 7 : Détail des substrats ajoutés dans les milieux de culture et des phases gazeuses des enrichissements MPN	136
Tableau 8 : Temps d'incubation des enrichissements MPN.....	137
Tableau 9 : Relative abundance of the bacterial taxa detected by cloning and Sanger sequencing	167
Tableau 10 : Relative abundance of the archaeal taxa detected by cloning and Sanger sequencing...	169
Tableau 11 : Characteristics of culture media used in MPN enrichments.....	204
Tableau 12 : Valeurs optimales de croissance et gammes de tolérance de la souche MO1340	248
Tableau 13 : Quantités initiales et finales mesurées des métabolites consommés et produits pendant les cultures en point final de la souche MO1340.	249
Tableau 14 : Résumé des réactions cataboliques réalisées par la souche MO1340 et des paramètres physiologiques en fonction des couples de substrats.....	269

Chapitre I - Synthèse

bibliographique

1) Systèmes hydrothermaux océaniques profonds

1) Les dorsales océaniques

La structure interne de la Terre est organisée en couches concentriques, et est à la base de nombreux phénomènes géologiques et sismiques. La chaleur dégagée par la désintégration des éléments radioactifs du manteau terrestre est transmise à la surface du globe par deux mécanismes : la conduction thermique qui se fait par contact, sans déplacement de matière, et la convection mantellique. Il s'agit d'un phénomène géologique impliquant l'asthénosphère, la partie ductile du manteau terrestre, et la lithosphère qui comprend la partie supérieure du manteau ainsi que la croûte terrestre (**Figure 1**). La température de l'asthénosphère est plus élevée que celle de la lithosphère, ce lui confère des propriétés mécaniques différentes, notamment une plus faible viscosité qui permet le déplacement vertical de matière pour évacuer la chaleur en surface. La matière chaude et visqueuse remonte (en orange sur la **Figure 1**), et à l'inverse la lithosphère, plus froide et dense, s'enfonce dans l'asthénosphère dans les zones de subduction (tirets noirs épais sur la **Figure 1**). C'est ce mouvement de matière, sous forme de cellules de convection (flèches rouges sur la **Figure 1**), qui cause le déplacement des plaques tectoniques et concentre les flux de chaleur en certains points à la surface de la Terre.

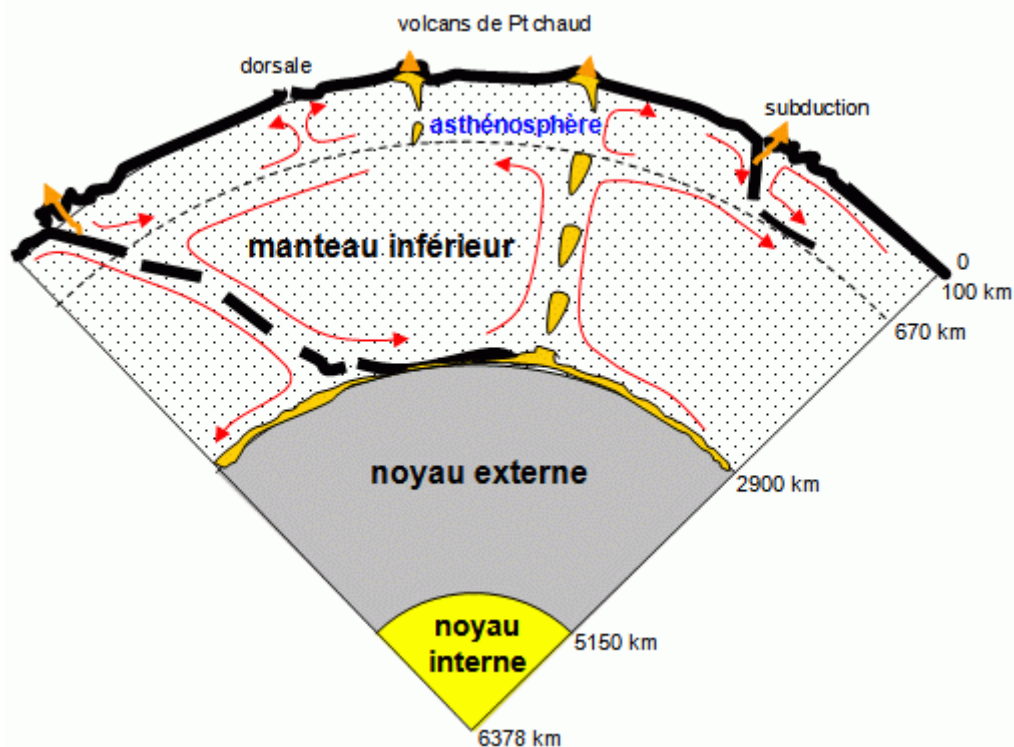


Figure 1: Représentation schématique du principe de convection mantellique. Détails dans le texte. D'après le site internet <http://svt.ac-dijon.fr/schemassvt/spip.php?article580>

Une partie de ces flux de chaleur est évacuée dans les zones océaniques et il est estimé que 30 % de ces flux sont focalisés au niveau des dorsales médio-océaniques (Stein & Stein, 1994). Il s'agit de chaînes de montagnes majoritairement sous-marines qui sont créées par la remontée des roches chaudes de l'asthénosphère. La croûte océanique est ainsi renouvelée dans ces zones où les plaques lithosphériques divergent. Sous l'effet de son refroidissement par contact avec l'eau de mer la croûte océanique se rétracte, formant des roches basaltiques ou des gabbros comprenant de nombreuses failles et anfractuosités.

En fonction de l'activité des dorsales et de la vitesse d'expansion de la croûte océanique de part et d'autre de l'axe des dorsales, celles-ci sont classées en deux voire trois catégories (Alt, 1995, Kelley *et al.*, 2002) :

- Les dorsales lentes (10 - 40 mm/an), comme la ride médio-Atlantique (37 °N). La remontée de magma est intermittente et la croûte océanique est créée lors de différents événements magmatiques. Dans ce cas les processus tectoniques sont importants et provoquent la formation d'une vallée axiale le long de la dorsale qui peut atteindre jusqu'à 15 km de large et comporter de nombreuses failles.
- Les dorsales intermédiaires (40 - 80 mm/an), comme la ride est-Pacifique à 21 °N. Une vallée axiale est présente mais moins marquée qu'au niveau des dorsales lentes.

- Les dorsales rapides (80-160 mm/an), comme la ride est-Pacifique à 3 °S. L'activité volcanique est continue au cours du temps, et la chambre magmatique couvre une grande surface sous la dorsale. Les dorsales rapides sont ainsi caractérisées par la présence d'une crête dans l'axe de la dorsale et d'une zone d'effondrement à son sommet qui marque la partie la plus active de la crête.

2) Formation du fluide hydrothermal

La circulation hydrothermale d'eau de mer dans la croûte océanique est rendue possible par la présence de failles qui rendent le substrat rocheux en partie perméable. En s'enfonçant dans la croûte océanique sur plusieurs kilomètres (**Figure 2**) dans la zone de recharge, l'eau de mer est réchauffée par la proximité de la chambre magmatique et interagit avec les roches environnantes. Ce lessivage des roches par l'eau de mer dépend de nombreux facteurs tels que la composition chimique de l'eau de mer, la composition des roches ainsi que leur perméabilité, la pression (qui augmente avec la profondeur), et la localisation de la chambre magmatique en subsurface qui influence la conduction de chaleur dans la croûte océanique (Tivey, 2007).

En réagissant avec les minéraux, l'eau de mer s'appauvrit progressivement en certains composés comme le sulfate ou le magnésium. Ceci altère les roches de la croûte océanique et mène à la précipitation de différentes phases minérales dépendamment de la température, comme par exemple l'anhydrite (CaSO_4). Durant sa circulation en subsurface, le fluide hydrothermal subit une déplétion en oxygène ainsi qu'une acidification suite à ses interactions avec les minéraux. Il se charge en éléments minéraux (Fe, S, Mn, Zn, Cu...) et en gaz dissous (H_2 , CO_2 , CH_4 , H_2S ...) qui proviennent du lessivage des roches ou du dégazage du magma.

Lorsque le fluide hydrothermal atteint une profondeur où la pression et la température peuvent être proches du point critique de l'eau de mer, soit 298 bar et 407 °C (Bischoff & Rosenbauer, 1988), il subit une séparation de phase qui provoque la formation d'une phase saumâtre riche en sels et d'une phase appauvrie en sels (Von Damm, 1990). Selon la circulation qu'empruntent les deux phases en subsurface, elles peuvent rester séparées ou se mélanger à nouveau, ce qui influence fortement la composition chimique du fluide hydrothermal (Hannington *et al.*, 1995).

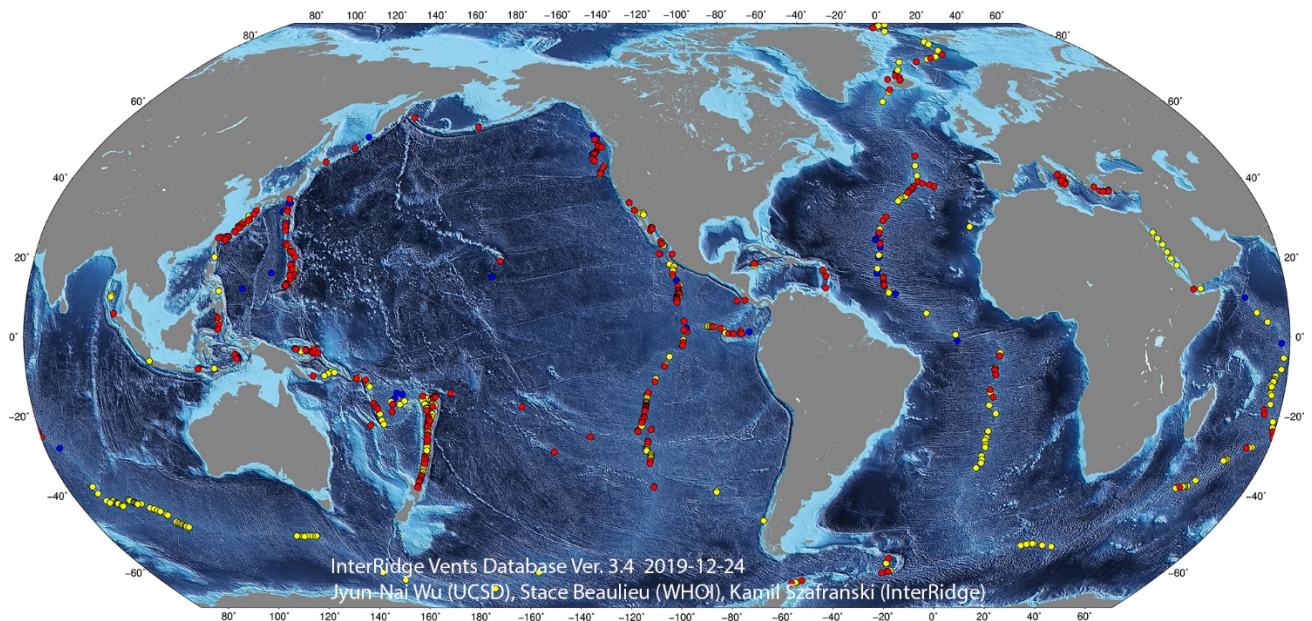


Figure 3 : Carte de la base de données InterRidge Global Database localisant les sites hydrothermaux référencés, version 3.4 du 24/12/2019 (Beaulieu et al., 2013). En rouge : sites dont la localisation est confirmée. En jaune : Sites dont la localisation est présumée.

3) Les cheminées hydrothermales

1) Généralités sur les cheminées hydrothermales

Le mélange soudain du fluide hydrothermal chaud (350 - 450 °C) avec l'eau de mer froide (2 - 4 °C) provoque la précipitation de minéraux à partir des espèces contenues dans le fluide. Ceux-là s'accumulent autour du point d'émission du fluide, ce qui mène à la formation des cheminées hydrothermales : des structures minérales partiellement poreuses dont la composition minéralogique et la structure évoluent au cours du temps.

Conjointement à la composition chimique du fluide hydrothermal, c'est sa température qui définit la séquence de précipitation des différents minéraux constituant les cheminées hydrothermales (Janecky & Seyfried Jr, 1984, Peter & Scott, 1988). Ces cheminées sont de type fumeurs noirs dans les cas où le fluide hydrothermal est expulsé à haute température (> 300 °C). A l'inverse, lorsque la circulation du fluide en subsurface favorise sa dilution préalable avec l'eau de mer froide et qu'il est expulsé à plus basse température (entre 150 et 290 °C), cela mène à la formation de fumeurs blancs. Ils émettent un fluide hydrothermal qui est moins chargé en minéraux que celui des fumeurs noirs et avec une vitesse d'émission du fluide plus faible (Lilley et al., 1995). Si le fluide est fortement dilué par l'eau de mer, son émission hors du

plancher océanique ne provoque pas de précipitation minérale car la température est trop faible pour faire précipiter les minéraux. On parle alors de zone d'émission de fluide diffus. Selon les conditions dans lesquelles précipitent les minéraux, les cheminées hydrothermales peuvent présenter plusieurs morphologies caractéristiques : en forme de cheminée classique, de « ruches » ou de « flanges » (**Figure 4**) (Koski *et al.*, 1994, Tivey, 2007). Ces différents types de diffuseurs peuvent être présents simultanément sur un même site hydrothermal.

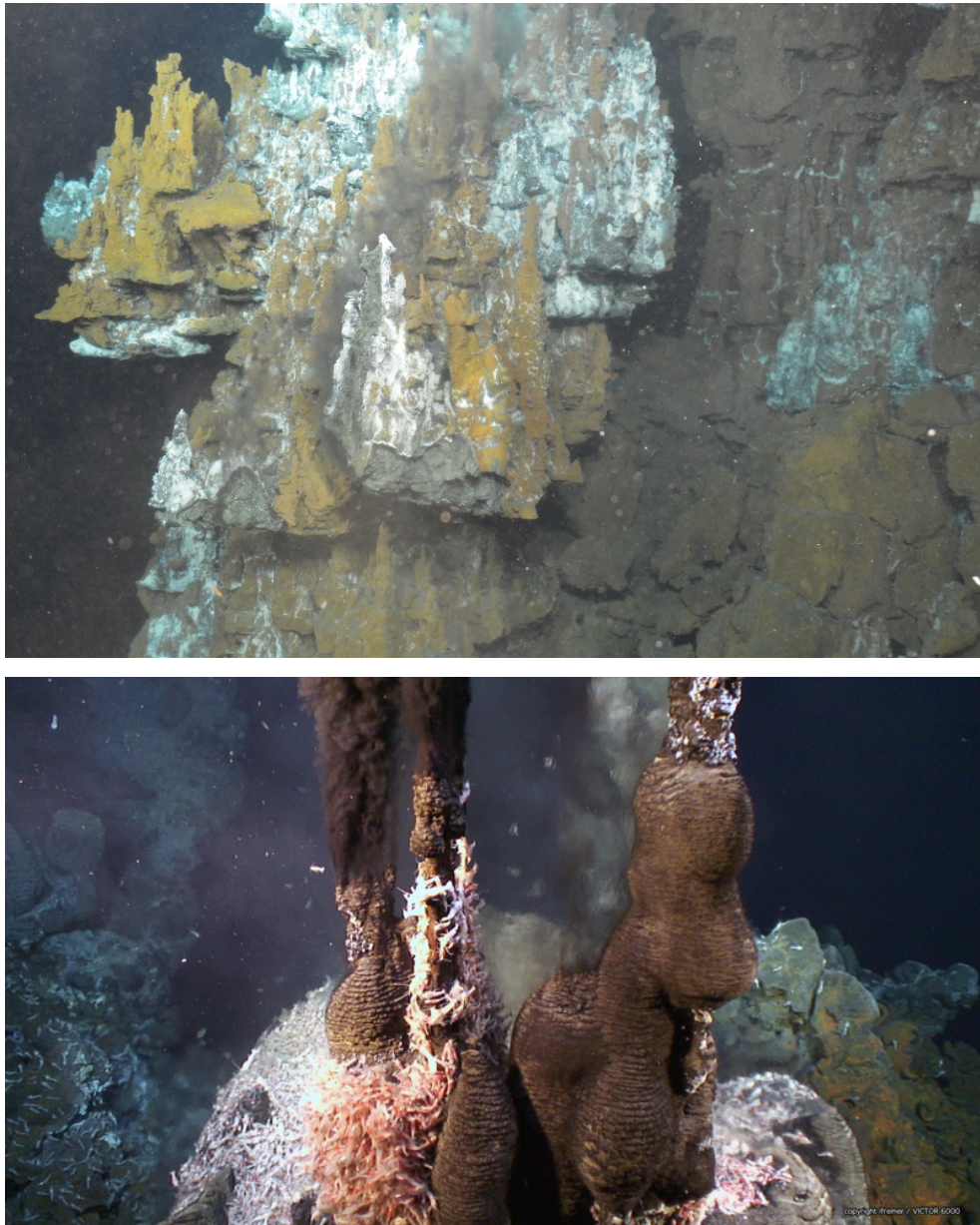


Figure 4 : Photographie d'une cheminée hydrothermale de type « flange » (en haut) sur le site Capelinhos (champ hydrothermal Lucky Strike, mission MOMARSAT 2019) et B d'une cheminée de type « ruche » (en bas) sur le site Snake Pit (mission BICOSEI 2014)

2) Formation des cheminées de type fumeur noir

Dans les sites riches en sulfures, la formation des cheminées de type fumeur noir commence par la précipitation de sels de sulfates, majoritairement de l'anhydrite (CaSO_4), dont le sulfate et la majorité du calcium proviennent de l'eau de mer (Haymon, 1983, Xiaotong & Huaiyang, 2005, Meng *et al.*, 2018). Il s'agit d'un minéral gris foncé très friable et poreux qui précipite lorsque la température est supérieure à $150\text{ }^\circ\text{C}$. Si l'anhydrite est exposée à l'eau de mer sans être réchauffée par le fluide hydrothermal, elle redevient soluble (Humphris & Kleinrock, 1996). La formation d'une telle structure peut être très rapide selon la vitesse d'émission du fluide hydrothermal. Par exemple la cheminée Aisics, du champ hydrothermal Lucky Strike, a été échantillonnée lors de la campagne MOMARSAT 2017 et toute la partie supérieure a été retirée. Neuf jours plus tard, une cheminée d'une hauteur de plus d'un mètre, constituée presque intégralement d'anhydrite, avait précipité (**Figure 5 A**).

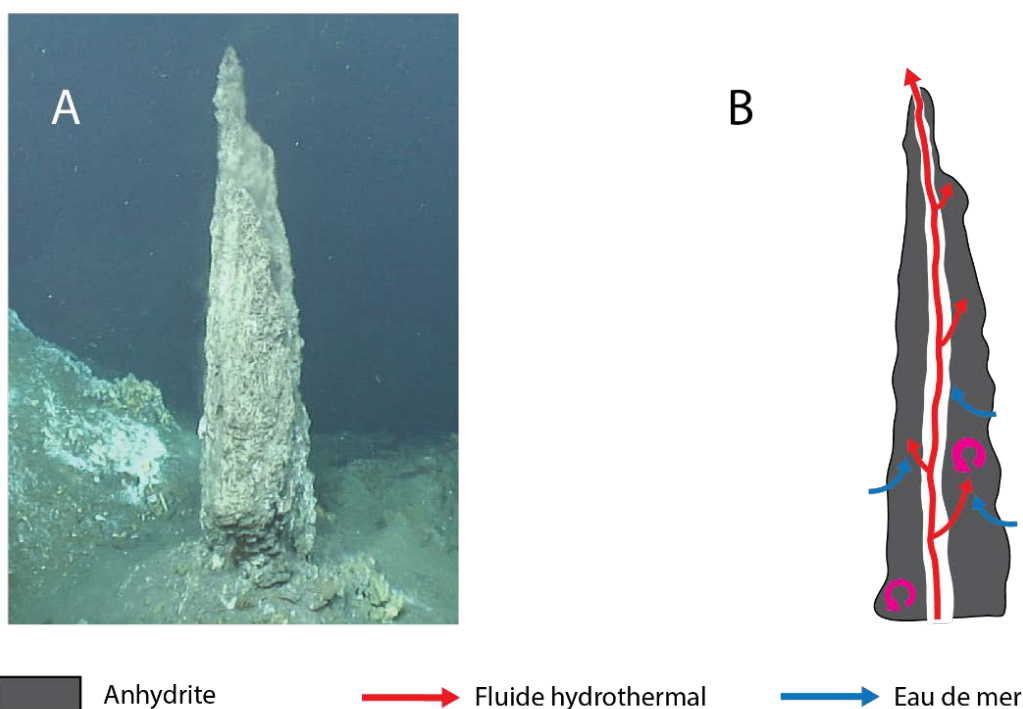


Figure 5 : A : Photographie de la cheminée Aisics prise pendant la campagne MOMARSAT2017 ; B : Schéma représentant la phase « sulfate-dominant » lors de la formation d'une cheminée de type fumeur noir (détail dans le texte).

Cette jeune structure minérale est schématisée sur la figure (**Figure 5 B**), et représente le premier stade de formation d'une cheminée hydrothermale de type fumeur noir. La cheminée d'anhydrite s'organise autour d'un conduit central, où circule le fluide hydrothermal (flèches rouges) qui est diffusé principalement par le sommet de la cheminée, mais aussi par les pores de l'anhydrite. Cette forte porosité crée des zones de mélange (représentées par des flèches violettes circulaires) entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer (flèches bleues). A ce stade, et lorsqu'il y a un unique conduit d'émission du fluide hydrothermal, la croissance de la cheminée est surtout verticale comme le montre la forme allongée de la cheminée Aisics (**Figure 5 A**). Ainsi, le premier stade de formation des cheminées hydrothermales peut être qualifié de « **sulfates-dominant** ».

Dans cette structure d'anhydrite, des sulfures commencent également à précipiter et à s'intégrer dans la matrice de sulfates. De la pyrite (FeS_2) favorise ainsi la croissance de la cheminée vers l'intérieur, au niveau du conduit central. De la pyrite, de la marcasite (FeS_2) et de la sphalérite (ZnS) précipitent dans les zones périphériques et font croître la cheminée en largeur (**Figure 6**). La précipitation de sulfates continue au niveau de la zone d'émission du fluide et permet le développement de la cheminée en hauteur. L'anhydrite et la pyrite sont donc des minéraux présents dans tous les stades de maturation des fumeurs noirs. La forme de cette structure, qui entoure le conduit central, l'isole partiellement de l'eau de mer froide. Le flux de fluide fait ainsi augmenter la température à l'intérieur de la cheminée (Xiaotong & Huaiyang, 2005).

Cette hausse de température à l'intérieur de la cheminée permet la précipitation de sulfures massifs (pyrite et chalcopirite CuFeS_2) dans le conduit central (**Figure 6**). La chalcopirite, qui précipite à des températures supérieures à 300 °C est un minéral typique des zones de haute température (Kim *et al.*, 2006). Ces sulfures de fer et de cuivre, contrairement à l'anhydrite qui est friable et fragile, forment une structure très rigide qui reste stable dans le temps. Ces minéralisations massives sont bien moins poreuses que l'anhydrite, ce qui restreint la circulation du fluide hors des conduits principaux et secondaires. L'échelle de temps pour la précipitation de ces sulfures et leur stabilisation dans les cheminées est bien plus grande que pour les sulfates. Contrairement à l'anhydrite, qui précipite rapidement et peut former une petite cheminée en quelques jours, les sulfures prennent quelques mois ou années voire quelques dizaines d'années à s'installer et remplacer les sulfates (Turner & Campbell, 1987).

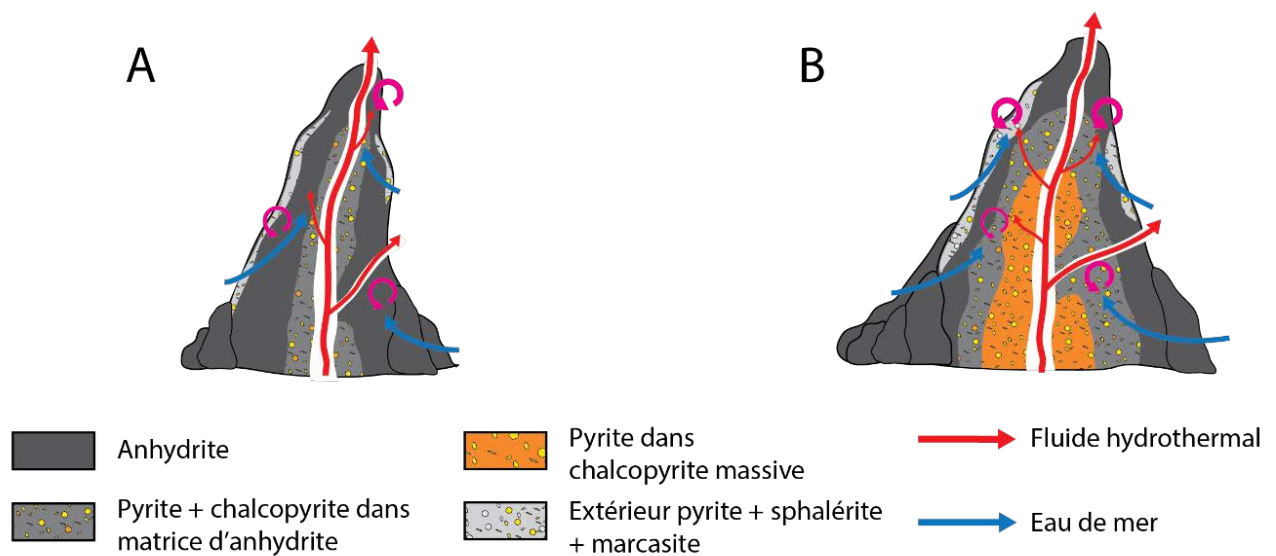


Figure 6 : Schémas représentant le remplacement progressif des sulfates par les sulfures lors de la formation d'une cheminée de type fumeur noir (détail dans le texte)

La cheminée entre progressivement dans un stade dit « **sulfures-dominant** ». En fonction de la température, les sulfures peuvent également subir d'autres événements de dissolution et de précipitation, ce qui continue de modifier la composition minéralogique de la cheminée (Meng *et al.*, 2018). Ainsi, la présence d'un minéral à un instant donné ne signifie pas que la température à cet instant correspond à la température de précipitation de ce minéral, car l'évolution de la structure des cheminées peut modifier les zones de circulation du fluide hydrothermal. Par exemple la présence de chalcopyrite indique qu'il y a eu une température élevée ($> 300\text{ °C}$) durant une période de formation de la cheminée ; or, si le conduit où circule le fluide hydrothermal est bouché par les précipitations minérales, la température dans cette zone de la cheminée diminuera mais la chalcopyrite sera toujours présente.

La cheminée du site South Crystal, sur le champ hydrothermal Lucky Strike de la ride médio-Atlantique (**Figure 7 B**), correspond à ce stade de maturation des fumeurs noirs. La partie basale de la cheminée de couleurs blanche, orange et grise est composée de sulfures ; les zones orangées étant probablement des oxyhydroxydes de fer. La partie supérieure constituée d'anhydrite, de couleur grise, est localisée autour de la principale zone de diffusion du fluide hydrothermal. D'autres zones de diffusion, visibles au centre de l'image et sur la droite de la cheminée, sont reconnaissables à la couleur sombre de l'anhydrite. Au niveau de ces zones, la

cheminée continue de croître en hauteur et en largeur, et les sulfures y remplaceront progressivement les sulfates au cours du temps.

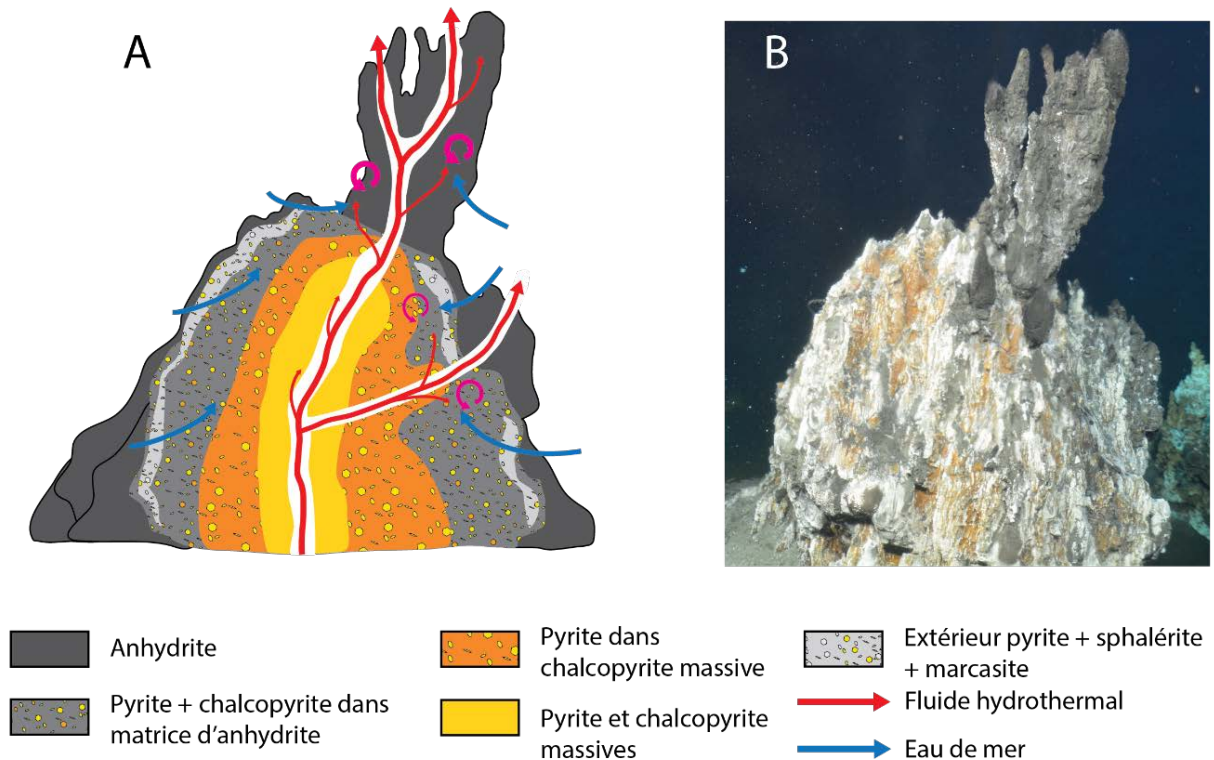


Figure 7 : A : Schéma représentant la phase « sulfure-dominant » lors de la formation d'une cheminée de type fumeur noir ; B : Photographie de la cheminée South Crystal (campagne MOMARSAT 2019)

3) Influence du substrat rocheux

Le type de cheminée hydrothermale décrit ci-dessus correspond à des édifices observables sur un site à substrat basaltique comme ceux du champ hydrothermal Lucky Strike de la ride médio-Atlantique. Les paramètres présentés précédemment (pression, température, circulation du fluide hydrothermal) modifient la composition chimique du fluide et la minéralogie ainsi que la structure des cheminées hydrothermales au sein d'un même site (Ray *et al.*, 2018). Un autre paramètre qui influence fortement les conditions de formation du fluide hydrothermal et des cheminées est le contexte géologique du site (Fouquet *et al.*, 2013).

Les champs hydrothermaux dits basaltiques (ou mafiques) sont caractérisés par un substrat rocheux composé majoritairement de basalte. Il s'agit d'une roche caractéristique de la croûte océanique qui est riche en silices et est créée par le refroidissement rapide du magma au

contact de l'eau de mer. Il en résulte la formation d'un fluide hydrothermal riche en calcium, en métaux et en gaz (CO₂, H₂S, CH₄) (Charlou *et al.*, 2000).

Dans les cas où l'activité hydrothermale a lieu au niveau d'une zone d'affleurement du manteau terrestre on parle de sites ultramafiques. Les péridotites du manteau contiennent une plus grande quantité de minéraux pauvres en silices tels que l'olivine en comparaison aux roches de la croûte océanique. C'est le cas par exemple du site Rainbow de la ride médio-Atlantique (Charlou *et al.*, 2000) (Brazelton *et al.*, 2013). L'interaction entre l'eau de mer et ces minéraux mène à la précipitation de fer ferrique et à la libération d'hydrogène par le biais d'une réaction exothermique appelée serpentinisation. A haute température, la présence de fortes concentrations en hydrogène et en dioxyde de carbone peut permettre la formation de petites molécules carbonées comme du méthane, ou de plus grosses molécules carbonées telles que des lipides (Holm & Charlou, 2001).

La découverte du site Lost City en 2000 (Kelley *et al.*, 2005), à 15 km de l'axe de la dorsale de la ride médio-Atlantique, a montré que le processus de serpentinisation pouvait fournir assez d'énergie pour émettre un fluide hydrothermal dont le pH est bien plus élevé par rapport aux sites basaltiques ou ultramafiques. En effet, le fluide de ce site est très alcalin, avec un pH de 9 à 11, et une température plus basse, de 40 à 90 °C au maximum. Ces conditions mènent à la formation de cheminées de carbonates très friables de couleur blanche. Cependant la découverte de sites de ce type reste exceptionnelle, et très peu ont été décrits.

Il existe également des sites hydrothermaux basés sur un substrat sédimentaires, comme le site du Bassin de Guaymas (Koski *et al.*, 1985), qui repose sur une couche sédimentaire poreuse de 500 mètres d'épaisseur dans laquelle circule le fluide hydrothermal. Ce site est caractérisé à la fois par la présence d'édifices hydrothermaux de sulfures ou de carbonates mais aussi par la présence de zones où le sédiment est réchauffé jusqu'à des températures d'environ 200 °C (McKay *et al.*, 2012).

4) Le gradient hydrothermal, base d'un écosystème

Lors de la découverte des cheminées hydrothermales en 1977 durant une plongée du sous-marin américain Alvin, l'observation de communautés animales très denses, formant un écosystème complexe à 2450 mètres de profondeur, fut une surprise (Corliss *et al.*, 1979). En effet, au-delà de 100 à 1000 mètres, selon la turbidité de l'eau, la lumière du soleil ne pénètre plus suffisamment pour permettre la production de matière organique par photosynthèse.

Rapidement, un autre processus métabolique connu, la chimiosynthèse, a été proposé comme alternative pour fournir une source d'énergie aux producteurs primaires de ces écosystèmes en absence de lumière. Cette hypothèse a été confirmée lorsque les premières souches de microorganismes chimiosynthétiques sulfo-oxydants se développant dans les sources hydrothermales ont été isolées dans les années suivantes (Jannasch & Wirsén, 1979, Ruby *et al.*, 1981).

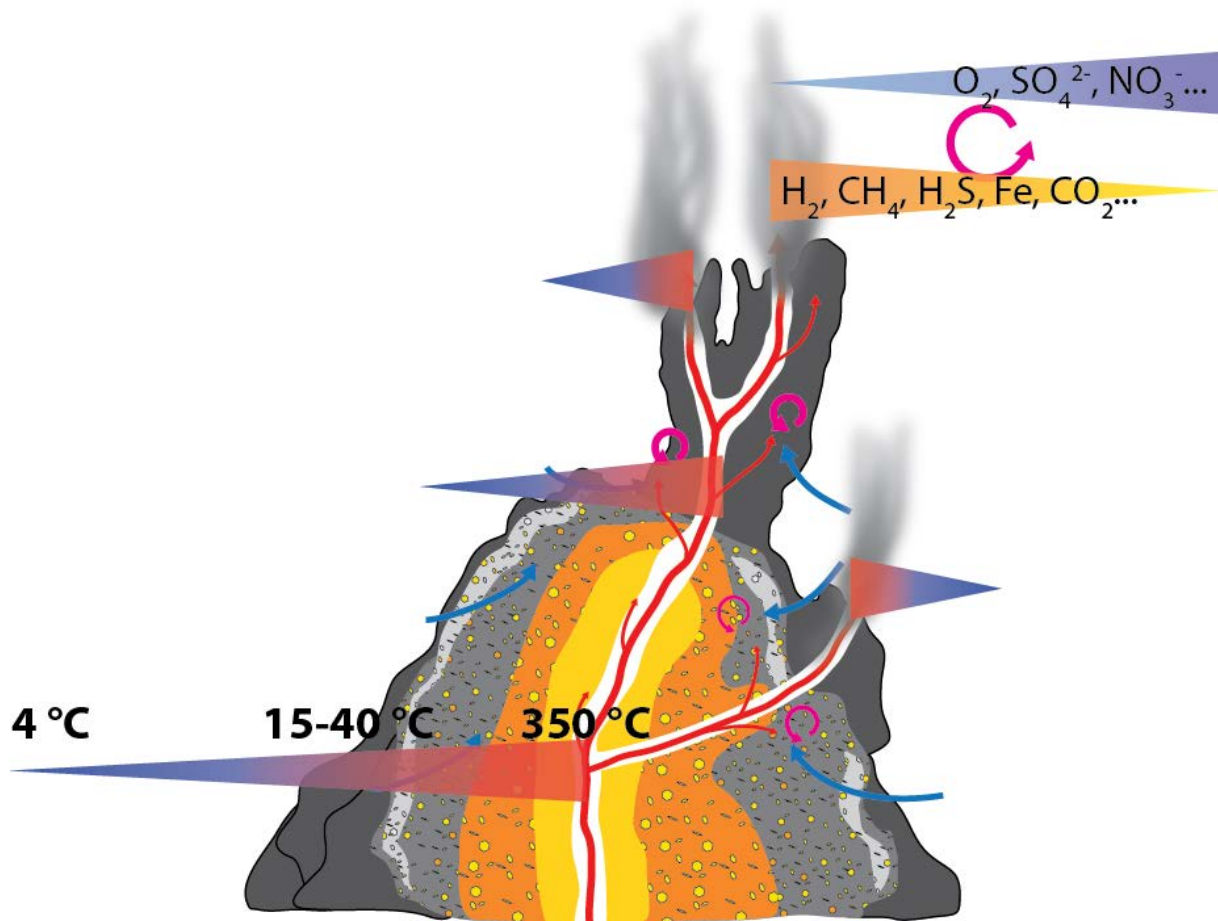


Figure 8 : Représentation schématique des gradients physico-chimiques créés par le mélange entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer. Le gradient thermique est représenté par les triangles en dégradé rouge et bleu. Les apports en donneurs et accepteurs d'électrons par le fluide hydrothermal et l'eau de mer sont respectivement représentés en orange et bleu. La température de 15 à 40 °C à l'interface cheminée-eau de mer provient d'une estimation de Li *et al.* (Li *et al.*, 2014).

C'est la formation d'un gradient physico-chimique créé par le mélange du fluide hydrothermal et de l'eau de mer qui permet le développement de ces microorganismes. Lorsque le fluide hydrothermal chaud, acide, anoxique et réduit est expulsé du plancher océanique au niveau des sources hydrothermales, il est rapidement mélangé à l'eau de mer froide et oxygénée dont le pH est légèrement basique (environ 8,2). Le gradient physico-chimique formé est alors

très abrupt et étendu sur une échelle de quelques centimètres. On parle alors de panache hydrothermal proximal pour décrire la zone dans laquelle l'eau de mer et le fluide hydrothermal sont mélangés et où le gradient physico-chimique est le plus abrupt.

Dans le conduit central des cheminées, la température est très élevée, dépendamment de la température du fluide hydrothermal (un exemple est présenté pour un fluide hydrothermal à 350 °C sur la figure (**Figure 8**)). Lorsqu'il est expulsé hors de la cheminée hydrothermale par les conduits de la cheminée, le fluide est mélangé à l'eau de mer, ce qui le refroidit rapidement. Cependant, l'épaisseur de la paroi des cheminées hydrothermales peut provoquer une séparation spatiale du fluide et de l'eau de mer, limitant les échanges entre ces deux éléments. Ainsi, la gamme de température (entre 4 et 350 °C) peut être étendue sur une large zone selon l'épaisseur de la cheminée.

Conjointement au gradient thermique, un gradient d'oxydo-réduction est créé par la différence de composition chimique du fluide hydrothermal et de l'eau de mer. Le fluide contient des éléments réduits à l'état de gaz (H_2S , H_2 , CH_4 ...) et des minéraux dissous ou particuliers (fer, sulfures...).

Le développement de microorganismes dans un environnement dépend de plusieurs facteurs :

- Les paramètres physico-chimiques comme le pH, la température, la salinité et la pression hydrostatique
- La présence d'une source d'énergie, sous forme de molécules réduites pouvant libérer des électrons
- La présence d'accepteurs d'électrons, qui prennent en charge les électrons
- La présence d'une source de carbone organique ou inorganique

L'eau de mer contient des composés oxydés, comme de l'oxygène, du sulfate ou du nitrate. Le fluide hydrothermal constitue donc un apport d'espèces chimiques réduites pouvant servir de donneurs d'électrons aux organismes, et à l'inverse l'eau de mer fournit plusieurs accepteurs d'électrons potentiels. De plus, du carbone inorganique est présent dans le fluide hydrothermal (CO_2 , CO) et dans l'eau de mer (CO_2 dissous). Du carbone organique est également présent, notamment sous forme de molécules carbonées produites abiotiquement lors de la formation du fluide. La matière organique peut aussi être apportée par l'eau de mer après avoir été produite localement dans l'écosystème (par les microorganismes autotrophes libres ou par les associations symbiotiques), ou provenir de la neige marine descendant dans la colonne

d'eau depuis la surface de l'océan. Dans le dernier cas, il s'agit d'un apport externe car la matière organique qui constitue la neige marine provient de la production photosynthétique de la zone photique.

Toutes ces conditions nécessaires au développement de microorganismes sont donc réunies dans les écosystèmes hydrothermaux. La matière organique produite par les communautés microbiennes chimiolithoautotrophes est ensuite transférée aux échelons trophiques supérieurs, ce qui permet ainsi le développement de la macrofaune.

5) La faune hydrothermale

Au même titre que les cheminées hydrothermales fumantes qui tranchent visuellement avec les fonds océaniques, la densité de la macrofaune des écosystèmes hydrothermaux contraste avec les rares animaux observés dans les plaines abyssales. Outre ces densités de population importantes, la plupart des organismes observés au moment de la découverte du premier site hydrothermal appartenaient à des taxa encore inconnus, ou peu représentés comme les vers *Pogonophora* ou les bivalves *Vesicomidae* (Corliss *et al.*, 1979).

Par exemple les premiers vers *Pogonophora* avaient déjà été décrits une vingtaine d'années plus tôt dans d'autres environnements, mais ceux-ci ne possédant pas de bouche ni de tube digestif, leur mode d'alimentation restait méconnu. C'est seulement après la découverte de l'espèce hydrothermale *Riftia pachyptila* (**Figure 9 A**) que leur mode de vie a été mis en évidence (de Beer, 1955, Felbeck, 1981, Jones, 1981, Dubilier *et al.*, 2008). Leur anatomie originale est due au fait qu'ils vivent en symbiose avec des *Bacteria* sulfo-oxydantes, qui se développent dans le trophosome des vers ; un organe spécifique à cette symbiose. Ainsi, c'est à la suite de la découverte des écosystèmes hydrothermaux que les symbioses entre des microorganismes chimiolithoautotrophes et des invertébrés ont été décrites dans d'autres écosystèmes (Dubilier *et al.*, 2008).

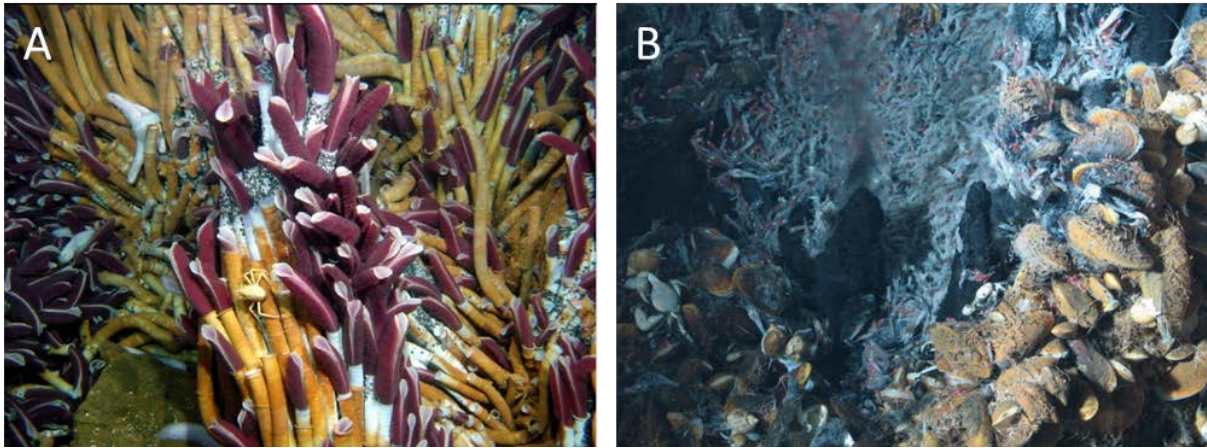


Figure 9 : Colonie de vers *Riftia pachyptila* ; B : Agrégat de crevettes *Rimicaris exoculata* (en fond) et de moules du genre *Bathymodiolus* (au premier plan). Source Ifremer.

D'autres animaux de ces écosystèmes vivent en symbiose avec des *Bacteria* autotrophes, comme les crevettes *Rimicaris exoculata* (Williams & Rona, 1986, Van Dover *et al.*, 1988) qui hébergent principalement les microorganismes dans leur cavité branchiale hypertrophiée. Ces crevettes de la famille des *Alvinocarididae* peuvent former de denses agrégats regroupant plusieurs milliers d'individus (**Figure 9 B**). Il s'agit d'un cas de symbiose extracellulaire (épibiose) car les microorganismes vivent dans la cavité céphalothoracique et dans le système digestif de la crevette mais en dehors de ses cellules (Petersen *et al.*, 2010). Des organismes présentant des endosymbioses sont les moules du genre *Bathymodiolus*, qui hébergent des *Bacteria* sulfo-oxydantes et méthanotrophes vivant dans les cellules de leurs branchies (Duperron *et al.*, 2006).

Néanmoins, le mode de vie symbiotique ne concerne pas tous les animaux des écosystèmes hydrothermaux. Par exemple la crevette *Mirocaris fortunata* semble se nourrir de manière opportuniste de débris organiques déposés sur les moules ou sur les substrats rocheux, et le crabe *Segonzacia mesatlantica* aurait une stratégie alimentaire de nécrophage, ou de prédateur de petits invertébrés (Matabos *et al.*, 2015). Cette abondante faune, qui subsiste grâce aux microorganismes chimiolithoautotrophes, libère de la matière organique dans l'eau de mer qui peut ensuite être réutilisée par les organismes hétérotrophes des communautés microbiennes.

2) Microbiologie des écosystèmes hydrothermaux

Une partie de cette introduction bibliographique a été publiée dans le cadre d'un chapitre d'ouvrage auquel j'ai contribué :

Deep-sea microbiology book (*Appendix 3*)

Physiology, metabolism and ecology of thermophiles from deep-sea vents

Anne Godfroy, David François, Jordan Hartunians, Yann Moalic and Karine Alain

In Deep-sea microbiology book eds Costantino Vetriani and Donato Giovanelli

Springer en cours d'édition

La présence simultanée de divers donneurs et accepteurs d'électrons et de sources de carbone variées favorise la formation de micro-habitats dont les paramètres physico-chimiques peuvent varier sur de très petites échelles (Li *et al.*, 2014). Ces conditions sont propices à la croissance de nombreux microorganismes, qui présentent ainsi des caractéristiques métaboliques variées, ainsi que des physiologies adaptées aux conditions de température, de pression, de pH et de salinité imposées par le gradient de dilution du fluide hydrothermal dans l'eau de mer.

1) Diversité phylogénétique et physiologique

Une grande variété de *Bacteria* et d'*Archaea* se développent dans les écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds. Les travaux de culture réalisés ont permis de décrire et valider respectivement plus de 120 et 50 espèces parmi ces deux domaines (Euzéby, 1997). Ce qui a apporté de nombreuses informations sur leur métabolisme, leur physiologie et leur écologie.

Le **Tableau 1** dans la section *Diversité métabolique* reprend une liste, souhaitée comme exhaustive, de tous les genres d'*Archaea* et de *Bacteria* isolés des écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds.

1) Diversité des *Bacteria* cultivées

Les *Bacteria* isolées à partir de ces écosystèmes présentent une importante diversité phylogénétique et physiologique, et leurs conditions de croissance couvrent une large gamme de température. Certains phyla sont représentés uniquement par des espèces thermophiles, dont la température optimale de croissance est supérieure à 60 °C. C'est le cas des *Thermodesulfobacteria* (Garrity *et al.*, 2001), des *Acidobacteria* (Thrash & Coates, 2010), des *Deferribacteres* (Garrity *et al.*, 2001), des *Deinococcus-Thermus* (Weisburg *et al.*, 1989), des *Aquificae* (Reysenbach *et al.*, 2001) et de la majorité des *Thermotogae* (Reysenbach *et al.*, 2001). Bien qu'ils partagent des températures optimales de croissance proches, entre 60 et 80 °C, les genres décrits parmi ces phyla se distinguent généralement par les métabolismes qu'ils pratiquent.

A l'inverse, certains phyla comprennent uniquement des espèces décrites comme mésophiles, dont la croissance est optimale dans une gamme de température comprise entre 15 et 60 °C, en moyenne autour de 30 °C. Cela comprend les phyla *Bacteroidetes* (Krieg *et al.*, 2010), et plusieurs classes parmi les *Proteobacteria* : les *Alpha-*, *Gamma-* et *Zeta-proteobacteria* (Bergey & Garrity, 2005, Garrity *et al.*, 2005, Garrity *et al.*, 2005, Makita *et al.*, 2017).

Dans plusieurs phyla, les différentes espèces décrites présentent des caractéristiques physiologiques plus variées et des réponses différentes à la température. Ainsi parmi les *Clostridia*, l'espèce *Bacillus alkalitolerans* (Liu *et al.*, 2018) présente une température optimale de croissance de 28 °C, contre 70 °C pour l'espèce *Carboxydobrachium pacificum* (Sokolova *et al.*, 2001). Il en est de même pour les espèces du phyla *Actinobacteria* (Goodfellow, 2015) et la classe *Deltaproteobacteria* (Kuever *et al.*, 2005) parmi les *Proteobacteria*. Les représentants du phylum *Epsilonbacteraeota* présentent également des températures optimales de croissance très variées, autour de 30 °C pour les genres *Sulfurimonas*, *Sulfurovum* et *Thioreductor*, contre 55 à 60 °C pour les genres *Caminibacter*, *Hydrogenimonas*, *Lebetimonas* et *Nautilia* (Waite *et al.*, 2017).

Il n'existe pas d'espèces psychrophiles isolées des sources hydrothermales car l'émission du fluide hydrothermal chaud dans l'écosystème augmente la température autour des zones d'émission. Des *Bacteria* proches du genre *Beggiatoa* se développent dans le pôle tempéré des sources hydrothermales, dans les zones d'émission de fluide diffus dont la température est inférieure à 20 °C, et forment des tapis microbiens très denses. Cependant aucun isolat n'a été décrit et les seules informations disponibles proviennent de méthodes indépendantes des techniques culturales (Jannasch *et al.*, 1989, Crepeau *et al.*, 2011). Concernant les espèces se développant dans les gammes de températures plus froides, il s'agit

de *Bacteria* et d'*Archaea* marines, pour lesquelles il est raisonnable de penser que toutes ne sont pas forcément inféodées aux écosystèmes hydrothermaux.

2) Diversité des *Archaea* cultivées

Toutes les souches d'*Archaea* isolées des sources hydrothermales sont des organismes thermophiles dont les températures optimales de croissance sont supérieures à 60 °C (62 °C au minimum pour *Methanothermococcus okinawensis* (Takai *et al.*, 2002)), ou des hyperthermophiles pour lesquels la température de croissance est supérieure à 80 °C. En comparaison aux *Bacteria*, la diversité des *Archaea* isolées de sources hydrothermales est plus faible.

La première *Archaea* hydrothermale isolée et décrite appartient au phylum des *Euryarchaeota*, qui est le phylum comprenant le plus d'espèces. Il s'agit de l'espèce *Methanocaldococcus janaschii*, décrite en 1983 (Kurr *et al.*, 1991) et qui appartient à la classe des *Methanococci*, des *Archaea* méthanogènes thermophiles et hyperthermophiles ne comprenant qu'un ordre. C'est également le cas des *Methanopyri*, représentées par l'espèce *Methanopyrus kandleri* (Kurr *et al.*, 1991). Une classe d'*Archaea* parmi les plus étudiées est celle des *Thermococci*, qui comprend trois genres : *Thermococcus* (Zillig *et al.*, 1983), *Pyrococcus* (Fiala & Stetter, 1986) et *Palaeococcus* (Takai *et al.*, 2000) représentés par respectivement 33, 6 et 3 espèces décrites. Ces trois genres peuvent être différenciés par leurs températures optimales de croissance ; aux alentours de 80 °C pour les *Thermococcus* et *Palaeococcus*, et 95 °C pour les *Pyrococcus* (Schut *et al.*, 2014). La classe des *Archaeoglobi* comprend également trois genres thermophiles et hyperthermophiles, *Archaeoglobus* (Burggraf *et al.*, 1990), *Geoglobus* (Kashefi *et al.*, 2002) et *Ferroglobus* (Hafenbradl *et al.*, 1996). Bien que la seule espèce de ce dernier genre ait été isolée d'une source hydrothermale côtière, des phylotypes proches ont déjà été détectés et enrichis à partir d'échantillons hydrothermaux océaniques profonds (Callac *et al.*, 2015). Un isolat décrit mais dont la taxonomie n'est pas officiellement établie, *Aciduliprofundum boonei*, est la première souche thermo-acidophile isolée d'une cheminée hydrothermale (température et pH optimaux de croissance 70 °C et 4,5) (Reysenbach *et al.*, 2006). Cette souche pourrait appartenir à la lignée des DHVE-2 (Deep-Sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotic group 2) parmi la classe des *Thermoplasmata* (Takai & Horikoshi, 1999).

Le second phylum d'*Archaea* cultivées vivant dans les écosystèmes hydrothermaux est celui des *Crenarchaeota*, qui comprend la classe des *Thermoprotei*. Un des cinq ordres de cette

classe, les *Desulfurococcales*, est représenté dans ces écosystèmes par plusieurs genres hyperthermophiles avec entre autre les genres *Pyrodictium* (Pley *et al.*, 1991) et *Pyrolobus*, le second comprenant l'espèce *Pyrolobus fumarii* qui est un des organismes les plus thermophiles décrits, avec une température optimale de croissance de 106 °C (Blöchl *et al.*, 1997). Parmi cet ordre on compte également l'espèce *Aeropyrum camini*, qui est la seule *Archaea* isolée d'une source hydrothermale utilisant l'oxygène comme unique accepteur terminal d'électrons (Nakagawa *et al.*, 2004). Un genre de cet ordre, *Ignicoccus* (Huber *et al.*, 2000), est connu pour la symbiose dans laquelle il est impliqué ; en 2002 une co-culture d'une souche du genre *Ignicoccus* et de coques de petite taille a été réalisée (Huber *et al.*, 2002). L'analyse des gènes codant les ARNr 16S de ces petites cellules a montré qu'elles appartenaient à une nouvelle espèce. Le nom *Nanoarchaeum equitans* (**Figure 10**) a été proposé pour nommer cette espèce parmi le phylum *Nanoarchaeota*. Cette lignée semble être présente dans différents habitats à haute température (Hohn *et al.*, 2002).

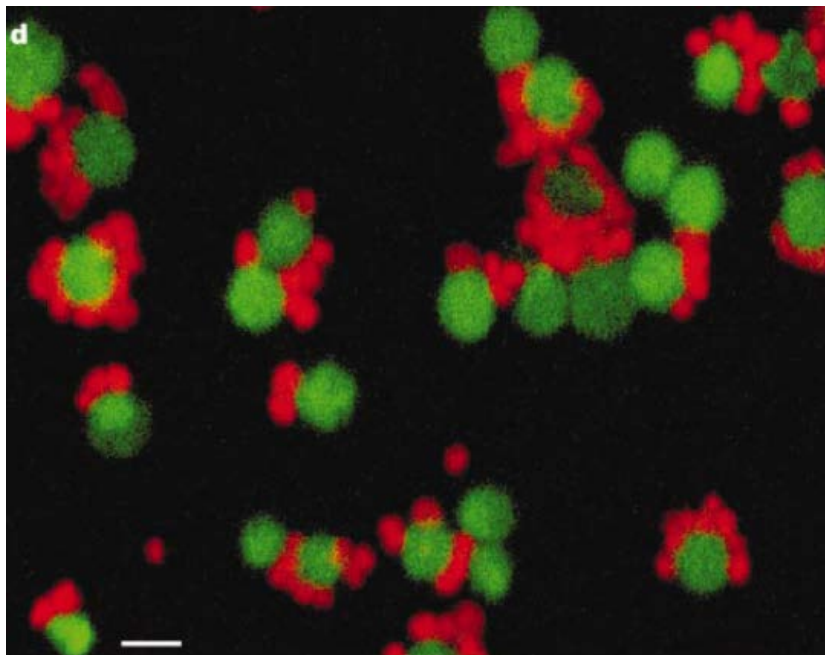


Figure 10 : Image de microscopie en fluorescence de la co-culture de *Nanoarchaeum equitans* (en rouge) et *Ignicoccus* sp. (en vert). Publié par (Huber *et al.*, 2002)

3) Lignées de microorganismes incultivés

Le développement des méthodes moléculaires depuis les années 1990 (Amann *et al.*, 1995) a permis de montrer l'existence de nombreux microorganismes incultivés dans les

écosystèmes hydrothermaux. Les premières lignées incultivées ont été détectées par des études moléculaires ciblant les gènes codant les ARNr 16S, comme les DHVE (Deep-Sea Hydrothermal Vent Euryarchaeota) (Takai & Horikoshi, 1999). Cependant, ces méthodes basées sur l'amplification de gènes requièrent l'utilisation d'amorces spécifiques à ces gènes, qui sont mises au point à partir des séquences génétiques des taxa cultivés. Ainsi, les taxa incultivés dont les gènes présentent trop de divergence avec les gènes des organismes cultivés ne sont pas détectés par les amorces classiques (Teske & Sørensen, 2008).

Les techniques de métagénomique, qui ne sont pas basées sur l'amplification de gènes spécifiques par PCR, permettent d'éviter ces biais et de détecter un plus grand nombre de taxa. De plus, les génomes assemblés à partir de métagénomiques (MAGs) apportent des informations putatives sur la physiologie, le métabolisme et l'écologie de ces organismes (Adam *et al.*, 2017). Cela permet également de mieux déterminer leur position phylogénétique en utilisant des gènes concaténés, ce qui est plus précis que l'utilisation de gènes seuls comme les gènes codant les ARNr 16S (Hug *et al.*, 2016, Schulz *et al.*, 2017, Spang *et al.*, 2017).

Actuellement le domaine des *Archaea* est représenté par 6 phyla cultivés. Les techniques moléculaires ont permis de compléter l'arbre phylogénétique des *Archaea* en proposant 21 phyla potentiels (Baker *et al.*, 2020). Entre les premières études qui ont détecté ces organismes à partir de séquences de gènes codant les ARNr 16S et les études de métagénomique qui ont proposé des classifications taxonomiques, les noms de ces groupes et leur taxonomie ont été remaniés plusieurs fois et ne font pas toujours consensus. Les phyla proposés ont récemment été regroupés en superphyla afin de clarifier la taxonomie. Ainsi, d'après la taxonomie proposée par Baker *et al.* (Baker *et al.*, 2020), le superphylum des DPANN (Rinke *et al.*, 2013) regroupe les phyla des *Micrarchaeota*, *Parvarchaeota*, *Pacearchaeota*, *Aenigmarchaeota*, *Diapherotites*, *Woesearchaeota*, *Altiarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Nanohaloarchaeota* et les *Huberarchaeota*. Le superphylum TACK (Guy & Ettema, 2011) regroupe les *Korarchaeota*, *Vertraetearchaeota*, *Nezhaarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Aigarchaeota*, *Thaumarchaeota*, *Bathyarchaeota*, *Geothermarchaeota*, *Geoarchaeota* et *Marsarchaeota*, et le superphylum Asgard (Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017) comprend les *Lokiarchaeota*, *Thorarchaeota*, *Odinarchaeota*, *Heimdallarchaeota* et les *Helarchaeota*.

Le nombre de lignées de *Bacteria* connues a aussi fortement augmenté avec l'apport des informations génomiques sur les lignées incultivées, qui constituent le «Candidate Phyla Radiation» ou CPR (Brown *et al.*, 2015). Parmi cet important groupe on peut citer les lignées majoritaires que sont les *Microgenomates* (anciennement la lignée OP11 pour «Obsidian

Pool », le nom de la source chaude du parc de Yellowstone où ce groupe a été détecté en premier) (Hugenholtz *et al.*, 1998, Harris *et al.*, 2004) et les *Parcubacteria* (anciennement OD1 pour « OP11-derived 1 ») (Harris *et al.*, 2004). Ces deux lignées pourraient être chacune composées de respectivement plus de 60 et 120 phyla, pour un total de plus de 250 phyla parmi la division des CPR en comptant les autres lignées (Brown *et al.*, 2015). Cette diversité de *Bacteria* incultivée est donc très importante en comparaison du nombre de phyla bactériens validés et de phyla candidats (respectivement plus de 30 et plus de 60).

Bien qu'il soit difficile de faire des inférences sur les traits physiologiques d'un organisme à partir d'informations génomiques, il a été démontré chez des souches isolées que le contenu en bases G et C des gènes codant les ARN ribosomiaux était corrélé avec leur température optimale de croissance (Galtier & Lobry, 1997). Ainsi une gamme de température de croissance a été proposée pour plusieurs lignées incultivées à partir des génomes disponibles, et certaines lignées sont considérées comme thermophiles ou hyperthermophiles. Cela concerne des *Archaea* comme les *Korarchaeota*, *Aigarchaeota*, *Aenigmarchaeota* et les *Hydrothermarchaeota* ainsi que des *Bacteria* comme les *Parcubacteria*, *Microgenomates* et les *Acetothermia* (Auchtung *et al.*, 2006, Hedlund *et al.*, 2015).

La présence de gènes de fonctions dans les génomes assemblés à partir de métagénomes peuvent également apporter des informations putatives concernant le métabolisme des lignées incultivées. Dans certains cas, des cartes métaboliques précises ont été reconstituées, notamment chez les *Diapherotites* et les *Woesearchaeota* et des interactions entre les différentes lignées ont été proposées entre les DPANN et les CPR (Castelle *et al.*, 2015, Castelle *et al.*, 2018). Ainsi les informations apportées peuvent permettre de mieux comprendre le fonctionnement général de l'écosystème, en déterminant la contribution des microorganismes incultivés dans les cycles biogéochimiques. Par exemple de nombreux organismes incultivés sont potentiellement impliqués dans les cycles du carbone, du soufre et de l'hydrogène (Wrighton *et al.*, 2012, Dombrowski *et al.*, 2017, Anantharaman *et al.*, 2018).

L'analyse des nombreux génomes des lignées DPANN et CPR reconstruits à partir de métagénomes a montré que ces organismes possédaient généralement des génomes de petite taille (en moyenne inférieure à 1 Mb), comparable aux génomes de microorganismes symbiotiques connus (Wrighton *et al.*, 2012, Brown *et al.*, 2015, Castelle *et al.*, 2015, Nelson & Stegen, 2015, Castelle *et al.*, 2018). De plus, les cellules de certains de ces organismes sont également de petite taille, ce qui semble indiquer un mode de vie symbiotique (Brown *et al.*,

2015, Castelle *et al.*, 2015, Luef *et al.*, 2015) comme c'est le cas chez les *Nanoarchaeota* (Huber *et al.*, 2002, Wurch *et al.*, 2016).

Cependant la plupart des informations concernant ces lignées restent hypothétiques car tant que les techniques actuelles ne permettent pas de les cultiver ou du moins de les enrichir, il n'est pas possible d'affirmer que ces organismes pratiquent ou non certaines réactions métaboliques en se basant uniquement sur la présence ou l'absence de certains gènes. Par exemple il a été montré que la réversibilité de certaines enzymes, notamment celles impliquées dans l'oxydation ou la réduction des composés soufrés, pouvait mener à des conclusions erronées si l'on se base uniquement sur des informations génomiques (Crane, 2019). Il est donc indispensable de poursuivre les efforts de culture afin de mieux connaître le mode de vie des organismes actuellement incultivés.

4) Adaptation aux conditions de fortes pression et température

Dans les environnements où la température est relativement élevée, comme dans les zones des sources hydrothermales océaniques profondes et les environnements géothermaux, de nombreux composants cellulaires des microorganismes mésophiles sont instables tandis que les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles produisent des molécules qui restent fonctionnelles à haute température (Stetter, 1999, Madigan *et al.*, 2010). C'est le cas notamment des lipides membranaires dont la fluidité augmente avec la température. Chez les *Archaea*, dont de nombreux représentants cultivés sont des hyperthermophiles, les liaisons esters de lipides sont remplacées par des liaisons éthers plus stables à haute température. Concernant les protéines, elles sont généralement dénaturées à haute température et deviennent non fonctionnelles. Les microorganismes hyperthermophiles produisent des enzymes dont les structures primaires sont assez similaires à celles des mésophiles. Elles comportent cependant quelques différences modifiant leur structure secondaire, qui leur confèrent une meilleure stabilité à haute température. De plus, de nombreuses « heat-shock proteins », des protéines chaperonnes, sont produites afin de préserver les autres protéines de la dénaturation thermique (Phipps *et al.*, 1993). Les hyperthermophiles possèdent également plusieurs mécanismes de réparation et de protection de l'ADN, dont une enzyme qui leur est spécifique, la reverse gyrase. Contrairement à la gyrase des autres microorganismes qui provoque un surenroulement négatif de l'ADN, la reverse gyrase des hyperthermophiles provoque un surenroulement positif qui stabilise la structure de l'ADN à haute température (De La Tour *et al.*, 1990).

La pression hydrostatique est un autre paramètre physique qui influence la distribution des microorganismes en milieu océanique. Elle augmente proportionnellement avec la profondeur, à raison de 0,1 MPa (environ la pression atmosphérique) pour 10 mètres de profondeur. Tout comme la température, la pression impacte différents composants et processus cellulaires, notamment la structure des protéines, l'assemblage des protéines multimériques, la motilité et la traduction des ARNm en protéines. Contrairement à la température, une augmentation de la pression diminue la fluidité des membranes (Oger & Jebbar, 2010). Bien que la plupart des microorganismes connus soient sensibles à la pression et présentent un taux de croissance qui diminue avec l'augmentation de la pression (piézosensibles et piézorésistants), certains organismes isolés de l'océan profond présentent une pression optimale de croissance supérieure à la pression atmosphérique ; ils sont dits piézophiles. C'est le cas notamment de *Thermococcus piezophilus* dont la pression optimale de croissance est de 50 MPa (Dalmaso *et al.*, 2016). Les microorganismes qui se développent uniquement dans une gamme de pression supérieure à la pression atmosphérique sont dits piézophiles stricts comme *Pyrococcus yayanosii* (Yayanos *et al.*, 1979, Yayanos, 1995, Birrien *et al.*, 2011).

Ces organismes présentent plusieurs adaptations, notamment une plus forte proportion d'acides gras insaturés dans les membranes cellulaires, l'accumulation d'osmolytes et l'expression de gènes spécifiques (des gènes présents uniquement dans le génome des microorganismes piézophiles, ou exprimés uniquement dans des conditions de forte pression) (Simonato *et al.*, 2006, Oger & Jebbar, 2010, Picard & Daniel, 2013).

Les températures et pressions optimales de croissance des microorganismes sont cohérentes avec les environnements d'où ils ont été isolés : les souches provenant des zones sédimentaires de suintements froids de l'océan profond sont piézophiles et psychrophiles, tandis que les souches piézophiles des sources hydrothermales océaniques profondes sont mésophiles ou thermophiles (Picard & Daniel, 2013).

2) Diversité métabolique

1) Présentation des différents types métaboliques

Les différents métabolismes pratiqués par les microorganismes sont définis d'après la source d'énergie, les donneurs d'électrons et la source de carbone qu'ils utilisent. Il existe deux sources d'énergie potentielles : lumineuse ou chimique. Les écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds étant localisés dans la zone aphotique des océans, qui ne reçoit pas de lumière, les microorganismes qui y vivent appartiennent exclusivement à la deuxième catégorie, et sont qualifiés de chimiotrophes.

Les chimiotrophes sont séparés en deux catégories selon les donneurs d'électrons qui leur fournissent l'énergie chimique nécessaire à l'anabolisme : les chimiolithotrophes, qui oxydent des composés minéraux inorganiques comme source d'électrons et les chimioorganotrophes qui oxydent des molécules organiques. Lorsque la source de carbone est inorganique (majoritairement du CO₂ dissous sous forme de bicarbonate) on qualifie le type trophique d'autotrophie, à l'inverse de l'hétérotrophie où la source de carbone est organique.

Les producteurs primaires des écosystèmes hydrothermaux sont des microorganismes autotrophes chimiolithotrophes qui fixent le bicarbonate dissous dans l'eau, et l'énergie utilisée pour leur anabolisme est produite par l'oxydation des composés réduits du fluide hydrothermal. Les hétérotrophes chimioorganotrophes à l'inverse ont besoin de molécules organiques comme sources de carbone et d'énergie. Celles-ci peuvent être produites de manière abiotique lors de la formation du fluide hydrothermal, ou proviennent de la production biotique par les chimioautolithoautotrophes. Une troisième catégorie, les hétérotrophes chimiolithotrophes présentent un métabolisme mixte et sont capables d'utiliser une source de carbone organique, tout en oxydant des composés inorganiques.

De nombreux microorganismes sont capables de pratiquer plusieurs métabolismes : on qualifie de mixotrophes ceux qui sont capables d'incorporer du carbone organique ou inorganique. Il existe ainsi une grande diversité de métabolismes car dans chaque type trophique (autotrophe ou hétérotrophe), plusieurs couples de donneurs (H₂, H₂S, S⁰, S₂O₃²⁻, Fe²⁺...) et d'accepteurs d'électrons (O₂, NO₃⁻, SO₄²⁻, S⁰...) peuvent être utilisés selon la disponibilité en substrats. Lorsque l'accepteur terminal d'électrons est exogène, il s'agit d'un métabolisme respiratoire qui est qualifié d'aérobie si l'accepteur est l'oxygène, ou d'anaérobie dans les autres cas. A la suite de l'oxydation de matière organique, si l'accepteur terminal d'électrons n'est pas exogène mais est une molécule dérivée de la matière organique consommée, il s'agit d'une fermentation.

Les donneurs et accepteurs d'électrons les plus communément utilisés par les microorganismes isolés de sources hydrothermales sont présentés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Donneurs et accepteurs d'électrons utilisés par les genres isolés de sources hydrothermales. Les genres sont groupés selon leur température optimale de croissance ($> 80\text{ }^{\circ}\text{C}$: hyperthermophiles ; $60 - 80\text{ }^{\circ}\text{C}$: thermophiles ; $30 - 60\text{ }^{\circ}\text{C}$: mésophiles). (sp) : seulement certaines espèces du genre pratiquent la réaction ; (M) : certaines souches sont mixotrophes et utilisent de la matière organique pour leur croissance ; (H) : utilise un donneur d'électrons inorganique mais une source de carbone minérale ; (F) : réalise une fermentation mais est aussi capable d'utiliser un accepteur d'électrons inorganique ; (CO) : est aussi capable d'oxyder du monoxyde de carbone. Les informations présentées dans ce tableau sont basées sur une liste regroupant les souches isolées et décrites ainsi que leurs caractéristiques métaboliques et leur température optimale de croissance. Cette liste a été réalisée et mise à jour par plusieurs anciens doctorants du LM2E et est présentée dans la thèse de Cécile Dalmasso (Dalmasso, 2016).

Donneurs d'électrons	Accepteurs d'électrons	Genres hyperthermophiles	Genres thermophiles	Genres mésophiles
Matière organique (aussi utilisée comme source de carbone)	Soufre	<i>Thermococcus</i> , <i>Palaeococcus</i> (F), <i>Pyrococcus</i> , <i>Pyrodictum</i> (sp, F)	<i>Aciduliprofundum</i> , <i>Marinitoga</i> , <i>Mesoaciditoga</i> , <i>Kosmotoga</i> , <i>Thermotomaculum</i> , <i>Thermosipho</i> , <i>Oceanithermus</i> , <i>Anoxybacter</i> (F), <i>Tepidibacter</i> (F), <i>Deferriroma</i> , <i>Hippea</i>	<i>Marinitoga</i> , <i>Mesoaciditoga</i> , <i>Thermotomaculum</i> , <i>Deferriroma</i> , <i>Nautilia</i> (sp)
	Sulfate	<i>Archaeoglobus</i> (sp)	<i>Palaeococcus</i> (sp, F), <i>Desulfothermus</i>	<i>Desulfovibrio</i>
	Nitrate	-	<i>Vulcanibacillus</i> , <i>Piezobacter</i> , <i>Geothermobacter</i> , <i>Alcanivorax</i> (F) <i>Oceanithermus</i>	<i>Exiguobacterium</i> , <i>Janibacter</i> , <i>Kribbella</i> , <i>Brevihabidus</i> , <i>Fulvimarina</i> , <i>Vulcanibacillus</i> , <i>Geothermobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas</i>
	Fer ferrique	-	<i>Aciduliprofundum</i> , <i>Anoxybacter</i> (F), <i>Caloranaerobacter</i> (F), <i>Thermosipho</i> (sp), <i>Deferriroma</i> , <i>Geothermobacter</i>	<i>Wukongibacter</i> , <i>Deferriroma</i> , <i>Geothermobacter</i>

Donneurs d'électrons	Accepteurs d'électrons	Genres hyperthermophiles	Genres thermophiles	Genres mésophiles
Matière organique (aussi utilisée comme source de carbone)	Fermentation	<i>Thermococcus</i> , <i>Pyrococcus</i>	<i>Caloranaerobacter</i> , <i>Caminiella</i> , <i>Thermosiphon</i> , <i>Carboxydobrachium</i> (CO), <i>Marinitoga</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Exilispira</i>	<i>Abyssivirga</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Crossaminicella</i> , <i>Exiguobacterium</i> , <i>Tepidibacter</i> , <i>Vallitalea</i> , <i>Wukongibacter</i> , <i>Marinitoga</i> , <i>Mesoaciditoga</i> , <i>Thermotomaculum</i> , <i>Caminiella</i> , <i>Vulcanibacillus</i> , <i>Exilispira</i> , <i>Piezobacter</i> , <i>Klebsiella</i>
	Oxygène	<i>Aeropyrum</i>	<i>Marinithermus</i> , <i>Oceanithermus</i> , <i>Rhabdothermus</i> , <i>Thermus</i> , <i>Vulcanithermus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Geobacillus</i> , <i>Rhodothermus</i> , <i>Piezobacter</i>	<i>Lutibacter</i> , <i>Pontibacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Exiguobacterium</i> , <i>Janibacter</i> , <i>Kribbella</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Brevirhabdus</i> , <i>Citromicrobium</i> , <i>Defluviimonas</i> , <i>Fulvimarina</i> , <i>Glycocaulis</i> , <i>Methyloceanibacter</i> , <i>Oceanibaculum</i> , <i>Parvibaculum</i> , <i>Salipiger</i> , <i>Thioclava</i> , <i>Alteromonas</i> , <i>Amphritea</i> , <i>Halomonas</i> , <i>Idiomarinus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Alteromonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Psychrobium</i> , <i>Salinisphaera</i> , <i>Vibrio</i>

Donneurs d'électrons	Accepteurs d'électrons	Genres hyperthermophiles	Genres thermophiles	Genres mésophiles
Hydrogène	Soufre	<i>Ignicoccus</i> , <i>Pyrodictium</i> (sp, H), <i>Methanocaldococcus</i> , <i>Methanococcus</i>	<i>Persephonella</i> (sp), <i>Balnearium</i> , <i>Desulfurobacterium</i> (sp), <i>Phorcysia</i> , <i>Thermosulfidibacter</i> , <i>Thermovibrio</i> , <i>Deferribacter</i> (M), <i>Hippea</i> , <i>Hydrogenimonas</i> , <i>Caminibacter</i> (M), <i>Cetia</i> , <i>Lebetimonas</i> , <i>Nautilia</i>	<i>Desulfonauticus</i> , <i>Cetia</i> , <i>Hydrogenimonas</i> , <i>Lebetimonas</i> , <i>Nautilia</i> , <i>Sulfurovum</i> , <i>Thioreductor</i> , <i>Thiofractor</i>
	Thiosulfate	<i>Pyrolobus</i> , <i>Archaeoglobus</i> (sp)	<i>Desulfurobacterium</i> (sp), <i>Nautilia</i> (sp)	<i>Desulfonauticus</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Nautilia</i> , <i>Sulfurovum</i>
	Sulfate	<i>Archaeoglobus</i> (M)	<i>Desulfurobacterium</i> (sp), <i>Thermodesulfatator</i> (M), <i>Thermodesulfobacterium</i>	<i>Desulfonauticus</i> , <i>Desulfovibrio</i>
	Sulfite	<i>Archaeoglobus</i> (sp, M)	-	<i>Desulfonauticus</i> , <i>Desulfovibrio</i>
	Nitrate	<i>Pyrodictium</i> (sp), <i>Pyrolobus</i>	<i>Desulfurobacterium</i> (sp), <i>Persephonella</i> , <i>Phorcysia</i> , <i>Thermovibrio</i> , <i>Calditrix</i> (M), <i>Oceanithermus</i> (sp, M), <i>Vulcanithermus</i> (H), <i>Deferribacter</i> (M), <i>Piezobacter</i> , <i>Hydrogenimonas</i> , <i>Nitratiruptor</i> , <i>Caminibacter</i> (M), <i>Cetia</i> , <i>Lebetimonas</i> (sp), <i>Nautilia</i> (sp)	<i>Piezobacter</i> , <i>Cetia</i> , <i>Hydrogenimonas</i> , <i>Lebetimonas</i> , <i>Sulfurimonas</i> (sp), <i>Sulfurovum</i> , <i>Thioreductor</i>
Fer ferrique	<i>Pyrodictium</i> (sp), <i>Geoglobus</i> (M)	<i>Deferribacter</i> (M)		
Dioxyde de carbone	<i>Methanocaldococcus</i> , <i>Methanococcus</i> , <i>Methanopyrus</i>	<i>Methanothermococcus</i> , <i>Methanotorris</i>		
Oxygène	<i>Pyrolobus</i>	<i>Persephonella</i> , <i>Vulcanithermus</i> (H), <i>Piezobacter</i> , <i>Hydrogenimonas</i> , <i>Nitratiruptor</i>	<i>Thiobacillus</i> , <i>Hydrogenimonas</i> , <i>Sulfurimonas</i> (sp)	

Donneurs d'électrons	Accepteurs d'électrons	Genres hyperthermophiles	Genres thermophiles	Genres mésophiles
Soufre	Dismutation	-	<i>Thermosulfurimonas</i> , <i>Thermosulfuriphilus</i> , <i>Dissulfuribacter</i>	
	Nitrate	-	<i>Hydrogenivirga</i> , <i>Thermosulfuriphilus</i> , <i>Piezobacter</i> , <i>Thioprofundum</i>	<i>Piezobacter</i> , <i>Thiolapillus</i> , <i>Thioprofundum</i> , <i>Sulfurimonas</i> (sp), <i>Sulfurovum</i>
	Oxygène	-	<i>Hydrogenivirga</i> , <i>Persephonella</i> , <i>Piezobacter</i> , <i>Thioprofundum</i>	<i>Thiobacillus</i> , <i>Thiogramum</i> , <i>Thiolapillus</i> , <i>Thiomicrospira</i> , <i>Thioprofundum</i> , <i>Sulfurimonas</i> (sp), <i>Sulfurovum</i>
Thiosulfate	Dismutation	-	<i>Thermosulfuriphilus</i> , <i>Dissulfuribacter</i>	
	Nitrate	-	<i>Hydrogenivirga</i> , <i>Piezobacter</i> , <i>Thioprofundum</i>	<i>Piezobacter</i> , <i>Thiolapillus</i> , <i>Thioprofundum</i> , <i>Sulfurimonas</i> (sp), <i>Sulfurovum</i>
	Oxygène	-	<i>Hydrogenivirga</i> , <i>Persephonella</i> , <i>Piezobacter</i> , <i>Thioprofundum</i>	<i>Piezobacter</i> , <i>Thiobacillus</i> , <i>Salinisphaera</i> , <i>Thiogramum</i> , <i>Thiolapillus</i> , <i>Thiomicrospira</i> , <i>Thioprofundum</i> , <i>Sulfurimonas</i> , <i>Sulfurovum</i>
Sulfite	Dismutation	-	<i>Thermosulfuriphilus</i> , <i>Dissulfuribacter</i>	-

2) Les cycles biogéochimiques

Les molécules qui servent de sources de carbone, de donneurs ou d'accepteurs d'électrons dans les métabolismes microbiens font partie des cycles biogéochimiques. Au cours de ces cycles, les éléments chimiques (carbone, azote, hydrogène, soufre, fer...) sont associés à des molécules organiques ou minérales que les microorganismes utilisent et modifient au cours de leur métabolisme. Les réactions métaboliques impliquées dans ces cycles sont présentées dans les sections suivantes.

Métabolismes du carbone

Les réactions métaboliques catalysées par les microorganismes pour dégrader la matière organique sont au cœur du cycle du carbone (**Figure 11**). En consommant des molécules carbonées, les microorganismes hétérotrophes minéralisent le carbone de la matière organique sous forme de CO₂ inorganique. Les molécules organiques peuvent être de différents types : glucides (simples ou complexes), lipides, protéines, ou des acides organiques (acétate, lactate...). Différents accepteurs d'électrons peuvent être utilisés lors de l'oxydation de la matière organique (principalement soufre, sulfate, nitrate, fer ferrique et oxygène).

Les microorganismes hyperthermophiles hétérotrophes isolés de sources hydrothermales sont peu nombreux, ils appartiennent uniquement au domaine des *Archaea* et utilisent un nombre limité d'accepteurs d'électrons. Des organismes caractéristiques sont les représentants des genres *Thermococcus*, *Pyrococcus* et *Palaeococcus* de la classe des *Thermococcales*. Ils pratiquent des métabolismes hétérotrophes en oxydant différents types de molécules carbonées (protéines, acides organiques, glucides...) soit par fermentation, avec production d'H₂ et de CO₂, soit en réduisant le soufre élémentaire en H₂S. Cette voie métabolique alternative évite l'accumulation d'H₂, qui limite leur croissance lorsque la concentration est trop élevée (Bertoldo & Antranikian, 2006, Schut *et al.*, 2014). Plusieurs espèces des genres *Archaeoglobus* et *Geoglobus* (Stetter, 1988, Kashefi *et al.*, 2002) sont mixotrophes et se développent en oxydant des acides organiques (lactate, acétate, pyruvate...) et en réduisant les sulfates, bien que ces genres soient principalement hydrogénotrophes. Seule l'espèce *Aeropyrum camini* (Nakagawa *et al.*, 2004) oxyde la matière organique et réduit l'oxygène à haute température.

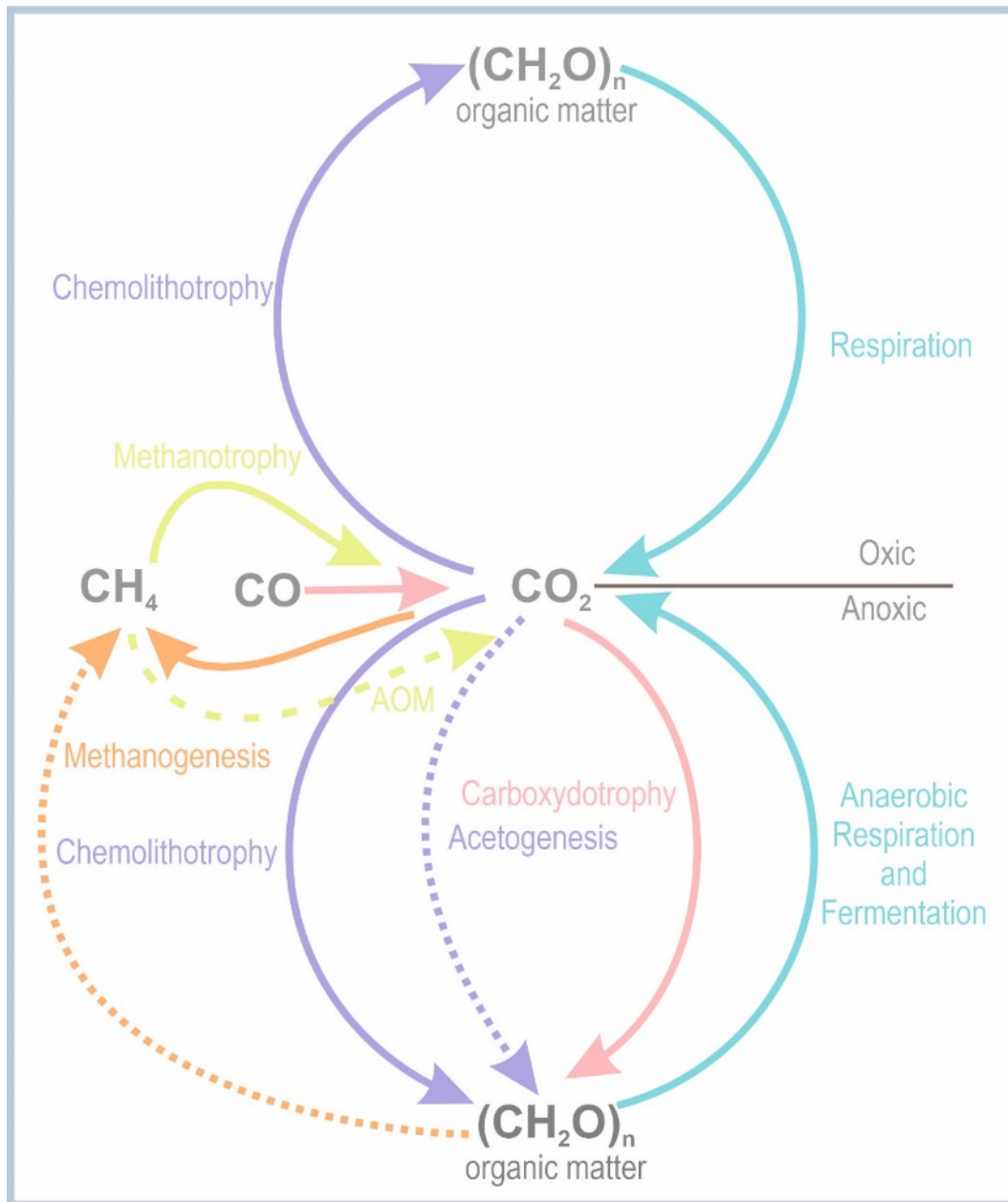


Figure 11 : Réactions métaboliques du cycle du carbone. Les flèches pleines indiquent un métabolisme pratiqué par des microorganismes isolés de sources hydrothermales. Les flèches en pointillés (...) indiquent des métabolismes pour lesquels il n'existe aucun représentant cultivé, et les pointillés (---) ceux pour lesquels des signatures moléculaires ou des mesures d'activité ont mis en évidence leur possible existence. Publié par (Godfroy et al., in press) d'après (Madigan et al., 2010).

La respiration aérobie est cependant très répandue parmi les *Bacteria* mésophiles et thermophiles. C'est le cas de nombreux genres notamment parmi les *Actinobacteria* (*Janibacter*, *Kribella*, *Rhodococcus*, *Kocuria*), les *Deinococci* (*Marinithermus*, *Oceanithermus*, *Rhabdothermus*, *Vulcanithermus*), les *Alphaproteobacteria* (*Brevirhabdus*,

Defluviimonas, *Citromicrobium*, *Fulvimarinas*, *Glycocaulis*, *Methyloceanibacter*, *Oceanibaculum*, *Parvibaculum*, *Salipiger*, *Thioclava*) et les *Gammaproteobacteria* (*Alteromonas*, *Amphritrea*, *Halomonas*, *Idiomarina*, *Klebsiella*, *Psychrobium*). Plusieurs de ces genres sont anaérobies facultatifs et peuvent se développer en anaérobiose en réduisant les nitrates, ou par fermentation comme certaines *Clostridia* (*Abyssivirga*, *Anoxybacter*, *Caminicella*, *Carboxydobrachium*, *Clostridium*, *Caminicella*, *Vallitalea*). Les métabolismes hétérotrophes anaérobies impliquant d'autres accepteurs d'électrons inorganiques sont détaillés ci-dessous dans les sections correspondantes.

A l'inverse des métabolismes hétérotrophes qui minéralisent le carbone, les métabolismes autotrophes permettent de produire de la matière organique à partir du carbone minéral. Ce processus peut être réalisé par différentes voies de fixation du carbone comme le cycle de Calvin ou le cycle rTCA (reductive Tricarboxylic Acid), qui sont les deux cycles les plus pratiqués par les microorganismes autotrophes dans les écosystèmes hydrothermaux (Hügler & Sievert, 2011, Mangiapia & Scott, 2016). Les autres voies de fixation du carbone utilisées par les microorganismes des sources hydrothermales sont la voie de Wood-Ljungdahl et le cycle du dicarboxylate/4-Hydroxybutyrate (DC/4-HB) (Nakagawa & Takai, 2008). L'énergie n'étant pas apportée par la source de carbone comme c'est le cas pour les hétérotrophes, il est alors nécessaire aux microorganismes d'utiliser une source d'énergie inorganique, sous forme de molécules réduites qui servent de donneurs d'électrons.

La carboxydrotrophie est un métabolisme autotrophe dans lequel le monoxyde de carbone (CO) sert à la fois de source de carbone et d'énergie, lors de son oxydation qui produit du dioxyde de carbone et de l'hydrogène. Elle est pratiquée par *Carboxydobrachium pacificum* (Sokolova *et al.*, 2001) une *Clostridia* thermophile anaérobie en autotrophie. Plusieurs isolats du genre *Thermococcus* utilisent également le monoxyde de carbone comme donneur d'électrons pour produire de l'énergie, mais nécessitent néanmoins une source de carbone organique (Sokolova *et al.*, 2004, Kozhevnikova *et al.*, 2016). Une étude métagénomique ciblant les *Hydrothermarchaeota*, des *Archaea* incultivées, indique que des représentants de cette lignée peuvent pratiquer un métabolisme carboxydrotrophe (Adam *et al.*, 2018).

La méthanogénèse est un métabolisme important du cycle du carbone, dont le principal produit métabolique est le méthane. Bien qu'il existe plusieurs voies de méthanogénèse (Evans *et al.*, 2019), seule la voie de la méthanogénèse hydrogénotrophe est réalisée par les

microorganismes isolés de sources hydrothermales. Ce métabolisme est donc décrit dans la section suivante, qui concerne les métabolismes de l'hydrogène.

Les deux derniers métabolismes impliqués dans le cycle du carbone présentés dans la figure (**Figure 11**) sont la méthanotrophie aérobie et l'AOM (Anaerobic Oxidation of Methane). L'oxydation aérobie du méthane est pratiquée par des *Bacteria*, mais actuellement aucune souche pratiquant cette réaction n'a été isolée de sources hydrothermales. Des mesures d'activité réalisées sur des sites hydrothermaux, comme Rainbow (Pimenov *et al.*, 2000) montrent que cette réaction est réalisée dans ces écosystèmes par des microorganismes vivant en symbiose avec des animaux (Duperron *et al.*, 2006, Zbinden *et al.*, 2008). Il en est de même pour l'AOM ; aucun microorganisme pratiquant cette réaction n'a été isolé. Les organismes oxydant le méthane en anaérobiose sont des *Archaea* incultivées appartenant au groupe des ANMEs (Anaerobic Methanotrophic *Archaea*) qui forment des consortia en syntrophie avec des *Deltaproteobacteria* sulfato-réductrices appartenant aux genres *Desulfusarcina*, *Desulfococcus* et *Desulfobulbus* (Caldwell *et al.*, 2008, Knittel & Boetius, 2009, Wegener *et al.*, 2015). Des ANMEs ont cependant été détectées dans des environnements hydrothermaux tels que Lost City et dans le bassin de Guaymas. Des mesures d'activité montrent également que l'AOM est possible à haute température (Brazelton *et al.*, 2006, Biddle *et al.*, 2012).

Métabolismes de l'hydrogène

L'hydrogène est présent dans les fluides hydrothermaux en concentrations variables et peut ainsi être une importante source d'énergie pour les microorganismes autotrophes ou mixotrophes lorsqu'il est suffisamment concentré. C'est le cas, en particulier, dans les sites ultramafiques où la concentration peut atteindre plus de 10 mM (McCollom, 2007, Perner *et al.*, 2010).

L'oxydation de l'H₂ couplée à la réduction du CO₂ peut être réalisée par les organismes acétogènes ou méthanogènes. Actuellement, aucun microorganisme homoacétogène n'a été isolé d'une source hydrothermale, et la méthanogénèse est la seule voie de fixation du carbone avec oxydation d'H₂ sans utilisation d'un autre accepteur d'électrons. Ce métabolisme strictement anaérobie est pratiqué par plusieurs genres d'*Archaea* méthanogènes thermophiles et hyperthermophiles parmi les *Methanococci* (*Methanocaldococcus*, *Methanococcus*, *Methanothermococcus*, *Methanotorris*) et les *Methanopyri* (*Methanopyrus kandleri*).

D'autres *Archaea* hyperthermophiles autotrophes oxydent l'hydrogène, en utilisant différents accepteurs d'électrons. Les composés soufrés, comme le sulfate, le soufre élémentaire et le thiosulfate, peuvent être utilisés par plusieurs genres d'*Archaea* parmi les *Archaeoglobi* (*Archaeoglobus*, *Geoglobus*) dont le second peut aussi réduire le fer ferrique. Les trois composés soufrés cités, ainsi que le sulfite sont utilisés par plusieurs genres de la classe des *Thermoprotei* (*Ignicoccus*, *Pyrodictium*, *Pyrolobus*). Ces deux derniers genres sont également capables d'utiliser du nitrate comme accepteur d'électrons, ainsi que de l'oxygène dans le cas de l'espèce *Pyrolobus fumarii* qui est la seule *Archaea* autotrophe hyperthermophile aérobie facultative décrite (Blöchl *et al.*, 1997).

A des températures légèrement plus basses (60-80 °C) de nombreuses *Bacteria* autotrophes oxydent l'hydrogène, notamment les *Aquificae* (*Balnearium*, *Deuslfurobacterium*, *Hydrogenivirga*, *Persephonella*, *Phorcysia*, *Thermosulfidibacter*, *Thermovibrio*) en utilisant les accepteurs d'électrons cités précédemment (composés soufrés, nitrate, oxygène). La plupart de ces microorganismes sont d'ailleurs capables d'utiliser plusieurs accepteurs d'électrons et font ainsi preuve d'une forte plasticité métabolique. C'est également le cas des *Epsilonbacteraeota* (*Hippea*, *Cetia*, *Hydrogenimonas*, *Caminibacter*, *Lebetimonas*, *Nautilia*, *Sulfurovum*, *Sulfurimonas*, *Thiofractor*, *Thioreductor*) (Waite *et al.*, 2017) qui se développent dans une large gamme de température (30 à 60 °C) en oxydant l'hydrogène en conditions aérobie et/ou anaérobie selon les espèces.

Métabolismes du soufre

Le soufre possédant plusieurs degrés d'oxydation (de +6 pour le sulfate à -2 pour les sulfures), les composés soufrés sont nombreux (S^0 , H_2S , $S_2O_3^{2-}$, SO_4^{2-} , SO_3^- ...) et peuvent être utilisés comme donneurs ou accepteurs d'électrons (**Figure 12**). Ces composés soufrés (soufre élémentaire, thiosulfate, sulfite, hydrogène sulfuré) servent ainsi de source d'énergie à certains microorganismes autotrophes en conditions aérobie ou anaérobie. Certaines *Aquificae* (*Hydrogenivirga*, *Persephonella*) et des *Epsilonbacteraeota* (*Sulfurimonas*, *Sulfurovum*), dont la versatilité du métabolisme a été soulignée dans le paragraphe précédent, sont capables d'oxyder le soufre élémentaire ou le thiosulfate à la place de l'hydrogène avec de l'oxygène ou du nitrate comme accepteurs d'électrons. Plusieurs genres des *Gammaproteobacteria* oxydent également les composés soufrés en réduisant l'oxygène et/ou le nitrate (*Thiogranum*, *Thiolapillus*, *Thiomicrospira*, *Thiopfundum*).

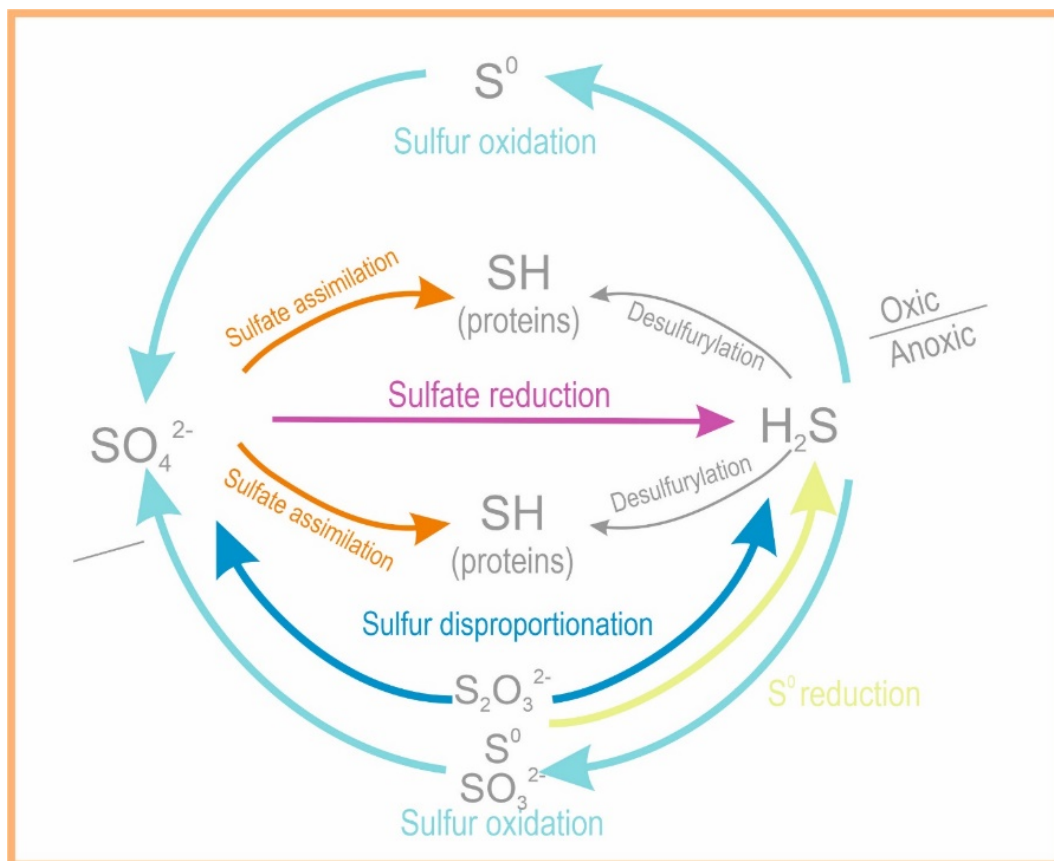


Figure 12 : Réactions métaboliques du cycle du soufre. Les flèches pleines indiquent un métabolisme pratiqué par des microorganismes isolés de sources hydrothermales. Les flèches en pointillés (...) indiquent des métabolismes pour lesquels il n'existe aucun représentant cultivé. Publié par (Godfroy et al., in press) d'après (Madigan et al., 2010).

Il est important de noter qu'actuellement aucune *Bacteria* hyperthermophile ni aucune *Archaea* sulfo-oxydantes n'ont été isolées d'environnements hydrothermaux (**Tableau 1**). Les métabolismes autotrophes d'oxydation des composés soufrés semblent donc avoir lieu uniquement dans les zones de température plus basses (< 80 °C). C'est d'ailleurs le cas des tapis microbiens, composés de *Gammaproteobacteria* filamenteuses sulfo-oxydantes proches des genres *Beggiatoa* et *Thioploca* vivant à basse température au niveau des zones d'émission de fluides diffus (Crepeau et al., 2011).

Ce n'est cependant pas le cas des métabolismes de réduction des composés soufrés, qui ont lieu en anaérobiose sur toute la gamme de température considérée. En effet, les *Archaea* hyperthermophiles décrites précédemment (*Thermococcales*, *Thermoprotei*, certaines *Methanococcales*) sont capables de réduire le soufre élémentaire, le sulfate, le thiosulfate et le

sulfite (*Archaeoglobales*, *Thermoprotei*) en condition anaérobie. C'est également le cas de plusieurs genres hétérotrophes parmi l'ordre bactérien des *Thermotogales* (*Marinitoga*, *Kosmotoga*, *Mesoaciditoga*, *Thermosiphon*) ainsi que les *Aquificae* et *Epsilonbacteraeota* citées précédemment.

La dismutation, ou disproportionation est un procédé métabolique qui permet aux microorganismes qui le pratiquent d'utiliser un même composé soufré comme donneur et accepteur d'électrons. Il en résulte la formation d'une espèce soufrée réduite et une oxydée ; par exemple la dismutation du soufre élémentaire (S^0) produit du sulfate (SO_4^{2-}) et de l'hydrogène sulfuré (H_2S). C'est le cas des genres *Thermosulfurimonas* et *Thermodesulfuriphilus* parmi les *Thermodesulfobacteria*, ou du genre *Dissulfuribacter* parmi les *Deltaproteobacteria*, qui peuvent dismuter le thiosulfate et le sulfite ainsi que le soufre élémentaire pour *Thermosulfurimonas*. Actuellement, les seuls organismes isolés de sources hydrothermales capables de pratiquer la dismutation sont des *Bacteria* thermophiles.

Métabolismes du fer

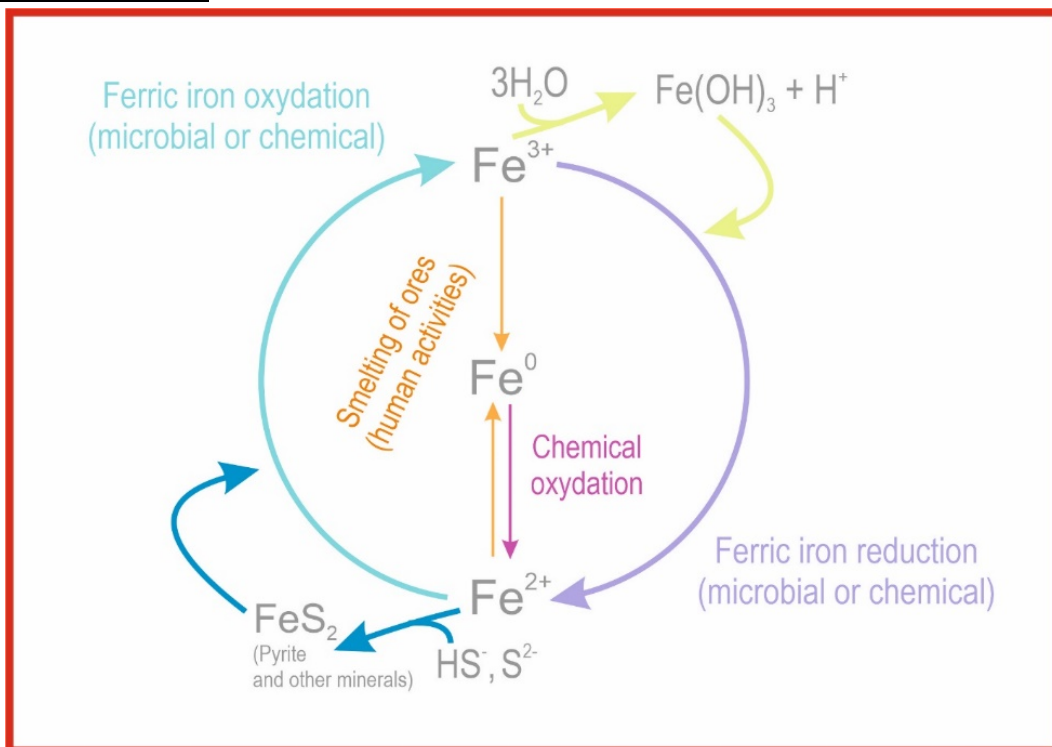


Figure 13 : Réactions métaboliques du cycle du fer. Les flèches pleines indiquent un métabolisme pratiqué par des microorganismes isolés de sources hydrothermales. Publié par (Godfroy et al., in press) d'après (Madigan et al., 2010).

Le fer est présent dans les sources hydrothermales sous forme de minéraux ferreux (pyrite FeS_2 , chalcopryrite CuFeS_2 ...) ou sous forme dissoute à deux états d'oxydation ; le fer ferreux (Fe^{2+}) ou le fer ferrique (Fe^{3+}) qui est la forme la plus oxydée. Selon sa forme, il peut donc servir de donneurs ou d'accepteur d'électrons (**Figure 13**).

Le fer ferrique peut ainsi être réduit par des microorganismes anaérobies répartis dans plusieurs taxa, qui utilisent une source d'électrons organique, comme l'*Archaea* thermoacidophile *Aciduliprofundum boonei*, ou des *Bacteria* thermophiles (*Thermosipho*, *Deferribacteres*, *Anoxybacter*, *Deferrisoma*) et mésophiles (*Wukongibacter*, *Deferrisoma*, *Geothermobacter*). La réduction du fer ferrique peut aussi être couplée à l'oxydation de l'hydrogène dans des métabolismes autotrophes ou mixotrophes, par des *Archaea* hyperthermophiles comme *Pyrodictium delaneyi*, *Geoglobus acetivorans* ainsi que certaines espèces du genre *Thermococcus* et *G. ahangari* et par plusieurs espèces du genre bactérien thermophile *Deferribacter* (Slobodkin *et al.*, 2001).

En milieu hydrothermal, l'oxydation du fer ferreux comme source d'énergie est pratiquée à basse température en microaérophilie par des *Zetaproteobacteria*, dont la première espèce, *Mariprofundus ferrooxydans* a été isolée en 2007 (Emerson *et al.*, 2007). Deux autres représentants de cette classe, *M. micogutta* et *Ghiorsea bivora* pratiquant cette réaction, ont été isolées en 2017 (Makita *et al.*, 2017, Mori *et al.*, 2017). D'autres *Bacteria* mésophiles, communément détectées dans les environnements hydrothermaux, sont capables d'oxyder le fer ferreux ; comme un isolat du genre *Thiomicrospira* (Barco *et al.*, 2017). Cependant aucune espèce de ce genre pratiquant ce métabolisme n'a été isolée de sources hydrothermales océaniques profondes. C'est également le cas de l'*Archaea* hyperthermophile *F. placidus* qui peut oxyder le fer ferreux et réduire le nitrate (Hafenbradl *et al.*, 1996). Cette espèce n'a pas été isolée d'une source hydrothermale profonde mais d'un site côtier. Néanmoins, un phylotype phylogénétiquement proche a été enrichi dans une culture en bioréacteur à partir d'un échantillon de cheminée hydrothermale du Bassin de Guaymas (Callac *et al.*, 2015).

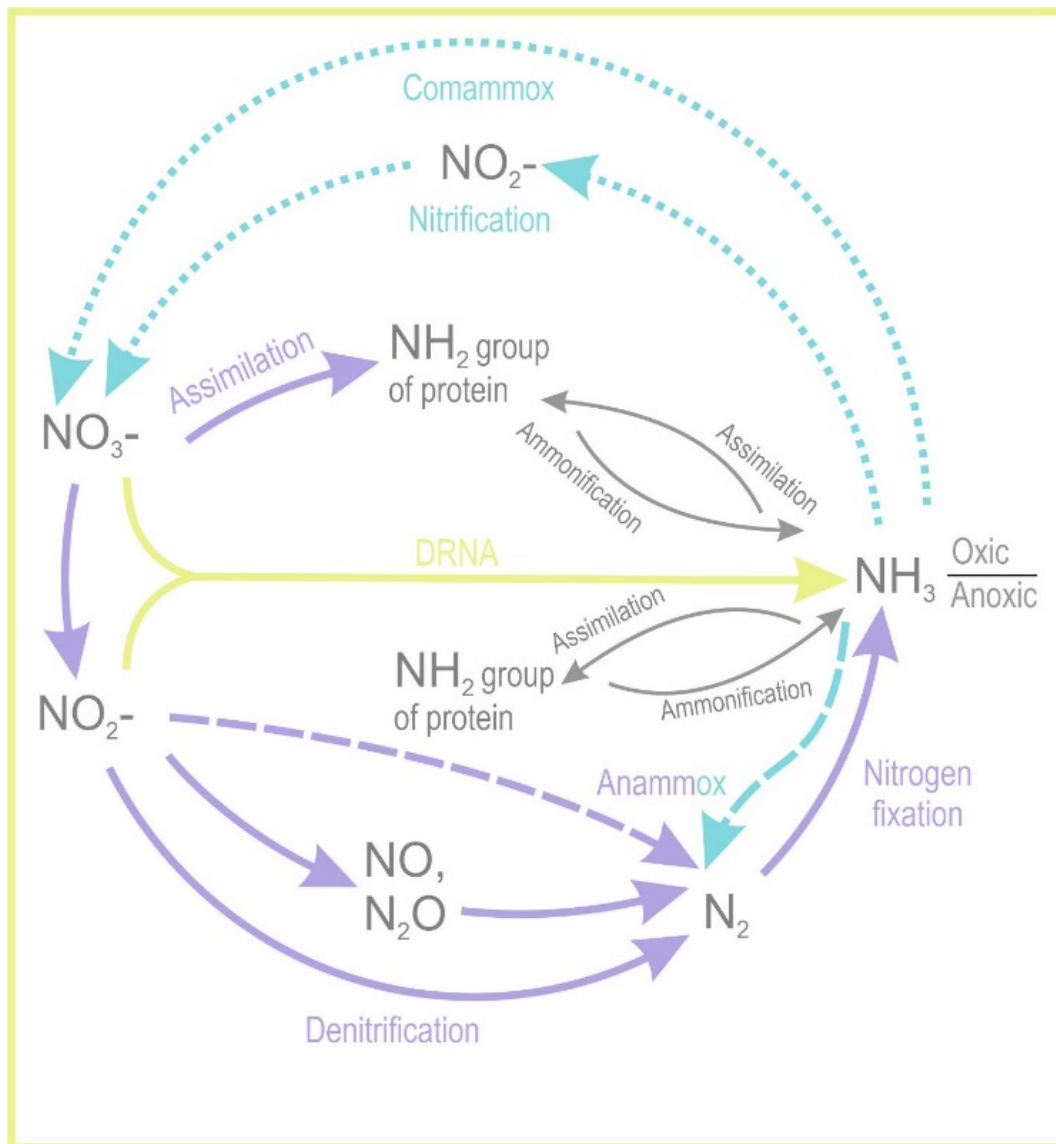


Figure 14 : Réactions métaboliques du cycle de l'azote. Les flèches pleines indiquent un métabolisme pratiqué par des microorganismes isolés de sources hydrothermales. Les flèches en pointillés (...) et les pointillés (---) indiquent les métabolismes pour lesquels des signatures moléculaires ou des mesures d'activité ont mis en évidence leur possible existence. Publié par (Godfroy et al., in press) d'après (Madigan et al., 2010).

De nombreuses réactions impliquant des molécules azotées peuvent être catalysées par les microorganismes (**Figure 14**). L'azote étant un constituant des acides aminés composant les protéines, sa fixation est un processus métabolique important dans un écosystème. Bien que ce métabolisme ait été peu étudié dans les écosystèmes hydrothermaux, il a été démontré qu'une souche d'*Archaea* méthanogène proche de l'espèce *Methanocaldococcus jannashii* était capable de fixer l'azote à haute température ($> 90\text{ °C}$) (Mehta & Baross, 2006). De plus, la

détection des gènes impliqués dans la fixation de l'azote (*nifH*) indique que d'autres microorganismes hydrothermaux peuvent réaliser ce métabolisme (Mehta *et al.*, 2003).

La réduction du nitrate, ou dénitrification, est un métabolisme anaérobie dans lequel le nitrate sert d'accepteur terminal d'électrons et est réduit en nitrite ou en diazote. Comme il a été précisé précédemment, de nombreux microorganismes autotrophes ou hétérotrophes isolés de sources hydrothermales sont capables de pratiquer cette réaction. La plupart de ces organismes sont aéro-anaérobies facultatifs et peuvent utiliser le nitrate comme accepteur d'électrons en anaérobiose ou l'oxygène en conditions aérobies (*Aquificae*, *Epsilonbacteraeota*).

L'oxydation anaérobie de l'ammonium (Anammox) n'est pas réalisée par les microorganismes isolées de sources hydrothermales, mais plusieurs études ciblant des gènes de fonction ou des mesures d'activité ont montré qu'il était probable que des organismes incultivés pratiquent ce métabolisme (Byrne *et al.*, 2009, Russ *et al.*, 2013).

A l'inverse, il n'y a pas d'indices d'oxydation aérobie de l'ammonium en deux étapes (nitrification) ou en une étape (Comammox) dans ces écosystèmes.

Conclusions sur la diversité métabolique des microorganismes hydrothermaux

Pour résumer, les microorganismes isolés d'environnements hydrothermaux présentent des capacités métaboliques variées. Les communautés microbiennes formées par ces espèces sont ainsi capables de catalyser des réactions impliquées dans les grands cycles biogéochimiques. La plupart de ces métabolismes sont liés à plusieurs cycles biogéochimiques à la fois, car ils impliquent l'utilisation de plusieurs éléments (par exemple l'oxydation de l'hydrogène liée à la réduction d'un composé soufré).

Bien que certaines réactions biochimiques ne soient catalysées par aucun isolat des écosystèmes hydrothermaux, il est probable qu'elles puissent être réalisées soit par des organismes actuellement incultivés (comme les ANMEs pour l'oxydation anaérobie du méthane), soit par des organismes vivant dans le pôle froid des écosystèmes, notamment par les microorganismes qui entretiennent une relation symbiotique avec des espèces animales.

A cette importante diversité métabolique est également associée une forte redondance fonctionnelle car de nombreux microorganismes partagent des métabolismes similaires. Dans certains cas, lorsque les organismes se développent dans une même gamme de température, il

s'agit d'une compétition directe car ils utilisent les mêmes substrats et occupent ainsi les mêmes niches écologiques. A l'inverse, des organismes dont la gamme de température de croissance est différente (mésophiles, thermophiles ou hyperthermophiles) pratiquent le même métabolisme. Ainsi la fonction métabolique est assurée dans une large gamme de température. C'est le cas pour de nombreux métabolismes, qui sont réalisés par les *Bacteria* mésophiles ou thermophiles de 30 à 80 °C, et par des *Archaea* hyperthermophiles au-delà de 80 °C.

Cependant, certains métabolismes ne sont pas réalisés à haute température par les organismes isolés. C'est le cas de la réduction du nitrate ou du fer ferrique lors de l'oxydation de la matière organique, et également de tous les processus d'oxydation des composés soufrés, qui ne sont pratiqués par aucun organisme dont la température optimale de croissance est supérieure à 80 °C (**Tableau 1**).

Ces observations peuvent être expliquées par le processus de dilution du fluide hydrothermal et de l'eau de mer. Les donneurs d'électrons étant principalement apportés par le fluide hydrothermal chaud, et les accepteurs d'électrons par l'eau de mer froide, leur disponibilité varie dans le gradient de dilution. Ainsi à certaines températures, tous les substrats ne sont pas disponibles simultanément. La thermodynamique permet de formaliser ce principe par le calcul de l'enthalpie libre des réactions métaboliques pratiquées par les microorganismes (voir partie « Influence de l'environnement sur les communautés microbiennes »).

La plupart des microorganismes hydrothermaux sont adaptés à ces environnements riches en donneurs et accepteurs d'électrons variés et sont capables de pratiquer plusieurs métabolismes. Les exemples les plus communs de la versatilité métabolique sont les phyla des *Epsilonbacteraeota* et des *Aquificae*.

3) Un exemple d'adaptation métabolique et physiologique : les *Aquificota* et le genre *Persephonella*

Le phylum *Aquificota*

Le phylum des *Aquificota* (Whitman *et al.*, 2018), anciennement *Aquificae* (Reysenbach *et al.*, 2001), est représenté par de nombreux isolats provenant d'écosystèmes hydrothermaux ou géothermaux. Lors de sa description en 2001, ce phylum contenait une famille, les *Aquificaceae*, représentée par *Aquifex pyrophilus* (Huber *et al.*, 1992). Les familles *Hydrogenothermaceae* et *Desulfurobacteraceae* ont ensuite été décrites et ajoutées au phylum (Eder & Huber, 2002, L'Haridon *et al.*, 2006). Les deux premières familles sont

phylogénétiquement proches et font partie de l'ordre des *Aquificales* tandis que les *Desulfurobacteraceae* ont été séparées dans un second ordre, les *Desulfurobacteriales* (Gupta & Lali, 2013).

Les caractéristiques physiologiques et métaboliques de ces microorganismes montrent une forte adaptation aux conditions de vie des environnements hydrothermaux océaniques profonds : ce sont des thermophiles ou des hyperthermophiles qui partagent un métabolisme autotrophe strict ou facultatif basé sur l'oxydation de l'hydrogène ou des composés soufrés et à la réduction du nitrate, ainsi que de l'oxygène pour les membres des *Aquificales*. Ces caractéristiques physiologiques et métaboliques ne sont pas spécifiques à ce phylum. Ce sont les séquences des gènes codant les ARNr 16S ainsi que les insertions et délétions conservées parmi les génomes des *Aquificota* (Gupta & Lali, 2013) qui le séparent des autres phyla. La base de données GTDB (Genome Taxonomy Database) basée sur les génomes a proposé une modification de la taxonomie de ce phylum, en séparant la famille des *Hydrogenothermaceae* dans un nouvel ordre ; les *Hydrogenothermales*, groupé avec les *Aquificales* dans la classe des *Aquificae* (Parks *et al.*, 2018). La famille des *Hydrogenothermaceae* comprend trois genres, *Hydrogenothermus*, *Sulfurhydrogenibium* et *Persephonella*.

Le genre *Persephonella*

Le genre *Persephonella* comprend trois espèces isolées de sources hydrothermales océaniques profondes : *P. marina*, la souche type, *P. guaymasensis* isolées d'un site de l'Océan Pacifique (Götz *et al.*, 2002) et *P. hydrogeniphila* provenant de l'Arc Izu-Bonin au sud-est du Japon (Nakagawa *et al.*, 2003). Ces trois isolats sont thermophiles (température optimale de croissance de 70 à 75 °C) et pratiquent un métabolisme strictement autotrophe en fixant le carbone par le cycle rTCA (reductive Tricarboxylic Acid) (Hügler *et al.*, 2007). Les sources d'énergie de *P. marina* et *P. guaymasensis* sont l'hydrogène, le thiosulfate et le soufre élémentaire, ce qui les différencie de *P. hydrogeniphila* qui oxyde seulement l'hydrogène. L'oxygène peut être utilisé comme accepteur d'électrons en conditions de microaérophilie, mais le taux de croissance est plus élevé lors de la réduction du nitrate en anaérobiose.

Des souches du genre *Persephonella* ont été isolées de sites hydrothermaux de l'est et de l'ouest de l'Océan Pacifique, de l'Océan Indien ainsi que de l'Atlantique (Reysenbach *et al.*, 2002, Ferrera *et al.*, 2014), ce qui montre leur vaste distribution parmi des sites hydrothermaux géographiquement éloignés. Il semble qu'il y ait un lien entre la distance géographique et la diversité génétique des souches du genre *Persephonella* au niveau de sites proches (Mino *et al.*,

2013), cependant l'utilisation des gènes codant les ARNr 16S n'est pas suffisamment sélective pour expliquer la biogéographie du genre à de plus grandes échelles spatiales (Reysenbach *et al.*, 2002).

Il s'agit donc d'un genre bactérien particulièrement adapté aux écosystèmes hydrothermaux, tout comme les *Epsilonbacteraeota* (Campbell *et al.*, 2006) qui sont ubiquistes dans ces environnements et pratiquent des métabolismes similaires. Cependant, les représentants du genre *Persephonella* se développent à plus haute température, leur température optimale de croissance étant de 70 à 75 °C contre 25 à 60 °C pour les *Epsilonbacteraeota*. Grâce à ces adaptations physiologiques et métaboliques à leur environnement, des isolats ou des phylotypes du genre *Persephonella* ont été enrichis, isolés ou détectés dans de nombreuses études culturelles ou moléculaires (Takai *et al.*, 2003, Nakagawa *et al.*, 2005, Kormas *et al.*, 2006, Houghton *et al.*, 2007, Perner *et al.*, 2007, Takai *et al.*, 2008, Takai & Nakamura, 2011, Rommevaux *et al.*, 2019, Trembath-Reichert *et al.*, 2019).

3) Etude des communautés microbiennes des écosystèmes hydrothermaux

1) Méthodes *in situ* et méthodes culturelles

1) Colonisateurs *in situ*

Un moyen d'étudier les communautés microbiennes des écosystèmes hydrothermaux utilisé depuis la fin des années 1980 est le déploiement de colonisateurs *in situ* (Karl *et al.*, 1988). Le principe est de déployer sur une cheminée hydrothermale, ou au niveau d'une zone d'émission de fluide hydrothermal, une structure dans laquelle circule le fluide hydrothermal, afin de permettre aux microorganismes d'y adhérer. Ensuite le colonisateur est récupéré afin d'étudier les communautés microbiennes qui l'ont colonisé.

Le Vent Cap (**Figure 15**) est un colonisateur *in situ* qui a été utilisé dans plusieurs études (Karl *et al.*, 1988, Reysenbach *et al.*, 2000, Corre *et al.*, 2001, Miroshnichenko *et al.*, 2003, Nercessian *et al.*, 2003, Miroshnichenko *et al.*, 2004). Il est composé d'une chambre de

colonisation dans laquelle circule le fluide hydrothermal. Différentes surfaces peuvent être mises en place à l'intérieur (céramique, acier, verre, basaltes par exemple) afin de servir de substrat à l'adhésion des microorganismes. Un mécanisme d'ouverture permet de maintenir la chambre de colonisation fermée avant son déploiement, de l'ouvrir lorsqu'elle est en place, puis de la refermer lors de sa récupération. Enfin, une sonde de température reliée à un enregistreur de données permet de relever les variations de température durant toute la durée du déploiement du Vent Cap. Après la récupération du colonisateur, il est ensuite possible d'étudier les communautés qui l'ont colonisé par des méthodes moléculaires (généralement le séquençage des gènes codant les ARNr 16S) ou culturales (cultures d'enrichissement ou d'isolement).

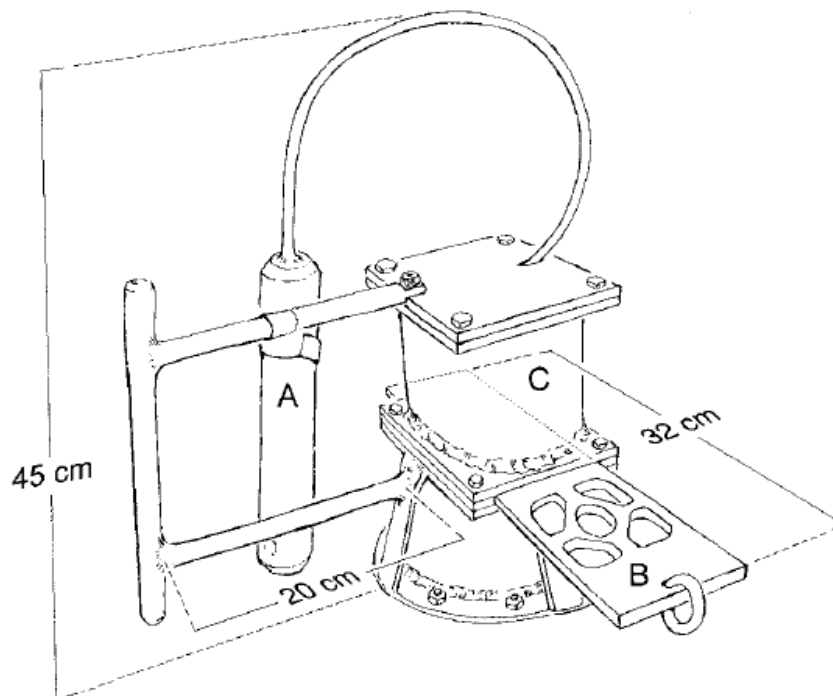


Figure 15 : Représentation schématique du Vent Cap. A : Sonde de température avec enregistreur de données ; B : Mécanisme d'ouverture ; C : Chambre de colonisation. Publié par (Reysenbach et al., 2000).

L'un des résultats communément mis en avant lors d'études impliquant des colonisateurs *in situ* est la prépondérance de phylotypes appartenant au phylum des *Epsilonbacteraeota*. Ces *Bacteria* mésophiles ou thermophiles modérées ont été détectées principalement dans des colonisateurs dont la température mesurée était comprise entre 20 et 60 °C, ce qui correspond à la gamme de température de croissance des *Epsilonbacteraeota* isolées et décrites.

La première étude soulignant ce phénomène a été réalisée en 2001 par Corre *et al.* qui ont déployé un colonisateur de type Vent Cap sur une cheminée hydrothermale du site Snake Pit pendant 5 jours (Corre *et al.*, 2001). Durant cette période, la température a varié entre 13 et 30 °C, avec une moyenne de 20 °C. La diversité microbienne a été analysée par clonage-séquençage des gènes codant les ARNr 16S. Cela a permis de mettre en évidence pour la première fois la forte diversité des *Epsilonbacteraeota* en milieu hydrothermal, alors qu'à l'époque les seules espèces décrites étaient des pathogènes (*Campylobacter* et *Helicobacter* par exemple). Les premiers représentants de ce phylum isolés de sources hydrothermales ont été décrits à partir de 2002 (Alain *et al.*, 2002). Aucune séquence d'*Archaea* n'avait été détectée.

Des résultats similaires ont été obtenus en 2004 par Alain *et al.* après le déploiement de colonisateurs près d'une colonie de vers du genre *Alvinella* pendant une à trois semaines sur un site de la dorsale Est-Pacifique (13 °N). Durant cette période la température a varié entre 1,5 et 65,8 °C (Alain *et al.*, 2004). Les *Bacteria* majoritaires étaient des *Epsilonbacteraeota*, et aucune *Archaea* n'a été détectée. Les hypothèses avancées pour expliquer ces résultats étaient que le temps de déploiement avait été trop court, ou les températures trop basses.

Des études de colonisation ont également été réalisées sur des sédiments hydrothermaux du champ hydrothermal Lucky Strike de la ride médio-Atlantique. Lopez *et al.* ont mis en place des colonisateurs, à proximité du site Tour Eiffel, constitués de différents substrats (riches en matière organique, en fer ou en pierre ponce) pendant deux semaines et ont comparé la diversité microbienne du sédiment adjacent avec la diversité des microorganismes qui se sont développés dans les colonisateurs (López-García *et al.*, 2003). L'étude moléculaire a montré que les sédiments contenaient une importante diversité bactérienne, cependant la majorité des séquences issues des colonisateurs étaient affiliées à des *Epsilonbacteraeota* indépendamment des substrats déployés.

Une étude plus longue a été réalisée, portant sur des colonisateurs déployés sur du sédiment hydrothermal d'un site de la dorsale est-Pacifique (9°50' N) à différentes distances des cheminées (Sylvan *et al.*, 2012). Les pièges à sédiment ont été échantillonnés plusieurs fois pendant 4 mois. Durant les premiers échantillonnages, à environ 40 et 75 jours, les phylotypes identifiés dans les banques de clones étaient majoritairement des *Epsilonbacteraeota* (environ la moitié des banques de clones), tandis qu'au bout d'environ 120 jours plus de 75 % des séquences étaient affiliées à des *Gammaproteobacteria*. Ces résultats ont montré que la diversité des communautés microbiennes provenant des particules du panache hydrothermal pouvait varier sur des échelles de temps de l'ordre de la semaine.

L'influence du temps de déploiement des colonisateurs sur la diversité des communautés microbiennes a également été montrée par Callac *et al.* lors du déploiement du colonisateur AISICS sur des sédiments hydrothermaux du Bassin de Guaymas (Callac *et al.*, 2013). Le colonisateur a été mis en place durant 8 et 22 jours et contenait différents substrats basaltiques. La température relevée était en moyenne de 40 à 45 °C. Les communautés microbiennes étaient constituées en majorité d'*Epsilonbacteraeota* et d'*Aquificales* pour les *Bacteria*, et de *Thermococcales* pour les *Archaea* et variaient principalement en fonction de la durée de déploiement des colonisateurs, et de la profondeur à laquelle ils étaient installés. Des séquences affiliées aux ANMEs, un groupe d'*Archaea* méthanogènes incultivées ont également été détectées.

A l'inverse des études portant sur les communautés bactériennes dans lesquelles les résultats principaux sont congruents, les études ciblant les *Archaea* ont parfois produit des résultats opposés. Nercessian *et al.* (Nercessian *et al.*, 2003) ont déployé des colonisateurs durant 2 à 11 jours sur trois cheminées hydrothermales d'un site de la dorsale est-Pacifique (13 °N) et analysé les changements de composition des communautés microbiennes par clonage-séquençage des gènes codant les ARNr 16S entre deux prélèvements (7 et 11 jours pour un colonisateur, 4 et 5 jours pour l'autre). Dans les deux cas, les phylotypes appartenaient pour la plupart à l'ordre des *Thermococcales* (des *Archaea* hyperthermophiles hétérotrophes) et la proportion d'OTUs de cet ordre diminuait entre les deux prélèvements au profit des *Archaeoglobales*, *Methanopyrales* et des *Methanococcales* (des *Archaea* majoritairement autotrophes). Cela indique donc qu'il y a eu une colonisation rapide de microorganismes hétérotrophes, et que leur proportion a diminué au cours du temps en faveur de plusieurs taxa d'autotrophes.

Des résultats opposés ont été présentés par McCliment *et al.*, indiquant que dans des colonisateurs déployés 92 heures sur un site de la dorsale est-Pacifique (9 °N), les premiers organismes présents appartenaient au genre *Ignicoccus* (des *Archaea* autotrophes hyperthermophiles oxydant l'hydrogène) et à leurs symbiontes, des *Nanoarchaeota* (McCliment *et al.*, 2006). De même, Pagé *et al.* ont déployé des colonisateurs de type thermocouple sur deux cheminées hydrothermales du bassin de Guaymas pendant 4 et 72 jours, mesuré la température *in situ* et identifié les microorganismes ayant colonisé les dépôts minéraux (Pagé *et al.*, 2008). Après 4 jours, les premiers microorganismes présents étaient des *Methanocaldococcus*, et après 72 jours des hétérotrophes putatifs ont été détectés.

Rommevaux *et al.* ont travaillé avec des colonisateurs *in situ* constitués de tubes Falcon en polypropylène percés contenant des verres basaltiques afin d'étudier la colonisation des basaltes par les microorganismes des sources hydrothermales (Rommevaux *et al.*, 2019). Deux colonisateurs ont été déployés sur de longues périodes, entre 9 et 13 mois entre 2009 et 2011 à proximité de la cheminée Aisics (site Tour Eiffel) du champ hydrothermal Lucky Strike de la ride médio-Atlantique. Un des deux colonisateurs était équipé d'une sonde de température autonome qui a mesuré et enregistré la température toutes les trois minutes pendant la durée du déploiement du colonisateur. Les communautés microbiennes ayant colonisé les basaltes, ainsi que les communautés microbiennes de la cheminée Aisics, ont été identifiées par séquençage des gènes codant les ARNr 16S. En complément des analyses de diversité, la composition chimique du fluide hydrothermal a été analysée chaque année pour étudier un potentiel impact des phénomènes magmatiques sur les communautés microbiennes. Un événement de dégazage du magma a ainsi été mis en évidence en 2010, ce qui a notamment fait augmenter la concentration en CO₂ dans le fluide hydrothermal (variations de 1,5 à 118,8 mM). Ce changement dans la composition chimique du fluide hydrothermal a été corrélé à l'émergence de microorganismes fixant le dioxyde de carbone, comme des *Archaea* hyperthermophiles anaérobies sulfato-réductrices proches de l'espèce *Archaeoglobus veneficus*, et des *Bacteria* thermophiles anaérobies réduisant le soufre et les nitrates (*Nautiliales* et *Nitratiruptoraceae*). Ces résultats ont donc mis en avant un lien possible entre les événements magmatiques survenant en subsurface, et la dynamique des communautés microbiennes.

Les résultats des études basées sur le déploiement de colonisateurs *in situ* sur des sources hydrothermales, ou à proximité, ont donc apporté de nombreuses informations sur la colonisation des édifices hydrothermaux par les microorganismes. Il semble que la température soit un des principaux facteurs influençant les communautés microbiennes. Cependant, la dynamique temporelle des communautés est difficile à appréhender avec ces approches.

Bien que la température puisse être mesurée régulièrement, il y a peu de contrôle sur les paramètres environnementaux et l'installation des colonisateurs peut être compliquée car elle est opérée à l'aide d'engins sous-marins. Il y a également des contraintes sur le nombre de colonisateurs qui peuvent être installés ainsi que sur la durée de leur déploiement, qui dépendent de l'organisation des campagnes océanographiques.

De plus, toutes ces études ont été réalisées sur différents sites parfois très distants (Lucky Strike et Rainbow de la ride médio-Atlantique, ou des sites de la dorsale est-Pacifique) ce qui

peut expliquer les résultats contradictoires obtenus dans certains cas, car les paramètres environnementaux peuvent être très variables entre les sites hydrothermaux.

Enfin, cette technique crée un biais en faveur des microorganismes capables d'adhérer à une surface. Ceux-ci sont ainsi plus facilement piégés par les colonisateurs *in situ*, tandis que les organismes qui ne possèdent pas cette capacité ne seront pas détectés même s'ils sont présents dans l'écosystème.

2) Méthodes culturelles

Les méthodes culturelles réalisées *ex situ* en laboratoire, permettent d'étudier les microorganismes viables cultivables, en ayant un contrôle sur les conditions de culture. En faisant varier ces conditions, il est possible d'observer les réponses des microorganismes. C'est grâce à la réalisation de cultures d'enrichissement et d'isolement que la physiologie et le métabolisme de nombreux microorganismes hydrothermaux ont pu être étudiés en détail.

Culture en bioréacteur

La plupart des études culturelles ciblant des microorganismes sont réalisées en milieu fermé, on parle alors de cultures « en batch ». Il s'agit de la méthode la plus simple et rapide à mettre en place pour cultiver des microorganismes. Cependant cette technique ne convient pas à la culture de tous les microorganismes, car certains métabolismes mènent à l'accumulation de produits qui peuvent être toxiques pour les cellules. Cela peut également modifier les paramètres physico-chimiques du milieu. Par exemple une accumulation d'acides organiques par un métabolisme fermentaire provoque une baisse de pH, qui peut inhiber la croissance de certains microorganismes.

La réalisation de cultures en continu permet de résoudre ces problèmes méthodologiques liés aux cultures en batch. Le principe est de réaliser la culture dans un bioréacteur, dans lequel le milieu de culture est constamment renouvelé. Il y a ainsi un apport de substrats et une élimination des produits du métabolisme. De plus, l'utilisation d'un bioréacteur permet de contrôler les conditions de culture (pH, température composition la phase gazeuse...). Si le débit d'entrée et de sortie de milieu de culture est correctement ajusté au temps de division des microorganismes cultivés il est possible de maintenir la culture en phase exponentielle.

Un exemple de bioréacteur permettant la culture en continu de microorganismes provenant d'environnements hydrothermaux est le bioréacteur Gas-lift, dont le fonctionnement est présenté en détail dans la section *Cultures en bioréacteur*. Il a été utilisé notamment pour améliorer la production de biomasse de *Pyrococcus furiosus* (Raven *et al.*, 1992), ainsi que pour étudier en détail le métabolisme de *Thermococcus hydrothermalis* (Godfroy *et al.*, 1997, Postec *et al.*, 2005), des *Archaea* hyperthermophiles hétérotrophes.

Des cultures de communautés ont également été réalisées en bioréacteur Gas-lift en utilisant des échantillons de cheminées hydrothermales comme inoculum, et un milieu de culture artificiel. En utilisant ce système Postec *et al.* ont ainsi identifié des interactions syntrophiques entre les microorganismes enrichis à partir d'un échantillon hydrothermal (Postec *et al.*, 2007). Byrne *et al.* ont étudié la réponse des communautés microbiennes hydrothermales à des changements des conditions de culture comme la température, la concentration en matière organique ainsi que la disponibilité en différents donneurs et accepteurs d'électrons (Byrne *et al.*, 2009). Callac *et al.* ont également inoculé le bioréacteur avec un échantillon de cheminée hydrothermale, mais ont utilisé du fluide hydrothermal comme milieu de culture afin de simuler au mieux les conditions *in situ* (Callac *et al.*, 2015). Cela a permis d'enrichir des microorganismes de plusieurs taxa (*Thermococcus*, *Archaeoglobus*, *Geoglobus*, *Sulfurimonas* et *Thermotoga*), dont les représentants isolés pratiquent des métabolismes variés (hétérotrophie, réduction du soufre, du sulfate, du fer, oxydation de l'hydrogène...). Un prélèvement quotidien du milieu de culture a été réalisé afin d'analyser les consommations et productions de métabolites par les communautés microbiennes. Un modèle présentant les interactions entre les communautés microbiennes, le fluide hydrothermal et les minéraux dans le bioréacteur a ainsi été proposé.

Houghton *et al.* ont également réalisé des cultures en bioréacteur à haute température (70 et 90 °C), en utilisant comme inoculum des échantillons de cheminées hydrothermales. La principale différence avec les études citées précédemment est le fait qu'ils aient incubé les cultures à haute pression (250 bar). La méthodologie employée ainsi que les résultats sont présentés dans la section *Interactions entre les microorganismes et les minéraux*.

La culture en continu en bioréacteur permet de cultiver une plus grande diversité de microorganismes que la culture en batch, tout en contrôlant les conditions de culture. Il s'agit néanmoins d'une technique plus laborieuse à mettre en place, et qui nécessite un équipement

spécialisé ainsi qu'un suivi quotidien. C'est probablement pourquoi peu d'équipes utilisent cette méthode malgré les avantages qu'elle apporte.

Enrichissements MPN

Une méthode qui est plus simple à appliquer, et qui requiert le même matériel que pour des cultures classiques est la technique d'enrichissement MPN (Most Probable Number). Elle est utilisée depuis plusieurs dizaines d'années par les microbiologistes pour estimer la concentration en cellules viables cultivables dans un échantillon (Cochran, 1950, Alexander, 1983, Woome, 1994). Le principe est de réaliser successivement des dilutions à partir d'un échantillon et d'observer jusqu'à quelle dilution une croissance microbienne se produit. En réalisant des réplicats et en diluant la culture jusqu'à extinction, il est possible d'estimer statistiquement la concentration initiale en microorganismes viables cultivables dans l'échantillon.

Cette technique permet d'enrichir spécifiquement certains microorganismes en fonction des conditions de culture qui sont imposées (source de carbone, donneurs et accepteurs d'électrons, pH, température...). Cela peut être un avantage pour une étude portant sur des organismes qui pratiquent un métabolisme en particulier. A l'inverse, si le but est d'étudier de manière exhaustive la diversité d'organismes cultivables, il est nécessaire de multiplier le nombre de conditions de culture pour pouvoir enrichir un maximum d'organismes.

Des enrichissements MPN ont été réalisés à partir d'échantillons de cheminées hydrothermales ou de fluides hydrothermaux dans différentes études afin d'estimer la concentration en microorganismes cultivables dans les échantillons, et de les identifier. Cette méthode est généralement pratiquée de manière complémentaire avec d'autres techniques et permet de répondre à différentes questions.

Par exemple Takai *et al.* ont réalisé des enrichissements MPN pour étudier la distribution des microorganismes dans une cheminée hydrothermale, en séparant la structure de la cheminée en plusieurs sous-échantillons (Takai *et al.*, 2001). Les conditions de culture mises en place ciblaient des *Thermococcus* (milieu riche en matière organique incubé à 55, 75 et 90 °C) et des *Haloarcula*, des *Archaea* halophiles (milieu à forte concentration en sel incubé à 30 et 45 °C). Les résultats ont été complétés par des études moléculaires (clonage-séquençage,

quantification d'ARNr par hybridation dot blot, T-RFLP) et des comptages en microscopie à épifluorescence.

Cette méthode a été appliquée par Topçuoğlu *et al.* (Topçuoğlu *et al.*, 2016) pour étudier les phénomènes de syntrophie entre des *Archaea* méthanogènes hydrogénotrophes et les microorganismes produisant de l'hydrogène dans les zones d'émission de fluide diffus à 55 et 80 °C. Des conditions de culture favorables à ces deux métabolismes ont été mises en place, et la production de méthane ou d'hydrogène a été mesurée après les incubations.

L'avantage de cette méthode est qu'elle est simple à mettre en place, et que le fait de contrôler les conditions de culture permet de cibler des microorganismes en fonction du métabolisme qu'ils pratiquent et des paramètres qui permettent leur croissance, comme la température.

Cependant cette méthode comprend généralement un biais car les microorganismes présentant les plus forts taux de croissance sont plus facilement enrichis et détectés par rapport à ceux dont la croissance est plus lente. De plus, bien que les milieux de culture soient définis afin de cibler un métabolisme en particulier, il n'est pas toujours possible de déterminer quel métabolisme a été réalisé par les microorganismes cultivés, ni de faire un lien entre la concentration cellulaire calculée et l'activité métabolique de ces microorganismes.

Mesures d'activité

Une technique permettant de mesurer l'activité métabolique d'un microorganisme ou d'une communauté microbienne est l'utilisation de substrats radiomarqués. Le principe est d'introduire dans le milieu de culture des molécules comportant un isotope radioactif dont l'activité de désintégration radioactive initiale est connue. Ainsi, la quantité de molécules métabolisées par les microorganismes à l'issue de la culture peut être déterminée en mesurant l'activité radioactive dans les cellules.

Cette méthode a principalement été employée lors d'études portant sur les communautés microbiennes des sédiments marins pour mesurer l'activité de différentes réactions métaboliques comme par exemple l'oxydation de composés soufrés (Jørgensen & Bak, 1991), la sulfato-réduction (Robador *et al.*, 2009), la méthanogénèse (Roussel *et al.*, 2015, Vigneron *et al.*, 2015), l'acétogénèse (Roussel *et al.*, 2015) ou l'oxydation de l'acétate (Roussel *et al.*,

2015). Les sédiments mélangés à l'eau de mer (slurries) sont ensuite incubés en présence des substrats radiomarqués.

Des mesures d'activité par marquage radioactif ont également été réalisées dans quelques études sur les écosystèmes hydrothermaux. Perner *et al.* ont réalisé des mesures d'activité de fixation du carbone à partir d'échantillons de fluide hydrothermal (Perner *et al.*, 2010, Perner *et al.*, 2011, Perner *et al.*, 2013), tandis qu'Olins *et al.* se sont focalisés sur les communautés microbiennes anaérobies des cheminées hydrothermales. Les mesures d'activité ont été faites sur des mésocosmes préparés à partir de quatre échantillons de cheminées hydrothermales, incubés à 4, 25, 50 et 90 °C durant 72 h en présence de sulfure, de sulfate, de nitrate et de bicarbonate marqué au ^{14}C , sous une atmosphère constituée d'azote. Ils ont montré que le taux de fixation de carbone inorganique par les communautés anaérobies était plus important à 4 °C, et diminuait avec l'augmentation de la température. En revanche il n'y avait pas de corrélation entre les taux de fixation du CO_2 mesurés et la géochimie des sites où ont été prélevés les échantillons de cheminées.

Cette technique permet ainsi de réaliser avec précision des mesures d'activité métaboliques à partir de différents types d'échantillons (sédiments, fluide hydrothermal, cheminées hydrothermales...). Ses avantages sont la spécificité et la précision des mesures, cependant il s'agit d'une méthode complexe à mettre en place à cause des risques liés à la manipulation de sources radioactives non scellées. De plus, les résultats sont très dépendants des conditions d'incubation mises en place, notamment l'apport de substrats, qui peuvent favoriser la croissance et l'activité métabolique de certains organismes. Il est donc indispensable de mettre au point un protocole expérimental cohérent et de comparer uniquement des résultats acquis avec la même méthodologie.

2) Etudes moléculaires

Bien qu'elles apportent de nombreuses informations et soient complémentaires entre elles, les méthodes culturales présentées comportent toutes le même biais car les microorganismes cultivables ne représentent qu'une faible partie de la diversité totale. De ce fait les résultats peuvent être sous-estimés, qu'il s'agisse de la concentration cellulaire pour les enrichissements MPN, ou les activités mesurées par marquage radioactif des substrats. Bien

que les cultures en continu en bioréacteur permettent d'enrichir une plus grande diversité de microorganismes que les cultures en batch, il reste une part non négligeable d'organismes qui ne peuvent pas être cultivés avec les techniques actuelles.

Identification des microorganismes par des approches moléculaires

Les techniques moléculaires, dont le développement est constant depuis la découverte des écosystèmes hydrothermaux, ont été utilisées dans de nombreuses études pour identifier les microorganismes qui y vivent.

Une méthode communément employée est la réalisation d'inventaires moléculaire par clonage-séquençage ou séquençage haut-débit des gènes codant les ARNr 16S. La réalisation d'une banque de clones permet d'obtenir quelques dizaines à quelques centaines de séquences d'une longueur pouvant couvrir la quasi-totalité du gène. Le séquençage haut-débit, mis au point plus récemment, produit jusqu'à plusieurs dizaines de milliers de séquences par échantillon, d'une longueur maximale d'environ 500 pb pour du séquençage Illumina MiSeq paired-reads.

L'identification des phylotypes microbiens par les approches moléculaires est rarement la seule technique utilisée dans une étude, au contraire il s'agit d'une approche complémentaire aux autres méthodes. Dans la plupart des études culturales, les phylotypes enrichis sont identifiés par séquençage des gènes codant les ARNr 16S. C'est le cas des différentes études présentées précédemment, qu'elles soient basées sur des approches culturales (cultures en batch, en continu, enrichissements MPN) ou basées sur le déploiement de colonisateurs *in situ*. Les amorces PCR spécifiques aux gènes ribosomiaux sont nombreuses et évoluent au fur et à mesure que les bases de données de séquences s'enrichissent (Herlemann *et al.*, 2011, Klindworth *et al.*, 2013, Takahashi *et al.*, 2014, Parada *et al.*, 2016, Walters *et al.*, 2016).

Les premières réalisations de banques de clones à partir d'échantillons issus d'écosystèmes hydrothermaux ont permis de mettre en évidence l'importante diversité microbienne de ces environnements, ainsi que la présence de phylotypes incultivés comme par exemple les DHVE et les *Epsilonbacteraeota* avant que ces dernières ne soient isolées et décrites (Takai & Horikoshi, 1999, Corre *et al.*, 2001, Hoek *et al.*, 2003).

Cependant les informations apportées par les études descriptives sont limitées, c'est pourquoi les inventaires moléculaires sont généralement associées à des mesures de paramètres physico-chimiques comme la minéralogie des cheminées (Zhou *et al.*, 2009, Lin *et al.*, 2016,

Li *et al.*, 2017) ou la composition chimique du fluide hydrothermal (Flores *et al.*, 2011, Lin *et al.*, 2016, Ding *et al.*, 2017).

Par exemple Li *et al.* ont couplé des données de minéralogie obtenues par diffraction aux rayons X (XRD) avec des données de séquençage haut-débit issues d'échantillons de trois cheminées hydrothermales du site Dudley de la dorsale Juan de Fuca (Li *et al.*, 2017). Ils ont ainsi proposé un modèle conceptuel expliquant la succession des communautés microbiennes à différents stades d'évolution des cheminées hydrothermales. Ils ont alors tenté de répondre avec une approche moléculaire aux mêmes problématiques que des études citées précédemment, qui étaient basées sur le déploiement de colonisateurs *in situ*, ou basées sur des méthodes culturales. Les résultats de Li *et al.* ont montré la dominance de *Bacteria* hétérotrophes et dénitrifiantes dans une cheminée de sulfate (représentant le premier stade de formation des cheminées hydrothermales) et l'absence d'*Archaea* dans cette cheminée, ce qui est en partie congruent avec les résultats d'études impliquant de colonisateurs *in situ* (Corre *et al.*, 2001, Alain *et al.*, 2004).

Bien que les inventaires moléculaires réalisés à partir de séquences de gènes codant les ARNr 16S permettent d'identifier les microorganismes présents dans l'écosystème et de déterminer leur diversité phylogénétique, ils n'apportent pas d'informations fonctionnelles fiables. Il est néanmoins possible d'inférer des caractères physiologiques ou métaboliques d'un phylotype à partir de sa taxonomie en se basant sur les données disponibles concernant les isolats les plus proches. Cependant ces données restent hypothétiques, car même si certains traits sont partagés entre tous les représentants cultivés d'un taxon donné, cela n'assure pas que ce soit le cas pour les représentants non cultivés.

Séquençage de gènes fonctionnels et métagénomique

L'identification de gènes fonctionnels dans un génome permet d'obtenir des informations plus robustes concernant les métabolismes des microorganismes. Le fait de détecter un gène de fonction dans le génome d'un phylotype n'assure pas que le gène soit transcrit et que l'organisme pratique la réaction métabolique associée. Cependant, il s'agit généralement d'un indicateur plus fiable que les informations putatives issues de la taxonomie.

Deux principales techniques sont utilisées pour étudier les métabolismes potentiellement pratiqués par les microorganismes d'une communauté : l'amplification spécifique de gènes fonctionnels, ou les études de métagénomique.

L'amplification de gènes fonctionnels est basée sur le même principe que l'amplification des gènes codant les ARNr 16S, mais cible des gènes codant pour des protéines dont la fonction métabolique est connue. Plusieurs métabolismes ont ainsi été étudiés, comme la méthanogenèse avec les gènes *mcrA* (Nercessian *et al.*, 2005, Roussel *et al.*, 2011, Olins *et al.*, 2013), la méthanotrophie aérobie avec les gènes *pmoA* (Nercessian *et al.*, 2005, Roussel *et al.*, 2011), la sulfato-réduction avec les gènes *dsrA* (Nercessian *et al.*, 2005, Roussel *et al.*, 2011), la fixation du carbone inorganique avec les gènes *acl* et *cbb* (Voordeckers *et al.*, 2008, Crepeau *et al.*, 2011, Olins *et al.*, 2013), l'oxydation de l'ammonium avec les gènes *amoA* (Wang *et al.*, 2009), l'oxydation de l'hydrogène avec les hydrogénases (Perner *et al.*, 2010) et l'oxydation des composés soufrés avec les gènes *sox* et *aprA* (Crepeau *et al.*, 2011).

Cependant, comme dans le cas des inventaires moléculaires de gènes ribosomiaux, cette approche est limitée par la couverture des amorces PCR (voir la section *Lignées de microorganismes incultivés*). Si les gènes fonctionnels des microorganismes étudiés ne sont pas couverts par les amorces utilisées, ils ne seront pas détectés.

Les études de métagénomique ne sont pas concernées par cette contrainte et permettent d'obtenir des données plus complètes sur les génomes des organismes d'un écosystème si la profondeur de séquençage est suffisante. Le second avantage de cette approche est qu'elle n'est pas centrée sur un gène en particulier, et que le séquençage d'un échantillon permet d'étudier de nombreuses voies génétiques simultanément. Le nombre d'études de métagénomiques réalisées sur les écosystèmes hydrothermaux est relativement faible, surtout à partir d'échantillons de cheminées hydrothermales. Les biomasses parfois faibles ainsi que la présence de nombreux métaux peuvent être une cause, car cela rend difficiles les extractions d'ADN et les études moléculaires qui en découlent. Quelques études ont néanmoins été réalisées, notamment par Xie *et al.* qui ont séquencé des métagénomes à partir d'une cheminée de la dorsale Juan de Fuca dans l'Océan Est-Pacifique (Xie *et al.*, 2011). Ces données ont permis d'identifier les microorganismes présents et d'inférer de potentiels traits physiologiques ou métaboliques à partir des gènes de fonction détectés. Ils ont ainsi mis en avant une importante proportion de transposases, pouvant être impliquées dans les transferts génétiques horizontaux, ainsi que la présence de gènes impliqués dans le chimiotactisme, la motilité, l'oxydation du

soufre et la fixation du carbone inorganique. Meier *et al.* ont également utilisé des outils métagénomiques et métaprotéomiques mais ont ciblé leur étude sur les cheminées inactives (Meier *et al.*, 2018). Ils ont ainsi pu associer des caractéristiques taxonomiques à des métabolismes putatifs concernant les microorganismes qui colonisent les sites inactifs. Dans une autre optique que les études présentées ci-dessus qui se sont intéressées à l'intégralité des communautés microbiennes, les données de métagénomique peuvent être utilisées pour apporter des informations sur des microorganismes incultivés ciblés. Par exemple Brazelton *et al.* ont ainsi comparé les données d'un métagénome, séquencé à partir d'un échantillon de cheminée hydrothermale du site Lost City, au génome d'une souche du genre *Thiomicrospira* isolée d'un site basaltique de l'Océan Pacifique afin de comparer leurs potentiels génomiques (Brazelton & Baross, 2010).

Limites des approches moléculaires

Les approches moléculaires permettent de s'affranchir des méthodes culturales pour étudier les microorganismes des environnements hydrothermaux et apportent ainsi de nombreuses informations supplémentaires sur les microorganismes non cultivables. Cependant, ces différentes techniques commencent toutes par une étape d'extraction d'ADN, qui présente plusieurs biais.

Les extractions d'ADN consistent à séparer l'ADN des autres molécules de l'échantillon : le substrat (cheminée hydrothermale broyée, panache hydrothermal proximal, milieu de culture liquide ou solide...) et les composants cellulaires (protéines, lipides...). Selon le substrat, différentes techniques sont utilisées. Par exemple pour un substrat liquide comme un échantillon de fluide hydrothermal, les cellules sont généralement concentrées sur un filtre, puis l'extraction d'ADN est réalisée sur ce même filtre (Cruaud *et al.*, 2017). Pour un échantillon de cheminée hydrothermale, les minéraux sont broyés finement et les cellules sont séparées des minéraux à l'aide de microbilles.

Le moyen le plus rapide et répétable d'extraire les ADN est d'utiliser un kit commercial. De nombreux kits sont disponibles pour chaque type de substrat environnemental (fluide, sédiment...) et pour la plupart la lyse cellulaire est basée sur une lyse chimique et/ou mécanique. Cependant, même si l'approche est similaire entre ces kits, les différents protocoles peuvent mener à des résultats variables. Dans certains cas, l'utilisation de plusieurs méthodes d'extraction sur un même échantillon a produit des résultats variables dans l'analyse de

diversité (Luna *et al.*, 2006, Carrigg *et al.*, 2007). Dans d'autres cas, seule la quantité ou la qualité des ADN extraits étaient influencées (Ramírez *et al.*, 2018).

Le choix de la méthode d'extraction est donc primordial pour limiter les biais dans les analyses en aval.

Un autre risque possible est l'extraction d'ADN exogène conjointement à l'extraction d'ADN des cellules présentes dans l'échantillon. Cela concerne notamment les contaminations, qui peuvent provenir de l'environnement de travail, de l'expérimentateur ou encore des kits d'extraction. Ce risque augmente lorsqu'il s'agit d'un échantillon de faible biomasse, cependant, la réalisation des extractions d'ADN dans un environnement de travail dédié et aseptique permet de prévenir ces risques. Si une contamination ne peut être évitée lors des manipulations, il est nécessaire de retirer les contaminants dès les premières étapes d'analyse des données. Dans ce cas, les contaminants peuvent être identifiés en réalisant un blanc d'extraction dans lequel aucun ADN n'est censé être présent. Si de l'ADN est détecté et amplifié dans un blanc d'extraction, il s'agit d'une contamination entre échantillons ou d'une contamination exogène (Tanner *et al.*, 1998, Salter *et al.*, 2014, Zhong *et al.*, 2018).

Il est également possible que de l'ADN extracellulaire soit présent dans l'échantillon, alors que généralement le but des études moléculaires est d'analyser uniquement l'ADN des microorganismes viables. Néanmoins, l'influence de ces ADN extracellulaires sur les analyses semble être mineure car la stabilité des ADN dans le temps est limitée (Ramírez *et al.*, 2018, Torti *et al.*, 2018).

3) Interactions entre les microorganismes et leur environnement

1) Influence de l'environnement sur les communautés microbiennes

Influence de la composition du fluide hydrothermal sur les communautés microbiennes

Les paramètres physico-chimiques du fluide hydrothermal étant parfois très contrastés entre les différents sites hydrothermaux (voir la section *Influence du substrat rocheux*), ils peuvent avoir une influence importante sur les communautés microbiennes.

Les réactions métaboliques catalysées par les microorganismes, tout comme les réactions abiotiques, sont soumises aux lois de la thermodynamique. Il est ainsi possible de déterminer l'énergie potentiellement produite par une réaction métabolique, en fonction des conditions physico-chimiques, en calculant l'enthalpie libre ou énergie libre de Gibbs. De nombreuses études de thermodynamique ont été réalisées afin de déterminer l'énergie produite par les réactions métaboliques pratiquées par les microorganismes isolés ou par des réactions métaboliques supposées, qui ne sont pas pratiquées par les microorganismes cultivés (Thauer *et al.*, 1977, Kelly, 1999, Amend & Shock, 2001, Amend *et al.*, 2011, Amend & LaRowe, 2019, Amend *et al.*, 2020).

Cependant l'énergie pouvant être produite par une réaction métabolique est très dépendante des conditions environnementales (pH, température, concentration en substrats et produits notamment). Il est donc important de prendre en compte ces paramètres afin de déterminer l'énergie que peut produire une réaction dans les conditions de vie des microorganismes. Plusieurs auteurs ont travaillé à partir de données de chimie et de température du fluide hydrothermal, mesurées *in situ*, et ont également intégré d'autres paramètres comme la structure et la composition minéralogique des cheminées hydrothermales, ce qui modifie la diffusion du fluide hydrothermal (McCollom & Shock, 1997, McCollom, 2000, McCollom, 2007, Takai & Nakamura, 2011). Ces données théoriques ont également été couplées aux données de diversité microbienne (Houghton & Seyfried, 2010, Perner *et al.*, 2011, Lin *et al.*, 2016, Dahle *et al.*, 2018).

Des études ont également fait le lien entre les paramètres du fluide hydrothermal et la diversité ou l'activité des communautés microbiennes, sans intégrer de prévisions

thermodynamiques (Nakagawa *et al.*, 2005, Perner *et al.*, 2007, Perner *et al.*, 2010, Flores *et al.*, 2011, Olins *et al.*, 2013, Steen *et al.*, 2016, Fortunato *et al.*, 2017, Olins *et al.*, 2017).

Les calculs thermodynamiques d'enthalpie libre des réactions *in situ* sont généralement basés sur un modèle de dilution entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer, dont la composition chimique et la température ont été mesurées *in situ*.

McCollom *et al.* ont réalisé plusieurs études basées sur cette méthodologie, dont deux études à partir des données d'un site de l'Océan Pacifique, EPR 21 °N (McCollom & Shock, 1997, McCollom, 2000). Ils ont ainsi montré que, dans un même site hydrothermal, l'énergie produite par les réactions chimiolithoautotrophes variait dans le gradient thermique créé par la dilution du fluide hydrothermal par l'eau de mer. Ainsi, pour les températures inférieures à 38 °C (dans les zones à forte influence de l'eau de mer) les réactions les plus favorables énergétiquement sont l'oxydation du sulfure d'hydrogène, du méthane, du fer ferreux et du manganèse. A l'inverse, pour les températures supérieures à 38 °C, la méthanogénèse et la réduction du soufre élémentaire ou du sulfate sont plus favorables. En prenant en compte les concentrations des différents substrats, qui sont limitantes dans les réactions métaboliques, le calcul de l'énergie pouvant être fournie par les métabolismes étudiés indique que la réaction la plus énergétique est l'oxydation aérobie du soufre, suivie dans l'ordre de l'oxydation aérobie de l'hydrogène, la méthanogénèse, la réduction du sulfate et l'oxydation du méthane.

Takai *et al.* ont synthétisé des données issues de plusieurs études et ont présenté l'énergie produite par 14 réactions métaboliques dans deux gammes de température (< 50 °C et 50 à 125 °C) pour 6 sites hydrothermaux (Takai & Nakamura, 2011). La synthèse de ces résultats, présentée dans la figure (**Figure 16**), montre que l'énergie maximale produite par les réactions chimiolithoautotrophes étudiées est principalement influencée par le site hydrothermal (et donc par la composition chimique du fluide hydrothermal). Bien qu'il ait été présenté dans le paragraphe précédent que l'énergie produite variait dans les différentes zones du gradient thermique, ce phénomène reste secondaire. L'exemple de la disponibilité en hydrogène a été mis en avant et montre une corrélation entre la concentration en hydrogène, l'énergie disponible pour la réaction de méthanogénèse et le nombre de cellules viables cultivables par gramme de cheminée.

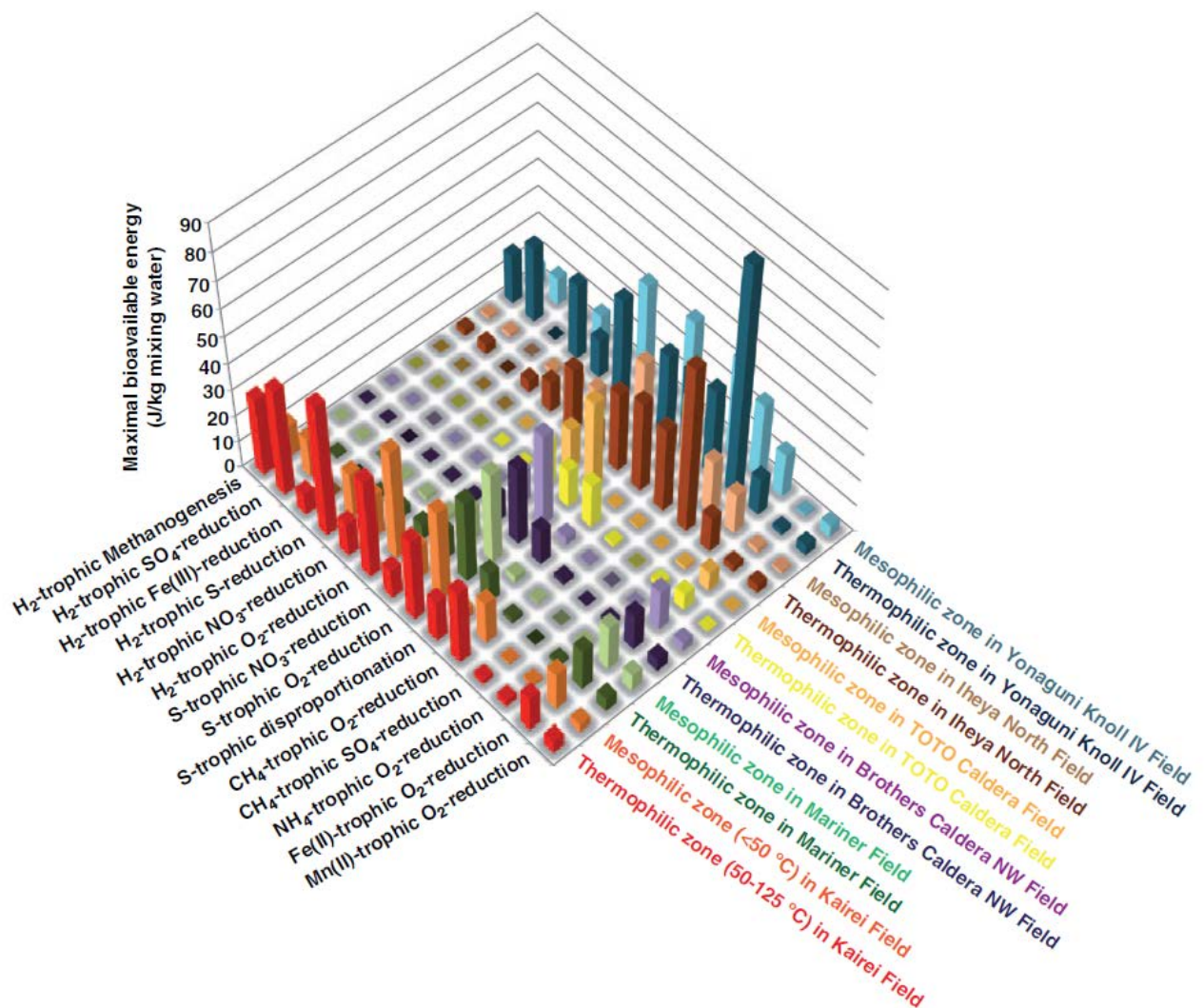


Figure 16 : Représentation graphique de l'énergie maximale produite par des métabolismes chimiolithoautotrophes dans deux gammes de température (« Mesophilic zone » : inférieure à 50 °C et « Thermophilic zone » : 50 à 125 °C) pour plusieurs sites hydrothermaux. Figure publiée par Takai et al. (Takai & Nakamura, 2011).

L'enthalpie libre de plusieurs réactions métaboliques a été calculée pour des conditions physico-chimiques de plusieurs sites hydrothermaux ultramafiques ou basaltiques par Amend *et al.* (Amend *et al.*, 2011). Les sites ultramafiques présentent généralement une concentration supérieure en hydrogène liée au substrat mantellique par rapport aux sites basaltiques (voir la section *Influence du substrat rocheux*). Ainsi, pour les sites ultramafiques, l'oxydation de l'hydrogène serait le métabolisme le plus énergétique pour les températures inférieures à 45 °C. A l'inverse, aux températures plus élevées, les réactions les plus énergétiques seraient l'oxydation du méthane, du fer ferreux et du manganèse. Concernant les sites basaltiques, l'oxydation des sulfures serait plus énergétique à toutes les températures étudiées. L'énergie requise pour assurer les processus anaboliques par les microorganismes chimiolithoautotrophes

(synthèse d'acides aminés, nucléotides, lipides, glucides) serait plus faible dans les basses températures (22 à 32 °C). Ces réactions nécessiteraient un coût métabolique moins élevé dans les sites ultramafiques que dans les sites basaltiques, facilitant ainsi la croissance des microorganismes. Les auteurs émettent l'hypothèse que cela pourrait favoriser la présence d'une plus forte diversité des communautés microbiennes dans les sites ultramafiques.

Ces hypothèses basées sur les calculs thermodynamiques, qui proposent une corrélation entre la chimie du fluide hydrothermal et le développement de microorganismes selon le métabolisme qu'ils pratiquent, ont été validées par plusieurs études.

Dans cette optique, Flores *et al.* ont étudié la diversité des communautés microbiennes de deux sites hydrothermaux de la ride médio-Atlantique : Rainbow et Lucky Strike (Flores *et al.*, 2011). Le premier étant un site ultramafique et le second un site basaltique, les concentrations en hydrogène dans le fluide hydrothermal sont différentes (respectivement 16,9 mM contre 0,071 mM au maximum) et font de Rainbow un site présentant des conditions chimiques plus réductrices.

L'analyse des gènes codant les ARNr 16S, *mcrA* et *dsrB* (impliqués respectivement dans la méthanogénèse et la réduction des composés soufrés) a montré que des *Archaea* méthanogènes étaient présentes sur Rainbow et absente de Lucky Strike (Necessian *et al.*, 2005). Les gènes *mcrA* ont également été détectés sur Rainbow mais pas sur Lucky Strike, et le nombre de copies des gènes *dsrB* était plus élevé sur les échantillons du site Rainbow. Il semble donc que ce soient les conditions physico-chimiques du site ultramafique Rainbow, incluant une concentration en hydrogène plus élevée, qui permettent la croissance d'*Archaea* méthanogènes qui sont des organismes anaérobies oxydant l'hydrogène.

Dahle *et al.* ont calculé l'énergie disponible pour plusieurs réactions métaboliques à partir des données physico-chimiques de deux sites hydrothermaux de la dorsale de l'Océan Arctique (Dahle *et al.*, 2018). L'un des deux sites, Bruse, était fortement enrichi en méthane et en hydrogène en comparaison du second site, Soria Moria (concentrations respectives en méthane 5400 et 0,4 µM et en hydrogène 10 et 0,30 µM). La concentration en sulfure d'hydrogène était moins contrastée entre les deux sites (respectivement 0,41 et 0,18 mM). De ce fait, l'énergie disponible pour les réactions d'oxydation du méthane était fortement supérieure à celle des réactions d'oxydation des composés soufrés pour le site Bruse, et inversement pour le site Soria Moria.

L'analyse de la diversité microbienne dans plusieurs échantillons de ces deux sites par séquençage 454 des gènes codant les ARNr 16S a montré que la proportion relative de microorganismes oxydant le méthane (*Methanococcales* et ANME-1) était de 10 à 60 % pour les échantillons du site Bruse, et de 20 % au maximum pour les microorganismes sulfuroxydants (*Epsilonbacteraeota*). Tandis que pour le site Soria Moria, les organismes sulfuroxydants représentaient jusqu'à 90 % de la diversité et peu d'organismes oxydant le méthane avaient été détectés. Les calculs d'enthalpie libre des différentes réactions métaboliques ont donc permis d'expliquer en partie les différences observées entre les communautés microbiennes de ces deux sites.

Rommevaux *et al.* ont lié l'utilisation de colonisateurs *in situ* à une analyse des variations de la composition du fluide hydrothermal au cours du temps (cette étude est présentée dans la section *Colonisateurs in situ*). Ils ont ainsi montré qu'il existait potentiellement un lien entre l'évolution temporelle de la composition chimique du fluide hydrothermal et la diversité des communautés microbiennes (Rommevaux *et al.*, 2019).

Ces résultats mettent donc en évidence la forte influence exercée par les paramètres physico-chimique du fluide hydrothermal sur les communautés microbiennes. Ils sont confortés par d'autres études qui ont montré que cette influence concernait la diversité phylogénétique et fonctionnelle des communautés microbiennes (Perner *et al.*, 2010, Lin *et al.*, 2016, Steen *et al.*, 2016, Fortunato *et al.*, 2017) ainsi que leur activité métabolique (Perner *et al.*, 2011, Perner *et al.*, 2013).

Influence de la structure des cheminées hydrothermales sur les communautés microbiennes

Comme il a été présenté dans la section *Formation des cheminées de type fumeur noir*, la structure des cheminées hydrothermales est fortement hétérogène : le conduit central est entouré de sulfures massifs et les zones périphériques sont constituées d'un mélange de sulfures et de sulfates. Ces différents minéraux ne présentent pas la même porosité, par conséquent le fluide hydrothermal et l'eau de mer ne circulent pas aussi librement dans les zones internes des cheminées que dans les parties périphériques.

Il en résulte la formation de nombreux micro-habitats pour les microorganismes qui présentent des conditions physico-chimiques sont différentes (température, pH, disponibilité en

donneurs et accepteurs d'électrons...). Ces conditions favorisent une séparation spatiale des microorganismes dans les cheminées hydrothermales.

Cette séparation des communautés microbiennes dans les différentes zones des cheminées hydrothermales a été mise en évidence par plusieurs études, dans lesquelles des cheminées ont été sous-échantillonnées. La diversité microbienne a ensuite été étudiée par des méthodes culturales (enrichissements MPN par exemple) ou moléculaires (séquençage des gènes codant les ARNr 16S) et les concentrations en microorganismes ont été déterminées par comptage en microscopie à épifluorescence ou PCR quantitative.

Un résultat commun à ces études est la variation de la concentration cellulaire entre les différentes zones des cheminées hydrothermales. La concentration en microorganismes est plus élevée dans les parties périphériques des cheminées, dans les premiers millimètres aux premiers centimètres en partant de la surface extérieure, ainsi que dans les zones supérieures (Harmsen *et al.*, 1997). Selon les études et les cheminées échantillonnées, la concentration estimée dans ces zones est dans un ordre de grandeur de 1.10^7 à 1.10^8 cellules par gramme de cheminée (Takai *et al.*, 2001, Schrenk *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2014), tandis que dans les zones internes des cheminées, à proximité du conduit central, la concentration est de l'ordre de 1.10^4 à 1.10^5 cellules par gramme de cheminée.

Ces résultats sont expliqués par le gradient de température qui traverse les cheminées : le fluide hydrothermal qui circule dans le conduit central peut atteindre une température supérieure à 300 °C, qui est largement trop élevée pour permettre le développement de microorganismes. Les minéraux au contact direct du fluide hydrothermal présentent également une température trop élevée, mais en s'éloignant du conduit central et du fluide hydrothermal, des zones de température plus modérées (autour de 100 °C) sont adaptées au développement de microorganismes hyperthermophiles.

Les travaux de Li *et al.* résument bien la complexité de la structure des cheminées hydrothermales et l'impact que cela provoque sur l'installation des communautés microbiennes dans les différentes zones des cheminées (Li *et al.*, 2014).

Une cheminée hydrothermale du site Dudley de la dorsale Juan de Fuca a été prélevée, coupée transversalement et sous-échantillonnée en 10 parties (**Figure 17**). La composition minéralogique de chaque sous-échantillon a été déterminée par diffraction aux rayons X (XRD). La diversité microbienne a été étudiée par RFLP et clonage-séquençage des gènes codant les

ARNr 16S et les biomasses ont été estimées par PCR quantitative des gènes codant les ARNr 16S.

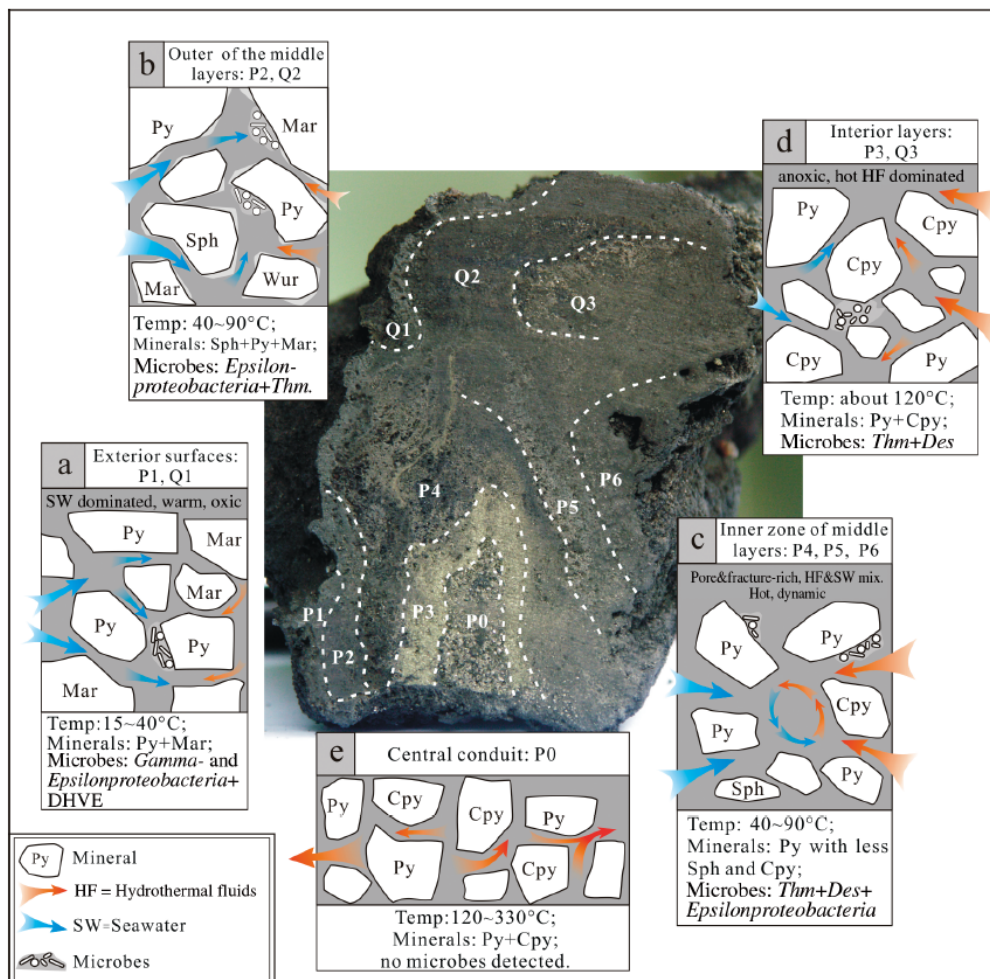


Figure 17 : Photographie et schémas présentant le sous-échantillonnage réalisé sur la cheminée étudiée par Li et al. (Li et al., 2014). a : surfaces extérieures ; b : zones externes des couches intermédiaires ; c : zones internes des couches intermédiaires ; d : zones internes proches des conduits ; e : conduit central actif. Py : pyrite ; Mar : marcasite ; Sph : sphalérite ; Wur : wurtzite ; Cpy : chalcopyrite. Thm : Thermococcales ; Des : Desulfurococcales ; DHVE : deep-sea hydrothermal vent Euryarchaeota.

La figure (**Figure 17**) illustre la complexité que peut présenter la structure interne d'une cheminée hydrothermale. Deux conduits sont visibles, le conduit noté P qui était encore ouvert au moment du prélèvement de la cheminée, où circulait le fluide hydrothermal, et le conduit Q qui était fermé par la précipitation des minéraux. Les autres sous-échantillons des parties internes sont séparés en trois zones (couches intermédiaires internes et externes, et zones internes proches des conduits). Ces différentes zones présentent des compositions minéralogiques variées : le conduit central (P0) est principalement composé chalcopyrite et de

pyrite (49,4 et 34,8 %), les zones internes proches du conduit (P3 et Q3) sont surtout composées de pyrite (70 %) tout comme les zones internes des couches intermédiaires (P4, P5 et P6) qui sont les parties qui présentent la plus forte porosité. Les zones périphériques (P1 et Q1) sont constituées majoritairement de marcasite et de pyrite.

Les extractions d'ADN n'ont pas permis d'extraire une concentration en ADN quantifiable à partir de l'échantillon P0, ce qui confirme les résultats des études présentées précédemment. La température au niveau du conduit où circule le fluide hydrothermal doit être trop élevée pour permettre la croissance de microorganismes. La concentration en microorganismes estimée à partir des concentrations d'ADN est de l'ordre de 1.10^4 cellules par gramme de cheminée dans les zones internes (P3 et Q3) contre 1.10^7 dans les zones externes (P1 et Q1), avec des valeurs moyennes de 1.10^5 et 1.10^6 dans les zones intermédiaires. Cela confirme donc que la température est un des principaux facteurs contrôlant les populations microbiennes. Dans l'ensemble, la concentration en ADN d'*Archaea* subit moins de variations que la concentration en ADN de *Bacteria* entre les différentes zones.

La disponibilité en substrat permet aussi d'expliquer la distribution des communautés microbiennes. Ainsi, l'intérieur de la cheminée est principalement colonisé par des microorganismes hyperthermophiles dont les représentants cultivés pratiquent un métabolisme de réduction du soufre (*Thermococcales* et *Desulfurococcales*). Tandis que les zones externes sont surtout colonisées par des organismes mésophiles sulfo-oxydants (*Epsilonbacteraeota* et *Gammaproteobacteria*).

La température dans les différentes zones de la cheminée a été estimée d'après les températures de croissance connues des microorganismes détectées. Ainsi la température du conduit central (P0) est estimée entre 120 et 330 °C, une température élevée à laquelle aucun microorganisme connu ne peut se développer. Le gradient thermique dans cette zone est donc très abrupt. Dans les zones internes proches des conduits (P3 et Q3), la température est estimée à environ 120 °C et est donc adaptée à la croissance d'*Archaea* hyperthermophiles qui y ont été détectées. Dans les couches intermédiaires, la température de l'ordre de 40 à 90 °C, serait adaptée à la croissance d'organismes mésophiles et thermophiles tandis que la température à la surface de la cheminée (P1 et Q1) serait diminuée à 15 à 40 °C par la présence d'eau de mer.

Ainsi les seuls microorganismes détectés dans les zones internes des cheminées hydrothermales sont des *Archaea* hyperthermophiles comme des *Thermococcales*, *Archaeoglobales*, *Desulfurococcales* ou des *Archaea* méthanogènes (Harmsen *et al.*, 1997, Schrenk *et al.*, 2003, Kormas *et al.*, 2006, Pagé *et al.*, 2008).

A l'inverse, dans les zones périphériques, sont également présentes des *Bacteria* thermophiles comme des *Aquificales* et des *Thermales* ainsi que des mésophiles comme certaines *Epsilonbacteraeota* et *Gammaproteobacteria* (Kormas *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2014). Des *Archaea* sont aussi détectées dans ces parties dont la température est plus modérée, notamment des groupes d'*Archaea* marines incultivées adaptées aux basses températures (Schrenk *et al.*, 2003). Nakagawa *et al.* ont montré la présence d'*Archaea* hyperthermophiles comme des *Thermococcales* dans les trois premiers millimètres de la surface d'une cheminée. Cela indique que le gradient thermique peut parfois être plus abrupt et que la température peut être élevée même dans les parties externes des cheminées.

2) Interactions entre les microorganismes et les minéraux

Les microorganismes des écosystèmes hydrothermaux entretiennent de nombreuses interactions avec leur environnement. Tout d'abord, les processus métaboliques d'oxydation ou de réduction des composés minéraux (S^0 , H_2 , Fe^{3+} , NO_3^- , SO_4^{2-} , $S_2O_3^{2-}$...), que les microorganismes catalysent pour produire de l'énergie, peuvent être considérés comme une interaction entre les microorganismes et leur environnement minéral (Edwards *et al.*, 2005). Ces réactions métaboliques sont détaillées dans la section *Diversité métabolique* et sont qualifiées d'assimilatrices, si les composés minéraux sont incorporés dans la cellule, et sont dites dissimilatrices dans le cas contraire (Holden & Adams, 2003).

Certaines réactions catalysées par les microorganismes mènent à la précipitation d'éléments minéraux qui peuvent s'accumuler à l'intérieur des cellules où être excrétés dans le milieu (Ehrlich, 1999, Gadd, 2010).

Différents processus de ce type ont été décrits pour des microorganismes isolés d'environnements hydrothermaux. C'est le cas d'*Archaea* hyperthermophiles, comme certaines souches de *Thermococcus*, qui produisent des nanocristaux de greigite (Fe_3S_4) en présence de sulfate de fer. Ces nanocristaux (**Figure 18**) peuvent rester stables dans le milieu de culture pendant plusieurs semaines (Gorlas *et al.*, 2018). Deux souches appartenant aux genres *Pyrodictium* et *Hyperthermus*, des *Archaea* hyperthermophiles, ont été isolées d'une cheminée hydrothermale contenant des oxy-hydroxydes de fer. L'analyse de leur métabolisme *ex situ* a montré leur capacité à produire de la magnétite (Fe_3O_4) et du fer ferreux (Fe^{2+}) à partir de

ferrihydrate [$\text{Fe}_{10}\text{O}_{14}(\text{OH})_2$]. Ces deux souches sont donc capables de réduire un minéral ferreux par contact sans nécessiter la présence de Fe^{3+} dissous (Jennifer Lin *et al.*, 2014).

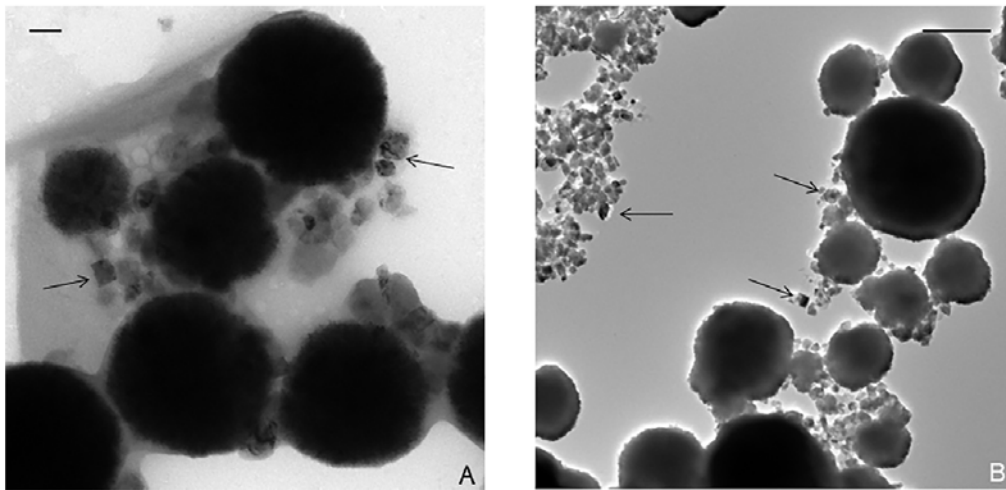


Figure 18 : Photographies en microscopie électronique à transmission présentant la production de greigite par des Thermococcales. A : *T. nautili*, barre d'échelle = 100 nm ; B : *T. kodakarensis*, barre d'échelle = 500 nm. Les nanocristaux de greigite sont indiqués par des flèches noires. Publié par Gorlas *et al.* (Gorlas *et al.*, 2018).

Ces souches sont des exemples de la capacité de certains microorganismes à pratiquer des métabolismes peu documentés impliquant des processus de biominéralisation à haute température. Des processus similaires sont observés à plus basse température, notamment dans le cas de symbioses bactériennes avec des animaux comme la crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata*. Cette espèce endémique des sources hydrothermales, qui vit dans le pôle froid à proximité des émissions de fluide diffus, héberge des communautés bactériennes dans sa cavité branchiale et perd ses symbiontes à chaque mue. Après la colonisation par les communautés bactériennes, un dépôt progressif d'oxyde de fer sous forme de ferrihydrate provoque une coloration des scaphognatites et des lames branchiales des crevettes (Gloter *et al.*, 2004, Corbari *et al.*, 2008). Il est supposé que cette accumulation d'oxydes de fer, qui est corrélée avec la colonisation des microorganismes, soit causée par des *Bacteria* symbiotiques ferro-oxydantes (Zbinden *et al.*, 2004).

Houghton *et al.* ont étudié ces processus en réalisant des cultures en continu en bioréacteur sous pression (250 bar) en utilisant des échantillons de cheminées hydrothermales comme inoculum et source de minéraux. Les cultures ont été incubées à deux températures (70 ou 90 °C) en présence de nitrate (20 mM) (Houghton *et al.*, 2007). Dans les deux cas, la

production de sulfate mesurée était trop élevée pour être due uniquement à la dissolution de l'anhydrite (CaSO₄). Dans l'incubation à 70 °C, les auteurs suggèrent une oxydation de la pyrrhotite couplée à la réduction du nitrate, car les microorganismes enrichis appartenaient aux genres *Persephonella*, *Hydrogenivirga* et *Desulfurobacterium* dont les représentants isolés sont capables de réduire les nitrates. La principale différence observée à 90 °C est une production de fer ferreux (0,5 mM). Elle est potentiellement due à la réduction du fer ferrique par des phylotypes appartenant aux genres *Aquifex* ou *Hydrogenivirga* ou à des lignées d'*Archaea* incultivées (DHVE-3 et DHVE-5).

La plupart des métabolismes décrits sont basés sur l'oxydation ou la réduction de composés dissous, et les processus impliquant des minéraux sont encore peu documentés. Au vu de la diversité des minéraux composant les cheminées hydrothermales, ces processus doivent pourtant avoir un rôle important dans les écosystèmes hydrothermaux, notamment dans les sites inactifs lorsqu'il n'y a plus d'apport d'éléments réduits par le fluide hydrothermal (Li *et al.*, 2017, Hou *et al.*, 2020).

Contexte et objectifs de l'étude

This section is also presented in English below

Contexte de l'étude

Depuis la découverte des sources hydrothermales océaniques profondes en 1977, de nombreuses études ont permis de mieux comprendre le fonctionnement des écosystèmes qui y sont associés. Les communautés microbiennes présentes sont diversifiées tant du point de vue phylogénétique que métabolique, et les microorganismes entretiennent des interactions complexes et réciproques avec leur environnement.

Plusieurs méthodologies ont été appliquées pour étudier les communautés microbiennes et leur relation avec l'environnement hydrothermal, et chacune présente des avantages ainsi que des inconvénients. Les principales approches employées sont le déploiement de colonisateurs *in situ*, la réalisation de cultures d'enrichissement et d'isolement ainsi que l'utilisation de méthodes moléculaires.

Les colonisateurs *in situ* permettent de conserver au maximum les conditions naturelles de l'environnement hydrothermal. Cependant, les difficultés d'accès aux sites hydrothermaux océaniques profonds limitent l'utilisation des colonisateurs *in situ* et la durée de leur déploiement est généralement assez courte (de quelques jours à quelques semaines) comparée à l'échelle de temps de la formation d'une cheminée hydrothermale (de quelques jours à quelques années). Il est donc difficile d'étudier la dynamique temporelle des communautés sur une durée plus longue que celle qui correspond aux premiers stades de maturation des cheminées hydrothermales.

Les méthodes culturelles *ex situ* permettent de contrôler les conditions de culture pour étudier la physiologie, le métabolisme, la génétique et l'écologie des microorganismes hydrothermaux. Néanmoins, il faut prendre en compte que la réponse des microorganismes à ces conditions artificielles peut varier par rapport à leur mode de vie dans l'environnement. De plus, seule une faible partie de la diversité microbienne peut être cultivée avec les techniques actuelles et de nombreux microorganismes ne peuvent être étudiés grâce aux méthodes culturelles.

Les approches moléculaires s'affranchissent de la nécessité de cultiver les microorganismes pour les étudier. Elles permettent ainsi d'obtenir des données sur les communautés microbiennes cultivées et incultivées. Les techniques de séquençage haut-débit, qui profitent d'un développement rapide depuis plusieurs années, ont mis en avant la présence d'une importante diversité phylogénétique et fonctionnelle, grâce aux techniques de métagénomique. Ces grandes quantités de données sont néanmoins à prendre en compte avec un certain recul, car les informations obtenues restent généralement putatives. De plus, l'échantillonnage est une étape primordiale pour assurer la robustesse des résultats produits par les techniques moléculaires. De même que les études utilisant des colonisateurs *in situ*, les études moléculaires réalisées à partir d'échantillons provenant de sites différents produisent des résultats qu'il est difficile de comparer.

Ces approches sont donc très différentes, mais surtout complémentaires. C'est pourquoi de nombreuses études couplent des techniques de culture ainsi que des méthodes moléculaires. La confrontation des résultats issus de ces approches à des données environnementales est généralement le meilleur moyen de comprendre le mode de vie et l'écologie des microorganismes vivant dans un environnement.

Les processus de colonisation des édifices hydrothermaux par les microorganismes ainsi que la dynamique spatiale et temporelle des communautés microbiennes ont fait l'objet de recherches impliquant les méthodologies décrites précédemment. Cependant les résultats de ces études sont parfois contradictoires, ce qui indique que de nombreux facteurs influencent ces phénomènes. Il reste donc nécessaire de continuer l'effort de recherche afin de mieux comprendre comment les microorganismes colonisent les cheminées hydrothermales, et comment les communautés évoluent dans ces écosystèmes particuliers.

Problématique et objectifs de l'étude

La présente étude a pour but de répondre à trois questions majeures :

- Quels microorganismes sont les premiers colonisateurs des écosystèmes hydrothermaux ?
- Comment se succèdent les communautés microbiennes au cours de la maturation des édifices hydrothermaux ?
- Quels sont les interactions qu'entretiennent les microorganismes avec l'environnement abiotique ?

Pour apporter des réponses à ces questions, des techniques complémentaires ont été utilisées. Une présentation globale de la méthodologie utilisée est résumée dans la **Figure 19**.

Tout d'abord, l'étude est basée sur un échantillonnage rigoureux des cheminées hydrothermales et du panache proximal associé (cadre **1** sur la **Figure 19**). Les cheminées ont été prélevées en deux parties, lorsque cela était possible, afin de séparer les zones supérieures, constituées majoritairement de sulfates, et les zones inférieures, constituées majoritairement de sulfures.

Les échantillons de cheminées hydrothermales ont été analysés par diffraction aux rayons X, et des sections polies de minéraux ont été observées au microscope pour déterminer la composition minéralogique des cheminées et estimer leur stade de maturation (**6**).

Des extractions d'ADN ont été réalisées à partir des échantillons de cheminées hydrothermales et du panache proximal associé, puis les gènes codant les ARNr 16S ont été séquencés par la méthode Illumina MiSeq (**3**). Les données de diversité microbienne et de minéralogie ont été regroupées dans des analyses statistiques afin de chercher des relations entre le stade de maturation des cheminées hydrothermales et la diversité des communautés microbiennes.

Les échantillons de cheminées hydrothermales ont été conditionnés pour permettre de réaliser des cultures de microorganismes. Ainsi, des enrichissements MPN et des mesures d'activité ont été réalisés à partir de quatre échantillons de cheminées hydrothermales représentatifs des deux principaux stades de maturation des cheminées. Plusieurs conditions de température et de disponibilité en substrats ont été mises en place pour les enrichissements MPN, afin d'estimer la concentration en microorganismes viables cultivables dans des

échantillons de cheminées hydrothermales (4). Les consommations et productions de métabolites ont été mesurées pour déterminer les métabolismes pratiqués par les microorganismes enrichis (8). Des mesures d'activité métabolique ont été réalisées à l'aide de molécules radiomarquées à partir des mêmes échantillons que les enrichissements MPN afin de mesurer les taux de fixation de carbone par les métabolismes autotrophes ou hétérotrophes à plusieurs températures d'incubation (5).

Des cultures d'enrichissement en bioréacteur ont été réalisées à bord durant les campagnes océanographiques pour étudier *in vitro* la croissance des microorganismes dans des conditions se rapprochant des conditions *in situ* (2). Des échantillons de panache hydrothermal proximal ont servi de milieu de culture et les bioréacteurs ont été inoculés avec des échantillons de cheminées hydrothermales. Les microorganismes enrichis ont été identifiés par séquençage haut-débit des gènes codant les ARNr 16S (3).

Des cultures d'enrichissement de *Bacteria* sulfo-oxydantes ont été réalisées à partir d'un échantillon de cheminée hydrothermale (7). A partir de ces enrichissements, une souche appartenant à une nouvelle espèce du genre *Persephonella* a été isolée et caractérisée. Ce genre étant un exemple concret d'adaptation des microorganismes à l'environnement hydrothermal, des expérimentations complémentaires ont été réalisées afin d'étudier en détail le métabolisme et la physiologie de la souche (8). Les résultats de cette étude ont été présentés dans un article qui a été publié en janvier 2021 dans la revue *Systematic and Applied Microbiology*.

Plan du manuscrit

Les matériels et méthodes utilisés dans cette étude sont décrits dans le chapitre 2. Les résultats de l'analyse minéralogique des échantillons de cheminées hydrothermales ont été utilisés pour estimer le stade de maturation des cheminées et servent ainsi d'échelle de temps dans les autres études. Ils font donc l'objet d'une partie dédiée dans le chapitre 3. Le chapitre 4 décrit ensuite la diversité phylogénétique et la structure des communautés microbiennes des cheminées hydrothermales et du panache proximal. Les résultats des cultures en continu en bioréacteur y sont également présentés. Le chapitre 5 complète ces résultats avec des données fonctionnelles obtenues en réalisant des enrichissements MPN et des mesures d'activité. Le chapitre 6 présente les travaux de caractérisation de la souche MO1340 du genre *Persephonella*, qui est un exemple d'adaptation des microorganismes à l'environnement hydrothermal. Enfin,

les résultats des différentes approches sont synthétisés et discutés dans le chapitre 7 qui tente de répondre à la problématique du sujet de thèse.

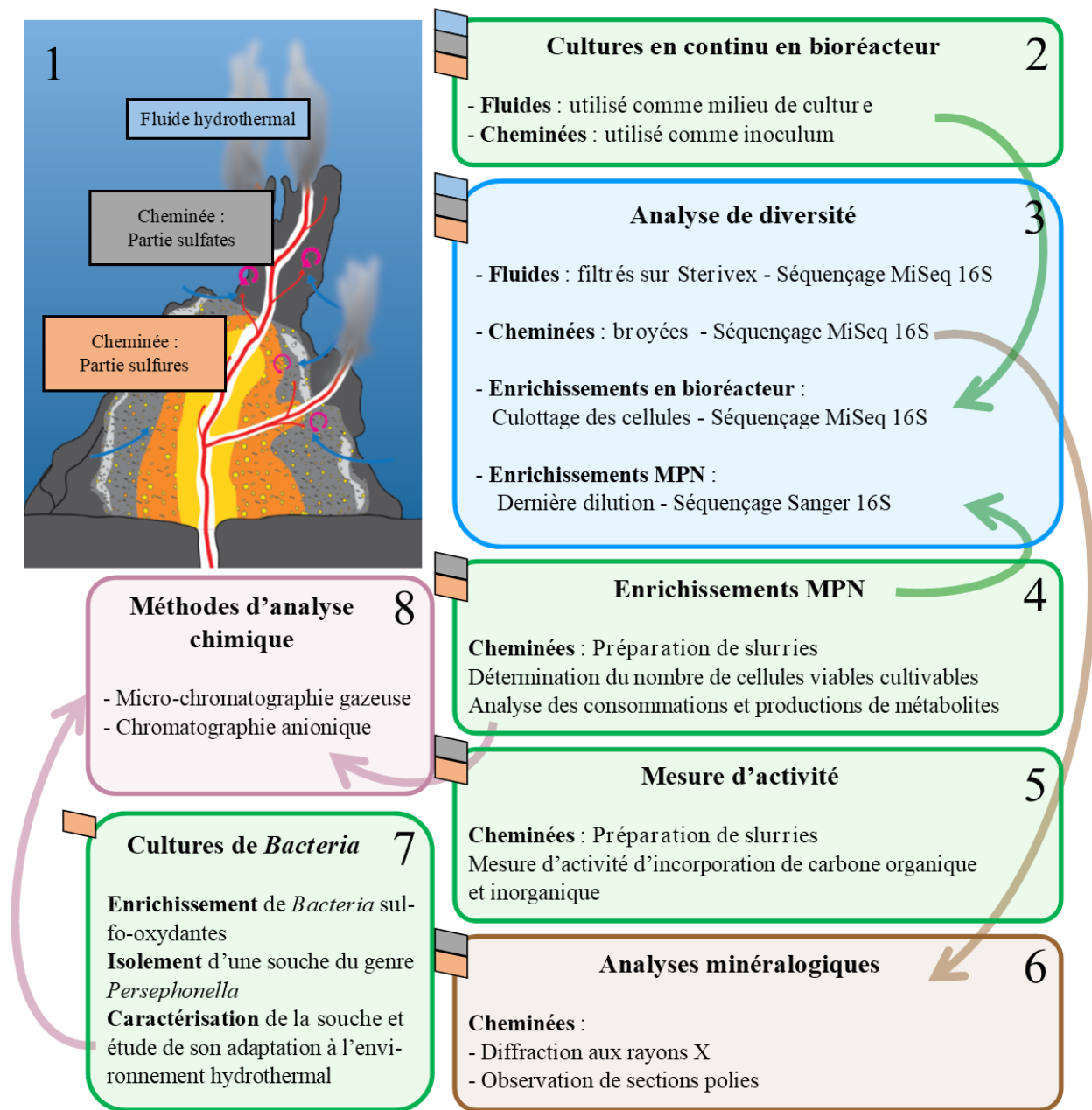


Figure 19 : Résumé graphique de la méthodologie appliquée durant la présente étude. Cadres verts : techniques culturales ; Cadres bleus : techniques moléculaires ; Cadre brun : techniques minéralogiques ; Cadre rose : techniques d'analyse chimique. Détail dans le texte.

4) Context and objectives of the study

Context of the study

Since the discovery of deep-sea hydrothermal vents in 1977, numerous studies have provided a better understanding of hydrothermal ecosystems. The associated microbial communities exhibit high phylogenetic and metabolic diversity and the microorganisms maintain complex interactions with their environment.

Different methods were used to study the microbial communities and their interactions with hydrothermal environments, each method presenting advantages and limitations. It concerns deployment of *in situ* colonizers, enrichment and isolation cultures and molecular approaches.

The deployment of *in situ* colonizers is useful because it conserves the natural conditions of hydrothermal environment. However, because of the depth of hydrothermal vents the access to the sites is difficult and it limits the period of deployment to a few weeks or months. Compared to the time scale of hydrothermal chimneys growth this duration is very short. Hence it is complicated to study the temporal dynamics of microbial communities on a time scale that exceeds the first stage of chimneys growth.

The *ex situ* cultural methods give the possibility to control the culture conditions in order to investigate the physiology, metabolism, genetic and ecology of microbial communities of hydrothermal vents. Nevertheless it is important to keep in mind that the conditions are artificial, and that the microorganisms may present a different response in natural settings. Moreover, only a small fraction of the diversity of microorganisms can be cultivated by the actual techniques, and numerous microorganisms cannot be studied using cultural methods.

The molecular approaches do not require to cultivate the microbial communities and allow to study cultivated and uncultivated microorganisms. The high throughput sequencing methods benefit from a fast and regular development and have highlighted the great phylogenetic diversity of microbial communities, as well as the functional diversity owing to metagenomics. However, those big data must be interpreted carefully because most of the time the information remains putative. Besides, the sampling step is essential to ensure robustness of the results produced by molecular methods. As for the studies using *in situ* colonizers, the results

produced by molecular approaches based on samples collected from different sites are uneasy to compare.

Those methods are thus very different, but above all they are complementary. This is the reason why numerous studies employed cultural and molecular studies. Comparing the results from these approaches to environmental data is usually the most efficient way to understand the ecology and lifestyle of microorganisms in each environment.

The colonization processes of hydrothermal vents by microorganisms, as well as spatial and temporal dynamics of microbial communities were investigated by studies that employed the methods described above. However these studies have sometimes produced contrasting results, meaning that numerous factors influence those phenomena. Thus it is still necessary to continue the investigations to better understand how the microorganisms colonize hydrothermal chimneys and how the communities succeed over time in these ecosystems.

Problematics and aims of the study

The objective of the current study is to answer to three main questions:

- Which microorganisms are the first colonizers of hydrothermal ecosystems?
- How do the microbial communities succeed over the hydrothermal chimneys growth?
- How do microorganisms interact with their environment?

To answer to these questions, complementary methods were used. The methodological approach is presented in the **Figure 20**.

First, the study is based on a meticulous sampling of hydrothermal chimneys and the associated plume (**frame 1** on the **Figure 20**). The chimneys were collected in two steps when it was possible in order to separate the upper parts, mainly composed of sulfates, and the lower parts, mainly composed of sulfides.

The hydrothermal chimney samples were analysed by X-ray diffraction, and microscopic observations of thin sections were realized. The aim was to determine the mineralogical composition of the samples in order and to estimate the growth stage of chimneys (**6**).

DNA extractions were performed from hydrothermal chimneys and fluid samples then 16S rRNA genes were sequenced by Illumina MiSeq (**3**). The data from microbial diversity

study and mineralogical study were statistically analysed to explore possible relations between the growth stage of hydrothermal chimneys and the diversity of microbial communities.

Hydrothermal chimney samples were also conditioned to realize microbial cultures. MPN enrichments and activity measurements were performed using four hydrothermal chimney samples that were representative of the two main stages of chimneys growth. Incubations were performed at different temperatures and in the presence of various substrates to estimate to concentration of viable culturable microorganisms in the chimney samples (4). The consumption of substrates and the production of metabolites were measured to identify the metabolisms performed by the enriched microorganisms (8). Activity measurements with radiolabelled substrates were realized using the same samples as the MPN enrichments to measure the carbon fixation rate by autotrophs and heterotrophs at different incubation temperatures (5).

Continuous cultures in bioreactor were performed on-board during the oceanographic cruises to study *in vitro* the microbial growth in conditions that tried to be closer to the *in situ* conditions (2). Hydrothermal proximal plume fluid samples were used as culture media and bioreactors were inoculated with hydrothermal chimney samples. The enriched microorganisms were identified by high-throughput sequencing of 16S rRNA genes (3).

Enrichment cultures of sulfur-oxidizing *Bacteria* we performed using hydrothermal chimney sample as inoculum (7). From these enrichments, a strain belonging to a new species of the genus *Persephonella* was isolated and characterised. The genus being a concrete example of microbial adaptation to hydrothermal vents, complementary experimentations were realized to investigate the metabolism and physiology of the strain (8). The results from this study were published in January 2021 in the journal *Systematic and Applied Microbiology*.

Manuscript plan

The materials and methods used in the present study are described in the chapter 2. The results of the mineralogical analysis of hydrothermal chimney samples were used to estimate the stage of growth of chimneys and so are used as time scale in the other studies. They are therefore the subject of a dedicated section in chapter 3. The chapter 4 describes the phylogenetic diversity and structure of microbial communities in hydrothermal chimneys and

proximal plume. The results of continuous cultures in bioreactor are also presented in this chapter. The chapter 5 completes these results with functional data obtained in MPN enrichments and activity measurements experiments. The chapter 6 presents the characterization and strain MO1340, which is an example of the adaptation of microorganisms to the hydrothermal environment. At least, the results of the different approaches are synthesized and discussed in the chapter 7, which attempts to respond to the problematics of the thesis subject.

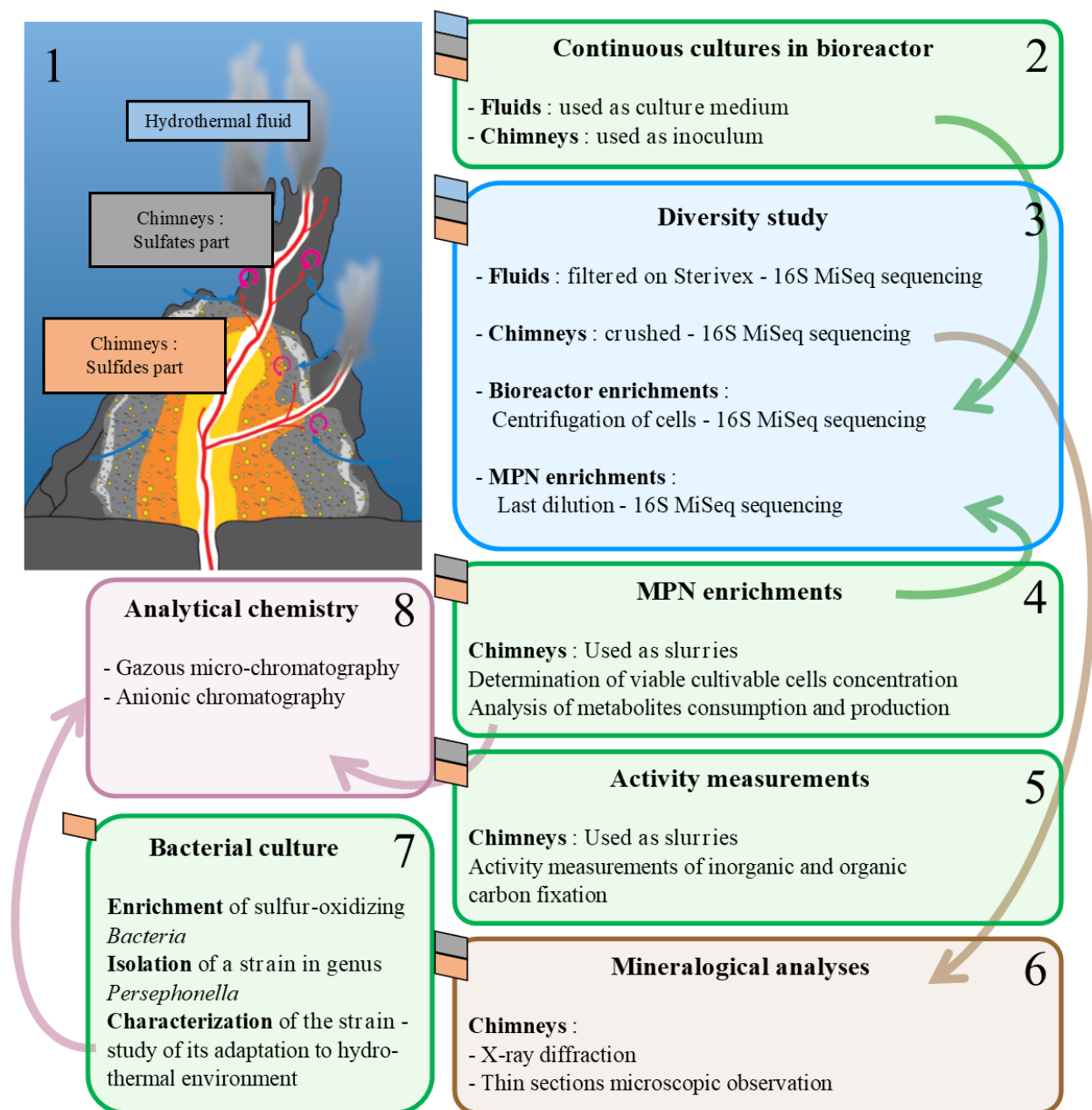


Figure 20 : Graphical summary of the methodology applied during this study. Green frames: cultivation techniques; Blue frames: molecular techniques; Brown frames: mineralogical techniques; Pink frames: chemical analysis techniques. See text for details.

Chapitre II - Matériel et méthodes

1) Sites d'étude

1) Ride médio-Atlantique

Tous les échantillons de cheminées hydrothermales et de panache proximal utilisés pendant cette étude ont été prélevés sur des sites du champ hydrothermal Lucky Strike de la ride médio-Atlantique (**Figure 21**), une dorsale lente dont la vitesse d'expansion est estimée à 22 mm/an (DeMets *et al.*, 1990, Cannat *et al.*, 1999). La présence de cette dorsale médio-océanique a d'abord été révélée au XIX^{ème} siècle grâce à des relevés bathymétriques, lors de l'expédition du H.M.S. *Challenger*, la première grande campagne océanographique au monde (Aitken & Foulc, 2018).

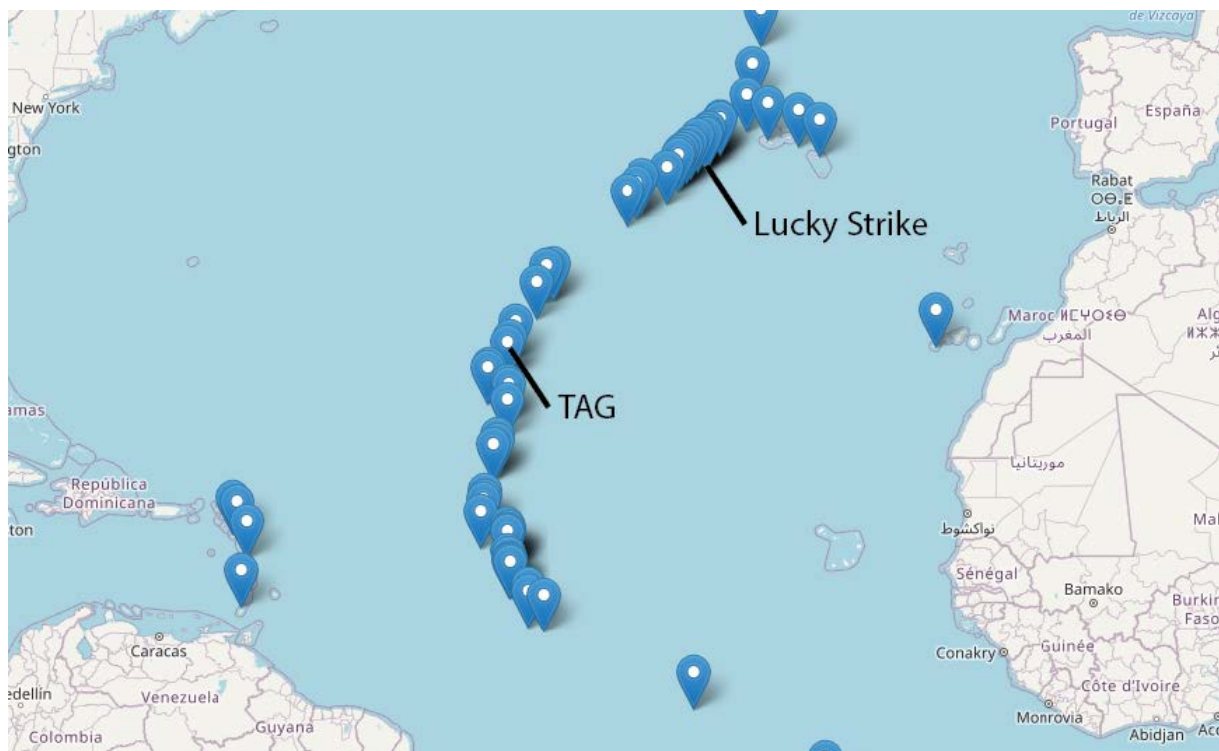


Figure 21 : Localisation géographique des sites hydrothermaux de la ride médio-Atlantique référencés par la base de données InterRidge (marques bleues). Modifié d'après Beaulieu *et al.* (Beaulieu *et al.*, 2013).

Plus d'un siècle plus tard, le premier site hydrothermal actif de la ride médio-Atlantique, Trans-Atlantic Geotraverse (TAG,) a été découvert en 1984 à 26 °N de latitude (Rona *et al.*, 1984). Il s'agit d'un site à substrat basaltique présentant des structures de type fumeurs blancs ou fumeurs noirs, et des massifs de sulfures inactifs.

2) Le champ hydrothermal Lucky Strike

Le champ hydrothermal où ont été prélevés les échantillons utilisés pendant cette étude, Lucky Strike, est situé à 400 km au sud-ouest des Açores à une latitude d'environ 37 °N. Suite à la découverte des premiers sites de la ride médio-Atlantique, un effort d'exploration a été fait afin de découvrir de nouveaux sites actifs plus au nord, en réalisant de la bathymétrie multifaisceaux, en recherchant des anomalies chimiques dans la colonne d'eau et en faisant des prélèvements de roches à l'aide de dragues. Lors d'un dragage du fond en 1992, un échantillon de sulfure hydrothermal recouvert de moules vivantes a rapidement été remonté, constituant une preuve incontestable de la présence d'un site actif dans la zone. Des plongées du sous-marin Alvin ont ensuite confirmé cette observation. C'est ce « coup de chance » dans la découverte du site qui a inspiré le nom Lucky Strike (Langmuir *et al.*, 1993, Langmuir *et al.*, 1997).

Le champ hydrothermal Lucky Strike est localisé sur un segment de la ride médio-Atlantique long de 65 km et large d'environ 11 km. La profondeur maximale de ce segment est de plus de 3000 mètres, mais Lucky Strike est situé sur un ancien volcan sous-marin étendu sur 13 km par 7 km, qui est surélevé par rapport à la vallée axiale de la dorsale. Il s'agit donc de l'un des sites hydrothermaux les moins profonds de la dorsale (1650 mètres) avec Menez Gwen (850 mètres) (Fouquet *et al.*, 1994). Trois cônes volcaniques, constituant le sommet de l'ancien volcan, entourent le champ hydrothermal. Ils sont nommés d'après leur localisation (Nord-Ouest, Nord-Est et Sud). Un lac de lave fossile d'un diamètre d'environ 300 mètres est présent au milieu de ces trois cônes volcaniques, à une profondeur légèrement supérieure, de 1730 mètres (**Figure 22**). D'après la vitesse d'expansion de la dorsale et la largeur du site, son âge est estimé à environ 45 000 ans et l'activité hydrothermale peut être estimée à plusieurs centaines ou milliers d'années. Les émissions de chaleur qui permettent au site de rester actif proviennent d'une chambre magmatique située environ 3 km sous la surface (Singh *et al.*, 2006).

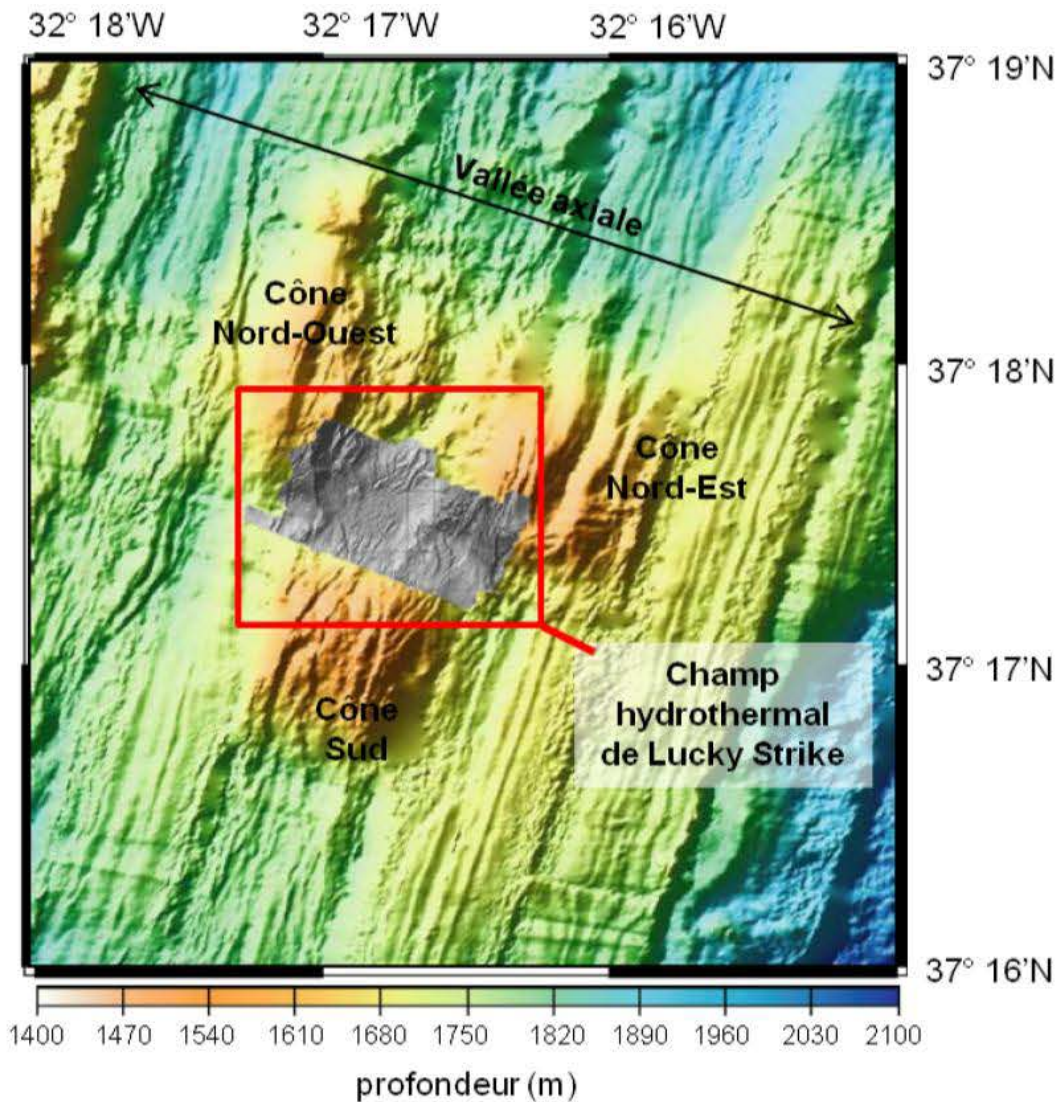


Figure 22 : Carte bathymétrique du site Lucky Strike présentant la localisation des trois cônes volcaniques par rapport au lac de lave (en gris au centre). D'après Ondréas et al. (Ondréas et al., 2009) et Henri et al. (Henri, 2015).

Des levées bathymétriques, l'acquisition d'images et la reconstruction de mosaïques ainsi que des plongées d'exploration réalisées lors de nombreuses campagnes océanographiques ont permis de constituer des cartes bathymétriques détaillées de ce champ hydrothermal, et d'identifier les différents sites actifs ou inactifs, ainsi que les zones de diffusion de basse température (Ondréas et al., 2009, Barreyre et al., 2012). Les cheminées hydrothermales sont composées de minéraux classiques pour ce type de structures : des sulfates polymétalliques (pyrite, chalcopyrite, marcasite, sphalérite), et des sulfates (anhydrite) (Langmuir et al., 1997). Environ 30 sites hydrothermaux ont ainsi été identifiés, dont la majorité sont localisés dans la zone sud-est.

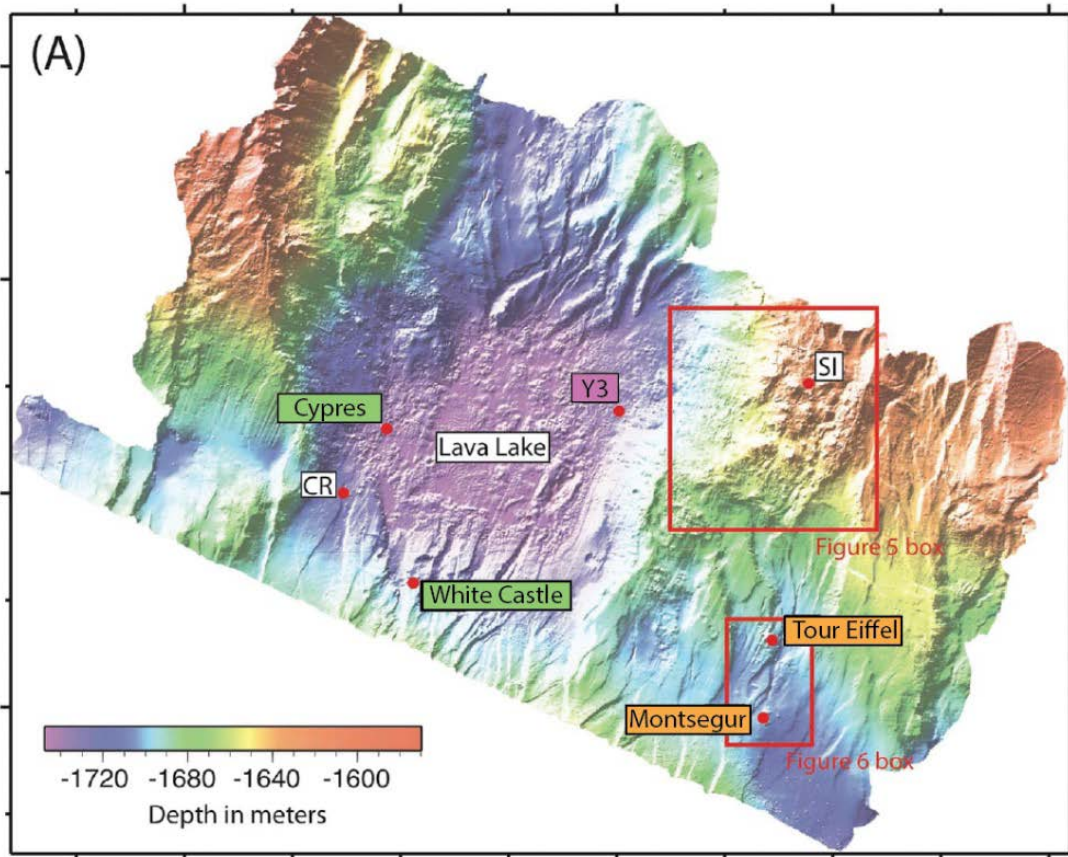


Figure 23 : Carte bathymétrique haute-résolution, campagne MoMARET'06 (Ondréas *et al.*, 2009), modifiée d'après (Barreyre *et al.*, 2012). Les noms des sites échantillonnés durant l'étude sont notés sur un fond dont la couleur précise l'endmember auquel ils sont associés.

Le fluide hydrothermal qui alimente ces sites emprunte différents « circuits » ou « endmembers » lors de sa circulation en subsurface, ce qui modifie ses propriétés physico-chimiques. Ainsi les sites qui sont alimentés par un même endmember expulsent du fluide hydrothermal dont la composition chimique est plus proche en comparaison des sites des autres endmembers (Escartin *et al.*, 2015, Chavagnac *et al.*, 2018). La **Figure 23** présente la localisation des sites échantillonnés durant l'étude, ainsi que les endmembers auxquels ils appartiennent (représentés par la couleur du fond). Les sites sont regroupés de la manière suivante : le groupe sud-est (Montsegur et Tour Eiffel, comprenant les cheminée Aisics et Montserrat/DEAFS), le groupe central (White Castle et Cypres) et le groupe nord-est (Y3).

Un 6^{ème} site a été échantillonné, mais n'est pas présenté sur la carte car il est localisé à 1,5 km à l'est du centre du champ hydrothermal. Il s'agit du site Capelinhos, qui a été découvert en 2013, et dont les fluides présentent une composition chimique très contrastée par rapport aux autres sites, avec un appauvrissement en chlorures (concentration divisée par deux), un

enrichissement en fer (jusqu'à 5 fois plus concentré, environ 2,5 mM) et en manganèse. (Chavagnac *et al.*, 2018).

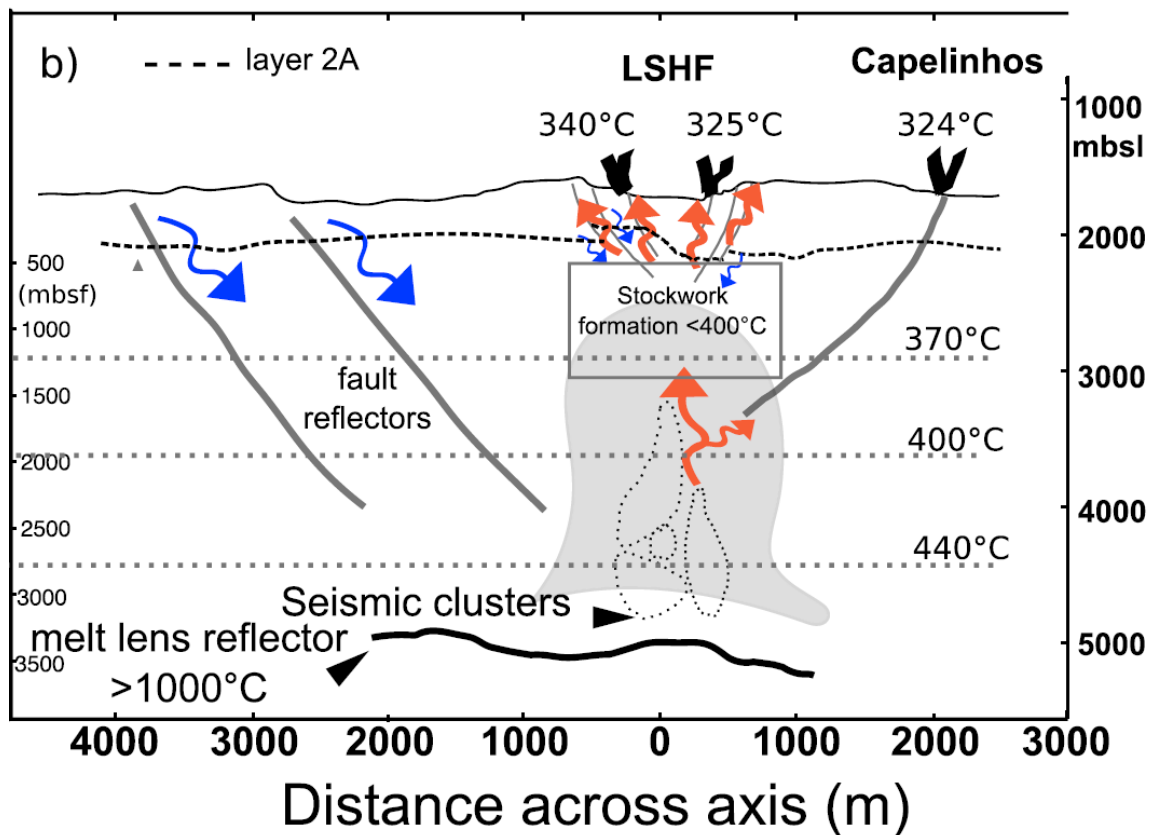


Figure 24 : Schéma représentant la circulation hydrothermale en subsurface dans le site Lucky Strike. Les flèches bleues représentent les flux d'eau de mer entrant dans le système, et les flèches rouges les flux de fluide hydrothermal chaud remontant par les failles. Publié par (Chavagnac *et al.*, 2018).

Des modèles géologiques et hydrologiques (**Figure 24**), représentant la circulation hydrothermale en subsurface, permettent d'expliquer ces différences dans la composition chimique du fluide hydrothermal de chaque site (Crawford *et al.*, 2013, Escartin *et al.*, 2015, Chavagnac *et al.*, 2018). Lorsque l'eau de mer atteint la zone de réaction à une profondeur d'environ 2600 mètres sous le lac de lave, les conditions de pression et de température (438 °C) sont propices à la séparation de phase. Le fluide hydrothermal remonte ensuite par deux circuits différents avant d'alimenter les sites centraux ou le site Capelinhos. Lors de la remontée au niveau du lac de lave vers les sites centraux, la distance est plus courte mais le substrat est moins perméable, donc le temps de résidence dans le substrat est plus élevé que lors de la remontée vers le site Capelinhos. Le refroidissement du fluide par conduction est ainsi plus important, ce qui mène à la précipitation de minéraux ferreux et appauvrit le fluide en fer

(jusqu'à 65 % de fer mobilisé dans la zone de réaction). A l'inverse, le fluide qui alimente Capelinhos conserve la majorité du fer, ce qui explique les fortes concentrations mesurées.

Comparativement à d'autres sites de la ride médio-Atlantique comme Rainbow, les fluides hydrothermaux des sites du champ Lucky Strike sont moins riches en gaz réduits comme l'hydrogène et le méthane (respectivement 0,02 à 0,73 mM et 0,5 à 0,97 mM contre 16 et 2,5 mM) car le substrat est basaltique. En revanche ils sont enrichis en dioxyde de carbone (13 à 28 mM) (Charlou *et al.*, 2000, Charlou *et al.*, 2002).

3) L'observatoire EMSO-Açores

L'observatoire grand fond pluridisciplinaire EMSO-Açores (European Multidisciplinary Seafloor and water column Observatory)¹ a été déployé sur le site Lucky Strike lors de la campagne MOMARSAT2010 en 2010 (Sarradin *et al.*, 2010, Colaço *et al.*, 2011). Il s'agit d'un projet impliquant plusieurs disciplines de recherche (géologie, géophysique, géochimie, écologie, microbiologie) dont l'objectif est d'acquérir des données temporelles pour comprendre les phénomènes géologiques, volcaniques, sismiques, l'écologie des écosystèmes présents et les liens qui existent entre les compartiments biotiques et abiotiques.

L'observatoire EMSO Açores est un observatoire non câblé composé d'un réseau de plusieurs instruments déployés en permanence sur le site Lucky Strike. Les différents éléments sont entretenus et améliorés durant les campagnes annuelles MOMARSAT. L'infrastructure est composée de deux nœuds, SEAMON ouest et SEAMON est, des plateformes sur lesquelles sont connectés les instruments et capteurs (**Figure 25**). Les données obtenues sont ensuite transmises par acoustique à la bouée BOREL qui les transmet par satellite au centre Ifremer de Brest. Une partie de ces données est accessible en temps réel sur le site internet de l'observatoire². Le nœud ouest est relié à des capteurs de pression et de température ainsi que des sismomètres utilisés dans les études de géophysique et géochimie. Le second nœud est équipé d'instruments pour les études d'écologie et de microbiologie. Il comprend notamment un module d'acquisition d'images, TEMPO, (Sarrazin *et al.*, 2007), un analyseur *in situ* pour le dosage du fer, CHEMINI (Vuillemin *et al.*, 2009) et une optode à oxygène. L'infrastructure

¹ <https://www.emso-fr.org/fr/EMSO-Azores>

² <http://www.emso-fr.org/charts/azores/>

comporte également un réseau de sondes de températures autonomes, des OBS (Ocean Bottom Sismometer), et un mouillage d'océanographie physique.

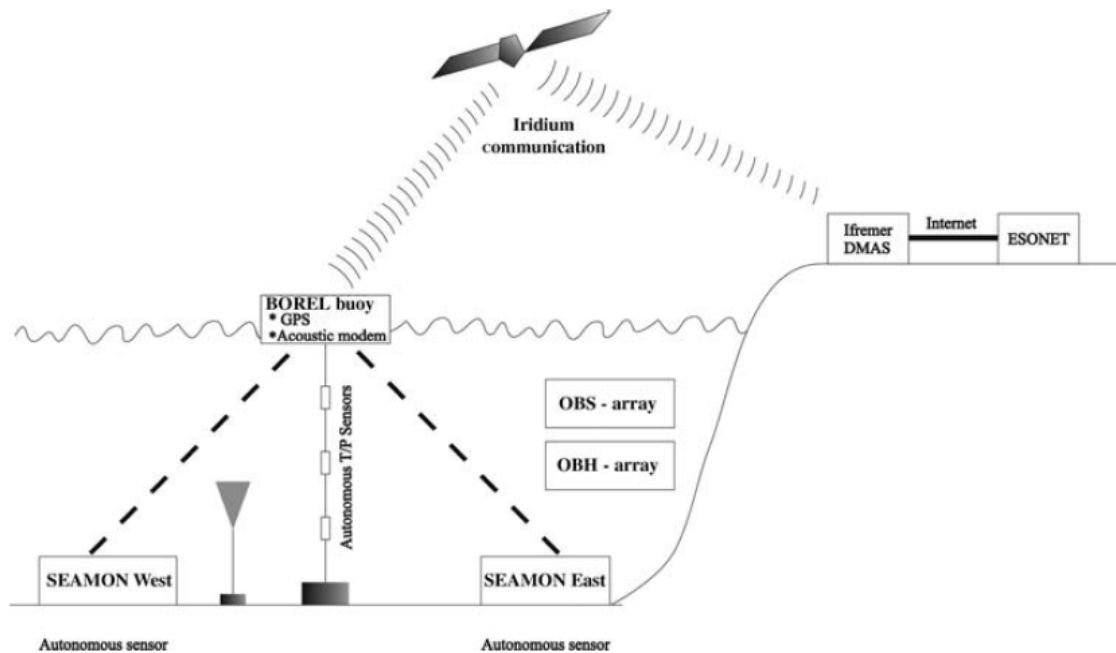


Figure 25 : Schéma de l'organisation des principaux éléments du réseau EMSO-Açores (détails dans le texte). Publié par (Colaço et al., 2011).

Un colonisateur microbien, CISICS (Connected *In Situ* Instrumented Colonizing System) a été déployé pour la première fois en 2013. Sa conception est basée sur celle du colonisateur AISICS (Autonomous *In Situ* Instrumented Colonizing System), qui a donné son nom à la cheminée Aisics, située à proximité de l'édifice principal du site Tour Eiffel (Callac et al., 2013). Ce prototype permet de prélever du fluide hydrothermal selon une séquence préprogrammée ou par un déclenchement à distance. Le module électronique (à gauche de la cheminée Aisics sur la **Figure 26**) contient une carte électronique et une pompe qui commande le déclenchement des prélèvements. Après chaque prélèvement, une solution saline saturée en EDTA et DMSO est injectée afin de préserver l'ADN jusqu'à la récupération du module. Le module de colonisation, relié au module électronique, est composé d'un cylindre en titane (à droite sur la **Figure 26**) contenant 8 colonisateurs en titane. Deux sondes de température sont également installées, et permettent de mesurer la température toutes les 5 minutes.



Figure 26 : Photographie du déploiement du colonisateur CISICS sur la cheminée Aisics du site Tour Eiffel lors de la campagne MOMARSAT2016.

2) Prélèvement des échantillons

1) Campagnes océanographiques

Le prélèvement des échantillons a principalement été réalisé par Anne Godfroy, chercheuse au LM2E et Françoise Lesongeur, technicienne au LM2E. J'ai également participé aux campagnes océanographiques et à l'échantillonnage en 2018 et 2019.

De par leur localisation, les cheminées hydrothermales océaniques profondes nécessitent des moyens spécifiquement adaptés pour réaliser un échantillonnage lors de campagnes océanographiques, à bord de navires hauturiers capables d'embarquer des engins sous-marins. Les échantillons étudiés durant cette thèse ont été prélevés sur le champ hydrothermal Lucky Strike entre 2008 et 2019 durant les campagnes MOMAR2008 (Escartin, 2008), BATHYLUCK 2009 (Escartin & Cannat, 2009), MOMARSAT2013 (Blandin & Sarradin, 2013), MOMARSAT2014 (Sarradin & Cannat, 2014), MOMARSAT2015 (Sarradin & Cannat, 2015), MOMARSAT2016 (Cannat & Sarradin, 2016), MOMARSAT2017 (Sarradin & Cannat, 2017), MOMARSAT2018 (Cannat, 2018) et MOMARSAT2019 (Sarradin &

Legrand, 2019). Une courte campagne de trois jours, LuckyDivMic (Godfroy, 2019) a été associée aux campagnes MOMARSAT de 2018 (un jour) et 2020 (deux jours) afin de bénéficier de temps de plongée dédiés et de réaliser un échantillonnage plus complet. Ces différentes campagnes ont été menées sur deux navires de la Flotte Océanographie Française, le Pourquoi pas ? et l'Atalante (**Figure 27 A et B**), embarquant soit le sous-marin habitable Nautille (**Figure 27 C**), soit le ROV (Remotely Operated Vehicle) Victor 6000 (**Figure 27 D**), un robot télé-opéré depuis le navire.

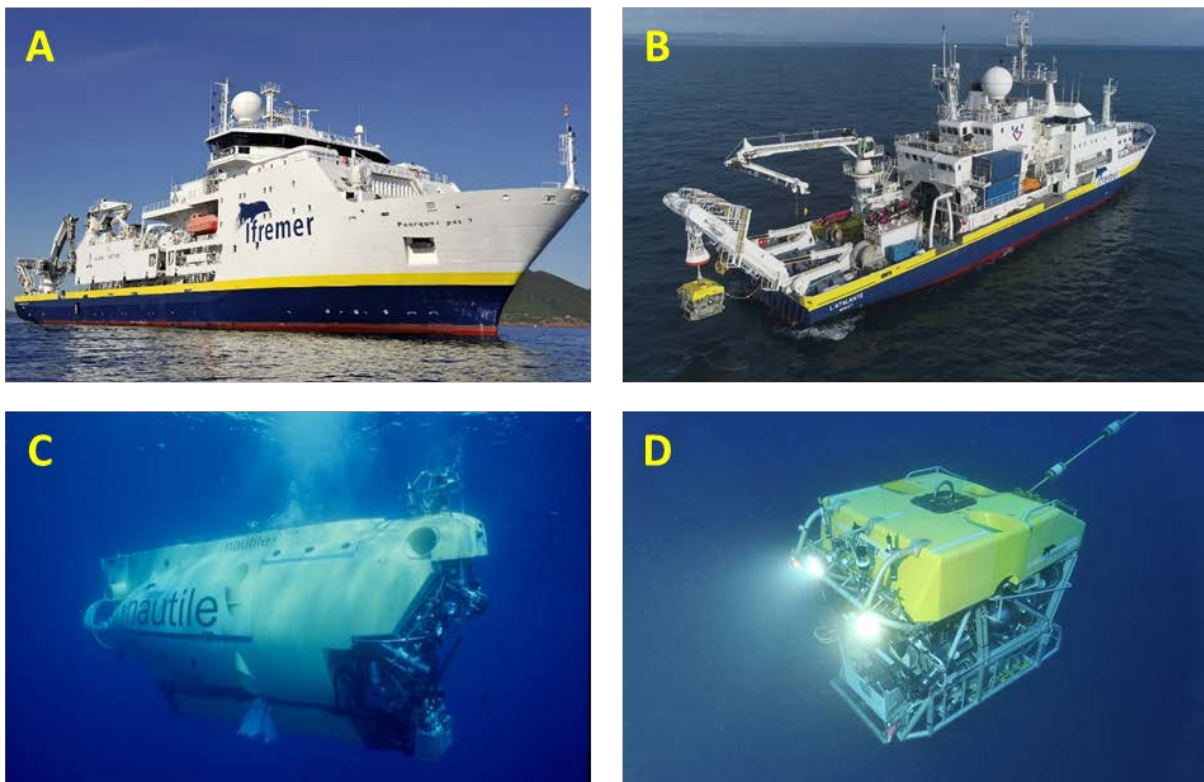


Figure 27 : Photographies des navires et engins sous-marins impliqués dans les campagnes MOMARSAT. A : N/O Pourquoi pas ? ; B : N/O Atalante ; C : HOV Nautille ; D : ROV Victor 6000

2) Prélèvement des échantillons

1) Echantillons de cheminées hydrothermales et de panache proximal

Afin de mieux comprendre les interactions existant entre les microorganismes et l'environnement, il est nécessaire de caractériser ce dernier dans son ensemble. Les cheminées hydrothermales sont formées par la précipitation des éléments minéraux du fluide

hydrothermal. Ses caractéristiques physico-chimiques telles que son pH et sa température influencent la structure des communautés microbiennes. La nature du fluide hydrothermal conditionne donc les processus qui s'opèrent dans cet écosystème et la connaissance de ses paramètres physico-chimiques est primordiale.

Ainsi depuis la campagne MOMARSAT2017, les prélèvements des échantillons de cheminées hydrothermales ont été associés à un prélèvement systématique du fluide pur, avant sa dilution avec l'eau de mer. Etant donné qu'il s'agit d'un environnement dynamique, il est important d'associer dans le temps le prélèvement de ces deux types d'échantillons. La comparaison d'échantillons prélevés à différentes périodes risquerait d'être biaisée par les modifications que peut subir naturellement le fluide hydrothermal au cours du temps. Une séquence de prélèvement standardisée a été mise en place en collaboration avec Valérie Chavagnac, Christine Destrigneville et Alain Castillo du laboratoire Géosciences Environnement Toulouse, qui ont réalisé l'acquisition et le traitement des données de chimie des fluides.

Lorsque cela était possible, les cheminées hydrothermales ont été prélevées en deux temps : tout d'abord la partie supérieure, composée majoritairement de sulfates, de couleur noire (**Figure 28 A et B**) ; ensuite la partie basse, à la base des édifices, composée majoritairement de sulfures, plus clairs (**Figure 28 C**). Les fragments de la cheminée (liste dans le **Tableau 2**) ont été prélevés en plusieurs fois avec la pince du Nautille ou du ROV (sur la droite des images, **Figure 28A, B et C**) et déposés dans une petite boîte de prélèvement étanche et isotherme (PBT, sur la gauche des images), préalablement décontaminée et remplie d'eau douce stérile. Le retrait de ces structures minérales libère ainsi la sortie de fluide et facilite le prélèvement du fluide hydrothermal. Une sonde de température équipée sur le sous-marin a permis de mesurer la température au niveau de la sortie de fluide afin d'identifier la zone précise où le fluide était expulsé de la cheminée, afin d'assurer un prélèvement de fluide pur à haute température, non dilué par l'eau de mer. Le fluide a ainsi été prélevé à l'aide d'une seringue titane pour réaliser les analyses de chimie (**Figure 28 D**).

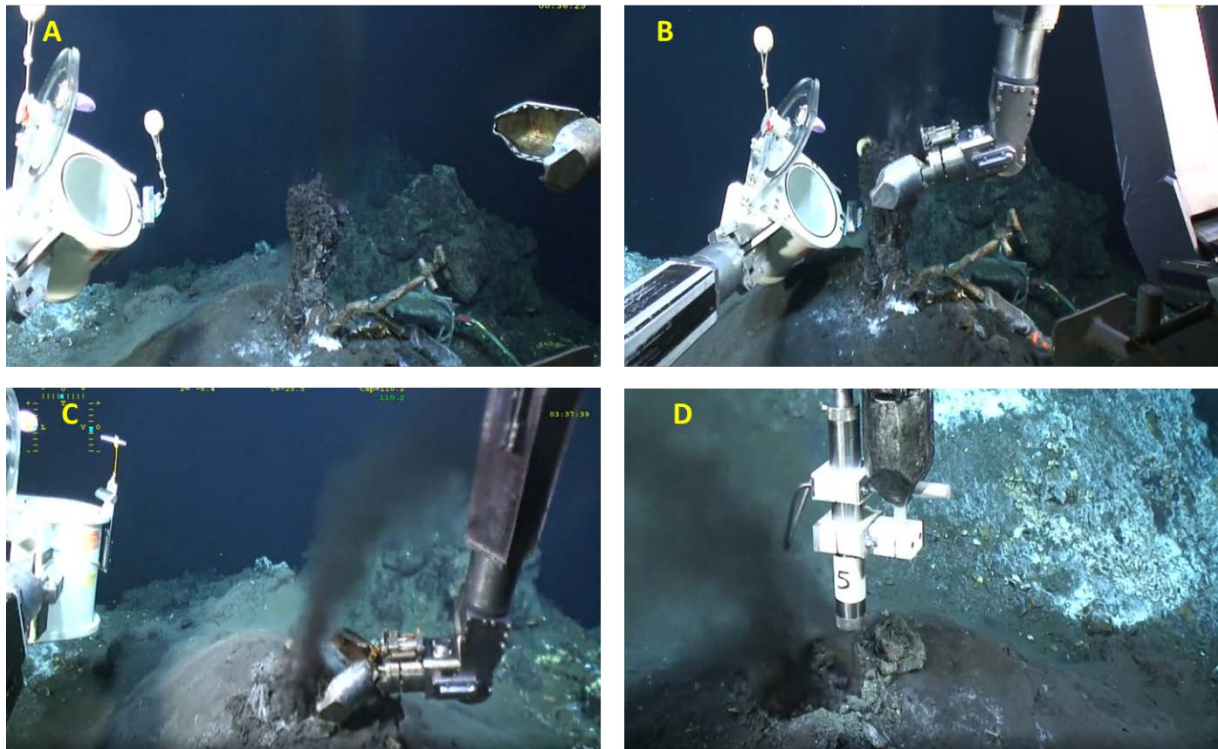


Figure 28 : Prélèvement de la cheminée Aisics (site Lucky Strike) lors de la campagne MOMARSAT2018. A : positionnement du ROV Victor 6000 ; B : prélèvement de la partie supérieure de la cheminée ; C : prélèvement de la partie basse de la cheminée ; D : prélèvement du fluide hydrothermal avec une seringue titane

2) Echantillons de panache hydrothermal proximal dans le gradient thermique

Des échantillons de panache hydrothermal ont également été prélevés chaque année à partir de la campagne MOMARSAT2016. Les prélèvements ont été effectués à différents points dans le panache ascendant proximal, qui correspondent au gradient de dilution du fluide hydrothermal avec l'eau de mer, soit pour étudier la diversité microbienne dans le gradient ; soit pour être utilisé comme milieu de culture dans les bioréacteurs (**Tableau 3**). Pour des raisons techniques et d'organisation (espace et instruments disponibles à bord des engins sous-marins, partage du temps de plongée...), le prélèvement de panache proximal dans le gradient de température n'a pas toujours été réalisé lors de la même séquence de prélèvement que les cheminées ou le fluide pur. Les prélèvements ont été réalisés soit par pompage par le préleveur d'eau PEPITO opéré par le ROV Victor 6000 (Sarrazin *et al.*, 2006, Sarradin *et al.*, 2007), soit par le préleveur PLUME opéré par le sous-marin Nautille, dont les canules associées à une sonde

de température ont été placées et maintenues aussi précisément que possible dans les zones de température ciblées (**Figure 29**).

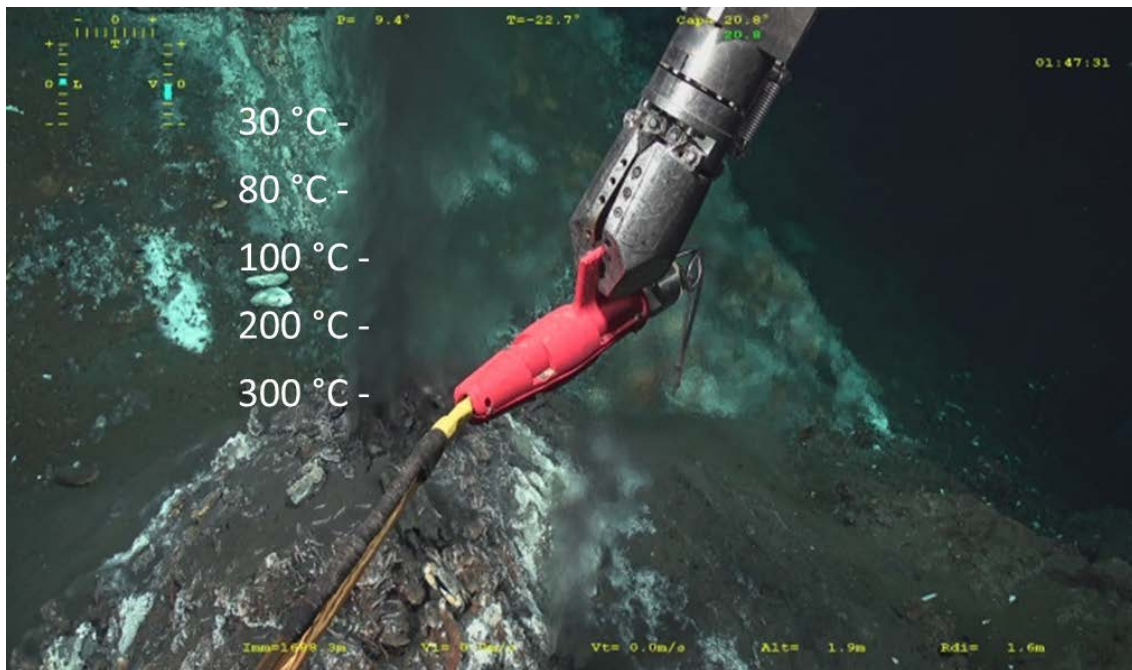


Figure 29 : Photographie de la canule de prélèvement du fluide hydrothermal dans le gradient de dilution avec l'eau de mer. Les températures sont données à titre d'exemple pour représenter le gradient thermique.

C'est durant la mission de 2018, en profitant du temps de plongée de la campagne LuckyDivMic que l'échantillonnage a été le plus complet : il a en effet été possible pour chaque cheminée de réaliser le prélèvement des cheminées en deux parties (zone supérieure et base), ainsi que des prélèvements de panache hydrothermal dans le gradient de température sur les cinq sites étudiés.

Tableau 2 : Echantillons de cheminées hydrothermales utilisés durant l'étude. * : les échantillons de la cheminée Montsegur sont notés « DEAFS » suite au déploiement sur cette cheminée d'un instrument de prélèvement de fluide du même nom par l'équipe de géochimie de Toulouse. ** : échantillons utilisé pour inoculer les cultures en bioréacteur.

Site	Cheminée	Campagne	Année	Plongée	Zone de la cheminée	Nom d'échantillon
Lucky Strike	Aisics	MOMAR	2008	PL359_1	Supérieure	MM1E1
Lucky Strike	Aisics	MOMAR	2008	PL359_1	Base	MM1E2
Lucky Strike	Aisics	MOMARSAT	2013	PL526_1	-	M13 Aisic
Lucky Strike	Aisics	MOMARSAT	2016	PL625_2	-	M16 Ais 1
Lucky Strike	Aisics	MOMARSAT	2017	PL668_2	Supérieure	M17 Ais 1
Lucky Strike	Aisics	MOMARSAT	2017	PL668_2	Base	M17 Ais 2**
Lucky Strike	Aisics	MOMARSAT	2017	PL675_9	Cheminée de 9 jours	M17 Ais 3
Lucky Strike	Aisics	MOMARSAT	2018	PL697_2	Supérieure	M18 Ais 1
Lucky Strike	Aisics	MOMARSAT	2018	PL697_2	Base	M18 Ais 2
Lucky Strike	Aisics	MOMARSAT	2019	PL1939_1	Supérieure	M19 Ais 1**
Lucky Strike	Aisics	MOMARSAT	2019	PL1939_1	Base	M19 Ais 2
Lucky Strike	Montsegur	MOMARSAT	2017	PL669_3	-	M17 Mont
Lucky Strike	Montsegur	MOMARSAT	2018	PL698_3	-	M18 DEAFS *
Lucky Strike	Montsegur	MOMARSAT	2019	PL1947_9	-	M19 DEAFS *
Lucky Strike	Cypres	MOMARSAT	2015	PL599_3	-	M15 Cyp
Lucky Strike	Cypres	MOMARSAT	2016	PL631_8	-	M16 Cyp
Lucky Strike	Cypres	MOMARSAT	2018	PL704_9	Supérieure	M18 Cyp 1
Lucky Strike	Cypres	MOMARSAT	2018	PL704_9	Base	M18 Cyp 2
Lucky Strike	Y3	MOMARSAT	2017	PL671_5	-	M17 Y3
Lucky Strike	Y3	MOMARSAT	2018	PL702_7	Supérieure	M18 Y3 1
Lucky Strike	Y3	MOMARSAT	2018	PL702_7	Base	M18 Y3 2
Lucky Strike	Capelinhos	MOMARSAT	2014	PL583_8	-	M14 Cap
Lucky Strike	Capelinhos	MOMARSAT	2015	PL602_6	-	M15 Cap
Lucky Strike	Capelinhos	MOMARSAT	2016	PL628_5	-	M16 Cap
Lucky Strike	Capelinhos	MOMARSAT	2017	PL670_4	-	M17 Cap
Lucky Strike	Capelinhos	MOMARSAT	2018	PL698_3	Supérieure	M18 Cap 1
Lucky Strike	Capelinhos	MOMARSAT	2018	PL698_3	Base	M18 Cap 2**
Lucky Strike	Capelinhos	MOMARSAT	2019	PL1945_7	Supérieure	M19 Cap 1
Lucky Strike	Capelinhos	MOMARSAT	2019	PL1945_7	Base	M19 Cap 2
Lucky Strike	White Castle	MOMARSAT	2016	PL627_4	-	M16 WC
Lucky Strike	White Castle	MOMARSAT	2018	PL700_5	Supérieure	M18 WC 1
Lucky Strike	White Castle	MOMARSAT	2018	PL700_5	Base	M18 WC 2
Lucky Strike	White Castle	MOMARSAT	2019	PL1941_3	-	M19 WC

Tableau 3 : Echantillons de panache hydrothermal proximal utilisés durant l'étude. * : échantillons utilisés pour les cultures en bioréacteur à bord. ** : échantillons conservés à 4 °C pour les utiliser lors de futures cultures en bioréacteur au laboratoire.

Site	Cheminée	Campagne	Année	Plongée	Température (°C)	Nom d'échantillon
Lucky Strike	Aisics	MOMARSAT	2016	PL632_9	90-100	M16 Ais E3
		MOMARSAT	2016	PL632_9	60	M16 Ais E2
		MOMARSAT	2017	PL668_2	100	M17 Ais A1 *
		MOMARSAT	2017	PL669_3	100	M17 Ais E1 *
		MOMARSAT	2017	PL669_3	100	M17 Ais E2 *
		MOMARSAT	2018	PL699_4	20-30	M18 Ais D1
		MOMARSAT	2018	PL699_4	50-60	M18 Ais D2
		MOMARSAT	2018	PL699_4	80-100	M18 Ais D3
		MOMARSAT	2019	PL1939_1	100-150	M19 Ais PL1939-1 PLUME 2 *
		MOMARSAT	2019	PL1939_1	100-150	M19 Ais PL1939-1 PLUME 3 *
		MOMARSAT	2019	PL1941-3	100-150	M19 Ais PL1941-3 PLUME 2 *
		MOMARSAT	2019	PL1941-3	100-150	M19 Ais PL1941-3 PLUME 3 *
		MOMARSAT	2019	PL1941-3	100-150	M19 Ais PL1941-3 PLUME 4 *
Lucky Strike	Cypres	MOMARSAT	2016	PL631_8	50-95	M16 Cyp D3
		MOMARSAT	2018	PL704_9	20-30	M18 Cyp A1
		MOMARSAT	2018	PL704_9	50-60	M18 Cyp C1
		MOMARSAT	2018	PL704_9	80-100	M18 Cyp E1
Lucky Strike	Y3	MOMARSAT	2016	PL632_9	80-100	M16 Y3 E1
		MOMARSAT	2018	PL702_7	20-30	M18 Y3 A3
		MOMARSAT	2018	PL702_7	50-60	M18 Y3 C3
		MOMARSAT	2018	PL702_7	80-100	M18 Y3 E3
Lucky Strike	Capelinhos	MOMARSAT	2016	PL628_5	55	M16 Cap C1
		MOMARSAT	2016	PL628_5	95-100	M16 Cap C2
		MOMARSAT	2018	PL701_6	50-60	M18 Cap B2
		MOMARSAT	2018	PL698_3	100-150	M18 Cap E1 *
		MOMARSAT	2018	PL701_6	100-150	M18 Cap B3 *
		MOMARSAT	2018	PL701_6	100-150	M18 Cap C1 *
		MOMARSAT	2018	PL706_11	100-150	M18 Cap B2 **
		MOMARSAT	2018	PL706_11	100-150	M18 Cap B3 **
		MOMARSAT	2019	PL1945_7	20-30	M19 Cap A1
		MOMARSAT	2019	PL1945_7	50-60	M19 Cap A2
		MOMARSAT	2019	PL1945_7	80-100	M19 Cap A3
Lucky Strike	White Castle	MOMARSAT	2018	PL700_5	20-30	M18 WC B1
		MOMARSAT	2018	PL700_5	50-60	M18 WC B2
		MOMARSAT	2018	PL700_5	80-100	M18 WC B3

3) Conditionnement des échantillons

Les échantillons de panache hydrothermal proximal prélevés dans le gradient thermique ont été conditionnés de deux façons : les poches ayant servi à alimenter le bioréacteur ont été maintenues fermées hermétiquement à 4°C jusqu'à leur utilisation ; les échantillons destinés à l'étude de diversité ont été filtrés sur des filtres Sterivex 0,22 µm (Millipore) à l'aide d'une pompe péristaltique, et les Sterivex conservés à -80 °C jusqu'à l'extraction d'ADN.

Après leur remontée à bord, les échantillons de cheminées hydrothermales ont été sortis des boîtes de prélèvement sous une hotte à flux laminaire et transférés dans des mortiers stériles. Ils ont ensuite été rapidement transférés dans une enceinte anaérobie afin d'éviter leur oxydation, avant d'être broyés au mortier le plus finement possible. Les échantillons ont été traités un par un dans l'enceinte anaérobie afin d'éviter les contaminations croisées (**Figure 30**). Cette étape de broyage avait pour but d'homogénéiser les échantillons, afin d'améliorer la répétabilité des manipulations.



Figure 30 : Photographie de l'échantillon M18 WC 2 dans un mortier (campagne MOMARSAT 2018)

Les fragments de cheminées ont ensuite été conditionnés dans différentes conditions :

- Dans des flacons Schott de 100 mL ou des fioles Pénicilline de 50 mL fermés hermétiquement par des bouchons en caoutchouc ou en butyle respectivement, sous une atmosphère d'azote et conservés à 4 °C pour les cultures de microorganismes
- Dans des tubes Falcon de 50 mL conservés à -80 °C pour les analyses de diversité et les analyses minéralogiques

- Dilués au 1/10^{ème} dans des fioles bouchées hermétiquement et contenant l'eau de mer formolée (2 %) pour la réalisation de dénombrements par comptage en épifluorescence

Afin de réaliser les cultures d'enrichissement MPN et les mesures d'activité, qui nécessitent de connaître la masse de cheminée utilisée comme inoculum, les échantillons M19 Ais 1, M19 Ais 2, M19 Cap 1 et MOM 19 Cap 2 ont été conservés dans des flacons Schott contenant 750 mL d'eau de mer artificielle anoxique stérile, pesés au préalable. Le flacon contenant l'échantillon M19 Cap 1 ayant été brisé durant son transport jusqu'au laboratoire, il a été remplacé par l'échantillon M19 DEAFS pour les enrichissements MPN, mais la quantité prélevée n'était pas suffisante pour réaliser les mesures d'activité.

3) Caractérisation minéralogique des échantillons de cheminées hydrothermales

1) Analyse par diffraction aux rayons X

1) Principe de l'analyse par XRD

Les analyses minéralogiques ont été réalisées en collaboration avec Ewan Pelleter et Sandrine Chéron du Laboratoire Cycle Géochimique et ressources du département Géosciences Marines de l'Ifremer.

La composition minéralogique des échantillons a été analysée par diffraction aux rayons X (XRD). Le principe de cette méthode est de bombarder un échantillon avec des rayons X, des rayonnements électromagnétiques, selon différents angles d'incidence. Les photons entrent en interaction avec le nuage électronique des atomes de l'échantillon avant d'être diffusés. Un détecteur enregistre l'intensité de cette diffusion et la convertit en signal électrique. Le nombre de pics, leur position sur le diffractogramme ainsi que leur intensité sont spécifiques des différentes phases minérales composant l'échantillon, ce qui permet de les identifier et de connaître leur quantité relative.

2) Protocole de l'analyse par XRD

Afin de pouvoir traiter conjointement les données issues de l'étude de diversité microbienne par séquençage haut débit et les données minéralogiques, un protocole standardisé a été appliqué pour le traitement de chaque échantillon. Lors de la première étape des extractions d'ADN, chaque échantillon a été broyé finement dans un mortier en conditions stériles et quelques grammes ont été aliquotés pour l'analyse minéralogique avant de continuer l'extraction sur le reste de l'échantillon. Ainsi, les deux analyses (microbiologique et minéralogique) ont été systématiquement réalisées sur les mêmes sous-échantillons homogènes afin de limiter l'influence de la structure hétérogène des cheminées hydrothermales. Les aliquots destinés à l'analyse minéralogique ont été séchés à l'étuve à 60 °C puis analysés rapidement par XRD afin de limiter l'altération des minéraux par l'humidité.

L'analyse par XRD nécessitant une poudre homogène très fine, les échantillons ont été broyés une seconde fois dans un mortier en agate. Cependant, l'analyse des premiers résultats a montré que cette méthode ne permettait pas de réaliser un broyage assez fin des sulfures et sous-estimait leur quantité relative. Par la suite, chaque échantillon a été broyé en utilisant un broyeur planétaire (deux cycles de deux minutes à 500 rpm en inversant le sens de rotation). Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un diffractomètre D8 ADVANCE (Brücker-AXS) en réalisant un spectre allant de 5 à 70 ° avec un pas de 0,01 °. L'analyse des diffractogrammes a été menée à l'aide du logiciel EVA dans le but d'identifier les phases minérales associées à chacun de pics (exemple de diffractogramme **Figure 31**). La quantification relative des minéraux a ensuite été réalisée avec le logiciel TOPAS en utilisant la méthode Rietveld. La programmation du diffractomètre ainsi que l'acquisition des données ont été réalisées par Ewan PELLETER, et Sandrine CHERON.

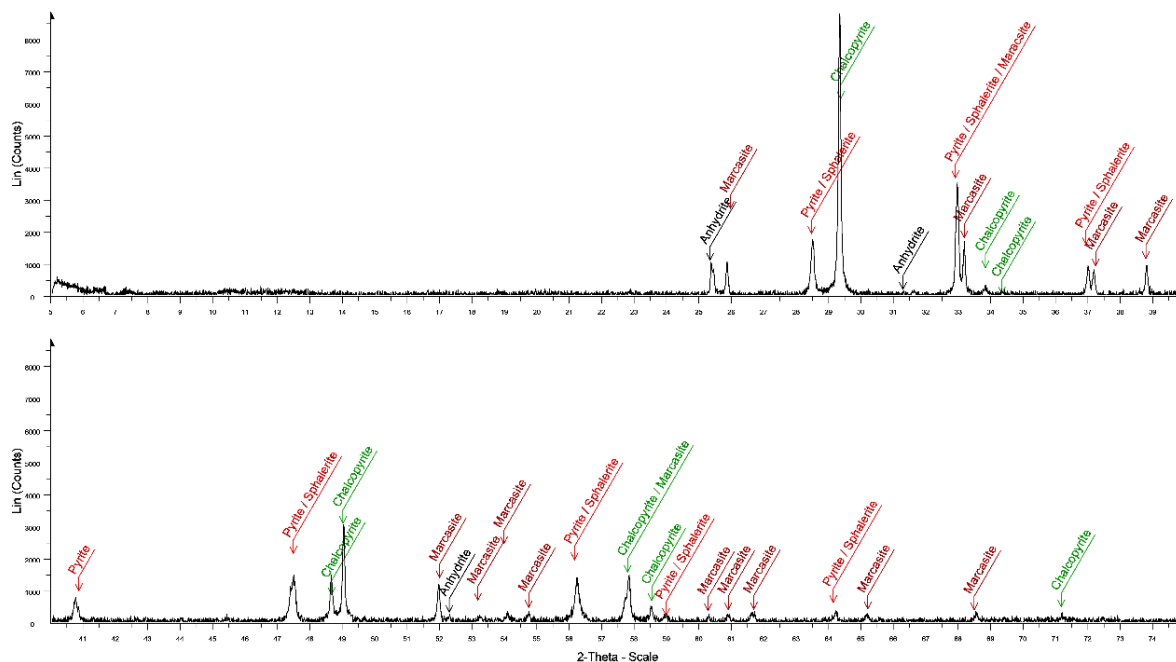


Figure 31 : Diffractogramme obtenu lors de l'analyse par XRD de l'échantillon M17 Ais 2. Abscisse : diffraction angulaire du faisceau. Ordonnée : intensité de la diffusion.

2) Classification ascendante hiérarchique

Les résultats de l'analyse par XRD ont permis de déterminer la composition minéralogique des échantillons de cheminées hydrothermales, contenant des sulfates, et des sulfures. Cette minéralogie a été utilisée comme échelle de temps relative pour classer les échantillons en fonction du stade de maturation des cheminées lors de l'étude de diversité microbienne par séquençage haut-débit. Ces résultats ont également permis d'obtenir des informations sur l'organisation spatiale des minéraux dans les cheminées, d'après les températures auxquelles ils précipitent ou se solubilisent. Cependant, afin de réaliser un traitement statistique de ces données, il était nécessaire de regrouper les échantillons de manière objective. Pour cela, une classification ascendante hiérarchique (CAH) a été appliquée. Le principe est de grouper les échantillons en différentes classes, en maximisant l'homogénéité intra-classe ainsi que l'hétérogénéité inter-classes. Une matrice de distance est utilisée (distance euclidienne dans ce cas) pour mesurer la distance entre les échantillons deux à deux. Les échantillons sont ensuite rassemblés de manière itérative pour produire un dendrogramme. La CAH et le dendrogramme regroupant les échantillons en fonction de leur composition minéralogique ont été réalisés à l'aide du logiciel R (version 3.5.0) en utilisant la commande *hclust* et la méthode Ward.D2.

Préalablement à ce traitement statistique, les données brutes de minéralogie ont subi un premier traitement pour s'affranchir des biais liés au conditionnement. Tout d'abord, les pourcentages correspondant à la présence de gypse et de halite ont été retirés car la halite provient de la cristallisation des sels de l'eau de mer, et le gypse d'une hydratation de l'anhydrite pendant la conservation des échantillons. Les différents minéraux à base de sulfates (anhydrite, barytine, chalcantite) ont ensuite été regroupés en une classe « sulfates » car la quasi-totalité de ces sulfates étaient de l'anhydrite.

3) Sections polies

Lorsqu'une quantité suffisante d'échantillon de cheminée était encore disponible après les analyses par XRD, des fragments minéraux de certains échantillons ont été utilisés pour réaliser des sections polies. Ces sections ont été observées en lumière réfléchie avec un microscope Olympus BX Advance afin de voir l'organisation spatiale des minéraux. Des photographies ont été prises à l'aide du logiciel Cell D.

4) Enrichissement et caractérisation de nouveaux phylotypes

1) Préparation des milieux de culture

Le fait de réaliser des cultures de microorganismes anaérobies nécessite de préparer des milieux de cultures anoxiques, exempts de toute trace d'oxygène afin de maintenir un potentiel d'oxydo-réduction suffisamment bas pour permettre la réalisation de métabolismes anaérobies stricts. Pour cela, tous les milieux de culture utilisés durant cette étude ont été préparés à partir d'une même base minérale, de l'eau de mer anoxique artificielle, selon un protocole inspiré de Widdel *et al.* (Widdel & Bak, 1992, Parkes *et al.*, 2010) et modifié par Erwan Roussel. Lorsque d'autres modifications ont été apportées à cette base minérale, celles-ci sont détaillées dans les parties méthodologiques correspondantes.

Ce milieu contient, en g/L : NaCl (24,3), MgCl₂.6H₂O (10), CaCl₂.2H₂O (1,5), KCl (0,66), KBr (0,1), H₃BO₃ (0,025), SrCl₂.6H₂O (0,04), NH₄Cl (0,021), KH₂PO₄ (0,0054), NaF (0,003). Sont également ajoutés 1 mL d'éléments traces et 0,2 mL de solution Sélénite-Tungstate (détail des solutions dans Parkes *et al.* (Parkes *et al.*, 2010)). Ces éléments sont ajoutés dans une fiole de Widdel en verre contenant un volume défini d'eau déminéralisée, sous agitation magnétique. Les masses et volumes suivants sont donnés pour un volume de 1 L. Parallèlement, une solution de NaHCO₃ (2,52 g dans 60 mL d'eau déminéralisée) est préparée dans un flacon Schott de 250 mL fermé hermétiquement avec un bouchon en butyle, et flushé 30 secondes sous N₂:CO₂ (80:20). La base minérale ainsi que la solution de bicarbonate sont stérilisées par un cycle d'autoclave de 60 minutes à 121 °C. A la fin de ce cycle, la fiole est sortie de l'autoclave et le milieu est maintenu sous agitation magnétique, et sous un flush de N₂:CO₂ (80:20). Cette étape est réalisée lorsque le milieu est encore chaud afin d'éliminer l'oxygène présent dans la phase gazeuse, car la température (80-90 °C) réduit la solubilité de l'oxygène dans la phase liquide. Après refroidissement, la solution de bicarbonate est ajoutée stérilement à la flamme. C'est à cette étape que sont ajoutés, lorsque nécessaire, 1,2 mL de Na₂S (1 M) pour réduire le milieu, les vitamines de Balch (Balch *et al.*, 1979) ou différents substrats (détaillés dans les parties méthodologiques correspondantes). Le pH est ensuite ajusté à la valeur souhaitée en ajoutant quelques millilitres d'acide chlorhydrique (1 M) ou d'hydroxyde de sodium (10 M).

Pour la distribution du milieu, des fioles Penicilline sont préalablement stérilisées au four Pasteur pendant deux heures à 180 °C. La phase gazeuse de la fiole de Widdel est soumise à un balayage gazeux constant (N₂:CO₂ 80:20) qui permet à la fois de balayer l'air présent dans les fioles Pénicilline et de faire refluer le milieu de culture jusqu'à la cloche de distribution. Après que le milieu ait été distribué dans les fioles, elles sont fermées hermétiquement avec un bouchon en butyle scellé par une capsule en aluminium. Les fioles sont ensuite pressurisées avec différents mélanges gazeux selon les besoins expérimentaux. Au minimum un jour après la distribution du milieu, une à plusieurs fioles sont ouvertes afin de mesurer les valeurs de pH et Eh.

2) Enrichissement et isolement de *Bacteria* sulfo-oxydantes

1) Cultures d'enrichissement et isolement

Des cultures d'enrichissements ciblant des microorganismes chimioautotrophes sulfo-oxydant ont été réalisées dans des fioles Pénicilline de 50 mL contenant 20 mL d'eau de mer artificielle citée dans la section *Préparation des milieux de culture*. Les fioles ont été inoculées avec 0,5 à 2 mL de broyat de l'échantillon MM1E2 de la cheminée Aisics dilué dans l'eau de mer artificielle. Cette base minérale a été supplémentée avec plusieurs sources d'énergies : thiosulfate (8, 20 ou 40 mM), tétrathionate (5 mM), soufre élémentaire (0,5 %), ou sulfite (5 mM). La phase gazeuse était constituée de N₂:CO₂ (80:20, 1,5 bar) et de l'oxygène a été ajouté en injectant stérilement différents volumes d'air (2 ou 10 mL) à la seringue afin de créer des conditions de microaérophilie (concentration finale de 3,6 ou 21 % d'O₂ dans la phase gazeuse). Les cultures ont été incubées à différentes températures (12, 20, 25, 30, 40, 50 ou 60 °C) et incubées durant des périodes variables selon le temps de croissance des microorganismes enrichis. Les cultures positives ont été repiquées soit dans les mêmes conditions, soit en modifiant la température d'incubation ou la phase gazeuse afin d'augmenter la diversité des microorganismes enrichis.

A partir de ces enrichissements, des cultures d'isolement ont été réalisées par dilution à jusqu'à extinction. Les cultures ont été diluées 10 fois successivement au 1/10^{ème} dans des tubes Hungate contenant 9 mL de milieu eau de mer artificielle (pH ajusté à 7) supplémenté de 8 mM de thiosulfate. Deux phases gazeuses ont été utilisées : N₂:CO₂:O₂ (40:40:20) ; ou N₂:CO₂ (80:20) avec injection de 1 mL d'air et les cultures ont été incubées respectivement à 30 ou 60 °C.

2) Identification des phylotypes enrichis et isolés

Des extractions d'ADN ont été réalisées sur 5 mL de culture, en utilisant le kit FastDNA Spin Kit for Soil (Mbio) ou une méthode d'extraction par PCI (Wery *et al.*, 2001).

A partir des ADN extraits des souches isolées, les gènes codant les ARNr 16S ont été amplifiés par PCR, dans un volume réactionnel de 50 µL contenant : 3 µL d'ADN matrice ; 10 µL de tampon 5X ; 4 µL de MgCl₂ 25 mM ; 1 µL de dNTP 10 mM ; 0,2 µL de chaque amorce 0.1 mM ; 0,25 µL polymérase GoTaq G2 5u/L (Promega) ; eau milliQ qsp 50 µL, avec les

amorces E8F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) et 907R (CCGTCAATTCCTTTRAGTTT) (Eden *et al.*, 1991, Ishii & Fukui, 2001). Le cycle suivant a été appliqué : 5' à 94 °C ; 30 cycles (1' à 94 °C - 1' 30'' à 57 °C - 2' à 72 °C) ; 6' à 72 °C.

Les produits PCR ont ensuite été purifiés à l'aide du kit PCR Clean-Up (Macherey-Nagel), puis séquencés par la méthode Sanger (prestataire GATC, Allemagne). Les séquences des gènes codant les ARNr 16S ont ensuite été comparées aux séquences de la base de données NCBI à l'aide du programme BLAST (Altschul *et al.*, 1990) afin d'identifier les phylotypes isolés.

Dans le but de réaliser un criblage rapide des cultures et de vérifier si les phylotypes ciblés ont été enrichis, des amorces PCR spécifiques ont été dessinées. Des séquences partielles d'environ 900 pb des gènes codant les ARNr 16S, obtenues durant mon stage de master (François, 2017) par clonage-séquençage des communautés bactériennes d'un échantillon de la cheminée Aisics (MM1E2), ont servi de références pour dessiner les amorces. Des extractions d'ADN plasmidiques ont été réalisées à l'aide du kit Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel) à partir de clones issus des banques réalisées précédemment (François, 2017). Les plasmides ont servi de témoins positifs (3 séquences affiliées au genre *Thiomicrospira*) et de témoins négatifs (séquences affiliées aux genres *Nitratiruptor*, *Persephonella*, *Desulfobulbus*, *Vulcanithermus*, *Thioprofundum* ou à des *Gammaproteobacteria* non identifiées).

Les amorces ont été dessinées à l'aide des programmes Primer Blast (Ye *et al.*, 2012) et ARB (Ludwig *et al.*, 2004) et leur température de fusion a été calculée avec l'outil en ligne Tm Calculator³. Des couples d'amorces ont été créés de manière à respecter des critères de longueur et de composition en bases G et C. Ils sont référencés dans le **Tableau 4** ainsi que leur longueur et leur température de fusion. La température optimale d'hybridation de ces couples garantissant une amplification spécifique a été déterminée expérimentalement par PCR en réalisant des gradients de température de 52 à 63 °C. Les PCR ont été réalisées en plaques 96 puits avec les réactifs cités précédemment, en modifiant les quantités pour ajuster le volume réactionnel à 15 µL. Le cycle suivant a été appliqué : 5' à 94 °C ; 30 cycles (1' à 94 °C - 1' 30'' au gradient de température - 2' à 72 °C) ; 6' à 72 °C. Un plasmide portant une séquence du gène codant les ARNr 16S affiliée au genre *Thiomicrospira* a servi de témoin positif, et un plasmide portant une séquence affiliée au genre *Nitratiruptor* a servi de témoin négatif.

Les couples d'amorces ayant amplifié de manière aspécifique les témoins négatifs à différentes températures ont été éliminés. La spécificité des couples restants a été testée vis-à-

³ <https://tmcalsculator.neb.com/#!/main>

vis de tous les témoins positifs et négatifs (respectivement 3 et 9), en utilisant les plasmides purs ou dilués au 1/20^{ème} ou 1/100^{ème}, à la température d'hybridation optimale déterminée précédemment.

A la suite de la mise au point des couples d'amorces spécifiques, les ADN extraits des cultures d'enrichissement ont été testés en PCR afin de détecter la présence éventuelle de *Bacteria* affiliées au genre *Thiomicrospira*.

Tableau 4 : Liste des couples d'amorces spécifiques « *Thiomicrospira* » dessinés durant cette étude, avec leurs caractéristiques.

Nom	Séquence	Longueur (nt)	Tm amorce F (°C)	Tm amorce R (°C)	Tm du couple d'amorces (°C)
Tms442F 907R	GTAGGGAGGAAGAGTAKAWG CCGTCAATTCCTTTRAGTTT	465	58-60	57-60	58-61
Tms439F 907R	TCAGTAGGGAGGAAGAGTAT CCGTCAATTCCTTTRAGTTT	468	60	57-60	58-61
E8F Tms438R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ATACTCTTCCTCCCTACTGAA	430	64	61	62
Tms374F Tms642R	ATGGACGCAAGTCTGATG CTTAAACTCTAGATGACCAGT	268	62	58	59
Tms469F Tms641R	CCTTATATTTTGACGTTACCTAC TTAAACTCTAGATGACCAGTA	162	57	56	57
Tms439F Tms642R	TCAGTAGGGAGGAAGAGTAT CTTAAACTCTAGATGACCAGT	203	60	58	59

3) Description de la souche *Persephonella* MO1340

Une partie des expérimentations de caractérisation de la souche *Persephonella* MO1340 ont été réalisées par Clémentine Mathien dans le cadre de son stage de Master 1 à l'UBO.

1) Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour caractériser la souche MO1340 a été préparé en utilisant la même base minérale que les autres milieux de cette étude. Cependant, il a été préparé avec une technique différente afin de réduire le temps de préparation au vu du nombre de conditions expérimentales à mettre en place. Bien que la souche MO1340 tolère et utilise l'oxygène (elle

a été isolée en conditions de microaérophilie), le milieu a été préparé en anaérobiose afin de pouvoir contrôler la concentration finale en oxygène dans les fioles. Le protocole de préparation du milieu est décrit ci-dessous :

Les différents sels et solutions sont introduits dans un Erlenmeyer contenant de l'eau déminéralisée, aux quantités précisées précédemment. Le milieu est ensuite porté à ébullition pendant 30 minutes sur une plaque chauffante, et maintenu sous un balayage gazeux de N₂:CO₂ (80:20) pour en chasser l'oxygène. Les substrats et les vitamines de Balch (6 mL) sont ajoutés et le pH est ajusté après le refroidissement du milieu par ajout d'acide chlorhydrique (1 M) ou d'hydroxyde de sodium (10 M).

Pour la distribution du milieu, l'oxygène contenu dans les fioles Penicilline ou les tubes Bellco est d'abord chassé par un flush de N₂:CO₂ (80:20), puis le milieu y est distribué à l'aide d'une propipette automatique. Les fioles sont ensuite bouchées, puis la phase gazeuse est balayée avec le mélange gazeux souhaité. Elles sont enfin stérilisées avec un cycle d'autoclave de 30 minutes à 100 °C dans le but de ne pas dégrader les vitamines de Balch ou de provoquer la fusion du soufre (dont la température de fusion est proche de 115 °C) lorsqu'il est ajouté comme substrat.

2) Caractéristiques morphologiques

La morphologie de la souche MO1340 a été déterminée par des observations au microscope à contraste de phase BX60 (Olympus) sur des cultures actives. Afin de déterminer précisément la morphologie et la taille des cellules, des observations au microscope électronique à transmission (MET) ont été réalisées. 1 mL de culture en phase exponentielle de croissance a été centrifugé 5 minutes à 10 000 g, puis 5 µL du surnageant ont été prélevés et déposés sur des grilles métalliques adaptées au MET. Après avoir laissé les grilles au repos 5 minutes pour que les cellules s'y déposent, l'excès de liquide a été retiré avec du papier Whatman. Les préparations ont ensuite été observées au MET (JEM-1400, Jeol) à la Plateforme d'Imagerie et de Mesures en Microscopie de l'Université de Bretagne Occidentale. Les dimensions moyennes des cellules ainsi que les écart-types ont été calculés d'après la mesure des dimensions de 30 cellules.

3) Caractéristiques physiologiques et métaboliques

Détermination des conditions optimales de croissance

Sauf indication contraire, toutes les expérimentations ont été réalisées en triplicats dans des tubes Bellco, remplis de 15 mL du milieu de culture décrit précédemment. Du CO₂ (20 % de la phase gazeuse) et du bicarbonate de sodium (30 mM) ont été fournis comme source de carbone. Le pH a été ajusté à 6,8 et les cultures ont été incubées à 70 °C sans agitation. La croissance a été mesurée par dénombrement cellulaire en utilisant une cellule de Thoma, ou par cytométrie en flux (Cyflox Space, Partec). L'influence de la concentration en oxygène, de la salinité et du pH sur la croissance de la souche MO1340, a été déterminée par dénombrement cellulaire en point final, après une nuit d'incubation. Pour déterminer l'influence de la température, des dénombrements ont été réalisés environ toutes les heures pendant une journée pour mesurer le taux de croissance dans chaque condition.

La tolérance et les besoins en oxygène de la souche ont été déterminés en augmentant la concentration en O₂ dans la phase gazeuse de 0 à 21 %, dans trois milieux différents, en utilisant respectivement comme donneurs d'électrons du thiosulfate (10 mM), du soufre élémentaire (1 %) à une pression de 1,5 bar, ou de l'hydrogène (80 % à une pression de 2 bar).

L'influence de la température sur le taux de croissance a été déterminée dans une gamme de 40 à 85 °C avec un pas de 5 °C, dans quatre conditions : en présence de thiosulfate (10 mM) sous une phase gazeuse composée de N₂:CO₂:O₂ (77,5:20:2,5 ; 1,5 bar) ; de soufre élémentaire (1 %) sous une phase gazeuse composée de N₂:CO₂:O₂ (66:20:14 ; 1,5 bar) ; d'hydrogène en conditions microaérophiles sous une phase gazeuse composée de H₂:CO₂:O₂ (79:20:1 ; 2 bar) ; d'hydrogène en conditions anaérobies avec du nitrate (8 mM) comme accepteur d'électrons, sous une phase gazeuse composée de H₂:CO₂ (80:20 ; 2 bar).

Les effets de la concentration en NaCl, et du pH sur la croissance de la souche ont été déterminés en présence de thiosulfate (10 mM) sous une phase gazeuse composée de N₂:CO₂:O₂ (77,5:20:2,5 ; 1,5 bar). La concentration en NaCl a été testée entre 0,5 et 5,5 %, avec un pas de 0,5 %. Le pH a été ajusté entre 4,5 et 6 en ajoutant des volumes croissants d'une solution stérile de NaHCO₃ (1 %) à du milieu non tamponné, et entre 6 et 8 en ajoutant des volumes croissants d'une solution stérile de Na₂CO₃ (2 %) à du milieu tamponné avec 2 mM de NaHCO₃ (au lieu de 30 mM dans le milieu standard).

Afin de déterminer l'influence de la température sur la croissance de la souche MO1340, des courbes d'Arrhenius ont été tracées. Le principe est de représenter graphiquement le logarithme népérien du taux de croissance spécifique en fonction de l'inverse de la température. La courbe présente généralement un segment linéaire pour les températures inférieures à la température optimale de croissance. La pente obtenue en calculant une régression linéaire à partir de ce segment est égale à : $-E_a / 2,303R$; avec R la constante universelle des gaz parfaits ($8,31 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$). E_a correspond à l'énergie d'activation.

$$Q_{10} = \exp \left[\frac{E_a \cdot 10}{RT(T + 10)} \right]$$

Caractéristiques métaboliques

a) Sources d'énergies, de carbone et accepteurs d'électrons

La souche MO1340 a été incubée en présence de différents couples de donneurs et d'accepteurs d'électrons ajoutés à la base minérale, afin de déterminer ses capacités à métaboliser différents substrats. Chaque condition a été testée en duplicats et les cultures positives ont été repiquées trois fois sur le même milieu afin d'éviter une croissance due à l'apport de substrat par l'inoculum. Ces expérimentations ont également été réalisées dans les mêmes conditions avec la souche *Persephonella hydrogeniphila* 29W^T (Nakagawa *et al.*, 2003), obtenue auprès de la DSMZ (souche DSM 15103).

Les donneurs d'électrons suivants ont été testés en présence soit d'oxygène (1,5 % ou 7 % dans la phase gazeuse, 1,5 bar) soit de nitrate (8 mM) : hydrogène (80 % dans la phase gazeuse), formate (10 mM), acide succinique (10 mM), fer ferreux (10 mM), acétate (1 mM), chlorure d'ammonium (15 mM), soufre élémentaire (1 %).

Les accepteurs suivants ont été testés en présence de H₂:CO₂ (80:20 ; 2 bar) : sulfate (10 mM), sulfite (10 mM), nitrite (1 ou 14 mM), fer ferrique (10 mM), soufre élémentaire (1% w/v), acétate (1 mM), thiosulfate (10 mM).

Afin de déterminer si la souche MO1340 était capable d'utiliser des molécules organiques comme source d'énergie ou de carbone, elle a été cultivée en présence de N₂:CO₂:O₂ (73:20:7, 1,5 bar) en ajoutant les substrats organiques suivants : extrait de levure (2 g/L), peptone (2 g/L), glucose (5 g/L), sucrose (5 g/L), fructose (5 g/L), lactose (5 g/L), sorbitol (5 g/L).

Le potentiel caractère mixotrophe de la souche MO1340 a été testé en remplaçant le bicarbonate de sodium par du PIPES (6 g/L) et le CO₂ de la phase gazeuse par du N₂. De l'hydrogène et du nitrate, ou du soufre, du thiosulfate et de l'oxygène ont été fournis comme sources d'énergie et accepteurs d'électrons.

La souche a également été cultivée dans un milieu standard (avec 10 mM de thiosulfate et une phase gazeuse composée de N₂:CO₂:O₂ 83:20:7, 1,5 bar), mais sans ajouter de vitamines de Balch, dans le but de tester son caractère strictement autotrophe comme il est conseillé par Srinivasan *et al.* (Srinivasan *et al.*, 2012).

b) Etude des voies métaboliques

Une étude approfondie des caractéristiques métaboliques de la souche MO1340 a été réalisée. Pour cela, des cultures ont été incubées à 70 °C en présence de quatre couples de donneurs/accepteurs d'électrons (S₂O₃²⁻/O₂; S⁰/O₂; H₂/O₂; H₂/NO₃⁻) dans les conditions suivantes :

- Thiosulfate (10 mM) ; phase gazeuse composée de N₂:CO₂:O₂ (73:20:7 ; 1,5 bar)
- Soufre élémentaire (1 %) ; phase gazeuse composée de N₂:CO₂:O₂ (66:20:14 ; 1,5 bar)
- Hydrogène ; phase gazeuse composée de H₂:CO₂:O₂ (79:20:1 ; 2 bar)
- Hydrogène, nitrate (8mM) ; phase gazeuse composée de H₂:CO₂ (80:20 ; 2 bar)

Dans chaque condition, des témoins négatifs ont été incubés en triplicats et de 3 à 10 tubes ont été inoculés. La consommation des substrats ainsi que la production des produits métaboliques ont été quantifiées dans les témoins incubés et dans les cultures en point final en phase stationnaire, après une nuit d'incubation. La composition de la phase gazeuse a été analysée par micro-chromatographie en phase gazeuse. La consommation et la production d'anions ont été quantifiées par chromatographie ionique (section *Analyses chimiques*). Systématiquement, l'analyse de la phase gazeuse a été réalisée en premier, suivie du prélèvement de la phase liquide pour la chromatographie ionique afin de ne pas créer une baisse de pression dans les tubes qui aurait faussé les résultats de calcul de quantité de gaz.

Des cinétiques de croissance ont été réalisées pour les souches MO1340 et *P. hydrogeniphila* 29W^T avec le couple de substrats S₂O₃²⁻/O₂ (thiosulfate 10 mM, concentration en oxygène de respectivement 7 % et 1,4 % selon la souche). Une cinétique a également été réalisée pour la souche *P. hydrogeniphila* 29W^T avec le couple H₂/NO₃⁻ (nitrate 8mM, phase gazeuse composée de H₂:CO₂ ; 80:20 ; 2 bar). Des témoins négatifs, non inoculés, ont été

incubés et 40 à 50 tubes ont été inoculés dans les mêmes conditions puis incubés à 70 °C. Les cultures ont été réalisées sur une durée d'environ 28 h. Trois tubes ont été sacrifiés à chaque temps (8 à 12 temps) afin de suivre la croissance cellulaire par dénombrement au microscope, ainsi que la consommation des substrats et la production de produits métaboliques avec la méthodologie décrite dans le paragraphe précédent.

4) Caractérisation phylogénétique et génomique

L'assemblage du génome de la souche MO1340 a été réalisé par Johanne Aubé, ingénieure au LM2E.

Afin d'étudier les caractéristiques phylogénétiques et génomiques de la souche MO1340, des extractions d'ADN génomique au PCI ont été réalisées (Wery *et al.*, 2001). Les gènes codant les ARNr 16S ont été amplifiés par PCR (Kit GoTaq G2 Hot Start Master Mix, Promega), en utilisant les amorces universelles bactériennes E8F, U1492 (Eden *et al.*, 1991) et l'amorce interne 907R (Ishii & Fukui, 2001). Les gènes ont été séquencés avec la méthode de Sanger par le prestataire Eurofins Scientific (Allemagne). La séquence de 1444 pb a été déposée dans les bases de données GenBank/EMBL/DDJB sous le numéro d'accèsion MT396293.

La séquence du gène codant les ARNr 16S de la souche MO1340 a été alignée à des séquences d'*Aquificales* issues de la base de données GenBank à l'aide du logiciel Geneious v10.2.3 (Kearse *et al.*, 2012) et du programme MUSCLE (Edgar, 2004). Des arbres phylogénétiques ont été construits à l'aide du logiciel MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) en utilisant la méthode du Neighbor-Joining (Jukes & Cantor, 1969) avec 1000 bootstraps.

Le génome de la souche MO1340 a été séquencé par le prestataire Eurofins Scientific (Allemagne) avec la technologie Illumina HiSeq. Le génome a été assemblé à l'aide du programme spades v3.13.0 (Bankevich *et al.*, 2012). La complétion et la contamination ont été calculées avec l'outil CheckM (Parks *et al.*, 2015) et la qualité de l'assemblage a été déterminée avec l'outil QUAST (Gurevich *et al.*, 2013). L'annotation du génome a été réalisée par l'outil PGAP de NCBI (Tatusova *et al.*, 2016). Les valeurs d'ANI (Average Nucleotide Identity) ont été calculées avec l'outil en ligne OrthoANIu (Yoon *et al.*, 2017).

5) Analyses chimiques

Les manipulations, l'utilisation des appareils et le traitement des données de chromatographie ionique et de micro-chromatographie gazeuse ont été réalisés avec l'aide d'Erwan Roussel, chercheur au LM2E, et Xavier Philippon, technicien au LM2E.

a) Expérimentations

Le métabolisme de la souche MO1340 a été étudié en mesurant la consommation et la production de différents anions et gaz par chromatographie ionique et micro-chromatographie gazeuse. Ces méthodes ont également été utilisées dans le cadre des enrichissements MPN (section *Mise en place des enrichissements MPN*).

Chromatographie ionique

La chromatographie ionique est une technique analytique séparative qui permet d'identifier les ions présents dans une solution et de mesurer leurs concentrations. Une chromatographie échangeuse d'ions ICS-2000 (Dionex/Thermo Scientific) a été utilisée durant cette étude pour analyser la concentration en différents anions dans des échantillons de culture. Cette instrumentation est équipée d'un générateur d'éluant qui fournit une solution de KOH selon un gradient de 8 à 65 mM pour notre application. Cet éluant permet de transporter l'échantillon et de jouer sur l'affinité entre les anions et la phase stationnaire de la colonne (AG15 + AS15, 0,9 ml/min, 30°C). Les analytes sont séparés dans la colonne et présentent un temps de rétention spécifique en fonction de leur taille, leur charge et leur hydrophobicité. L'éluant passe ensuite dans un suppresseur électrochimique (AERS 500) qui produit des ions hydronium et permet un échange de cations au travers des membranes. L'échange des ions sodium par des ions hydronium permet de diminuer le bruit de fond et permet d'augmenter la conductance des couples hydronium/anion. Cette conductance (μS), qui est proportionnelle à la concentration des ions analysés, est ensuite mesurée par une cellule de conductivité (DS6, 35 °C). Le signal est enregistré sous la forme d'un chromatogramme et analysé avec le logiciel Chroméléon. Chaque analyte ayant une conductivité électrique spécifique, la réponse du détecteur est systématiquement calibrée pour les anions suivants : fluorure, acétate, lactate, chlorure, formate, propionate, acrylate, pyruvate, sulfate, oxalate, fumarate, phosphate,

bromure, nitrate et thiosulfate. Ce détecteur ne permet cependant pas une identification formelle du signal à l'instar des détecteurs de masse et ne peut garantir l'absence de co-élution avec un produit inconnu.

Les échantillons de culture à analyser par chromatographie ionique ont préalablement été centrifugés à 16 000 g pendant 15 minutes afin de culoter les cellules. Les surnageants ont été récupérés dans des flacons Chromacol en verre borosilicaté, préalablement passés au four à pyrolyse à 450 °C, et conservés à -20 °C jusqu'à l'analyse. Avant injection, les échantillons ont été dilués au dixième dans de l'eau ultrapure car la concentration en ion chlorure des échantillons marins est généralement trop élevée pour le système d'analyse utilisé.

Micro chromatographie en phase gazeuse

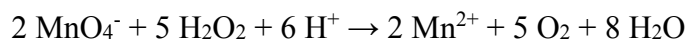
La micro-chromatographie gazeuse (μ GC) est également une technique d'analyse séparative. Cette fois-ci, le vecteur est un gaz et le détecteur un catharomètre. Cette technologie est dite « micro » car elle est composée d'un injecteur, une colonne, un détecteur (ces trois composants formant un module) de taille 1000 fois plus petite que les chromatographies classiques. Les analyses ont été réalisées avec un μ GC Fusion (Inficon, revendu en France par Chemlys). Dans la configuration du système installé au laboratoire, deux modules sont dédiés à l'analyse de gaz différents. Un module A, avec une colonne molsieve 5A (flux d'argon, 10 m, 65°C), permet la séparation de l'hydrogène, l'oxygène, l'azote, le monoxyde de carbone, et le méthane. Un module B, avec une colonne RT-Q (flux d'hélium, 12m, 60°C), permet de séparer l'azote, le dioxyde de carbone, le sulfure d'hydrogène et la vapeur d'eau. Un prélèvement gazeux (1 à 2 ml) est réalisé, puis le gaz est aspiré pendant 30 sec à travers les injecteurs (15 μ l) par une pompe d'échantillonnage avant d'être introduit dans les colonnes. En sortie de colonne, la présence d'un gaz, autre que le gaz vecteur, modifie la conductivité thermique du flux gazeux. Ce signal, qui est proportionnel à la concentration des molécules analysées, est mesuré par le micro-catharomètre (μ V). Chaque gaz ayant une conductivité thermique spécifique, une calibration régulière de l'instrument permet de convertir les aires des pics en concentration (%). La loi des gaz parfaits (présentée dans la section *Traitement des données de l'analyse chimique*) permet de convertir les concentrations des gaz (en %) en concentration molaire ou en quantité de matière. La pression de la phase gazeuse dans les fioles d'échantillons, qui intervient dans la loi des gaz parfaits, est mesurée par une sonde installée en aval du système d'analyse. Le système d'échantillonnage est également pourvu d'une pompe à vide qui permet de purger le volume mort entre l'échantillon et les soupapes d'entrée des deux

micro-injecteurs. Le vide supprime ainsi toute contamination croisée entre deux échantillons analysés successivement.

Le micro-GC a été utilisé pour suivre la consommation ou la production de différentes molécules (hydrogène, oxygène, azote, dioxyde de carbone, sulfure d'hydrogène, méthane) par les cultures réalisées en fiole ou en tube scellés hermétiquement. La quantité de gaz dissous a été considérée comme négligeable. Pour les analyses réalisées à partir des fioles d'enrichissement MPN, la température de la salle d'analyse était de 21 °C, tandis que lors des cinétiques de croissance de la souche MO1340 la température des cultures était de 70 °C dans l'étuve.

Détection de la production de peroxyde d'hydrogène

En premier lieu la production de peroxyde d'hydrogène a été testée par titration au permanganate de potassium, d'après la méthode décrite par Reichert *et al.* (Reichert *et al.*, 1939). Du permanganate de potassium (20 mM) a été introduit progressivement, dans un milieu réactionnel (15 mL de culture incubée une nuit) acidifié par quelques gouttes d'acide sulfurique. Le principe de la titration est le suivant : tant que du peroxyde d'hydrogène est présent, il réduit le permanganate de potassium selon la réaction suivante :



La coloration violette du permanganate disparaît lors de cette réaction. Ainsi, tant que du peroxyde d'hydrogène est présent, le milieu réactionnel reste incolore. Lorsque tout le peroxyde d'hydrogène a été consommé et que la réaction atteint l'état d'équilibre, le milieu prend une couleur rose très marquée. Il est ainsi possible de déterminer visuellement le passage à l'état d'équilibre.

Afin de confirmer les résultats obtenus par la première méthode de détection du peroxyde d'hydrogène, le kit MyQubit AmplexTM Red Peroxyde Assay (Invitrogen) a été utilisé en suivant les recommandations du fabricant. Ce kit contient un réactif qui, en présence de peroxydase, réagit avec le peroxyde d'hydrogène et produit de la résorufine (Zhou *et al.*, 1997), une molécule fluorescente émettant à 585 nm. En mesurant l'intensité de la fluorescence au Qubit (Invitrogen) il est possible de déterminer précisément la concentration en peroxyde d'hydrogène dans un échantillon.

b) Traitement des données de l'analyse chimique

Les données de concentrations en anions (comprenant entre autres $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_4^{2-} , NO_3^-) obtenues par chromatographie anionique ont été normalisées en fonction de la concentration en ions chlorures. Chaque tube ayant été préparé à partir du même lot de milieu de culture, la concentration en ions chlorures était supposée être identique. Lors de la dilution au $1/10^{\text{ème}}$ des aliquots prélevés pour l'analyse par chromatographie, la manipulation de faibles volumes (< 1 mL) a pu mener à des erreurs mineures dans la dilution. La normalisation selon la concentration en ions chlorures a permis de rectifier ces imprécisions expérimentales.

Les données obtenues par micro-chromatographie en phase gazeuse contiennent deux informations : la pression dans les tubes ou les fioles, en millibar, ainsi que les concentrations relatives en gaz (comprenant entre autres H_2 , N_2 , O_2 et CO_2). La quantité de matière des gaz présents dans la phase gazeuse a été calculée en utilisant la loi des gaz parfaits :

$P * V = n * R * T$; soit $n = (P * V) / (R * T)$; avec :

P : la pression en Pascal

V : le volume de la phase gazeuse en m^3

n : la quantité de matière en mole

R : la constante universelle des gaz parfaits, en $\text{J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$

T : la température en degrés Kelvin

Les concentrations en hydrogène et en oxygène dissous dans la phase liquide des cultures ont été calculées en utilisant les formules et les constantes décrites pour l'eau de mer à 70°C par Weiss *et al.* et Crozier *et al.* (Weiss, 1970, Crozier & Yamamoto, 1974).

Les stœchiométries calculées expérimentalement dans les cultures en point final ont ensuite été comparées aux réactions décrites dans la littérature.

6) Calculs d'enthalpie libre

Afin de déterminer l'énergie produite *in situ* par quatre réactions métaboliques, des calculs d'enthalpie libre ont été réalisés par Cécile Cathalot du laboratoire Cycles Géochimiques et ressources (Unité Géosciences Marines, Ifremer) dans le cadre de la rédaction

de l'article de caractérisation de la souche MO1340. L'enthalpie libre de Gibbs a été calculée pour plusieurs températures entre 5 et 153°C dans le gradient thermique d'après la formule suivante :

$$\Delta_r G = \Delta_r G_0 + RT \ln Q_r ; \text{ avec :}$$

$\Delta_r G_0$: l'énergie libre standard de Gibbs

R : la constante universelle des gaz parfaits, en $\text{J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$

T : la température en degrés Kelvin

Q_r : le produit d'activité dans les conditions naturelles, calculé par l'équation suivante :

$$Q_r = \prod a_i^{\gamma_{i,r}} ; \text{ avec :}$$

a_i : l'activité du $i^{\text{ème}}$ constituant de la réaction

r et $\gamma_{i,r}$: le coefficient stœchiométrique de la réaction (négatif pour les réactifs, positif pour les substrats). Les activités sont dérivées des concentrations par l'équation Debye-Huckel.

Les concentrations de plusieurs espèces chimiques (oxygène, thiosulfate, sulfate, nitrate) sont issues de données *in situ* collectées lors de la campagne MOMARSAT2015 dans le gradient de mélange entre le fluide de la cheminée Aisics (site Lucky Strike) et l'eau de mer environnante. Le fluide hydrothermal a été échantillonné en utilisant le préleveur PEPITO (Cotte *et al.*, 2015) couplé à une optode à oxygène Aanderaa et à l'analyseur *in situ* CHEMINI pour mesurer la concentration en sulfures (Vuillemin *et al.*, 2009). La concentration en thiosulfate, sulfate et nitrate du fluide a été mesurée par chromatographie ionique après la campagne. Pour les espèces chimiques dont les données *in situ* n'étaient pas disponibles (hydrogène, azote, soufre élémentaire), un modèle hydrodynamique a été utilisé pour simuler le processus de dilution dans le gradient de mélange et calculer les concentrations. Un mélange simple du fluide hydrothermal et de l'eau de mer a été simulé, sans réaction entre les espèces chimiques. Les valeurs des concentrations sont issues de la littérature concernant l'end-member du site Aisics (Chavagnac *et al.*, 2018, Rommevaux *et al.*, 2019), ou d'autres sites lorsque les données sur Aisics n'étaient pas disponibles (pour le soufre élémentaire, (Findlay *et al.*, 2019)).

5) Etude de la colonisation microbienne des cheminées hydrothermales par approche moléculaire

1) Extractions d'ADN

1) Echantillons de cheminées

Les extractions d'ADN à partir d'échantillons de cheminées hydrothermales ont fait l'objet d'une longue étape de mise au point, notamment à cause de la forte hétérogénéité entre les échantillons, tant au niveau de leur composition minéralogique que de la quantité de biomasse. Le kit DNeasy PowerMax Soil (Qiagen) a été choisi car il est spécifiquement conçu pour extraire l'ADN à partir d'échantillons minéraux qui peuvent contenir des inhibiteurs de PCR tels que des métaux lourds. Ces échantillons contenant généralement une faible biomasse microbienne, les extractions d'ADN ont été réalisées en conditions stériles sous une hotte CaptairBio dans une salle dédiée aux échantillons de faible biomasse afin de limiter les contaminations.

Suite à des résultats obtenus lors de mon stage de Master 2 (François, 2017), une modification a été apportée au protocole du kit : l'ajout de 250 µL d'acide polyadénylique (PolyA) à 660 mg/mL entre les étapes 2 et 3 du protocole original. Ces oligonucléotides sont censés se fixer aux sites de potentiels contaminants de l'ADN contenus dans les minéraux (Webster *et al.*, 2003). La quantité d'ADN obtenue à la fin des extractions étant généralement faible, les ADN extraits ont été concentrés à l'aide du kit Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices (Merck-Millipore) en suivant les recommandations du fabricant (30 minutes de centrifugation à 5000 g). L'ADN extrait a ensuite été conservé à 4 °C, ou -20 °C pour une conservation à long terme. Des blancs d'extraction ont été réalisés, puis testés en PCR et séquencés suivant le même protocole que les échantillons afin de détecter la présence d'une potentielle contamination.

Le kit d'extraction d'ADN DNeasy PowerMax Soil est une version grand volume du kit DNeasy PowerSoil (Qiagen), qui permet d'introduire jusqu'à 10 grammes d'échantillon par réaction. Au vu des faibles biomasses dans les échantillons de cheminées de sulfates, il a été nécessaire de réaliser en parallèle quatre extractions à partir de 10 grammes. Les 20 mL de solution d'ADN extraits à la fin du protocole ont ensuite été réunis et concentrés avec une

colonne du kit Amicon Ultra-15 décrit ci-dessus. Pour les échantillons de cheminées de sulfures, 8 grammes ont été utilisés par extraction. Afin de vérifier que la masse d'échantillon utilisée pour l'extraction n'avait pas d'influence sur les résultats de séquençage haut-débit, des extractions ont été réalisées sur 8, 3*10 et 3*40 grammes à partir de deux échantillons de cheminées de sulfures, puis les ADN ont été séquencés en suivant le même protocole.

2) Echantillons de panache hydrothermal proximal dans le gradient thermique

Les échantillons de panache hydrothermal proximal prélevés dans le gradient thermique ayant été filtrés sur des Sterivex (Millipore), les extractions d'ADN ont été réalisées à partir de ces filtres en suivant les premières étapes décrites par Cruaud *et al.* (Cruaud *et al.*, 2017). Cet article décrit une méthode permettant d'extraire le filtre contenu dans le Sterivex afin d'optimiser la quantité d'ADN extrait. Dans les conditions de l'étude, le rendement d'ADN extrait a été multiplié par 4,1 en moyenne en utilisant cette méthode. L'ADN a ensuite été extrait en utilisant le kit DNeasy PowerSoil (Qiagen).

Comme pour les échantillons de cheminées hydrothermales, les manipulations ont été réalisées en conditions stériles sous une hotte CaptairBio, dans une salle dédiée « faible biomasse ». Tout d'abord le cylindre en plastique du Sterivex a été ouvert à l'extrémité à l'aide d'un coupe-tube, puis le cylindre intérieur sur lequel est enroulé le filtre a été sorti. Le filtre a été séparé du cylindre intérieur, puis coupé en morceaux d'environ 5 x 5 mm à l'aide d'une lame de scalpel stérile. Les morceaux de filtres ont ensuite été répartis dans trois PowerBead Tubes du kit DNeasy PowerSoil car leur volume était trop important pour réaliser l'extraction dans un seul tube. Pour la suite de l'extraction, les recommandations du fabricant ont été suivies à l'exception de l'étape d'homogénéisation de 10 minutes au Vortex qui a été remplacée par un cycle de 40 secondes (intensité 4) au FastPrep (MP Biomedicals). L'ADN extrait a ensuite été conservé à 4 °C, ou -20 °C pour une conservation à long terme. Les extraits d'ADN issus des trois extractions en répliquats ont été réunis préalablement aux étapes de purification et d'amplification par PCR pour s'affranchir d'une éventuelle hétérogénéité entre les répliquats d'extraction.

3) Echantillons de cultures en continu en bioréacteur

Les extractions d'ADN à partir des échantillons de cultures en continu en bioréacteur (section *Cultures en bioréacteur*) ont été réalisées en utilisant le kit FastDNA Spin kit for Soil (MP Biomedicals). Les échantillons, d'un volume de 50 mL, ont d'abord été centrifugés 60 minutes à 15 500 g à 4 °C, puis le surnageant a été retiré. Le culot a été repris avec la solution Sodium Phosphate Buffer du kit, et les recommandations du fabricant ont été suivies pour la suite de l'extraction, à l'exception de l'étape d'homogénéisation au FastPrep (MP Biomedicals) dont la durée et l'intensité ont été réduites (30 secondes, intensité 5,5). L'ADN extrait a ensuite été conservé à 4 °C, ou -20 °C pour une conservation à long terme.

2) Choix des amorces de séquençage

Avant de réaliser l'étude de diversité par séquençage haut-débit, la première étape a consisté à sélectionner des couples d'amorces répondant à différents critères : la taille des amplicons, ainsi que la couverture des communautés d'*Archaea* et de *Bacteria*. Une première sélection a été réalisée *in silico*, puis des tests ont été réalisés sur plusieurs échantillons avec les couples d'amorces sélectionnés lors de l'analyse *in silico*. Les résultats ont été comparés à des résultats obtenus précédemment par clonage-séquençage lors de mon stage de Master 2 (François, 2017) sur des échantillons de la cheminée Aisics (amorces *Bacteria* : E8F-907R ; amorces *Archaea* : A344F-915R).

1) Analyse *in silico*

Un total de 11 couples d'amorces ont été analysés *in silico*, ceux-ci sont présentés dans le **Tableau 5** ainsi que leurs caractéristiques. Tout d'abord, la longueur théorique des amplicons a été calculée d'après la position des amorces sur le gène codant les ARNr 16S de *Escherichia coli*. La couverture théorique des amorces a ensuite été testée *in silico*, à l'aide de l'outil TestPrime de la base de données SILVA (Klindworth *et al.*, 2013). Ainsi, les amorces ont été alignées contre plus de 300 séquences d'*Archaea* et 4300 séquences de *Bacteria* afin de déterminer quels taxons pouvaient être théoriquement couverts. Les taxons dont la séquence n'était pas couverte par les amorces, risquaient de ne pas être détectés lors du séquençage.

Tableau 5 : Caractéristiques des couples d'amorces testés *in silico* préalablement à l'étude de diversité par séquençage haut-débit. Les amorces dont le nom est en gras ont également été testées sur des échantillons. Références ; 1 : (Parada et al., 2016) ; 2 : (Apprill et al., 2015) ; 3 : (Takai & Horikoshi, 2000) ; 4 : (Herlemann et al., 2011) ; 5 : (Takahashi et al., 2014) ; 6 : (Ovreås et al., 1997) ; 7 : (Kolganova et al., 2002) ; 8 : (Ding et al., 2017) ; 9 : (Stahl, 1991) ; 10 : (Klieve, 2008).

Nom des amorces	Longueur de l'amplicon (nt)	Cible	Séquence 5' -> 3'	Références
515Fmod 806Rmod	291	Procaryotes	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA GGACTACNVGGGTWTCTAAT	1 2
515Fmod 926R	411	Procaryotes	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA CCGYCAATTYMTTTRAGTTT	1 1
Pro341F 805R	464	Procaryotes	CCTACGGGNBGCASCAG GACTACHVGGGTATCTAATCC	5 4
515Fmod 1000R Arch	485	<i>Archaea</i>	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA GGCCATGCACYWCYTCTC	1 5
Arch2A519F 1017R	498	<i>Archaea</i>	CAGCMGCCGCGGTAA GGCCATGCACCWCCTCTC	6 7
519F 915R	396	<i>Archaea</i>	CAGYMGCCRCGGKAAHACC RGTGCYCCCCCGCCAATTC	8 8
archaea349F archaea806R	457	<i>Archaea</i>	GYGCASCAGKCGMGAAW GGACTACVSGGGTATCTAAT	10 3
A344F 915R	571	<i>Archaea</i>	AYGGGGYGCASCAGGSG GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	9 9
A344F archaea806R	462	<i>Archaea</i>	AYGGGGYGCASCAGGSG GGACTACVSGGGTATCTAAT	9 3
Arch2A519F 915R	396	<i>Archaea</i>	CAGCMGCCGCGGTAA GGCCATGCACCWCCTCTC	6 9
whoi341F whoi785R	444	<i>Bacteria</i>	CCTACGGGNGGCWGCAG GACTACHVGGGTATCTAATCC	4 4

2) Test des couples d'amorces sélectionnées *in silico*

Afin de vérifier expérimentalement la couverture des couples d'amorces, ceux qui ont présenté les meilleurs résultats lors de l'analyse *in silico* ont été testés sur trois échantillons de la cheminée Aisics (MM1E2, M15 Aisics et M16 Ais 2). Le séquençage haut-débit a été réalisé par la plateforme MrDNA (Etats-Unis) avec la technologie Illumina MiSeq (détail dans la section *Réalisation des banques et séquençage*). Les librairies ont été réalisées par le prestataire, en utilisant les couples d'amorces Arch2A519F-1017R et A344F-archaea806R qui ciblent les *Archaea*, le couple d'amorces whoi341F-who785R qui cible les *Bacteria*, et les couples Pro341F-805R et 515Fmod-806Rmod qui couvrent les deux domaines.

3) Séquençage haut-débit

Réalisation des banques et séquençage

Les librairies pour le séquençage haut-débit des gènes codant les ARNr 16S ont été préparées différemment pour les communautés de *Bacteria* et d'*Archaea* car deux couples d'amorces ont été sélectionnées pour l'étude de ces deux domaines.

➤ Préparation des librairies *Archaea*

Les librairies ont été préparées en réalisant des PCR nichées à partir des ADN extraits d'échantillons de cheminées, de panache hydrothermal ou de cultures en bioréacteur. La première PCR a été réalisée dans 5 tubes pour chaque échantillon de cheminée ou de panache proximal en faisant varier le volume d'ADN (dans 3 tubes pour les échantillons de cultures, avec des volumes de 1, 3 et 5 μL d'ADN). Le volume réactionnel était de 50 μL et contenait : 1, 1, 3, 3 ou 5 μL d'ADN matrice ; 5 μL de tampon 10X ; 1 μL de dNTP 10 mM ; 0,2 μL de chaque amorce 0,1 mM ; 0,5 μL de polymérase Taq Core 5 u/ μL (MP Biomedicals) ; eau stérile DNA-free qsp 50 μL , avec les amorces A24F (CGGTTGATCCTGCCGGA) et A1492R (GGCTACCTTGTTACGACTT) (Teske *et al.*, 2002, Lepage *et al.*, 2004). Le cycle suivant a été appliqué pour les échantillons de cheminées et de panache proximal : 5' à 94 °C ; 35 cycles (1' à 94 °C - 1' 30'' à 51 °C – 2' à 72 °C) ; 6' à 72 °C. Pour les échantillons de culture en bioréacteur, le même programme a été appliqué, à l'exception des 35 cycles qui ont été

remplacés par 30 cycles. Les produits PCR issus des 5 amplifications ont été réunis et purifiés pour retirer les restes d'amorces et de polymérase, à l'aide du kit PCR Clean-Up (Macherey-Nagel) en suivant les recommandations du fabricant, à l'exception des durées de centrifugation qui ont été doublées et du temps d'incubation à température ambiante qui a été porté à 15 minutes. La seconde PCR a été réalisée dans 3 tubes, pour chaque échantillon, en utilisant les produits PCR purifiés comme ADN matrice (1, 3 ou 5 µL). Les conditions utilisées étaient les mêmes que pour la première PCR, à l'exception des amorces (A344F et 806R (Stahl, 1991, Takai & Horikoshi, 2000)) et de la température d'hybridation qui a été portée à 54 °C. Les produits PCR issus des 3 amplifications ont été réunis et purifiés dans les conditions précisées précédemment. Les barcodes, des séquences de 8 nucléotides, ont été ajoutés sur le primer forward (A344F) des produits PCR purifiés par le prestataire MrDNA (Shallowater, Texas) en réalisant 5 cycles de PCR dans les conditions décrites ci-dessous.

➤ Préparation des librairies *Bacteria*

Les ADN extraits d'échantillons de cheminées hydrothermales, de panache ou de cultures en bioréacteur ont été purifiés avant envoi au prestataire avec le kit PCR Clean-Up (Macherey-Nagel). Les librairies ont été réalisées par la société MrDNA avec le kit HotStarTaq Plus Master Mix (Qiagen, USA) et les amorces whoi341F (CCTACGGGNGGCWGCAG) et whoi 785R (GACTACHVGGGTATCTAATCC) (Herlemann *et al.*, 2011) en appliquant les cycles suivant : 3' à 94 °C ; 28 cycles (30'' à 94 °C - 40'' à 53 °C - 1' à 72 °C) ; 5' à 72 °C.

➤ Séquençage Illumina MiSeq

Le séquençage à partir des libraires de gènes codant les ARNr 16S de *Bacteria* et d'*Archaea* a été réalisé par le prestataire MrDNA (Shallowater, Texas) en suivant le protocole Illumina Truseq. Il s'agit d'une méthode « paired-read » qui, pour chaque amplicon, produit deux séquences de 300 paires de bases en sens inverse, avec une zone de recouvrement plus ou moins longue, selon la position des amorces et la longueur de l'amplicon : pour deux amorces éloignées sur le gène, l'amplicon est plus long, mais la zone de recouvrement plus courte. Au moins 20000 séquences ont été produites pour chaque échantillon.

4) Traitement bioinformatique

1) Traitement des données de séquençage

Les échantillons ayant été prélevés durant différentes campagnes, les librairies ont été préparées en plusieurs fois entre 2017 et 2020 et séquencées en différents « runs ». Chaque run a été traité séparément durant les premières étapes du traitement bioinformatique et les jeux de données de séquences des communautés de *Bacteria* et d'*Archaea* ont été traités séparément durant toute l'analyse. Les paramètres présentés ont été choisis empiriquement à la suite de nombreux tests comparant le nombre final de séquences et leur qualité.

Le séquençage des librairies a produit des fichiers FastQ contenant les séquences fasta ainsi qu'un score de qualité associé à chaque base. La qualité des séquences a été vérifiée à l'aide de l'outil FastQC (Andrews, 2010).

La première étape du traitement, le **demultiplexage** a consisté à séparer les séquences en fonction de l'échantillon à partir duquel elles ont été séquencées. La reconnaissance de l'échantillon d'origine est possible grâce au barcode ajouté à chaque séquence forward. Cette étape a été réalisée à l'aide de l'outil FASTq Processor⁴ fourni par le prestataire de séquençage MrDNA avec les paramètres suivants : format de sortie « Mothur » et conservation des barcodes et primers.

La première étape du **trimming** a été réalisée à l'aide de l'outil Cutadapt (Martin, 2011) en appliquant les paramètres suivants : *overlap=3*, *times=5*, *minimum-length 100*, *discard-untrimmed*, *pair-filter=any*. Cette étape consiste à retirer les séquences des barcodes et des amorces afin de conserver uniquement les séquences d'origine biologique.

La suite du traitement a été réalisée à l'aide du package *dada2* sous RStudio (Team, 2013, Team, 2015, Callahan *et al.*, 2016). Les paramètres précisés ci-dessous sont ceux qui ont été appliqués pour les amorces A344F-806 et whoi341F-whoI 785R. Certains paramètres ont ainsi été modifiés pour le traitement des séquences des communautés de *Bacteria* ou d'*Archaea*

⁴ <http://www.mrdnalab.com/mrdnafreesoftware/fastq-processor.html>

car les amorces couvraient différentes régions des gènes codant les ARNr 16S, de longueurs différentes.

La suite de l'étape de **trimming** a consisté à retirer les extrémités des séquences dont la qualité était trop faible et éliminer les séquences de faible qualité. La qualité des séquences en sens reverse étant généralement plus faible que pour les séquences forward avec la technologie Illumina MiSeq, un plus grand nombre de nucléotides a été retiré. La commande *filterAndTrim* a été appliquée, avec les paramètres suivants : *trimRight=c(30,90)*, *maxN=0*, *maxEE=c(6,6)*, *truncQ=5* pour les *Bacteria*, et *trimRight=c(20,80)*, *maxN=0*, *maxEE=c(6,6)*, *truncQ=5* pour les *Archaea*.

Un défaut des données de séquençage haut-débit est le nombre d'erreurs d'identification des nucléotides, qui surestime artificiellement le nombre de séquences différentes, surestimant la diversité microbienne présente initialement dans les échantillons. Plusieurs solutions ont été proposées par les différents pipelines d'analyse, généralement basés sur l'agrégation des séquences en OTUs (Operation Taxonomic Units, Unités Taxonomiques Opérationnelles). Cette agrégation peut être basée sur un seuil de similarité (généralement basé à 97 ou 98 % d'identité des séquences), ou des méthodes agrégatives plus complexes comme l'outil SWARM (Schloss *et al.*, 2009, Mahé *et al.*, 2015, Westcott & Schloss, 2017). Les OTUs les moins abondants sont souvent considérés comme des artefacts créés par les erreurs de séquençage et sont retirés du jeu de données. L'outil DADA2 est basé sur une étape qui traite ce problème en suivant une autre approche. Le principe est de calculer un modèle d'erreur afin d'estimer statistiquement si les différences entre les séquences sont dues à des différences biologiques réelles ou à des erreurs de séquençage, en se basant sur le score de qualité associé à chaque nucléotide. Si les indices statistiques indiquent que les différences entre des séquences sont dues à une erreur de séquençage, les séquences seront regroupées et la séquence la plus abondante sera considérée comme représentative de l'ASV (Amplicon Sequence Variant), qui est un équivalent des OTUs. Ainsi, contrairement aux autres méthodes qui produisent de nombreux OTUs dont les moins abondants ne reflètent pas une réalité biologique, les ASVs produits par DADA2 correspondent théoriquement à des phylotypes réels. Cette étape a été réalisée en appliquant le paramètre *pool=«pseudo»* à la commande *dada*, et les autres paramètres par défaut.

L'étape suivante, le **merging**, réunit les reads forward et reverse afin de recréer les séquences complètes. Il est important à cette étape de vérifier que la zone de recouvrement est égale à la longueur attendue. Par exemple, pour un séquençage pair-reads de 2x300 paires de bases impliquant les amorces A344F-806R un fragment de 462 nucléotides est attendu (à l'exception des possibles insertions/délétions), pour un recouvrement de 138 nucléotides. Ce recouvrement est réduit lorsque les extrémités des séquences sont retirées à l'étape de trimming.

Les séquences de longueur anormale ont ensuite été retirées, car elles sont généralement liées à des erreurs de séquençage ou à l'étape de merging. Ce traitement ne doit cependant pas être trop stringent car cela éliminerait les séquences issues de phylotypes qui ont des insertions ou des délétions dans leurs gènes codant les ARNr 16S. Ces valeurs minimales et maximales ont été définies à 380 et 425 nucléotides pour les *Bacteria* et 380 à 390 pour les *Archaea*.

Une autre erreur courante du séquençage haut-débit est la formation de séquences chimériques, qui sont dues à l'hybridation de différents brins d'ADN durant les étapes de PCR. Cela crée des séquences artificielles dont les deux moitiés (ou deux parties inégales) sont issues des deux séquences parentes. L'impact sur les analyses en aval peut être très important car cela crée une surestimation de la diversité et produit des séquences artificielles dont l'affiliation sera forcément faussée. Ces séquences ont été filtrées à l'aide de la commande *removeBimeraDenovo*, avec le paramètre *minFoldParentOverAbundance=10*.

L'affiliation taxonomique des ASVs du jeu de données des communautés de *Bacteria* a été réalisée à partir de la version 138 de la base de données Silva (Quast *et al.*, 2012). Pour les communautés d'*Archaea*, cette base de donnée a été modifiée par l'ajout d'une séquence (numéro d'accèsion NCBI **AB611366**) pour éviter certains problèmes d'affiliation décrits dans la section *Taxonomic affiliation of the ASVs*. Un arbre phylogénétique a été construit pour les *Bacteria* et les *Archaea* à l'aide des packages *phangorn* et *DECIPHER* du logiciel R en utilisant respectivement comme racines des séquences de *Thermococcus* ou de *Nitratifractor* (Schliep, 2011, Wright, 2016).

2) Analyse des données avec l'outil phyloseq

Les données de séquençage ont ensuite été analysées sur le logiciel R (Team, 2013, Team, 2015), principalement à l'aide du package *phyloseq* en s'inspirant des méthodes décrites par Callahan *et al.* (McMurdie & Holmes, 2013, Callahan *et al.*, 2016). La table d'ASV (qui présente l'abondance des ASVs dans chaque échantillon), les informations taxonomiques des ASVs et les métadonnées des échantillons ont été réunies dans un objet *phyloseq*. Les ASVs affiliés aux *Bacteria* ont été retirés du jeu de données des *Archaea* et inversement, puis les ASVs considérés comme des contaminants ont été retirés. Les indices de diversité ont été calculés à l'aide du package *phyloseq*, en ayant normalisé ou non au préalable les données par sous-échantillonnage aléatoire, puis les résultats ont été comparés afin d'éviter un potentiel biais lié aux différences de profondeur de séquençage des échantillons (Weiss *et al.*, 2015). Des analyses de la variance (Anova) ont été réalisées avec la fonction *aov* pour comparer les indices d'alpha-diversité. Des ordinations en analyse en composante principale (ACP) ont été réalisées après une transformation log-ratio centrée (CLR) des données par le package *microbiome* (Aitchison, 1986, Lahti *et al.*, 2017) comme il est recommandé par Gloor *et al.* (Gloor *et al.*, 2017). La significativité des distances entre les communautés microbiennes des échantillons a ensuite été calculée par des analyses de variance multivariées permutationnelles (Permanova) à l'aide de la fonction *adonis* du package *vegan* (Oksanen *et al.*, 2013). Des analyses d'abondance différentielle ont été réalisées à l'aide du package *DESeq2* (Love *et al.*, 2014). Les tests statistiques ont été considérés comme significatifs lorsque les p-valeurs étaient inférieures à 0,05, ou 0,01 dans le cas des analyses d'abondance différentielle.

6) Etude des communautés microbiennes des cheminées hydrothermales par des approches culturelles

1) Cultures en bioréacteur

Dans le but d'étudier *in vitro* la croissance des microorganismes dans des conditions reproduisant au mieux les conditions *in situ*, des cultures d'enrichissement en bioréacteur ont été mises en place. Contrairement aux cultures dites « en batch » qui sont réalisées en milieu fermé, les cultures en continu en bioréacteur permettent de renouveler constamment le milieu, d'éliminer les produits du métabolisme et de réguler des paramètres tel que le pH et la température. Ce contrôle constant du système permet de mener des cultures d'enrichissement dans des conditions stables pendant plusieurs jours ou semaines. Ce type d'approche peut favoriser l'enrichissement de microorganismes qui ne peuvent se développer dans des cultures en batch.

1) Bioréacteur Gas-lift

Le système utilisé pour les cultures d'enrichissement en continu est un bioréacteur de type Gas-lift, qui a été développé par Raven *et al.* (Raven *et al.*, 1992) afin d'optimiser la culture et la production de biomasse de l'*Archaea* hyperthermophile anaérobie *Pyrococcus furiosus* en absence de soufre. Ce système de culture a été transféré et optimisé au LM2E pour la production de biomasse de *P. abyssi* (Godfroy *et al.*, 2006), la réalisation d'études physiologiques et la réalisation de cultures d'enrichissement à partir d'échantillons de cheminées hydrothermales (Postec *et al.*, 2005, Postec *et al.*, 2007, Byrne *et al.*, 2009, Callac *et al.*, 2015). Un des points fort de ce système de culture est le renouvellement continu de la phase gazeuse sur le même principe que le renouvellement de la phase liquide, ce qui assure des conditions anaérobies et une agitation régulière sans génération de forces de cisaillement. Le montage du bioréacteur Gas-lift réalisé durant la campagne MOMARSAT2018 est présenté dans la figure (**Figure 32**).

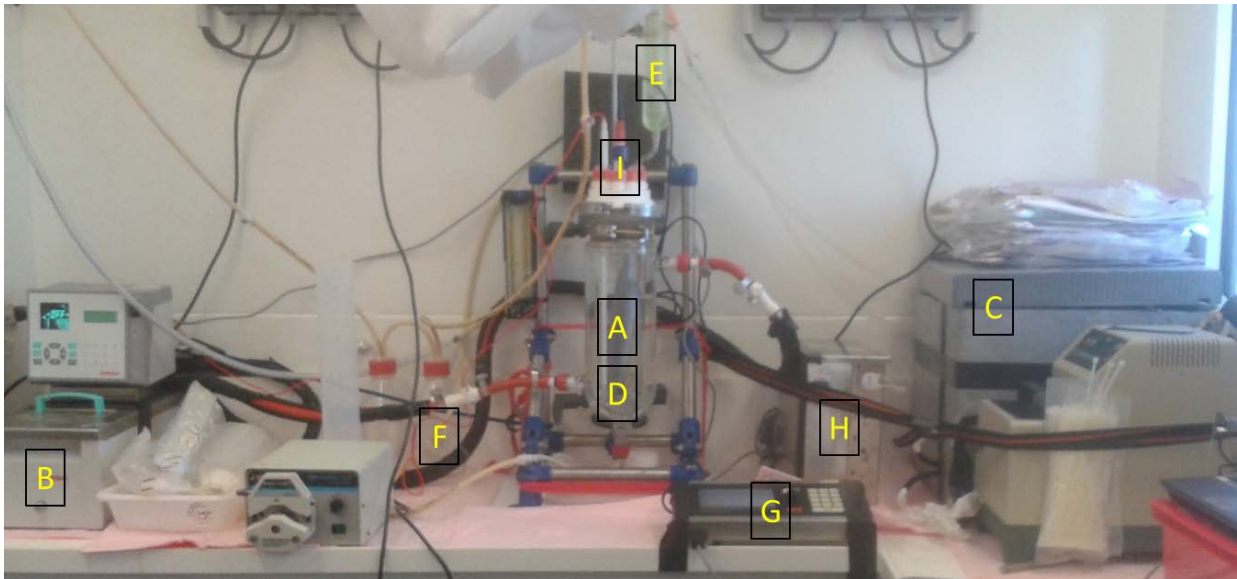


Figure 32 : Photographie du bioréacteur Gas-lift mis en place pour les cultures d'enrichissement durant la campagne MOMARSAT 2018. A : Cuve ; B : Bain thermostaté ; C : Bac de refroidissement relié à un Cryostat ; D : Spargeur ; E : Condenseur ; F : Fioles de garde en sortie du condenseur ; G : Contrôleur analogique Infors ; H : Pompes péristaltiques (entrée/sortie/acide/base) ; I : Sondes de température et de pH

La cuve du bioréacteur Gas-lift est constituée d'une cuve en verre borosilicaté d'un volume utile de 2 L (**Figure 32 A**) qui contient le milieu de culture. Une double paroi permet la circulation d'eau chaude dans la partie périphérique de la cuve. L'eau circulante est maintenue à la température désirée grâce à un bain thermostaté (**Figure 32 B**). Le renouvellement du milieu de culture est assuré par deux pompes péristaltiques, en entrée et en sortie, dont le débit est réglé afin de maintenir un volume constant dans la cuve. Le milieu de culture entrant et sortant est conservé dans des poches stériles, dans un bac de refroidissement (**Figure 32 C**) dont la température est maintenue entre 5 et 8°C grâce à un cryostat qui alimente également le condenseur (**Figure 32 E**) placé sur la platine supérieure du bioréacteur pour limiter l'évaporation du milieu.

Un balayage gazeux constant est effectué par le bas de la cuve, au niveau d'un spargeur (**Figure 32 D**) en verre fritté. Un cylindre en verre (draft-tube) est positionné dans la cuve au-dessus du spargeur afin de créer un mouvement de convection des bulles de gaz qui permet d'homogénéiser le milieu. Ce balayage permet d'assurer l'anaérobiose dans le bioréacteur et évite l'accumulation des produits du métabolisme (par exemple de l'hydrogène dans le cas d'une culture de microorganismes pratiquant la fermentation).

A la sortie du condenseur les gaz circulent par deux fioles de garde (**Figure 32 F**) dont la première contient une solution de NaOH (concentration 10 N) pour piéger le sulfure d'hydrogène.

Les paramètres physico-chimiques du milieu de culture contenu dans la cuve sont contrôlés grâce à une électrode de pH et une sonde de température (PT100) (**Figure 32 I**), reliées à un système analogique de contrôle Infors V5 (**Figure 32 G**) et à un ordinateur portable. Un logiciel dédié, Iris, sert à récolter les données et commander la régulation du pH et de la température, ainsi que le débit des pompes d'entrée et de sortie de milieu. Le pH est maintenu à la valeur souhaitée par l'ajout d'HCl (1 N) ou de NaOH (1 N) à l'aide de pompes péristaltiques (**Figure 32 F**) gérées par le contrôleur analogique. La cuve du bioréacteur a été couverte de papier aluminium (non présenté sur l'illustration) afin de maintenir la culture dans l'obscurité durant toute la durée de l'incubation.

2) Conditions de culture

Des cultures d'enrichissement dans le bioréacteur Gas-lift ont été réalisées à bord durant les campagnes MOMARSAT de 2017 (Anne Godfroy et Françoise Lesongeur), 2018 (AG et David François) et 2019 (AG, FL et DF). Durant les trois incubations, les mêmes conditions de culture ont été appliquées :

- Balayage gazeux sous $N_2:CO_2:H_2$ 75:20:5 à 100 mL/min : apporte de l'hydrogène comme source d'énergie potentielle et réduit le milieu
- Température réglée à 80 °C : correspond à une température adaptée pour la croissance de microorganismes hyperthermophiles
- pH réglé à 6,5 : ce pH légèrement acide est adapté à la croissance de nombreux microorganismes hydrothermaux connus se développant à 80 °C

Dans le but de mettre en place des conditions de culture proches des conditions *in situ*, du panache hydrothermal proximal non filtré a été utilisé comme milieu de culture. Le fait de réaliser les cultures à bord, durant les campagnes océanographiques, a permis d'utiliser le panache quelques heures après son prélèvement sans qu'il ne subisse d'oxydation ou de fortes variations de température, qui auraient altéré sa composition. Après trois heures de stabilisation du milieu, le bioréacteur a été inoculé avec 120 à 150 mL d'un échantillon de cheminée hydrothermale broyée. Le milieu a été renouvelé à un débit de 25 mL/heure durant les trois

cultures. Les échantillons de cheminées hydrothermales et de panache proximal utilisés dans les cultures sont présentés dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Détail des échantillons de cheminées hydrothermales et de panache proximal utilisés comme milieu de culture et inoculum durant les incubations en bioréacteurs.

Incubation	Site de prélèvement	Inoculum (zone de la cheminée)	Echantillon de panache	Température du panache (°C)	Durée de l'incubation
M17 FERM	Aisics	M17 Ais 2 (partie basse)	M17 Ais A1 M17 Ais E1	80 - 120	11 jours
M18 FERM	Capelinhos	M18 Cap 2 (partie basse)	M18 Cap E1 M18 Cap1PBT M18 Cap C1	100 - 150	11 jours
M19 FERM	Aisics	M19 Ais 1 (partie haute)	M19 Ais PL1939-1 PLUME 2 et 3 M19 Ais PL1941-3 PLUME 2, 3 et 4	150	18 jours

3) Conditionnement des échantillons et analyses

Des prélèvements ont été réalisés régulièrement à partir des cultures en bioréacteur et conditionnés de différentes façons selon les analyses prévues :

- Extraction d'ADN : quotidiennement, 50 mL transférés dans des tubes Falcons, conservés à -80 °C. La méthodologie réalisée pour l'identification par metabarcoding est précisée dans la section *Séquençage haut-débit*.
- Culture : quotidiennement, 20 à 30 mL transférés en fiole Pénicilline, conservés à 4 °C sous une atmosphère composée à 100 de N₂
- Chromatographie ionique : quotidiennement, 1 mL transféré en fiole chromatographie, conservé à -20 °C
- Dénombrement cellulaire : quotidiennement, 1 mL transféré dans une fiole Pénicilline contenant 9 mL d'eau de mer formolée. Les dénombrements cellulaires ont été réalisés par comptage en épifluorescence sur un microscope Axio Imager Z2 Apotome équipé d'un système COLIBRI (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Allemagne) après filtration sur filtres polycarbonate (Whatman® Nuclepore 0,25 µm) et marquage au Sybr Gold (Parkes *et al.*, 2014). *Les dénombrements cellulaires ont été réalisés par Anne Godfroy.*
- Poches « out » prélevées quotidiennement et conditionnées différemment un jour sur deux : soit conservées à 4 °C pour des cultures ultérieures, soit filtration sur Sterivex pour analyse moléculaire (conservation du Sterivex à -80 °C) et utilisation du filtrat pour des analyses

chimiques réalisées par les collègues du laboratoire Géosciences Environnement Toulouse (mesure de salinité, pH, Eh, conductivité, concentration en soufre total, H₂S et Fe)

2) Enrichissements MPN

1) Mise en place des enrichissements MPN

En complément des approches moléculaires d'identification et de quantification des communautés microbiennes par séquençage haut-débit, une approche culturale a été mise en place en réalisant des enrichissements MPN.

Les communautés microbiennes des édifices hydrothermaux présentant une forte diversité métabolique et physiologique, les enrichissements MPN ont été réalisés en croisant plusieurs conditions de température et de disponibilité en substrats dans l'objectif de pouvoir enrichir un maximum de microorganismes cultivables. Trois accepteurs d'électrons ont été fournis (soufre élémentaire, sulfate et oxygène), en apportant une source de carbone organique (extrait de levure et peptone, acétate, pyruvate, butyrate et propionate selon les milieux) ou inorganique sous forme de CO₂ dissous (en présence d'hydrogène et/ou de thiosulfate selon les milieux). Pour plus de lisibilité, les différents milieux de culture seront par la suite nommés M1 à M6. Les caractéristiques des milieux sont présentées dans le **Tableau 7** ; le détail de leur préparation et de leur composition est présenté dans la section *Préparation des milieux de culture*.

Les fioles correspondant à ces six conditions ont été incubées à quatre températures (30, 60, 80 et 95 °C) ; une gamme qui permet la croissance de mésophiles, thermophiles modérés et hyperthermophiles.

Quatre échantillons ont été utilisés comme inoculum :

- E1 : M19 Ais 1 (partie haute de la cheminée Aisics)
- E2 : M19 DEAFS (partie haute de la cheminée Montserrat)
- E3 : M19 Ais 2 (partie basse de la cheminée Aisics)
- E4 : M19 Cap 2 (partie basse de la cheminée Capelinhos)

L'objectif initial était d'utiliser les parties hautes et basses des cheminées Aisics et Capelinhos pour comparer les communautés microbiennes dans les échantillons de sulfates et de sulfures. Cependant, le flacon contenant l'échantillon M19 Cap 1 (partie haute de la cheminée Capelinhos) qui avait été conditionné pour les enrichissements MPN a été brisé durant le transfert des échantillons du navire au laboratoire et ne pouvait être utilisé. Il a été remplacé par l'échantillon M19 DEAFS qui est également un échantillon de cheminée de sulfates. Bien qu'il ne soit ainsi pas possible de comparer les communautés entre les deux parties de la cheminée Capelinhos, une comparaison entre un échantillon de sulfates représentant une cheminée jeune (M19 DEAFS) et un échantillon de sulfures représentant une cheminée mature (M19 Cap 2) est réalisable. Les quatre échantillons ont été prélevés durant la même campagne, conditionnés dans les mêmes conditions et conservés durant la même durée afin de pouvoir comparer les résultats et limiter les biais techniques. La masse de ces échantillons a été mesurée afin de déterminer par la suite la concentration microbienne par gramme de cheminée. L'eau de mer utilisée pour réaliser les slurries est la base minérale du milieu de culture utilisé durant le reste de l'étude, sans vitamines de Balch ni Na₂S.

2) Protocoles expérimentaux

1) Préparation des milieux de culture

La même base minérale a été utilisée pour chaque milieu, il s'agit de l'eau de mer artificielle anoxique décrite dans la section *Préparation des milieux de culture*, préparée en fiole de Widdel, contenant la solution de vitamines de Balch, sans Na₂S ni FeCl₂ (Balch *et al.*, 1979, Widdel & Pfennig, 1982, Parkes *et al.*, 2010). Chaque milieu a été préparé séparément par lot de 3 L. Les masses et volumes précisés ci-dessous sont donnés pour un volume final de 3 L. Les milieux M1 et M2 ont été réduits avec du Na₂S (3,6 mL à 1 M), et les milieux M3 et M4 avec du dithionite, S₂O₄²⁻ (3 mL de solution à 50 g/L préparée le jour même). Les milieux M5 et M6, étant des milieux microaérophiles, n'ont pas été réduits. Pour les milieux M2, M3, M5, du bicarbonate de sodium (7,56 g) a été utilisé comme tampon pH et comme source de carbone inorganique, en ajoutant 20 % de CO₂ dans la phase gazeuse. Le pH des milieux M1, M4 et M6 a été tamponné en ajoutant du PIPES disodium salt (18,15 g, Sigma Aldrich). Le détail des substrats ajoutés dans chaque milieu comme donneurs ou accepteurs d'électrons et sources de carbone est présenté dans le **Tableau 7**. Le pH des milieux a été stabilisé à environ

6,8 en ajoutant de l'acide chlorhydrique (1 M) ou de l'hydroxyde de sodium (10 M) dans la fiole de Widdel, puis a été distribué par 9 mL dans des fioles Pénicilline de 20 mL. Après stabilisation, le pH et le potentiel redox Eh ont été mesurés dans trois fioles témoins, qui ont également été analysées par chromatographie ionique et micro-chromatographie gazeuse dans les conditions précisées dans la section *Analyses chimiques*. Des fioles non inoculées de chaque milieu ont également été incubées aux quatre températures puis analysées par chromatographie ionique et micro-chromatographie gazeuse afin d'identifier d'éventuels processus abiotiques modifiant la composition des milieux durant l'incubation. Ces témoins d'incubation ont également permis de vérifier l'absence de contamination,

Tableau 7 : Détail des substrats ajoutés dans les milieux de culture et des phases gazeuses des enrichissements MPN.

Milieu	Substrats	[c] finale (mM, g/L)	Masse pour 3 L (g)	Phase gazeuse	Source de carbone	Accepteur d'électrons
M1	Soufre élém. Extrait de levure Peptone	5 g/L 0,5 g/L 0,5 g/L	15,0 1,50 1,50	N ₂ 100 % - 1,5 bar	Organique	Sulfate
M2	Soufre élém.	5 g/L	15,0	H ₂ :CO ₂ 80:20 - 2 bar	Inorganique	Sulfate
M3	Na ₂ SO ₄ FeSO ₄ ·7H ₂ O	30 mM 0,2 mM	12,784 0,167	H ₂ :CO ₂ 80:20 - 2 bar	Inorganique	Soufre élémentaire
M4	Extrait de levure Na-Formate Na-Acétate Na-Pyruvate Na-Propionate Na ₂ SO ₄ FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g/L 3 mM 3 mM 3 mM 3 mM 30 mM 0,2 mM	0,600 0,612 0,738 0,990 0,865 12,784 0,167	N ₂ 100 % - 1,5 bar	Organique	Soufre élémentaire
M5	Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	20 mM	14,891	H ₂ :CO ₂ :O ₂ 76:20:4 - 2 bar	Inorganique	Oxygène
M6	Extrait de levure Peptone	0,5 g/L 0,5 g/L	1,50 1,50	N ₂ :O ₂ 96:4 - 2 bar	Organique	Oxygène

2) Inoculation et suivi des cultures

Après préparation et stabilisation, chaque milieu a été inoculé avec les quatre échantillons dans la même journée. Les fioles ont été inoculées avec 1 mL de slurry, pour réaliser une première dilution au 1/10^{ème}. Quatre autres dilutions au 1/10^{ème} ont été réalisées en transférant 1 mL de la dilution précédente dans les 9 mL de milieu de culture, faisant ainsi des

dilutions jusqu'au facteur 1.10^{-5} . Toutes les dilutions ont été faites en triplicat à l'aide de seringues, puis incubées à 30, 60, 80 et 95 °C. A cause du grand nombre de fioles incubées pour chaque milieu (5 dilutions * 3 réplicats * 4 températures * 4 échantillons = 240 fioles inoculées ainsi que les témoins), seuls un ou deux milieux ont été incubés simultanément dans les étuves.

La croissance des milieux a été suivie de manière régulière, plusieurs fois par semaine par observation visuelle : apparition d'un trouble (principalement dans les milieux hétérotrophes), coloration noire dans les milieux M3 et M4 (en cas de production d'H₂S par les cultures, réaction avec le FeSO₄ qui produit du FeS et colore le milieu). Des prélèvements ont été réalisés dans chaque culture afin de confirmer une croissance microbienne par observation au microscope à contraste de phase et les morphologies observées ont été notées. Les milieux ont été incubés pendant des durées variables, selon la vitesse de croissance dans les différentes dilutions. Les incubations ont été arrêtées lorsqu'aucune croissance n'a été observée pendant plusieurs jours. Ces informations sont présentées dans le **Tableau 8**. L'intérêt de réaliser des incubations longues (entre 4 et 8 semaines) est de s'assurer que l'absence de croissance était bien due à une dilution de la culture jusqu'à extinction. Si les incubations avaient été trop brèves, une croissance lente n'aurait pas été observée et les concentrations auraient été sous-estimées.

Tableau 8 : Temps d'incubation des enrichissements MPN, et durée passée entre la dernière croissance observée et l'arrêt de la culture.

Milieu de culture	Durée d'incubation (jours)	Temps sans croissance (jours)
M1	27	7
M2	39	7
M3	39	13
M4	55	23
M5	35	23
M6	31	18

3) Arrêt des cultures et analyses

Dès qu'une croissance a été confirmée, et après l'arrêt des incubations de chaque milieu, les fioles ont été conservées à 4°C puis conditionnées pour plusieurs analyses. Afin de réduire les coûts et l'utilisation de consommables, seules les dernières dilutions positives ont été analysées (soit environ 250 fioles).

➤ Analyse de la phase gazeuse par micro-chromatographie gazeuse :

Les fioles ont été mises à température ambiante pour stabiliser la pression, puis analysées par micro-chromatographie gazeuse en suivant la méthode décrite précédemment dans la section *Analyses chimiques*. La mesure de la concentration des gaz au μGC a systématiquement été réalisée avant de faire les autres prélèvements pour éviter une perte de pression.

➤ Analyse des anions par chromatographie ionique :

1 mL de chaque fiole a été prélevé puis centrifugé à 16 000 g pendant 15 minutes afin de culoter les cellules. Le surnageant a été récupéré et conservé à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ avant d'être analysé par chromatographie ionique en suivant la méthode décrite précédemment dans la section *Analyses chimiques*. Les fioles de chaque milieu, ainsi que les témoins correspondants, ont été analysés consécutivement dans une même série afin de s'affranchir d'une éventuelle dérive du signal sur les chromatogrammes. L'analyse par chromatographie ainsi que le traitement des chromatogrammes ont été réalisés par Xavier Philippon, technicien au LM2E.

➤ Identification des phylotypes :

Les souches qui se sont développées aux dernières dilutions de chaque condition ont été identifiées par séquençage des gènes codant les ARNr 16S. 4 mL ont été prélevés puis conservés à $-20\text{ }^\circ\text{C}$, et les ADN ont été extraits en utilisant le kit Macherey Nagel Nucleospin Soil - Genomic DNA from soil. Les cultures ont d'abord été centrifugées à 8000 g pendant 30 minutes, le surnageant a été éliminé et le culot repris avec la solution SL1 puis transféré dans les Bead Tubes. Le protocole du fabricant a été suivi, avec les précisions suivantes : utilisation du tampon SL1 et ajout de 150 μL d'enhancer SX. La lyse cellulaire a été effectuée par un passage au FastPrep pendant 30 secondes à intensité 5. Les ADN ont été repris dans 50 μL de tampon d'éluion SE chauffé au préalable à $80\text{ }^\circ\text{C}$. Les gènes codant les ARNr 16S ont été amplifiés par PCR, en utilisant les amorces E8F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) et 907R (CCGTCAATTCCTTTRAGTTT) (Eden et al., 1991, Ishii & Fukui, 2001) pour les *Bacteria*, et les amorces A344F (AYGGGGYGCASCAGGSG) et 915R (GTGCTCCCCGCCAATTCCT) (Stahl, 1991) pour les *Archaea* (mêmes conditions PCR que décrites dans la section Identification des phylotypes enrichis et isolés). Les gènes ont été séquencés avec la méthode de Sanger par le prestataire Eurofins Scientific (Allemagne).

Le volume restant dans les fioles a été conservé à 4 °C pour garder la possibilité d'isoler certaines souches d'intérêt par la suite.

4) Calcul des concentrations cellulaires dans les échantillons

En connaissant à la fois le facteur de dilution appliqué dans les enrichissements MPN, le nombre de réplicats et le nombre de fioles dans lesquelles une croissance a été observée, il est possible d'estimer la concentration en microorganismes viables cultivables dans l'échantillon à l'aide d'outils statistiques. Ces estimations ont été réalisées en utilisant un tableur Excel pré-formaté⁵ réalisé par Jarvis *et al.* (Jarvis *et al.*, 2010), qui inclut les formules pour calculer la concentration cellulaire initiale, l'écart-type et les intervalles de confiance associés, ainsi qu'un indice de rareté qui permet de déterminer la fiabilité de chaque résultat.

5) Traitement statistique des données

Des analyses statistiques ont été réalisées afin d'évaluer les potentielles corrélations entre les conditions de culture, les communautés microbiennes enrichies et les consommations ou production de métabolites. Toutes les analyses ont été réalisées avec le logiciel R (Team, 2013, Team, 2015) en utilisant les packages *vegan*, *RVAideMemoire* et *FactorMineR* (Lê *et al.*, 2008, Oksanen *et al.*, 2013, Hervé & Hervé, 2020) et les commandes *shapiro.test*, *bartlett.test*, *kruskal.test*, *aov*, *chisq.test*, *fisher.test*, *cca*, *MVA.synt* et *anova.cca*.

⁵ <https://www.wiwiss.fu-berlin.de/fachbereich/vwl/iso/ehemalige/professoren/wilrich/index.html>

3) Mesures d'activités métaboliques grâce à utilisation de substrats radiomarqués

Le plan expérimental, les manipulations ainsi que le traitement des données ont été réalisées avec l'aide d'Erwan Roussel, chercheur au LM2E.

1) Principe des mesures d'activité et plan expérimental

En complément des enrichissements MPN qui ont servi à estimer la concentration en microorganismes viables cultivables dans les slurries de cheminées hydrothermales, des mesures d'activité métabolique ont été réalisées à l'aide de molécules radiomarquées. Cette technique a été utilisée afin de comparer les taux d'incorporation du carbone par les métabolismes autotrophes (bicarbonate marqué au ^{14}C) ou hétérotrophes (leucine marquée au ^3H).

2) Détermination des temps d'incubation

Deux expérimentations ont d'abord été menées afin de déterminer la cinétique d'incorporation du bicarbonate et de la leucine. Le but était de déterminer la durée d'incubation pour laquelle le taux d'incorporation était maximal, afin de ne pas sous-estimer les taux d'incorporation métabolique. Cette expérience préliminaire permettait également de vérifier que la quantité de substrats radiomarqués ajoutée dans les cultures soit suffisante pour que l'activité soit détectable et quantifiable après des incubations à différentes températures. Pour cela, des fioles ont été incubées en triplicat dans plusieurs conditions décrites ci-dessous, puis les incubations ont été stoppées après différentes durées et l'activité de fixation autotrophe ou hétérotrophe du carbone a été mesurée.

➤ Cinétique d'incorporation du bicarbonate

La première cinétique a été réalisée à partir des slurries des échantillons M19 Ais 1 et M19 Ais 2 qui correspondent respectivement aux parties haute et basse de la cheminée Aisics échantillonnée en 2019. Pour chaque échantillon, un volume de 15 mL a été distribué dans 12 fioles Pénicilline de 25 mL dans une enceinte anaérobie et les fioles ont été scellées avec un

bouchon en butyl et une capsule en aluminium sertie par-dessus. La suite des manipulations a été effectuée dans un laboratoire dédié à la manipulation des radioéléments (incluant les éléments ^{14}C et ^3H). 16,2 μL d'une source de bicarbonate marqué au ^{14}C (NEC086H005MC, Perkin Elmer) à 37 kBq/ μL (59,2 mCi/mmol) ont été ajoutés dans chaque fiole, soit une activité totale de 600 kBq/fiole. Le bicarbonate a été prélevé avec une seringue Hamilton, puis distribué dans les fioles au travers d'une aiguille de gros diamètre piquée dans le bouchon en butyl. Chaque fiole a été pressurisée avec un mélange de gaz à une pression de 1,4 bar $\text{N}_2:\text{H}_2$ 90:10 afin de ne pas limiter les processus hydrogénotrophes. Un volume de 2,1 mL d'air a été ajouté stérilement à la seringue au travers d'un filtre 0,22 μm pour une concentration finale en O_2 de 4 % dans la phase gazeuse. Ainsi, seules des conditions de microaérophilie ont été testées. Il a été considéré que des conditions de faible concentration en O_2 dissous seraient naturellement imposées à haute température avec la diminution de la diminution de l' O_2 à 60, 80 et 95 °C par rapport à 30 °C. Les fioles de l'échantillon M19 Ais 1 ont été incubées à 95 °C, et celles de M19 Ais 2 à 30 °C.

Après plusieurs durées d'incubation (0 h - 15 h - 46 h - 112 h), 1 mL des cultures a été prélevé pour une analyse en chromatographie anionique afin de déterminer la production d'acides organiques radiomarqués, et les cultures ont été fixées par l'ajout de formol boraté (900 μL de solution de formol à 37 %, dans laquelle du di-sodium tétraborate a été ajouté à saturation). L'ajout de formol a pour but d'arrêter toute activité métabolique des cellules et le tampon boraté permet de maintenir un pH alcalin pour éviter la libération de bicarbonate sous forme de dioxyde de carbone gazeux. Après homogénéisation au vortex, 200 μL de milieu ont été prélevés puis conservés à - 20 °C dans des fioles à scintillation de 6 mL pour réaliser, plus tard, un comptage de l'activité totale dans la fiole, et vérifier que cette valeur correspond à l'activité introduite initialement. Tout le contenu des fioles a ensuite été filtré sur des filtres en nitrocellulose de 0,22 μm (Whatman 514-0547) pour récupérer les cellules, et éliminer la phase liquide contenant le bicarbonate non incorporé. Les filtres ont ensuite été acidifiés dans un dessiccateur (300 DN, VWR) sous vide en présence d' HCl (300 mL à 25 %) et d'un bécher contenant 20 mL d'éthanolamine (concentration minimale 99,5 %, VWR Chemicals) durant une nuit afin de libérer le bicarbonate restant sous forme de dioxyde de carbone. Les filtres ont ensuite été conservés à - 20 °C dans des fioles à scintillation de 20 mL. Afin de quantifier le ^{14}C présent sur les filtres et dans les aliquots de 200 μL , du liquide à scintillation Optiphase HiSafe 3 (PerkinElmer) a été ajouté (20 mL pour les filtres, et 6 mL pour les aliquots correspondant au volume des fioles). L'activité a ensuite été mesurée avec un compteur à scintillation (Tri-Carb 2910TR, PerkinElmer). Trois mesures de 20 minutes précédées d'une

pause de 10 minutes ont été réalisées pour chaque échantillon sur une plage de 4 à 156 keV. Pour chaque désintégration du ^{14}C , un électron est libéré et interagit avec le liquide à scintillation qui émet des photons. La correction du quenching est réalisée grâce à un étalonnage interne à l'appareil pour le ^{14}C . C'est cette émission de lumière qui est captée par le compteur, et qui permet de réaliser une mesure indirecte de l'activité de désintégration.

➤ Cinétique d'incorporation de la leucine

Une seconde cinétique a été réalisée à partir du slurry de l'échantillon M19 Cap 2, en ajoutant une source de carbone organique, de la leucine marquée au ^3H . La même méthodologie que pour le bicarbonate a été suivie, à l'exception de plusieurs points détaillés ci-dessous. Suite aux résultats de la première cinétique, le volume de slurry distribué dans les fioles a été adapté et abaissé à 10 mL. 5 μL d'une source de leucine tritiée (NET460A005MC, Perkin Elmer) à 185 kBq/ μL (125,6 Ci/mmol) ont été ajoutés dans chaque fiole, soit une activité totale de 925 kBq/fiole. Chaque fiole a été pressurisée à une pression de 1,4 bar avec de l'azote, de l'air (3,5 mL pour adapter au volume de slurry de 10 mL) a été ajouté dans les conditions décrites précédemment, puis les fioles ont été incubées à 60 °C.

Les cultures ont été stoppées après 0 h, 6 h, 24 h et 53 h d'incubation par ajout de 600 μL de formol boraté. Des aliquots ont été prélevés, et les cultures ont été filtrées dans les conditions décrites précédemment, à l'exception de l'étape d'acidification qui n'était pas nécessaire pour la leucine. La mesure d'activité a été réalisée sur le même compteur que pour le ^{14}C , avec un programme dédié au ^3H . Trois mesures de 20 minutes, précédées d'une pause de 10 minutes, ont été réalisées pour chaque échantillon sur une plage de 2 à 18,6 keV. La correction du quenching est réalisée grâce à un étalonnage interne à l'appareil pour le ^3H .

3) Mesure d'activité sur des cultures en point final

Les mesures d'activité en point final ont été réalisées à partir de trois slurries qui ont servi d'inoculum dans les enrichissements MPN (slurries des échantillons de cheminées M19 Ais 1, M19 Ais 2 et M19 Cap 2), en incubant les fioles dans les mêmes conditions que lors des incubations MPN (volume de 10 mL en fioles Pénicilline de 25 mL à 30, 60, 80 et 95 °C). Le même protocole que celui appliqué durant les cinétiques décrites précédemment a été suivi, les différences sont précisées ci-dessous.

Pour chacun des trois échantillons, le bicarbonate ou la leucine radiomarqués ont été introduits dans 15 fioles, puis les fioles ont été pressurisées et de l'air a été ajouté. Les fioles ont été incubées en triplicat à 30, 60, 80 et 95 °C. Les cultures ont été stoppées immédiatement pour un triplicat, puis après 16 h pour les cultures incubées en présence de bicarbonate, et après 24 h en présence de leucine.

Mesure de l'alcalinité totale

Les mesures d'alcalinité totale ont été réalisées par Christophe Brandily, ingénieur au Laboratoire Environnement Profond de l'Ifremer.

Afin de déterminer la concentration totale de dioxyde de carbone, trois fioles de chaque échantillon ont été conditionnées pour réaliser une mesure de l'alcalinité totale, en ajoutant 200 µL d'une solution de chlorure de mercure à 3,7 g/L, puis conservées à température ambiante. Les mesures d'alcalinité ont été réalisées en suivant la méthode décrite par Kaltin *et al.* (Kaltin *et al.*, 2005). Il s'agit d'une méthode séparative qui consiste à acidifier l'échantillon d'eau de mer afin de libérer le CO₂ sous forme gazeuse. Le gaz extrait est pompé puis la concentration en CO₂ est déterminée par spectroscopie infrarouge.

4) Traitement des données

Les valeurs d'activité de désintégration du ¹⁴C et du ³H mesurées à partir des aliquots de 200 µL ont été utilisées pour normaliser les données en fonction de la quantité de substrat radiomarqué introduite dans chaque fiole. L'activité mesurée dans les témoins non incubés (T0 h) a été soustraite de l'activité des filtres, et l'activité des filtres, après soustraction des témoins non incubés, a été considérée comme nulle lorsque la différence était négative.

- Calcul pour la production microbienne autotrophe :

$$\text{Taux de production autotrophe} = \left(\left(\left(\frac{{}^{14}\text{C filtres incubés*} - {}^{14}\text{C filtres témoins*}}{{}^{14}\text{CO}_2^*} \right) \times \frac{1}{T} \right) \times \emptyset [\text{CO}_2] \right) \times \frac{1}{m}$$

- Le taux de production autotrophe est exprimé en pmol de C/ g de cheminée/ heure)
- Les astérisques (*) qui suivent un paramètre indiquent qu'il s'agit d'une activité exprimée en dpm
- T : temps d'incubation (heures)
- $\emptyset [\text{CO}_2]$: quantité totale de CO_2 dans les fioles (pmol)
- m : masse d'échantillon de cheminée introduite dans les fioles (grammes)

La décroissance radioactive du ${}^{14}\text{C}$ a été considérée comme négligeable. Pour le bicarbonate marqué au ${}^{14}\text{C}$, le taux de fixation du carbone inorganique a été calculé en prenant en compte la mesure d'alcalinité totale. Le turnover a été calculé en fonction du temps d'incubation et le taux d'incorporation de carbone organique ou inorganique a été exprimé par gramme de cheminée.

- Calcul pour la production microbienne hétérotrophe :

$$\text{Taux de production hétérotrophe} = \left(\left(\left(\frac{{}^3\text{H filtres incubés*} - {}^3\text{H filtres témoins*}}{{}^3\text{H-Leucine*}} \right) \times 1,55 \times \frac{1}{T} \right) \times \emptyset [{}^3\text{H} - \text{Leucine}] \right) \times \frac{1}{m}$$

- Le taux de production hétérotrophe est exprimé en pmol de C/ g de cheminée/ heure)
- $[{}^3\text{H-leucine}]$: quantité totale de leucine dans les fioles (pmol)

Une correction de la décroissance pour le ${}^3\text{H}$ a été appliquée à toutes les activités mesurées sur la base d'une demi-vie de 12,33 années. La concentration en leucine marquée au ${}^3\text{H}$ a été considérée comme saturante dans les incubations à une concentration de 10 nM. Un facteur de conversion de 1,55 a été utilisé pour calculer la quantité de carbone fixé par mole de leucine utilisée. Ce facteur a été déterminé empiriquement par Simon *et al.* (Simon & Azam, 1989).

Chapter III - Mineralogical characterization of hydrothermal chimney samples

1) Hydrothermal chimneys sampling

Because almost the entire study was based on this step, the sampling procedure was realized very carefully. Since 2017 and when it was possible, the hydrothermal chimneys from the hydrothermal field Lucky Strike were sampled in two steps to retrieve separately the upper (sulfate-dominated) and bottom (sulfide-dominated) parts. All the dives and sampling processes were recorded so we could verify which parts of the chimneys were collected. Thus, every sampling of the chimneys was realized on the same diffusers over years to allow a comparison of results based exactly on the same zone of the different chimneys. Snapshots from dive records and pictures of samples are presented below.

Chimney Aisics

The hydrothermal chimney Aisics is a small chimney located at the bottom of the main chimney of the “Tour Eiffel” site. This chimney was sampled in 2008 (two steps), 2009, 2013, 2014, 2015, 2016 (two steps), 2017 (three steps), 2018 (two steps) and 2019 (two steps). The two first steps in 2017 correspond to the sampling of the upper and bottom parts of the chimney during the same dive. The third step consisted in sampling the anhydrite precipitation that occurred during the 9 days following the first sampling steps (**Figure 5 A**).

The upper part of the chimney (sample M17 Ais 1 on **Figure 33**) was a very porous and friable structure that was easily destroyed during sampling process. In contrast, the bottom part of the chimney (sample M17 Ais 2) was a very tough structure composed of shiny sulfides and dark or rusty minerals.

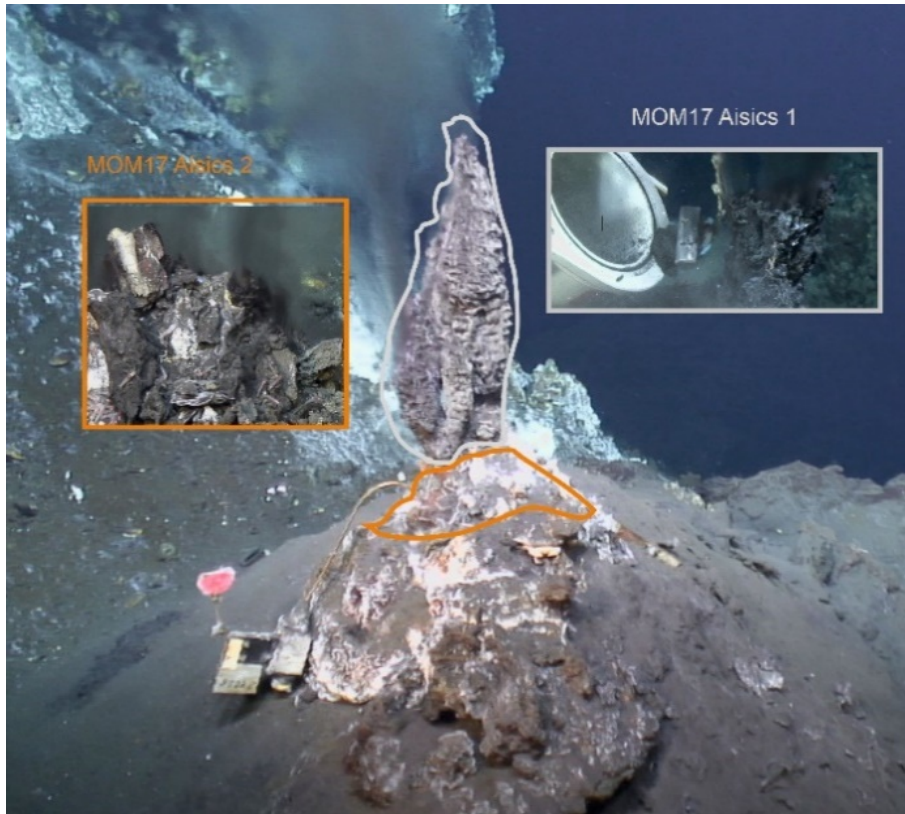


Figure 33 : Picture of hydrothermal chimney Aisics in 2017 detailing the upper and bottom parts (top). Picture of sample M18 Ais 2 before crushing in a mortar (bottom).

Chimney Montserrat

The chimney Montserrat is located on the Montsegur site which is fed by the same endmember fluid as the Aisics chimney (south-east group of Lucky Strike). It was sampled in 2017, 2018 and 2019. The samples collected from this chimney in 2018 and 2019 were named DEAFS because a Deep-Sea Autonomous Fluid Sampler (Legrand *et al.*, 2019) was installed next to the chimney. Only the upper part was sampled, that consisted of a large structure of dark anhydrite (**Figure 34**).



Figure 34 : Picture of hydrothermal chimney Montserrat in 2019 (top). Picture of sample M19 DEAFS before crushing in a mortar (bottom).

Chimney Cypres

The chimney Cypres was sampled in 2015, 2016 and 2018 (two-steps). The structure was similar to the chimney Aisics with a soft and dark beehive like upper part, and a tougher part at the bottom (**Figure 35**). Compared to the sample M18 Ais 2, M18 Cyp 2 was less shiny and the colour was mostly grey, that may indicate the presence of sphalerite (ZnS) instead of iron sulfides like pyrite or chalcopyrite.



Figure 35 : Picture of hydrothermal chimney Cypres in 2018 detailing the upper and bottom parts (top). Picture of sample M18 Cyp 2 before crushing in a mortar (bottom).

Chimney White Castle

Sampling of the chimney White Castle was performed in 2016, 2018 (two steps) and 2019. This site is fed by the same endmember fluid as the Cypres chimney (middle group of Lucky Strike). The upper part was a large structure of black and friable sulfates (**Figure 36**). The bottom part was very tough, as sample M18 WC 2 was composed of a layer of tough and shiny sulfides (on the right of the picture) and a darker layer (on the left of the picture) that possibly composed the central conduit and the adjacent parts.



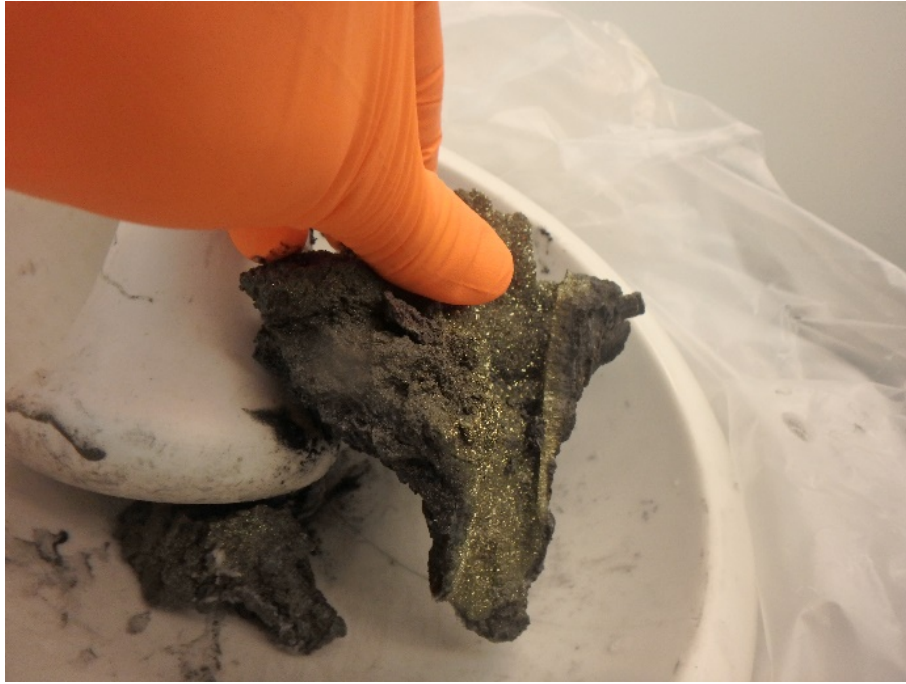


Figure 36 : Picture of hydrothermal chimney White Castle in 2018 detailing the upper and bottom parts (top). Picture of sample M18 WC 1 and M 18 WC 2 before crushing in a mortar (respectively middle and bottom).

Chimney Y3

The chimney Y3 is located in the north-east group of Lucky Strike and was sampled in 2016, 2017 and 2018 (two steps). Its structure is similar to the chimneys Aisics, Cypres and White Castle (**Figure 37**). As for the sample M18 WC 2, M18 Y3 2 was heterogeneous and was likely composed of internal parts of the chimney because the minerals were very tough. This is illustrated by the fragment presented in the **Figure 37** (bottom) where an internal conduit is apparent.

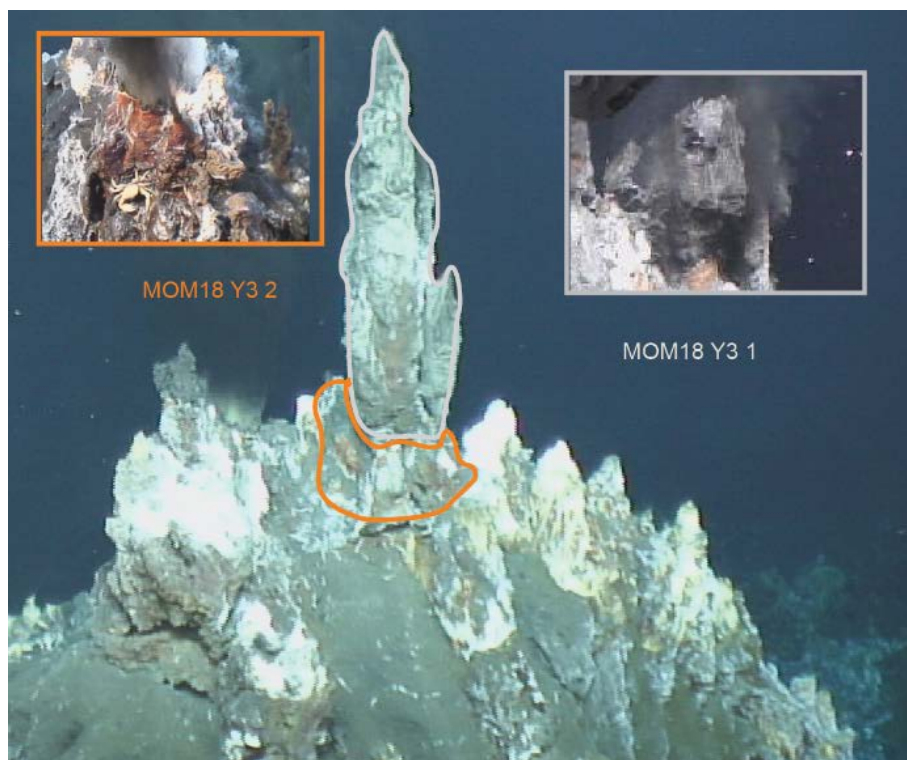


Figure 37 : Picture of hydrothermal chimney Y3 in 2018 detailing the upper and bottom parts (top). Picture of sample M18 Y3 2 before crushing in a mortar (bottom).

Chimney Capelinhos

The site Capelinhos is located 1.5 km at the East of the of Lucky Strike lava lake and the fluid exhibits a different chemical composition from other sites of the field (Fe and Mn concentrations 5 folds higher (Chavagnac *et al.*, 2018)). At the site Capelinhos, chimneys were sampled in 2014, 2015, 2016, 2017, 2018 (two steps) and 2019 (two steps). Due to the structure of the chimneys at this site, the sampling procedure was not performed exactly in the same manner as for the other chimneys by sampling upper and bottom parts of the same spire.

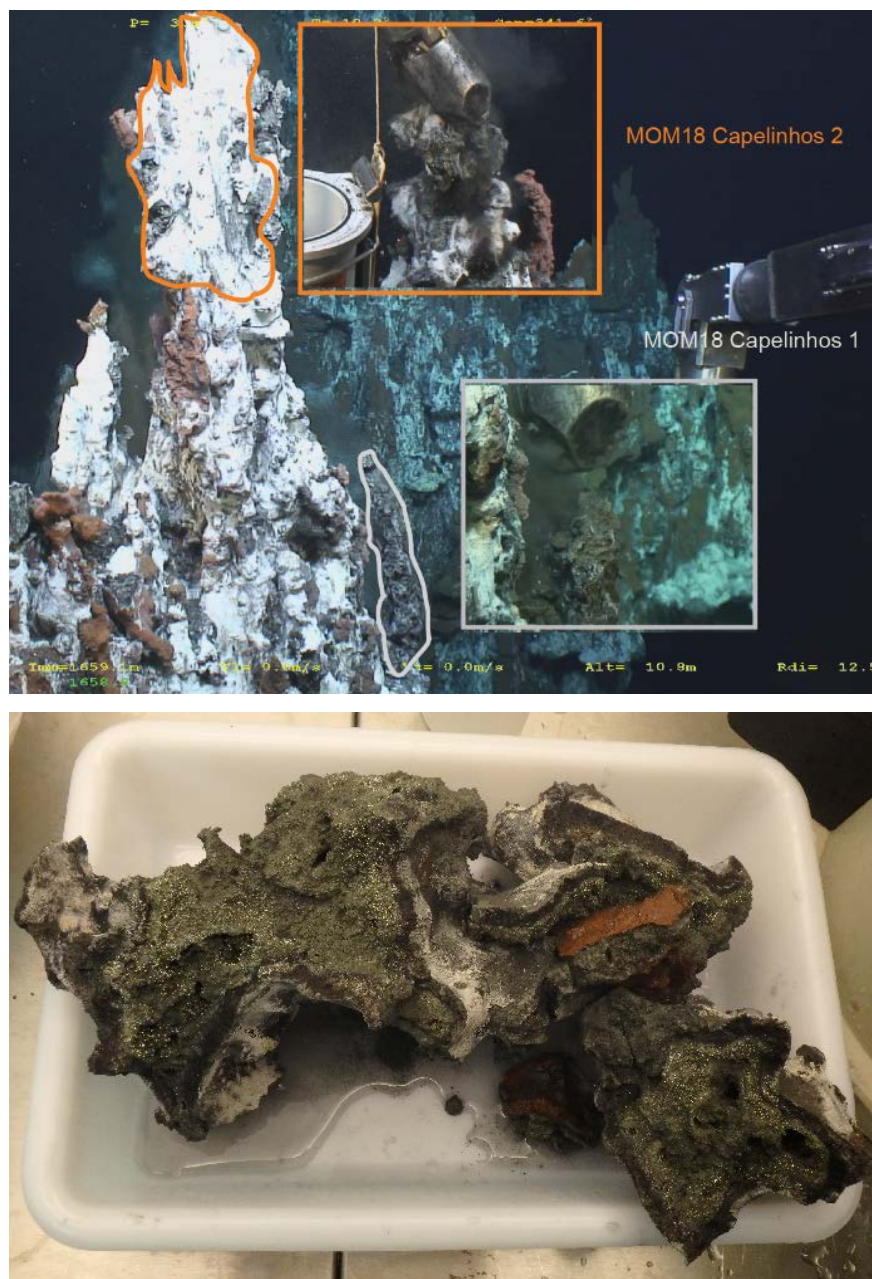


Figure 38 : Picture of hydrothermal chimney Capelinhos in 2018 detailing the upper and bottom parts (top). Picture of sample M18 Cap 2 before crushing in a mortar (bottom).

The Capelinhos site is composed of several high main chimneys (15 m high) with numerous lateral diffusers forming flanges or candle holder structures. Sample M18 Cap 1 corresponded to a lateral secondary diffuser whereas M18 Cap 2 was collected at the top of one of the main chimneys (**Figure 38**). The sample M18 Cap 2 was one of the biggest and complete fragments recovered during the study. As we could recover a very large part of the top of the chimney, the sample contained several conduits in which the hydrothermal fluid circulated. Due to the large size of this sample, we could not crush it completely and only a subsample was used for down-step studies. In 2019 sampling was also performed in the same way (lateral diffuser and main chimney flange fragment).

2) Mineralogical characterization of hydrothermal chimney samples

Hydrothermal chimney samples were analysed using two methods (*Caractérisation minéralogique des échantillons de cheminées hydrothermales*), X-ray diffraction (XRD) and microscopic observation of thin sections. The XRD analyses were performed on all the samples to determine their mineralogical composition with a precision of approximately 1%. A hierarchical clustering analysis (HCA) was then applied on the data to group the samples depending on their mineralogical composition. Thin sections were prepared from some samples of the chimney Aisics and were observed to visualize the structural organisation of minerals and their porosity.

1) X-Ray Diffraction analysis

The relative abundance of minerals in the hydrothermal chimney samples and the results of hierarchical clustering analysis are presented in the **Figure 39**. The results of PCR and sequencing reactions are also presented on this figure and will be discussed in the *Chapter IV*. The main minerals present in the samples were sulfates (> 90% of sulfates being anhydrite, CaSO₄), chalcopryrite (CuFeS), pyrite (FeS₂), marcasite (FeS₂), and sphalerite (ZnS).

The hierarchical clustering analysis produced a dendrogram (at the top of the **Figure 39**) that groups the samples depending on their mineralogical composition. Depending on the

cut-off threshold considered, the number of mineralogical classes is different. The choice of the number of classes to retain will be discussed below in order to choose the most representative manner to group the samples. The classes will be designated classes 1, 2, 3 or 4 based on the classification written in blue on the **Figure 39**.

The samples of class 1 were mainly composed of anhydrite, that represented more than 80% of minerals, excepted for samples M18 CAP 1 and M19 Cap 1 that contained 69 and 71% of anhydrite. The second most abundant mineral in those samples was pyrite, up to 14% in M18 Cap 1 and M17 Mont. Anhydrite is one of the first minerals that precipitates when seawater is warmed by the hydrothermal fluid at temperature exceeding 150°C. This is specific to the external and upper parts of hydrothermal chimneys when the fluid is emitted in seawater. In this case the structure is very friable and porous and promotes the infiltrations of seawater because only a few inclusions of pyrite are present in the anhydrite matrix (Haymon, 1983, Humphris *et al.*, 1995, Meng *et al.*, 2018). The picture of the sample M19 DEAFS (**Figure 34**) shows a typical precipitation of porous anhydrite.

This is consistent with the sampling procedure established during the study. Indeed, for some samples only the upper part of the chimneys was collected (represented by grey rounds on **Figure 39**). The sample M18 Ais 1 (M18 Ais 1B corresponding to the same hydrothermal chimney sample which was used for extracting DNA in duplicate) exhibited an unexpected mineralogical composition. Even if the top of the chimney was dark and looked like an anhydrite structure it is not always easy to sample a soft anhydrite chimney. It is likely that sulfide bottom part of the chimney was sampled together with the anhydrite upper part.

The samples of classes 2, 3 and 4 were mainly composed of sulfides but presented differences in their ratio sulfates/sulfides and in the proportion of the different sulfides (pyrite, chalcopyrite, marcasite and sphalerite). Sulfides are generally associated with higher temperature zones and progressively precipitate and replace sulfates over at least several months or years.

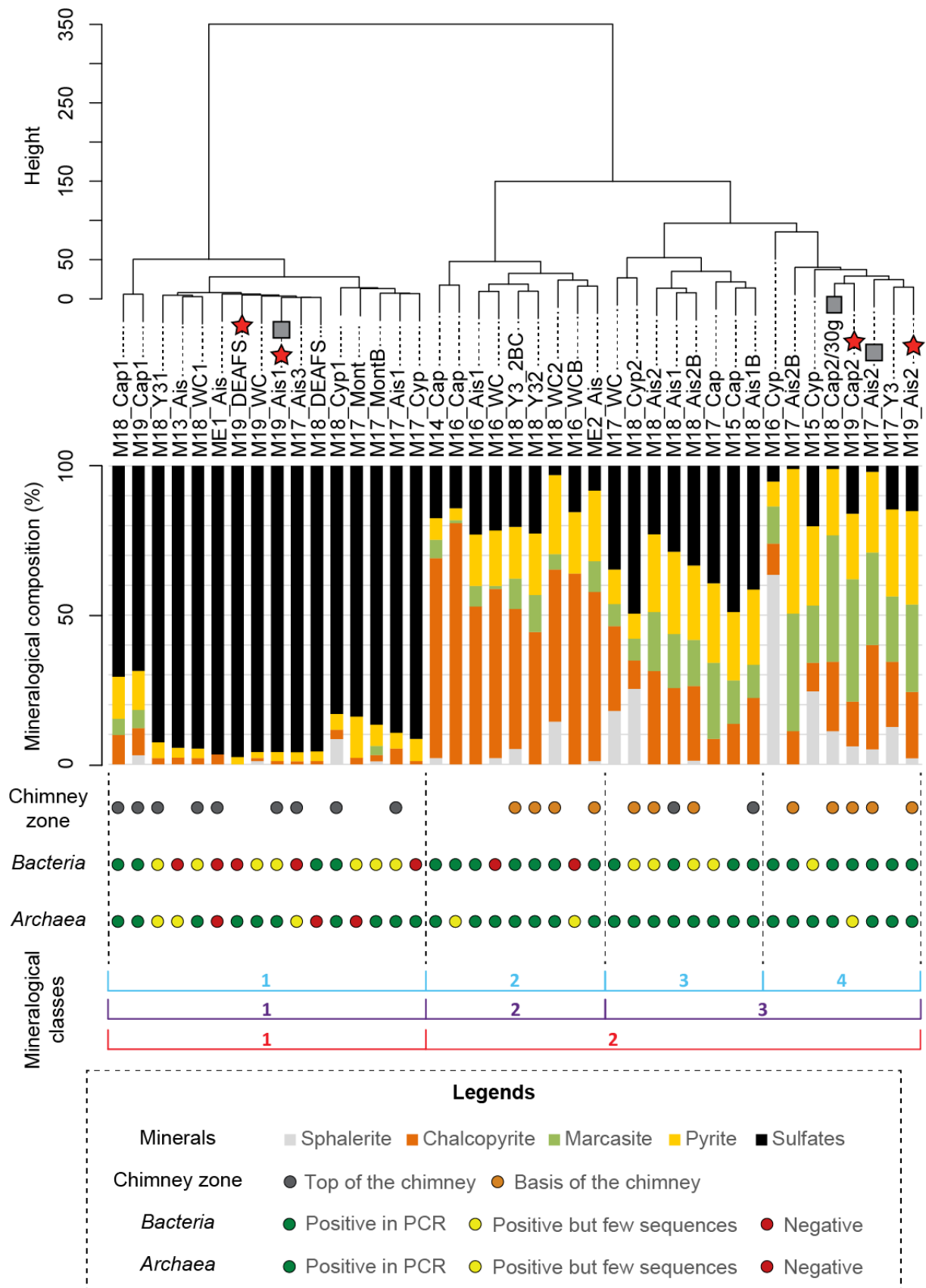


Figure 39 : Mineralogical composition of the hydrothermal chimney samples (middle) and hierarchical clustering of the samples (top) depending on their mineralogy. Samples used for MPN and activity measurements studies are marked with a red star. Samples used for continuous cultures in bioreactor are marked with a grey square.

The class 2 samples were composed of at least 77% of sulfides and the main minerals were chalcopyrite (44 to 81%) and pyrite (4 to 27%). The others sulfides (sphalerite and marcasite) represent at most 14% of the minerals. This proportion of chalcopyrite is characteristic of high-temperature zones in contact to hydrothermal fluid, because chalcopyrite precipitates at temperatures over 300°C (Thompson *et al.*, 1988, Kim *et al.*, 2006). Hence, samples of class 2 were partially composed of internal parts of the chimneys, from the central conduit or next to the conduit. The samples M18 Y3 2 and M18 WC 2 confirm this assumption by the presence of central conduits surrounded by a thick layer of sulfides, probably chalcopyrite or pyrite **Figure 37**.

Such as class 2 samples, the samples of class 4 were mostly composed of sulfides (at least 80%) but instead of chalcopyrite, the main sulfides were marcasite (up to 42%) and pyrite (up to 48%). On the contrary of pyrite which is present in the different parts of the chimneys, marcasite is essentially present in the external parts of the chimneys because it precipitates at temperatures between 150 and 250°C (Kim *et al.*, 2006). The lower proportion of chalcopyrite compared to samples of class 2, and the higher proportion of marcasite indicates that samples of class 4 were mainly composed of peripheral zones of the chimneys, and inner zones at the exception of the innermost zones including the central conduit.

The class 3 is represented by samples that are composed of 23 to 49% of anhydrite and varying amounts of the different sulfides described earlier. Unlike classes 1, 2 and 4, samples from class 3 cannot be reliably assigned to a specific stage of growth of chimneys or to a particular part of the structures. Instead, the proportions of sulfates and sulfides tend to indicate that these samples were composed of different parts of the chimneys. We can assume that during the collection of samples M17 WC, M17 Cap and M15 Cap, the upper zone and the basis of the chimneys were not separated so it is probable that these parts have been mixed. The other samples in this class correspond to replicates realized during the DNA extractions of samples M18 Ais 1 and M18 Ais 2. As it was presented above, the sampling of chimney Aisics in 2018 was realized in two steps but it seems that the collection of the upper part was not successful. It confirms that the samples from mineralogical class 3 may result from the mixing of sulfate and sulfide-dominating part of the chimneys.

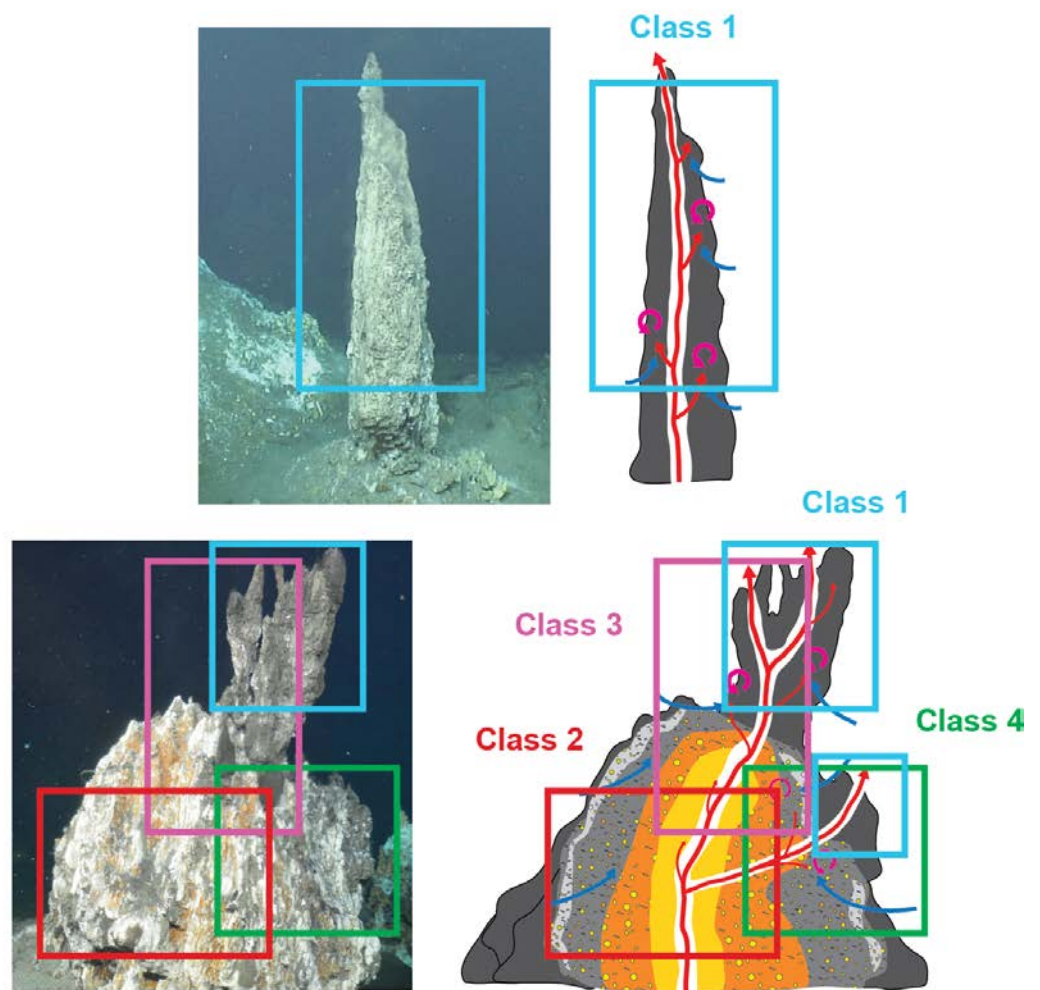


Figure 40 : Schematic representation of the spatial position of mineralogical classes in young (top) and mature chimneys (bottom). Legends of schemes and pictures correspond to the **Figure 7**.

The **Figure 40** represents the spatial location where the samples from the four mineralogical classes were probably collected, on two chimneys representative of sulfates and sulfide dominant stages. Samples of class 1 correspond to zones that precipitated recently (at the time scale of chimneys growth), such as sample M17 Ais 3 (top left of **Figure 39**). Samples as M17 Ais 3 have been observed to form within a few days. It also corresponds to the upper parts of bigger chimneys or secondary conduits where the hydrothermal fluid is emitted (such as sample M18 Cap 1 on **Figure 38**). Samples from class 2 and 4 correspond to the sulfide-dominant zone at the bottom of the chimney, respectively to the inner and outer parts. Samples of class 3 represent the mixing of the previously described parts, or to an intermediate stage when sulfates are being replaced by sulfides.

Thus, the separation of samples in 4 mineralogical classes seems to be a good representation of the spatial organisation and temporal evolution of minerals in the chimneys. Indeed, the classes 3 and 4 should not be merged because class 4 contains samples that present a homogeneous mineralogical composition and that probably correspond to the same parts of the chimneys (with the exception of sample M16 Cyp that contains more sphalerite). In contrast, samples from class 3 possibly result from the mixing of different parts of chimneys and do not represent a specific zone or a defined growth stage. Merging the classes 2, 3 and 4 may be interesting for contrasting the sulfide dominant samples with the class 1 that is the most homogenous class.

The samples M19 DEAFS, M19 Ais 1, M19 Ais 2 and M19 Cap 2 were collected for MPN enrichments and activity measurements experiments (marked with a red star on **Figure 39**). The aim was to collect separately the upper part and the basis of the chimneys to compare samples that are representative of sulfate and sulfide dominants stages of chimneys growth. XRD analysis have shown that samples M19 Ais 1 and M19 DEAFS (composed of 95 and 96% of anhydrite), are classified into the mineralogical class 1 and correspond as expected to young parts of the chimneys. On the opposite, samples M19 Ais 2 and M19 Cap 2 were mostly composed of sulfides (> 85%) and represent mature parts of the chimneys. Thus, the objectives of the sampling were successful and will allow a functional comparison of microbial communities from samples of young and mature chimneys.

2) Microscopic observation of thin sections

Samples from the chimney Aisics were used to realize thin sections to visualize the spatial organisation of minerals at a microscopic spatial scale.

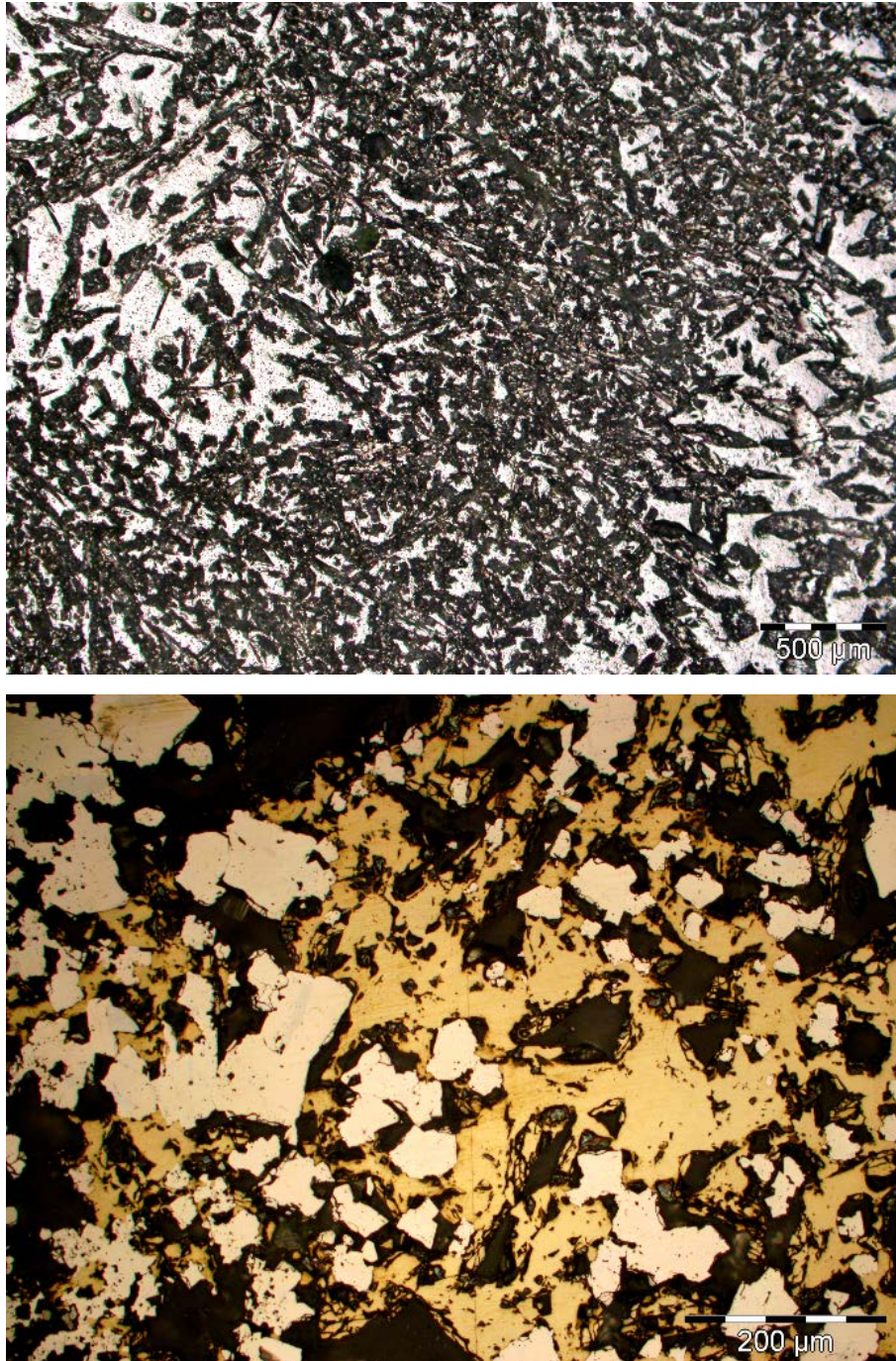


Figure 41 : Photomicrographs of thin sections of samples ME1_Ais (top) and M16_Ais 1 (bottom). Black minerals in sample ME1_Ais are anhydrite. Yellow and off-white minerals in sample M16_Ais 1 are respectively chalcopyrite and pyrite.

The sample ME1 Ais, that contains 97% of anhydrite, is representative of class 1 chimneys. The thin section at the top of **Figure 41** shows the spatial organisation of the anhydrite matrix. The high porosity of anhydrite that allows the circulation of seawater and hydrothermal fluid is clearly apparent.

In contrast, the sample M16 Ais 1 belongs to the mineralogical class 2, corresponding to the central part of the chimney. The thin section at the bottom of **Figure 41** shows the presence of pyrite crystals surrounded by massive chalcopyrite. This illustrates the replacement of sulfates by chalcopyrite at high temperature, that fills the pores between the minerals and reduces the porosity of the chimney.

3) Discussion

The hydrothermal chimney samples collected on the Lucky Strike field were described by XRD analysis and observations of thin sections. First, XRD analyses have shown that the samples were composed of different sulfates and sulfides that were already described as main components of active chimneys at Lucky Strike (Langmuir *et al.*, 1997). Depending on their proportions, these minerals provided information about the growth stage of the chimneys, and the location of the samples inside the structure of the chimneys. A hierarchical clustering analysis was applied to group the samples into four homogenous mineralogical classes. These mineralogical data confirmed that in almost all cases the sampling protocol in two steps was successful and allowed us to collect separately the sulfate-dominant or sulfide-dominant parts. The microscopic observations of thin sections have shown that the porosity of chimneys was higher in sulfate samples compared to sulfide samples.

The mineralogical composition of the samples cannot be used as an absolute dating proxy of the chimneys parts that were collected because the precipitation sequence of the minerals is influenced by many parameters including the flow rate, chemical composition and temperature of the fluid and the structure of the chimneys. Moreover, those parameters vary over time, depending on the activity of the sites and the evolution of the chimneys structures. Thus it is not possible to know how much time it took to an anhydrite structure to precipitate at the top of a chimney, and it is even more complicated for the sulfides at the basis of chimneys

due to the multiple phases of successive mineral dissolution and precipitation (Meng *et al.*, 2018).

However, these data can be used as a relative time scale to compare samples to each other. Indeed, we have shown that the samples of class 1 were mainly composed of anhydrite, indicating they have precipitated recently. In the young anhydrite structures the minerals present an important porosity so the thermal gradient must be very sharp due to the mixing of hydrothermal fluid with seawater. These samples can be used for studying the microbial communities inhabiting young chimneys, that are still mainly influenced by seawater.

On the contrary the samples of classes 2 and 4, that were mainly composed of sulfides, represent more mature chimneys parts associated to higher temperature zones. Due to the lower porosity of sulfides compared to anhydrite, the mixing between hydrothermal fluid and seawater is limited by the structure of the chimneys.

Unlike samples of classes 1, 2 and 4, samples of class 3 do not represent a homogeneous class because it represents either the mixing of different parts, either an intermediate stage of chimneys growth when sulfates are being replaced by sulfides. Thus, the data obtained on the microbial communities of these samples should be interpreted carefully.

In conclusion, the results of mineralogical analyses have brought temporal and spatial information concerning the samples collected from the hydrothermal chimneys at Lucky Strike vent field. These data were used as a basis for describing the chimney samples used in molecular (*Chapter IV*) and cultural approaches (*Chapter V*). The links between mineralogical composition of chimney samples are also discussed in the *Chapter VII*.

Chapter IV - Phylogenetic diversity of microbial communities in hydrothermal vents

High-throughput sequencing of 16S rRNA genes

The first step in understanding the microbial communities of deep-sea hydrothermal vents is to identify the microorganisms that are present. Because cultivation methods are selective, they are not well suited to a diversity study. Hence, our approach consisted first to study the diversity of microbial communities in hydrothermal chimneys and in the proximal plume by high-throughput sequencing. The metabarcoding studies allow the identification of a large part of the microbial communities, depending on the sequencing depth and the primers used. We have chosen to sequence the genes encoding 16S rRNA gene because they are an universal marker for prokaryotes and because they were used in numerous studies and so the 16S database contains a lot of informative data.

Samples of hydrothermal chimneys and proximal hydrothermal plume (close the fluid outlet in the mixing gradient between fluid and seawater) were collected from the Lucky Strike hydrothermal vent field to study the microbial communities from six different sites of Lucky Strike (Aisics, Cypres, Y3, White Castle, Montsegur, Capelinhos).

The mineralogical composition of hydrothermal chimney samples was studied by XRD analysis and microscopic observation of thin sections. The results, presented in the previous chapter, were used to determine the growth stage of the chimneys and to identify the part of the chimneys that were collected.

Samples from proximal hydrothermal plume were also collected at the vicinity of chimneys, where hydrothermal fluid mixes with seawater. The temperature gradient was used as an indicator of the dilution of the hydrothermal fluid. Mixed hydrothermal fluids were sampled from Aisics, Cypres, Y3, White Castle and Capelinhos sites of Lucky Strike at temperatures of approximately 20-30°C, 50-60°C and over 80°C. These samples are expected to bring data about the microbial communities inhabiting the plume and seawater around the hydrothermal chimneys.

Some of these hydrothermal chimneys and proximal plume samples were also used as inoculum and culture medium respectively in continuous enrichment cultures in bioreactors performed on-board during oceanographic cruises. The planktonic phase of the culture was sampled daily and the enriched phylotypes were identified by sequencing 16S rRNA genes using the same method (high-throughput sequencing) as for chimney and plume samples.

Preliminary methodological assessments

High-throughput sequencing methods are relatively recent compared to other techniques in microbiology. Moreover, different sequencing technologies have been developed over the last years and different bias are inherent to these methods thus the good working practices are still being discussed and developed. Pollock *et al.* reviewed the techniques and proposed a guide of “best practice” for 16S rRNA gene human microbiome studies (Pollock *et al.*, 2018). Most of these advices can also be applied to environmental samples.

The first issue that can be encountered is the degradation of DNA in the samples, which results in a loss of information. To avoid this issue, all the samples were frozen at -80°C immediately after their arrival on-board ship until DNA extractions in the laboratory.

A common bias of all the molecular approaches occurs in the DNA extraction step. Because some cells can be more resistant to the lysis methods, their DNA is not recovered and cannot be detected, that also lead to a loss of information. Depending on the method used, the yield and quality of extracted DNA can impact the results of the diversity studies (Luna *et al.*, 2006, Carrigg *et al.*, 2007, Ramírez *et al.*, 2018). Extracting DNA from hydrothermal chimney samples is not easy especially because of the microbial biomass can be very low in some samples, and chimney samples contains many metals that can inhibit PCR reactions. Thus, the choice of the extraction method is essential to obtain DNA of sufficient quality and quantity. An optimisation work was realized for chimney samples using the DNeasy PowerMax Soil kit (Qiagen), by performing the extractions from different quantities of chimneys and by testing the addition of various concentrations of polyadenylic acid, that is supposed to bind on the minerals present in the samples (Webster *et al.*, 2003). The DNA was then concentrated using Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices (Merck-Millipore) to obtain a sufficient DNA concentration for PCR amplifications. Even if it is advised to always performed all the extractions by following the same protocol, in our study the extractions were performed from 8 grams of chimneys, and for some samples from 40 grams when 8 grams did not allow to recover of a sufficient quantity of DNA (for the extractions on 40 grams, four extraction were

performed simultaneously and the DNA extracts were pooled during the concentration step). The repeatability of DNA extractions, and the potential influence of the mass of chimney samples used for extractions were checked and the results are presented in the section *Validation of the implemented methods, identification of biases and the solutions provided*.

Because the risk of contamination is always present during a diversity study, especially for low biomass samples, we realized extraction blanks for each batch of DNA extraction and in each sequencing run. These blanks were used to identify potential contaminations.

The downstream steps can also have a great influence on the results. These steps include the choice of the primers, the PCR protocols and PCR kits, the choice of the sequencing platform and sequencing technology (Fouhy *et al.*, 2016). Depending on the sequence of the primers and the genes sequences of the microorganisms, some phylotypes may not be detected. *In silico* analyses were performed to test the coverage of different pairs of primers and then the selected primers were tested for sequencing on DNA extracts from three hydrothermal chimney samples (results in the section *In silico analysis of theoretical primers coverage*).

The best approach would be to test and optimize all the steps. However, it would be expensive and time-consuming to compare different PCR conditions, polymerases and then to analyse the data obtained from different sequencing platforms. Moreover, it is likely that the optimal conditions are not similar for all the samples, because of the variability of microbial communities or DNA concentration. Thus, only the PCR conditions were optimized by choosing as criterion the success of PCR amplifications. The same PCR conditions were then applied to all the chimney samples while they were slightly modified for plume or cultures in bioreactor samples as DNA was easier to extract and so DNA concentration were higher (section *Séquençage haut-débit*).

The 16S rRNA genes were sequenced using the Illumina MiSeq technology at the sequencing platform MrDNA (Shallow Water, Texas). It produced paired-read sequences of 2x300 nucleotides. We have chosen this technology because it allows the amplification of tens of thousands of sequences of a length that is sufficient to identify phylotypes up to the family or genus.

Our study did not include a mock community as recommended (Schloss *et al.*, 2011, Brooks *et al.*, 2015, Fouhy *et al.*, 2016, Pollock *et al.*, 2018) but all the samples were processed using the same protocol so if a bias was introduced it should be similar among all the samples so we expect that it would not affect a comparison of the samples. Some DNA extracts and some PCR products were subsampled and were sequenced in different runs to check the

repeatability of the runs. The results are presented in the section *Validation of the implemented methods, identification of biases and the solutions provided*.

Finally, the sequence analysis methods are also essential because depending on the bioinformatics pipeline used, the results can differ. We have chosen to process the raw data using the pipeline DADA2 because unlike the OTU-based approaches it does not rely on the use of a subjective threshold that may overestimate the diversity (Callahan *et al.*, 2016). After removal of chimeric sequences, all the ASVs (Amplicon Sequence Variants) were conserved, and no filtering on low counts ASVs was realized. The community matrix (occurrence of ASVs in the samples), taxonomic affiliation of the ASV and metadata (such as hydrothermal site...) were combined into a phyloseq object, and the package *phyloseq* in the software R was used to produce graphical outputs and to realize statistical analyses and alpha-diversity calculation (McMurdie & Holmes, 2013). Several studies were realized to propose the best practice to analyse high-throughput sequencing data, by avoiding to use inappropriate analysis methods (McMurdie & Holmes, 2014, Weiss *et al.*, 2015, Gloor *et al.*, 2017). In order to normalize the data as it is recommended in these studies the data were transformed using a Centered-Log Ratio (CLR) transformation (Aitchison, 1986) prior to beta-diversity analyses, using the package *microbiome* in the software R (Lahti *et al.*, 2017). Differential abundance of the ASVs was determined using the package *DESeq2* (Love *et al.*, 2014). The scripts used were mainly inspired from the workflow provided by Callahan *et al.* (Callahan *et al.*, 2016).

1) Choice of the sequencing primers

1) *In silico* analysis of theoretical primers coverage

11 pairs of primers from different bibliographic (**Tableau 5**) sources were compared to choose the most suited pairs for our study. The first discriminant criterion was the size of the amplicons: at least 400 nucleotides allows a reasonable identification of phylotypes. Thus, three pairs of primers were removed because the length of the amplicons was too short: 515Fmod-806Rmod (291 nt) (Apprill *et al.*, 2015, Parada *et al.*, 2016), 519F-915R (396 nt) (Ding *et al.*, 2017) and ArchA519F-915R (396 nt) (Stahl, 1991, Ovreås *et al.*, 1997). The maximum length of the amplicons is limited by the Illumina MiSeq sequencing technology. It allows the

amplification of two fragments of 300 nucleotides each (forward and reverse orientations). Those two sequences are then merged during the bioinformatic process, and it requires a minimal overlap. Hence the amplicons should not be longer than 500-550 nucleotides to allow a sufficient overlap. The A344F-915R couple was removed because the amplicon length was 571 nucleotides long (Stahl, 1991).

Then, the tool TestPrime provided by the Silva Database was used to estimate *in silico* the theoretical coverage of each pair of primers (Klindworth *et al.*, 2013). Based on previous diversity studies of hydrothermal microbial communities, and molecular data obtained from four samples of the chimney Aisics (ME2 Ais, M13 Ais M15 Ais, M16 Ais 2) during my Master 2 internship (François, 2017) we could have an idea of some of the taxa that might be present in these samples. Thus, only the pairs of primers that theoretically allow to detect these taxa were chosen for the diversity study.

For example, the numerous molecular inventories realized from hydrothermal samples have shown that archaeal communities were mainly composed of *Thermococcales*, *Archaeoglobales* and *Desulfurococcales*. The preliminary results obtained from the Aisics chimney samples have confirmed the presence of these taxa in this chimney. The *in silico* simulation of TestPrime have indicated that the pairs of primers 515Fmod-926R (Parada *et al.*, 2016) and 515Fmod-1000R (Takahashi *et al.*, 2014, Parada *et al.*, 2016) (targeting archaeal 16S rRNA genes) may not detect the *Archaeoglobales* and *Thermococcales* based on the sequences available in the database (0 to 4.8% of *Archaeoglobales* 16S rRNA genes were covered, and 0% of *Thermococcales* genes). Thus, these two pairs of primers are not adapted to study the microbial communities of hydrothermal ecosystems because they do not cover the 16S rRNA genes of the most abundant microorganisms. Finally, only five pairs of primers were selected to realize sequencing tests.

2) Comparison of the sequencing results

Among the five selected pairs of primers, two were designed to cover archaeal genes, one to cover bacterial genes, and two universal pairs of primers should theoretically cover both domains. Those five pairs of primers were used to sequence the 16S rRNA genes from DNA extracted from three of the samples that have already been studied by cloning and Sanger sequencing (ME2 Ais, M15 Ais and M16 Ais2).

Universal primers

The universal pairs of primers Pro341F-805R (Herlemann *et al.*, 2011, Takahashi *et al.*, 2014) and 515Fmod-806Rmod (Aprill *et al.*, 2015, Parada *et al.*, 2016) were described as being able to target bacterial and archaeal 16S rRNA genes. However, for both pairs of primers the sequences affiliated to *Archaea* represented less than 2% of the sequences. Therefore, those two pairs of primers were not chosen because the ratio between archaeal and bacterial sequences was unbalanced. The number of archaeal sequences was too low to realize a relevant diversity study by high throughput sequencing. So we did the choice to use different pairs of primers to study bacterial and archaeal communities.

Bacterial primers

Only one pair of primers (whoi341F-785R) was validated *in silico* and was tested on the chimney samples so it was only compared to the results previously obtained by cloning and Sanger sequencing (Herlemann *et al.*, 2011).

Table 9 : Relative abundance of the bacterial taxa detected by cloning and Sanger sequencing (primers E8F-907R) and high-throughput sequencing (primers whoi341F-whoi785R). The sum of columns is lower than 100 when sequences were affiliated to *Archaea*. The values are highlighted in pink or green if the relative abundance of a taxon was respectively under- or overestimated (difference > 5 %).

Bacterial taxa	M1E2 Ais		M15 Ais		M16 Ais2	
	Cloning	whoiF/R	Cloning	whoiF/R	Cloning	whoiF/R
<i>Acidobacteria</i>	0,00	0,00	1,10	0,02	0,00	0,02
<i>Aquificae</i>	12,64	2,90	11,10	1,27	21,05	4,15
<i>Bacteroidetes</i>	2,30	6,53	1,10	2,81	3,16	6,53
<i>Chloroflexi</i>	0,00	1,39	5,60	1,43	6,32	1,11
<i>Deinococcus-Thermus</i>	3,45	6,13	11,10	8,38	4,21	7,05
<i>Ignavibacteriae</i>	1,15	0,13	0,00	0,71	4,21	1,23
<i>Microgenomates</i>	0,00	0,00	3,30	0,21	0,00	0,05
<i>Nitrospirae</i>	0,00	0,36	0,00	0,00	1,05	0,16
<i>Parcubacteria</i>	0,00	1,49	27,80	38,91	0,00	2,47
<i>Planctomycetes</i>	0,00	0,19	1,10	0,07	0,00	0,00
<i>Alphaproteobacteria</i>	5,75	9,25	5,56	6,71	15,79	16,10
<i>Deltaproteobacteria</i>	3,45	3,14	4,44	3,85	6,32	1,59
<i>Epsilonbacteraeota</i>	10,34	19,52	12,22	19,47	18,95	48,78
<i>Gammaproteobacteria</i>	59,77	46,37	11,11	13,87	13,68	5,95
<i>Proteobacteria</i>	1,15	0,23	1,10	0,02	2,11	0,13
<i>Thermodesulfobacteria</i>	0,00	0,32	0,00	0,37	1,10	0,16
<i>Thermotogae</i>	0,00	0,13	0,00	0,03	1,10	0,06

Globally the results obtained using the two pairs of primers and different sequencing techniques were similar and a difference of relative abundance higher than 5% was only observed for three taxa (**Table 9**). The relative abundance of *Aquificales* and *Gammaproteobacteria* was lower with the primers whoi341F-785R, and higher for *Parcubacteria* and *Epsilonbacteraeota*. By taking into account that we compare the results obtained by different sequencing methods and different pairs of primers, these differences are rather small. Moreover, the results obtained by cloning and Sanger sequencing were used as a reference but do not necessarily represent an accurate description of the bacterial communities. The pair of primers whoi341F-806 was validated for the study because it covered all the taxa considered.

Archaeal primers

Two pairs of primers (A344F-806R and Arch2A519F-Arch1017R) were tested using the same samples as for *Bacteria*, and compared with each other and with the cloning and Sanger sequencing results (Stahl, 1991, Ovreås *et al.*, 1997, Takai & Horikoshi, 2000, Kolganova *et al.*, 2002).

In the case of the archaeal communities, more differences were observed than for the bacterial communities (Table 10). Globally, the relative abundance of *Woesearchaeota* was overestimated whereas the relative abundance of *Desulfurococcales*, *Thermoproteales*, DHVE-2 and *Thermococcales* was underestimated. This is especially true for the primers Arch2A519F-Arch1017R which mainly detected *Woesearchaeota* (representing up to 55 % of the sequences in the sample M16 Ais 2). This group is not represented by cultivated strains and the only data available were obtained by molecular studies such as metagenomics (Xiao *et al.*, 2020). Thus, the sequences affiliated to cultured lineages represented by numerous strains like *Thermococcales* and *Desulfurococcales* were more informative compared to the sequences affiliated to *Woesearchaeota* for which information is available. Therefore, we decided to choose primers A344F-806R that present a better coverage of cultivated lineages without ignoring uncultivated lineages.

Table 10 : Relative abundance of the archaeal taxa detected by cloning and Sanger sequencing (primers A344F-915R) and high-throughput sequencing (primers A344F-806R and Arch2A519F-Arch1017R). The sum of columns is lower than 100 when sequences were affiliated to Bacteria. The values are highlighted in pink or green if the relative abundance of a taxon was respectively under- or overestimated (difference > 5 %).

Archaeal taxa	M1E2 Ais			M15 Ais			M16 Ais2		
	Cloning	A344F-806R	Arch2A519F-Arch1017R	Cloning	A344F-806R	Arch2A519F-Arch1017R	Cloning	A344F-806R	Arch2A519F-Arch1017R
<i>Aenigmarchaeota</i>	0,0	5,8	1,47	0	6,71	5,66	0,0	0,8	5,56
THSCG	3,4	1,7	1,06	3,9	5,82	8,30	0,0	0,0	0,00
DHVE-3	1,1	0,0	0,00	0	0	0,00	13,5	0,0	0,00
<i>Desulfurococcales</i>	19,3	7,6	1,23	14,5	11,38	0,71	6,7	2,8	0,23
<i>Thermoproteales</i>	6,8	0,1	0,89	7,9	4,13	6,23	7,9	0,0	0,01
DHVE-2	1,1	1,2	1,51	22,4	5,92	14,40	30,3	4,1	19,97
<i>Archaeogobales</i>	27,3	24,4	17,48	1,3	4,09	3,39	1,1	25,9	2,82
<i>Thermococcales</i>	13,6	9,4	4,08	43,4	32,1	6,06	37,1	30,0	0,39
MBG-E	22,7	9,5	16,20	0	0,02	0,86	0,0	0,0	0,01
MEG	0,0	0,5	1,76	0	0,4	4,34	1,1	11,9	2,22
<i>Woesearchaeota</i>	1,1	31,4	46,97	0	23,17	29,00	0,0	23,3	55,93
<i>Korarchaeota</i>	0,0	0,0	0,00	5,3	1,08	17,92	0,0	0,0	0,03

2) Validation of the implemented methods, identification of biases and the solutions provided

Many biases can be generated at each step during a metabarcoding study as it is described in the introduction of the present chapter. Hence before analysing the results we checked the data to ensure that we did not create such bias, and to validate our methodological approach.

DNA extraction bias

Because the DNA extractions were not performed on the same quantity of chimney samples (8 or 4x10 grams), the DNA obtained from those different extraction protocols were compared on two samples. DNA was extracted using both protocol from the sample M18 Cap2 (8 and 3x10 grams) and from the sample M18 Y3 2 (8 grams in triplicate and 4x10 grams). Replicates were also performed from different samples using the same extraction conditions (8

grams) to determine if variability in the results was observed. The analysis of the sequencing results showed that the number of chimney samples used for DNA extraction did not affect the microbial community composition or alpha-diversity assessment. Slight variations were observed but were of the same order of magnitude as for the variability between strict technical replicates realized on the same number of chimney samples. Only the two DNA extraction replicates from the sample M17 Ais 2 have produced contrasting results, and the microbial communities were significantly dissimilar. We can reasonably think that the observed differences could be due to an incomplete crushing of a heterogeneous sample which resulted in the extraction of two probably different subsamples.

Bacterial contamination

Because the microbial biomass can be very low in the hydrothermal chimney samples, there was a constant risk of contamination. The analysis of microbial communities detected in the extraction and sequencing blanks has shown the presence of possible bacterial contamination. The contamination may have occurred from numerous sources: at the sampling step, during crushing of chimney samples, during DNA extractions and finally during the preparation of libraries and sequencing reaction. It may also be caused by the presence of contaminants in the PowerMax Soil DNA isolation kit as it was shown by Glassing *et al.* (Glassing *et al.*, 2016). We exclude the possibility of an important cross-contamination between the samples because almost no sequence detected in the blanks was affiliated to hydrothermal taxa. The contaminant ASVs were identified using the package *microDecon* in the software R (McKnight *et al.*, 2019) that uses the proportion of ASVs detected in the blanks. Data were then manually curated by removing human skin-associated *Bacteria* that are common contaminants (Salter *et al.*, 2014). The data obtained with the primers A344F-806R were slightly affected because these primers were not designed for amplifying bacterial genes. On the contrary, the bacterial datasets obtained using the primers whoi341F-806R were more impacted. Several samples were mainly composed of contaminant sequences and those samples had to be removed from the dataset. We assume that the samples that were the most affected by contaminations contained a lower microbial biomass. Indeed, if the DNA amount extracted from the samples was high, the presence of a small quantity of contaminant DNA should have been insignificant. But in low biomass samples, a slightly contamination is likely to have an important impact.

Taxonomic affiliation of the ASVs

The ASVs were affiliated to archaeal and bacterial taxa using the latest version (v138.1) of the Silva database (Quast *et al.*, 2012). The taxonomic affiliations of the most abundant ASVs were checked using BLAST or ARB (Altschul *et al.*, 1990, Ludwig *et al.*, 2004) and were in most case correct, especially for *Bacteria* that could be accurately identified up to the genus level for most taxa. However numerous improper affiliations were identified for archaeal ASVs. These errors were not observed when the affiliation step was performed with a former version (v128) of the Silva database.

This is due to the removal of a sequence (GenBank accession number AB611366⁶) between the two versions of the database. This sequence that was identified as a uncultivated *Nanoarchaeota* is associated to the DPANN superphylum (Rinke *et al.*, 2013). Numerous ASVs had shown similarity from 88 to 98.5% with the sequence AB611366 and with sequences detected from the hydrothermal vent field Lucky Strike (Rommevaux *et al.*, 2019). Also, these ASVs were similar to the sequences of phylotypes enriched during continuous enrichment cultures in bioreactor (Le Guellec, 2015, Roussel *et al.*, 2018). When using the Silva database 138.1, these ASVs were randomly affiliated to other sequences, with a low similarity, within the *Thermoprotei* and with other *Archaea*. To solve this issue, we have added the sequence AB611366 to the latest Silva database, and indicated “DPANN” to the all the taxonomic ranks affiliated to this sequence. So all the ASVs similar to the sequence AB611366 were identified as “DPANN” and not as other taxa.

Independently of this issue, the taxonomic affiliation of archaeal ASVs were not as accurate as for the *Bacteria*, and some *Archaea* could only be identified only up to the family level. This was especially true for the *Thermoprotei* and *Archaeoglobi*.

Importance of the sequencing depth

Weiss *et al.* have shown that the sequencing depth, or libraries size (number of sequences per samples) could have a great influence on the results. For example, samples can be grouped depending on the library size instead of their origin if an ordination by PCoA (Principal Coordinate Analysis) is performed using a qualitative index (Weiss *et al.*, 2015). Thus, we have checked the influence of libraries size on the results of alpha- and beta-diversity.

⁶ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB611366>

In the samples from the *Archaea* dataset that contained less than 10 k sequences, the alpha-diversity indices were greatly higher than in the other samples, suggesting an overestimation for low sequencing depth samples. Instead, in the samples from the *Bacteria* dataset, the alpha-diversity was positively correlated to the library size. Thus, low-counts samples were removed from the *Archaea* dataset as it is recommended, and the alpha-diversity in the *Bacteria* dataset was compared between samples of similar library size.

Repeatability of the sequencing reactions

The *Archaea* and *Bacteria* dataset were both sequenced in three different runs, because the samples were not collected at the same time. In order to identify a possible variability between the runs, replicates (aliquots of the same DNA) were sequenced in the different runs and the results were compared. After a preliminary analysis, the results of the runs seemed to be reproducible, because the alpha-diversity indices and the taxonomic diversity of the replicates seemed to be similar. However, an ordination of the samples according to the distance between microbial communities have shown that the samples were mainly grouped by sequencing run. It suggests that there is variability between the runs at the ASVs level, that can produce bias when an analysis of beta-diversity is realized. To avoid this possibly important bias, the data from different run were only compared in analyses that were not impacted by this bias (alpha-diversity and global comparison of the taxonomic diversity). As a consequence, the Beta diversity analyses could only be carried out correctly on a smaller number of samples (only the ones that were sequenced in the same run).

3) Microbial communities in active hydrothermal chimneys

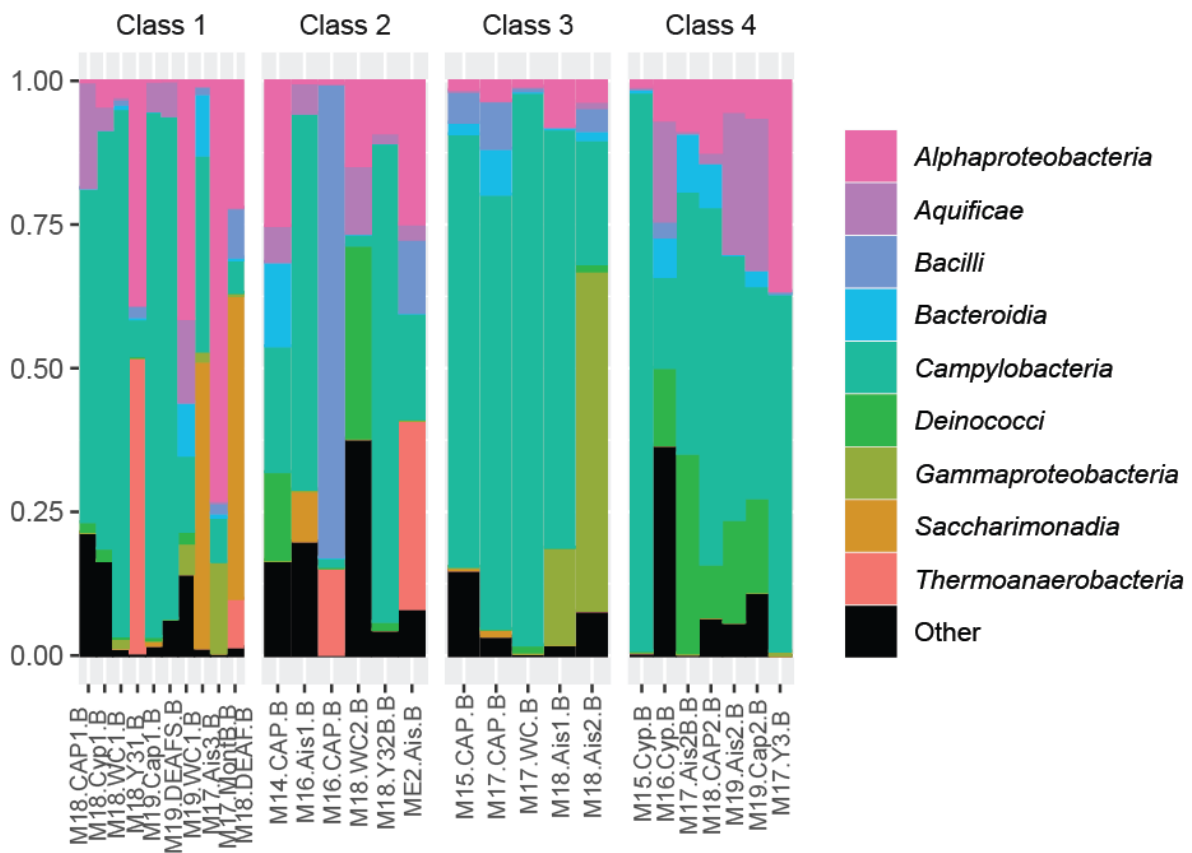
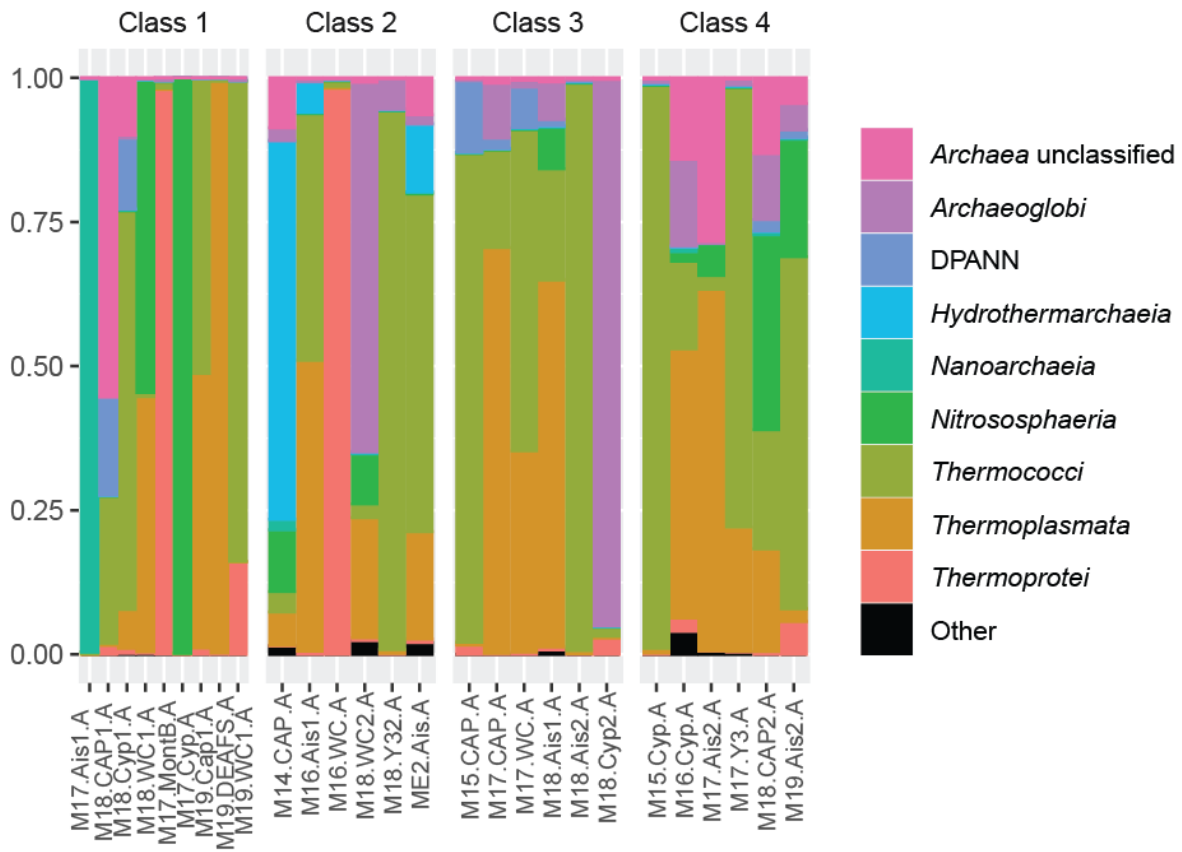
The microbial communities from most chimney samples could be studied by 16S rRNA genes sequencing, but for some samples the DNA could not be amplified or the sequencing reactions produced a small number of reads (**Figure 39**). In a general way, the sequencing reactions were more successful for archaeal communities and sulfide chimney samples (mineralogical classes 2, 3 and 4) than for bacterial communities and sulfate chimney samples (mineralogical class 1).

Sequencing reactions from respectively 27 and 28 chimney samples were positive with primers targeting *Archaea* and *Bacteria*, and 735 and 1060 ASVs were identified. For alpha-

and beta-diversity analyses, samples with more than 20 k and 3.5 k sequences were conserved for *Archaea* and *Bacteria*. The minimal library size for the bacterial communities was lower because of the presence of contaminants in some samples.

Taxonomic diversity

Archaeal communities from hydrothermal chimney samples were globally dominated by *Thermococci* and *Thermoplasmata*, especially in the samples from the mineralogical classes 3 and 4 (**Figure 42**). Almost all the *Thermococci* phylotypes were affiliated to the genus *Thermococcus*, and *Thermoplasmata* to the genus *Aciduliprofundum* except in the sample M19 DEAFS in which *Thermoplasmata* were dominated by members of the Marine Group III (MG-III). The automatic taxonomic affiliation tool of the bioinformatics pipeline has identified most of the *Thermoprotei* as members of the genus *Aeropyrum*, that is represented by two microaerophilic and hyperthermophilic species (Sako *et al.*, 1996, Nakagawa *et al.*, 2004) but a BLAST comparison of the sequences to the NCBI database has shown that the 16S rRNA genes identity was 100% with others genera like *Thermodiscus*. Hence, because of the short length of the sequences produced by the Illumina MiSeq technology, we could not accurately identify the *Thermoprotei* up to the genus level (most of them probably belonging to the order *Desulfurococcales*). The *Archaeoglobi* seemed to be mainly affiliated to *Archaeoglobus* and although some ASV were assigned to other genus (such as *Ferroglobus* or *Geoglobus*) and uncultured genera, their accurate taxonomic identification at the genus level was not possible either. All these archaeal taxa were described as hyperthermophiles, growing at temperatures over 80°C (Burggraf *et al.*, 1990, Reysenbach *et al.*, 2006, Mori *et al.*, 2008, Schut *et al.*, 2014) at the exception of *Aciduliprofundum* which is thermo-acidophilic (optimal growth temperature and pH respectively 70°C and 4.5). The other taxa mainly belong to uncultured lineages such as DPANN, *Hydrothermarchaeia*, *Nanoarchaeia* (mainly *Woesearchaeales*), *Nitrososphaeria* (mainly *Nitrosopumilaceae*), *Bathyarchaeia* and *Korarchaeia* (Baker *et al.*, 2020).



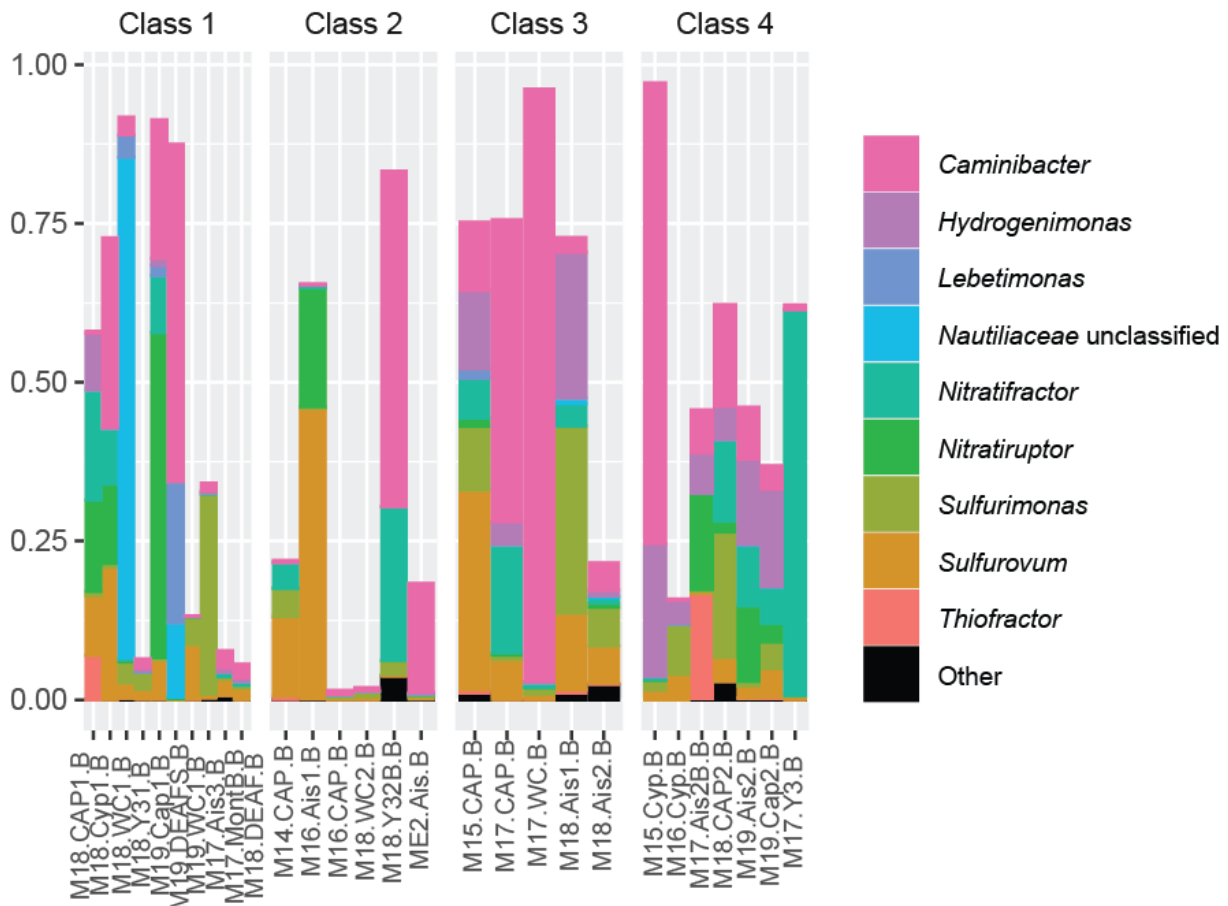


Figure 42: Barplots showing the relative abundance of Archaea, Bacteria and Campylobacteria (respectively top, middle and bottom) in hydrothermal chimney samples, at the taxonomic level of the class (or genus for Campylobacteria). Only the 9 most abundant taxa are presented on each plot. Samples are grouped according to their mineralogical composition.

The bacterial communities from hydrothermal chimneys exhibited a higher taxonomic diversity (**Figure 42**). The *Campylobacteria* (within the *Epsilonbacteraeota*, formerly named *Epsilonproteobacteria*) were the most abundant *Bacteria*, particularly in samples from mineralogical classes 3 and 4. The detail at the taxonomic level of genus is presented in the (**Figure 42**). A large diversity of *Campylobacteria* was present in almost all the samples, including common genera of hydrothermal vents such as *Caminibacter*, *Sulfurovum*, *Nitratiruptor*, *Nitratifractor*, *Thiofractor*, *Sulfurimonas*, *Hydrogenimonas*, *Lebetimonas* and uncultured phylotypes. These taxa are mainly mesophilic or moderate thermophilic autotrophs (Campbell *et al.*, 2006, Waite *et al.*, 2017). *Alphaproteobacteria* were also represented by diverse genera, like *Acidisphaera* (Hiraishi, 2015), *Thermopetrobacter* (Sislač, 2013), *Thioclava* (Sorokin *et al.*, 2005), *Gemmobacter* (Yoo *et al.*, 2019), *Defluviimonas* (Jiang *et al.*, 2014) and phylotypes close to the genus *Roseobacter* or within the family *Rhodobacteraceae*

(Buchan *et al.*, 2019). For most of these genera, strains were isolated from hydrothermal vents, marine environments, or acidic hot springs. Most phylotypes affiliated to *Aquificae* belonged to taxa commonly detected in hydrothermal vent, such as *Persephonella* and secondary *Hydrogenothermus* and *Hydrogenivirga* (Gupta, 2014). *Bacteroidetes* such as *Lutibacter* (Bauer *et al.*, 2016) were present, and also genera for which no strains were isolated from hydrothermal ecosystems (*Lutimonas*, *Fluviicola* and *Paludibacter*). *Deinococci* were represented by *Oceanithermus*, *Vulcanithermus* and *Rhabdothermus* from which all species are thermophilic and have been isolated from hydrothermal vents. The phylotypes affiliated to the *Saccharimonadia* could not be accurately identified because they belong to uncultured lineages. The most abundant *Thermoanaerobacteria* belonged to the thermophilic genus *Thermoanaerobacterium*, that contains strains isolated from various environments including hydrothermal vents (Hung *et al.*, 2011). Most *Bacilli* were affiliated to the thermophilic genus *Thermicanus* (Göbner *et al.*, 1999). The least abundant bacterial taxa were affiliated to described taxa (*Anaerolineae*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*) and uncultured lineages (*Gracilibacteria*, *Parcubacteria*).

Because almost all the taxa that are detected in hydrothermal chimney samples include strains isolated from hydrothermal ecosystems, we can assume that the filtration of contaminant taxa was successful.

Alpha- and beta-diversity

The comparison of the microbial communities in these samples at the taxonomic levels up to the class or genus did not show a clear link between the occurrence of some taxa with the mineralogical composition of the samples or with the hydrothermal site. It was therefore necessary to analyse the microbial communities on a more accurate scale to study the links between the microbial community structure and their environment. Alpha- and beta-diversity of both archaeal and bacterial communities were then performed. As stated above, samples for which a low number of sequences was obtained and samples sequenced in different sequencing runs were removed for this analysis. Alpha-diversity analyses were performed by calculating the Shannon (Shannon, 1997) and Inverse Simpson indices (Simpson, 1949). These results, such as the number of archaeal and bacterial ASVs from hydrothermal chimney samples are presented in the **Figure 43**. To avoid a possible bias due to the differences in library size, analysis of the data was compared with or without normalization by random subsampling at the

number of sequences of the lowest library size. Minor changes were observed between the two conditions.

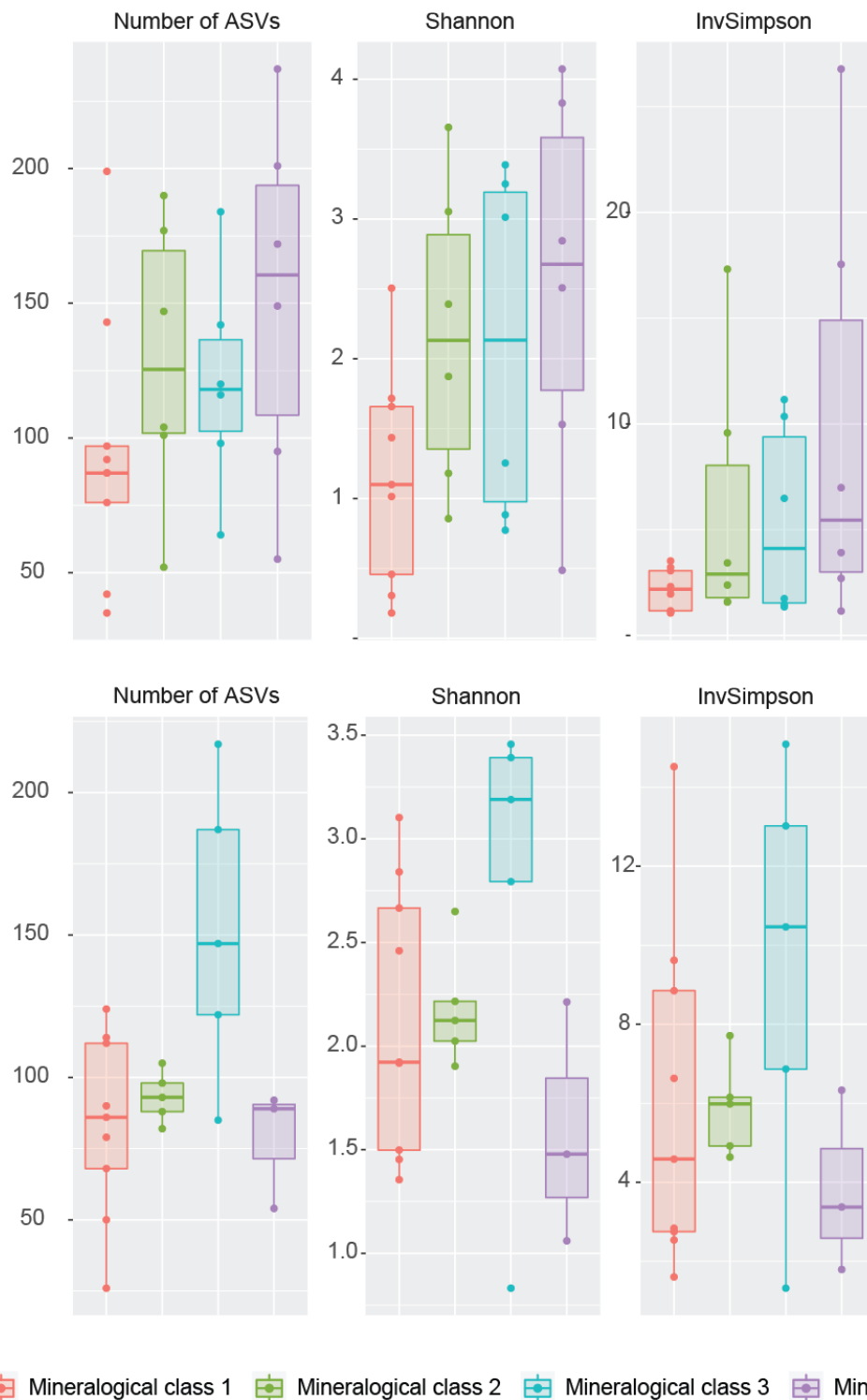


Figure 43 : Boxplots presenting the numbers of ASVs (Observed) and alpha-diversity indices (Shannon and InvSimpson) in hydrothermal chimney samples (Archaea at the top, Bacteria at the bottom). Samples are grouped according to their mineralogical composition.

The alpha-diversity of archaeal communities was lower in the mineralogical class 1 (sulfate chimneys) samples from compared to the classes 2, 3 and 4 (sulfide chimneys) samples. When the samples from sulfide chimneys were grouped together, this difference with samples from sulfate chimneys was statistically significant, p-values were respectively 0.03 or 0.02 for the Shannon (Anova) and InvSimpson (Kruskal-Wallis test) indices. This trend is common to all the archaeal classes described previously, with the exception of *Thermoplasmata* which exhibited a higher diversity in samples of mineralogical classes 2 and 3 compared to classes 1 and 4.

For bacterial communities, the alpha-diversity indices were similar between the four mineralogical classes. However, we can assume that a difference can exist but the number of samples may not be sufficient to highlight it. If slight tendencies exist it may be masked by the high variability of alpha-diversity within each mineralogical class, which was particularly noticeable for archaeal communities in samples of the mineralogical class 4. Moreover, the library size of *Bacteria* dataset was not always sufficient to cover all the diversity (rarefaction curves are presented in *Appendix 2*), so the calculation of alpha-diversity indices may be biased. For both communities (*Archaea* and *Bacteria*), no correlation was observed between alpha-diversity and the hydrothermal sampling sites or fluid endmembers.

The distance between the microbial communities of hydrothermal chimney samples was represented on PCA plots to visualise if the archaeal and bacterial communities were different between the mineralogical classes (**Figure 44**). According to these results, the microbial communities of the sulfate or sulfide chimney samples broadly shared the same ASVs. Also there is no difference either when separating the four mineralogical classes (not shown). However, the dispersion on the plots shows that the variability of archaeal and bacterial communities was possibly higher in sulfide chimney samples. This was statistically significant for the *Bacteria* (p-value 0.045 for a permutation-based test of multivariate homogeneity of variances) but not for the *Archaea* (p-value 0.12).

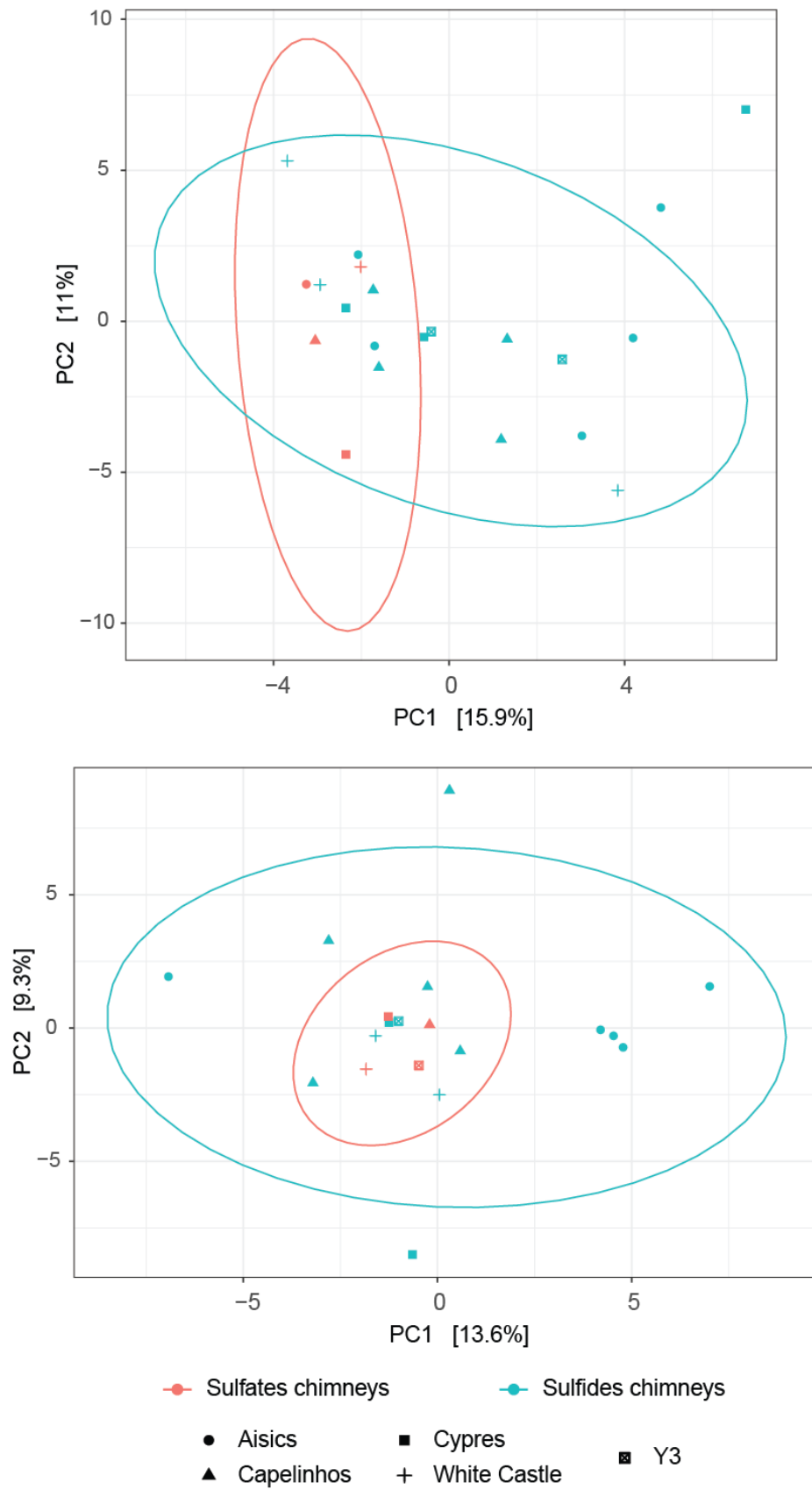


Figure 44 : Principal Components Analysis (PCA) plots of archaeal (top) and bacterial (bottom) communities using Euclidean distance with CLR-transformed data. The shape of the points represents the hydrothermal sites where the samples were collected.

The shapes of the points on the plots represent the hydrothermal sites where the samples were collected. We did not observe a link between the archaeal communities of chimney samples and the hydrothermal sampling site. However, for *Bacteria*, most samples were grouped according to the site where they were collected, especially for samples from Aisics (4 out of 5 samples are grouped together on the plot), White Castle, Cypres and Y3. It suggests a possible influence of the site on the bacterial communities in chimneys, but this tendency was not statistically significant. However, as it was suggested previously the number of samples was probably too low to confirm this observation.

A differential abundance analysis was performed to identify ASVs whose abundance varies between the sulfate and sulfide chimneys (p-value < 0.01). 4 ASVs (affiliated to *Thermococcus*, *Sulfurimonas*, *Nitratifractor* and *Persephonella*) were more abundant in sulfide chimneys. 9 ASVs (affiliated to uncultured *Archaea*, DPANN, *Nitrososphaeria*, *Woesearchaeia*, *Anaerolineae*, *Thermoanaerobacterium*, *Gracilibacteria*, and *Persephonella*) were more abundant in sulfate chimneys.

Taxonomic diversity in the samples studied for cultural and activity measurements approaches

Four chimney samples (M19 Ais 1, M19 Ais 2, M19 DEAFS and M19 Cap 2) were prepared as slurries in artificial seawater and used to inoculate MPN enrichments and to measure the autotrophic and heterotrophic activity of microbial communities (*Chapter V*). The microbial diversity in these samples was also studied by high-throughput sequencing of 16S rRNA genes and the results are presented below.

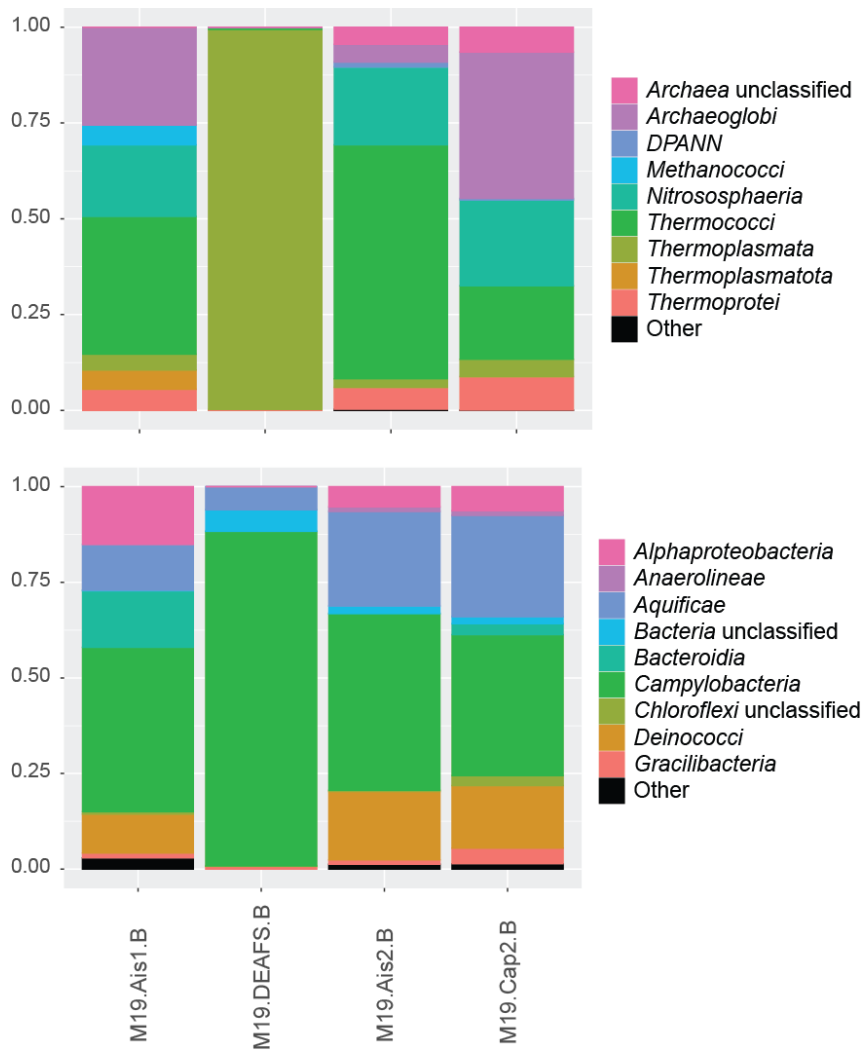


Figure 45 : Barplots showing the relative abundance of Archaea and Bacteria (respectively top and bottom) at the taxonomic level of the class in hydrothermal chimney samples used for MPN enrichments and activity measurements. Only the 9 most abundant taxa are presented on each plot.

The chimney samples M19 Ais 1, M19 Ais 2 and M19 Cap 2 were composed of similar archaeal and bacterial communities (**Figure 45**). The most abundant taxa were similar to the ones that have already been described in the section *Taxonomic diversity* except the presence of ASVs affiliated to *Methanopyrus* in the sample M19 Ais 1. The archaeal sequences from sample M19 DEAFS were almost all affiliated to the lineage Marine Group-III in class *Thermoplasmatata*, that are marine *Archaea* living in pelagic or benthic zones (Haro-Moreno *et al.*, 2017). The *Campylobacteria* (mainly *Caminibacter* and *Lebetimonas*) were the dominant *Bacteria* in this sample. The high abundance of sequences affiliated to the MG-III group in sample M19 DEAFS may suggest a contamination of the sample by seawater, but the low quantity of sequences affiliated to other frequently observed marine archaea as *Nitrososphaeria*

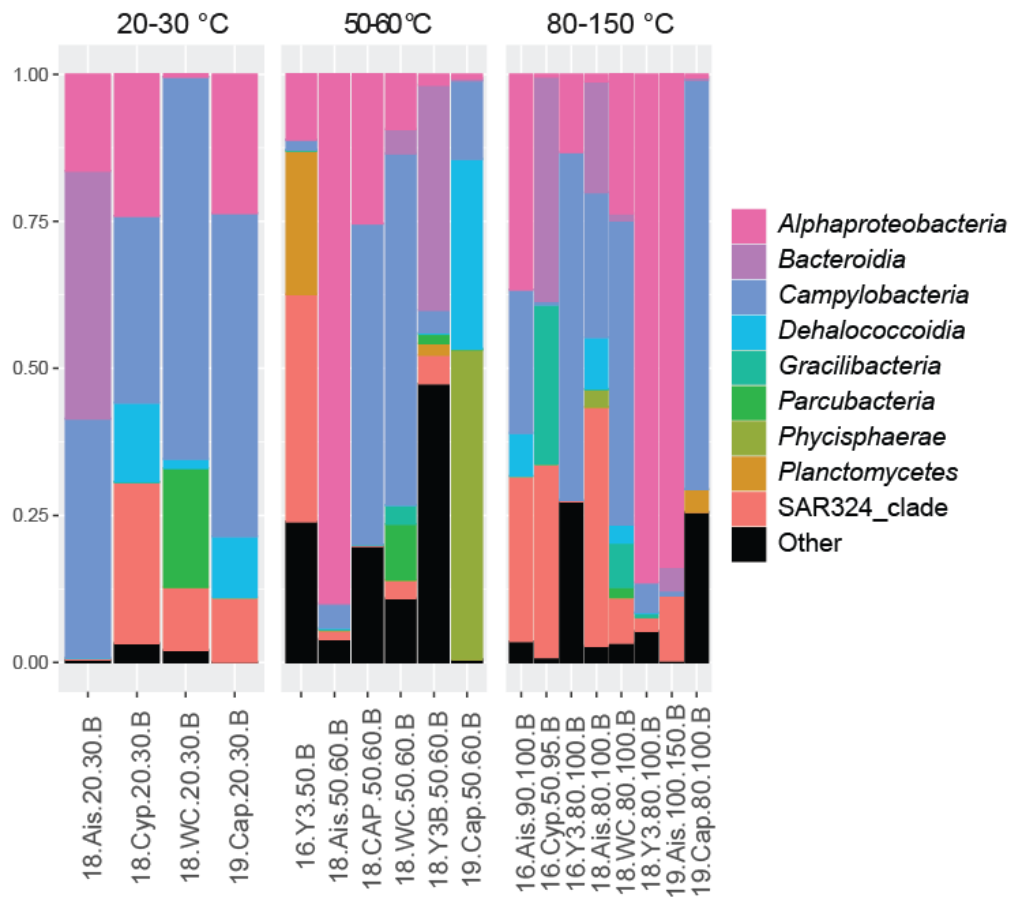
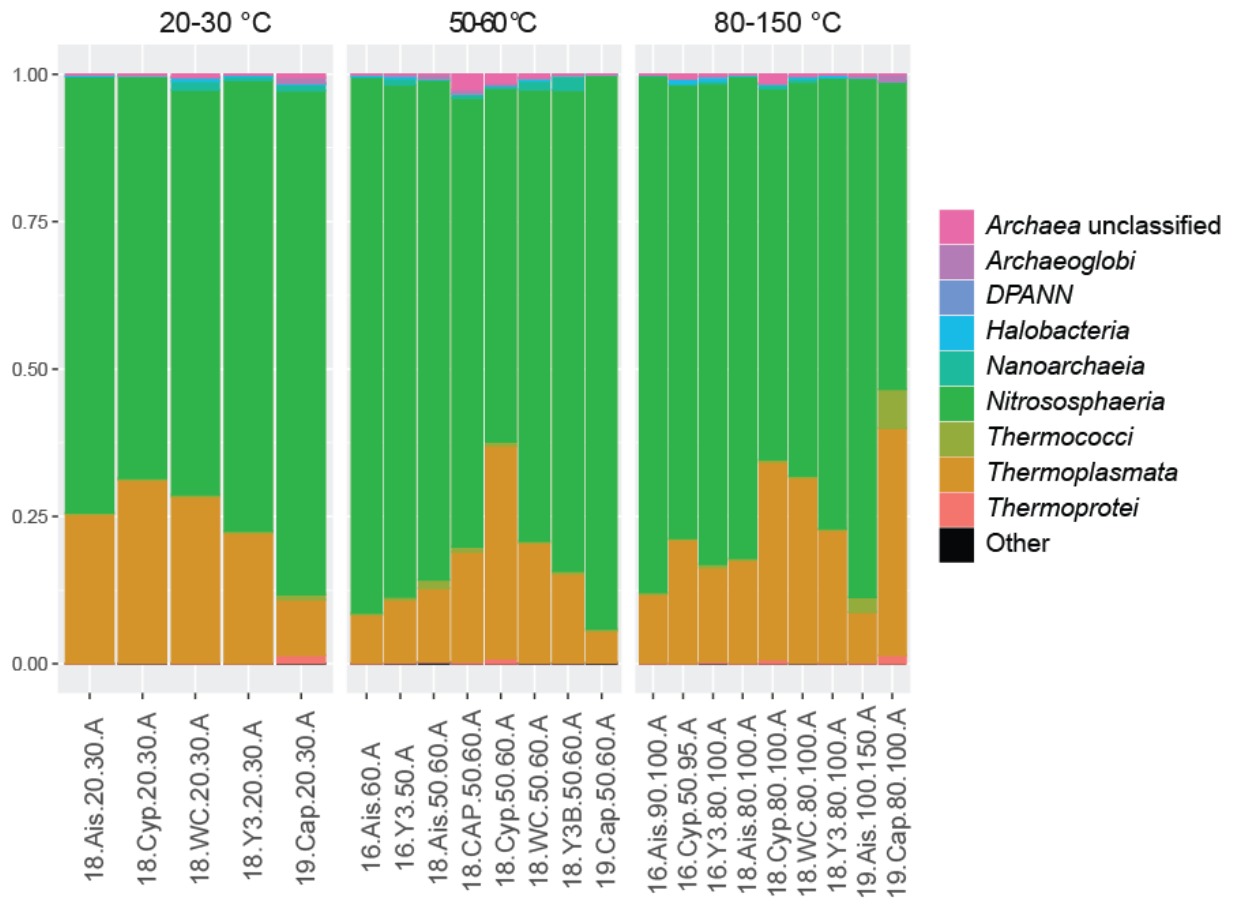
or *Bacteria* is surprising. Because it is the sole sample that was dominated by a unique marine taxon, we can assume that it was caused by a contamination of the chimney sample by the surrounding seawater. Moreover, the diversity data were obtained from subsamples that were conserved at -80°C, not from the subsamples used to prepare the slurries. So, despite a careful crushing and homogenization it may have provided diversity information that can be slightly different from those of the subsamples used in cultural approaches and these results should be compared to the results of cultural approach with caution.

4) Microbial communities in the proximal hydrothermal plume

Sequencing reactions from respectively 22 and 18 plume samples were positive using primers targeting *Archaea* and *Bacteria*, and 1068 and 821 ASVs were identified. For alpha- and beta-diversity analyses, samples with more than 15 k and 7 k sequences were conserved for *Archaea* and *Bacteria*, respectively.

Taxonomic diversity

All the hydrothermal plume samples exhibited very similar archaeal communities, mainly composed of two classes (**Figure 46**). The dominant class was *Nitrososphaeria*, and contained mainly uncultured lineages and a lower proportion of sequences (<10 % of the *Nitrososphaeria*) were affiliated to *Nitrosopumilus* and *Nitrosopelagicus*. These *Archaea*, formerly named Marine Group-I (MG-I) and later renamed as *Thaumarchaeota* (Brochier-Armanet *et al.*, 2008) were described as mesophilic autotrophic ammonia-oxidizers (Qin *et al.*, 2015, Qin *et al.*, 2017) and are commonly detected in the seawater around hydrothermal vents (Takai *et al.*, 2004). It was also the sole archaeal lineage detected in a microbial survey of microbial mats at the Tour Eiffel site of the field Lucky Strike (Crepeau *et al.*, 2011). The second dominant taxa belong to the *Thermoplasmata*, and the ASVs are affiliated to uncultured marine *Archaea* MG-II and MG-III (DeLong, 1992, Fuhrman & Davis, 1997). Hence, almost all the *Archaea* present in the proximal hydrothermal plume were affiliated to marine lineages, and only a few percent of the sequences were affiliated to the hydrothermal taxa detected in the chimneys.



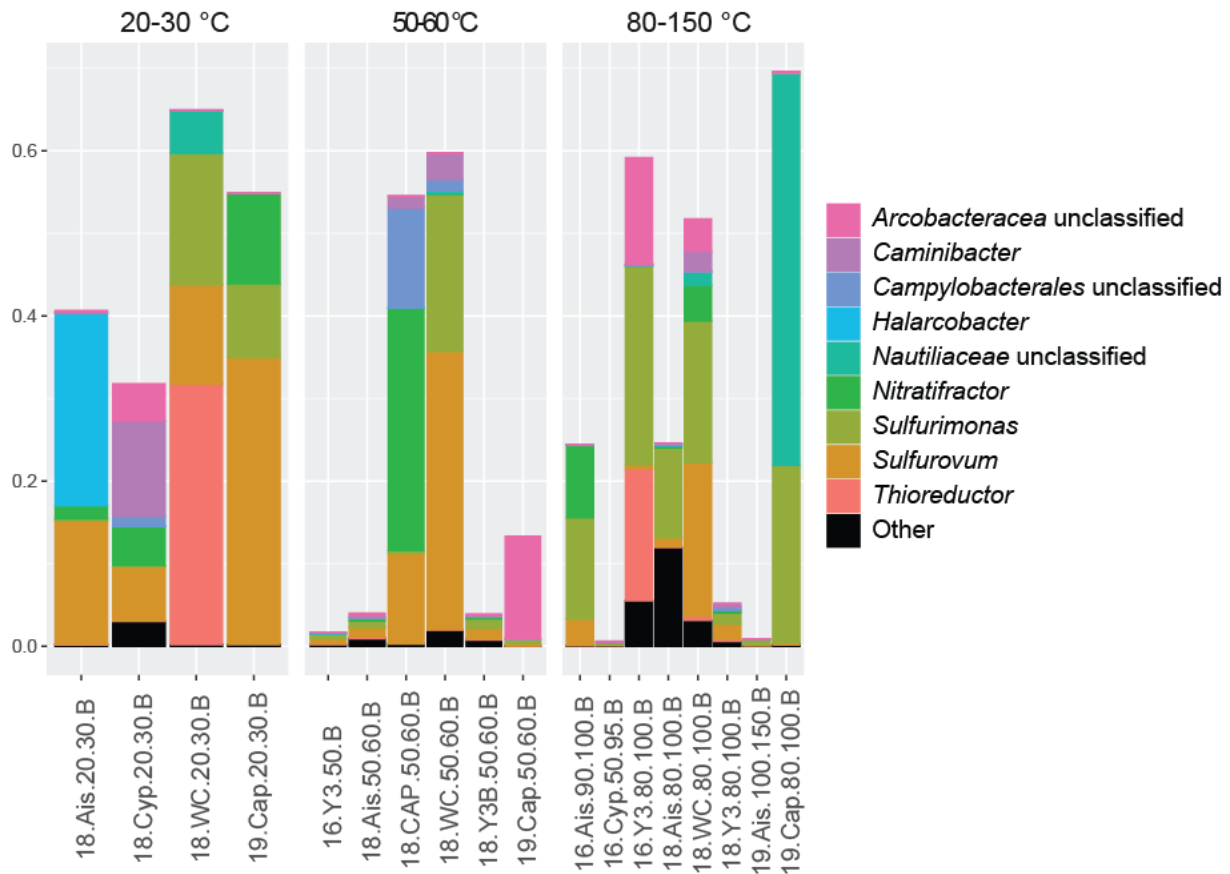


Figure 46: Barplots showing the relative abundance of Archaea, Bacteria and Campylobacteria (respectively top, middle and bottom) in hydrothermal plume samples, at the taxonomic level of the class (or genus for the Campylobacteria). Only the 9 most abundant taxa are presented on each plot. Samples are grouped by temperature of the plume.

The bacterial communities of hydrothermal plume samples were more diverse than the *Archaea* and a higher variability between the samples was observed. The *Campylobacteria* were represented by various taxa described previously in the chimneys, that are representative of hydrothermal habitats. Other taxa detected in the chimneys were present in the plume samples, like *Deinococci*, *Bacteroidia*, *Gracilibacteria* and *Parcubacteria*. Diverse marine *Bacteria* were also detected, in taxa *Alphaproteobacteria* (SAR11, *Rhodobacterales* and *Rhodospirillales*), *Dehalococcoidia* (phylum *Chloroflexi*), *Phycisphaera* (phylum *Planctomycetes*) and SAR324 (an uncultured lineage).

Thus, unlike the archaeal communities that were mainly composed of a few marine taxa, bacterial communities of proximal plume samples consist of a large diversity of lineages commonly observed in deep seawater but also in hydrothermal chimneys.

Alpha- and beta-diversity

No correlation was observed between the composition of archaeal and bacterial communities and the temperature of the plume. The variability of alpha-diversity was also not explained by these parameters.

However, a significant correlation was observed between the microbial community structure and the hydrothermal sites where the plume samples were collected. Grouping the sites depending on the endmembers has shown similar results. After a CLR transformation of the data from archaeal communities, a permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) indicated that 25.8 or 23.2% of the variance was explained by the sites or the endmembers (p-values 0.014 or 0.003). For bacterial communities, the endmembers explained 20.2% of the variance (p-value 0.034) but the influence of the hydrothermal sites was not significant (p-value 0.079).

41 ASVs of archaeal communities were differentially abundant across the hydrothermal sites where the samples were collected (p-value < 0.01). All these ASVs were affiliated to the marine lineages of MG-I and MG-II. On the contrary, the hydrothermal taxa that were also detected in the chimneys presented similar abundance between the sites. Differential abundance across the sites concerned 87 bacterial ASVs, comprising marine lineages but also taxa observed in the chimney samples.

5) Comparison of microbial communities of hydrothermal chimneys and proximal plume

The analysis of microbial communities from hydrothermal chimneys and proximal plumes have shown that they were different at the taxonomic level of the class or genus for *Archaea*, but bacterial community were globally composed of the same taxa. The data from these two types of samples were compared to accurately identify the differences between microbial communities.

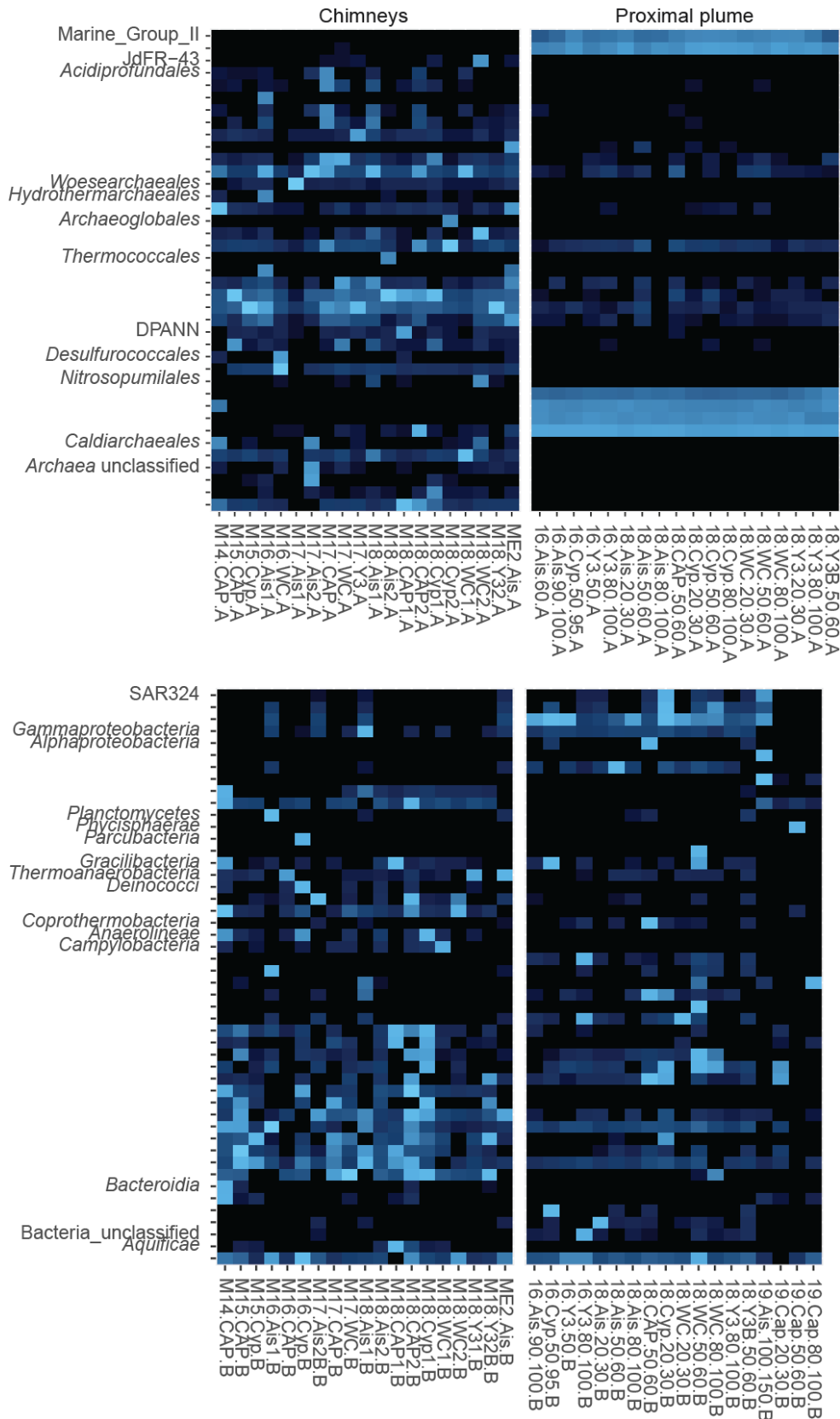


Figure 47 : Heatmap presenting the relative abundance of the 39 and 48 most abundant archaeal (top) and bacterial (bottom) ASVs of hydrothermal chimneys or proximal plume samples. ASVs are presented in rows and samples in columns. When no taxon name is written, the ASVs is affiliated to the taxon above. The light blue squares represent an abundant ASVs whereas the black squares represent the absence of this ASVs in the corresponding sample.

The relative abundance of the 39 and 48 most abundant taxa from archaeal and bacterial communities from hydrothermal chimney samples and proximal plumes can be visualized in the **Figure 47**.

As we could already see on the barplots (**Figure 42** and **Figure 45**), most ASVs affiliated to the marine *Archaea* MG-I and MG-II were detected only in the plume samples. The heatmaps further show that several ASVs affiliated to the other taxa were only present in the chimneys (some *Archaeoglobi*, *Thermoprotei*, unaffiliated *Archaea* and *Nitrososphaeria* affiliated to *Geothermarchaeaceae*) whereas a few ASVs were present in both types of samples but were more abundant in chimneys (affiliated to *Thermoplasmata*, *Hydrothermarchaeia*, *Archaeoglobi* and *Thermococci*). A PERMANOVA indicated that 47% of the variance was explained by the sample type (p-value 0.001), which confirms that archaeal communities across these two habitats were very different.

For the bacterial communities, only 12% of the variance (p-value 0.001) was explained by the hydrothermal site according to the PERMANOVA. It is consistent with the heatmaps which show that unlike the *Archaea*, most bacterial ASVs were shared between the hydrothermal chimneys and proximal plume. However, it did not concern all the ASVs, and differential abundance analysis was performed to identify the ASVs that are specific to one type of sample (p-value < 0.01). 29 ASVs were differentially abundant between the two types of samples. 6 ASVs were more abundant in the plume samples (3 ASVs affiliated to *Sulfurimonas*, SAR202, SAR324 and *Nitratifractor*). The 23 ASVs that were more abundant in the chimney samples were affiliated to *Campylobacteria* (*Sulfurimonas*, *Nitratifractor*, *Sulfurovum*, *Caminibacter*, *Hydrogenimonas*), *Thermicanus*, *Fluviicola*, *Thermoanaerobacterium*, *Oceanithermus* and *Chloroflexi*.

The alpha-diversity indices of microbial communities from hydrothermal chimneys and proximal plume samples are presented on the **Figure 48**. The archaeal communities from hydrothermal plume exhibited a much higher alpha-diversity than the communities from chimneys (p-values were respectively 1.10^{-7} and 1.10^{-4} for the Shannon and InvSimpson indices with Kruskal-Wallis test). In contrast, the diversity of *Bacteria* was similar between the two types of samples.

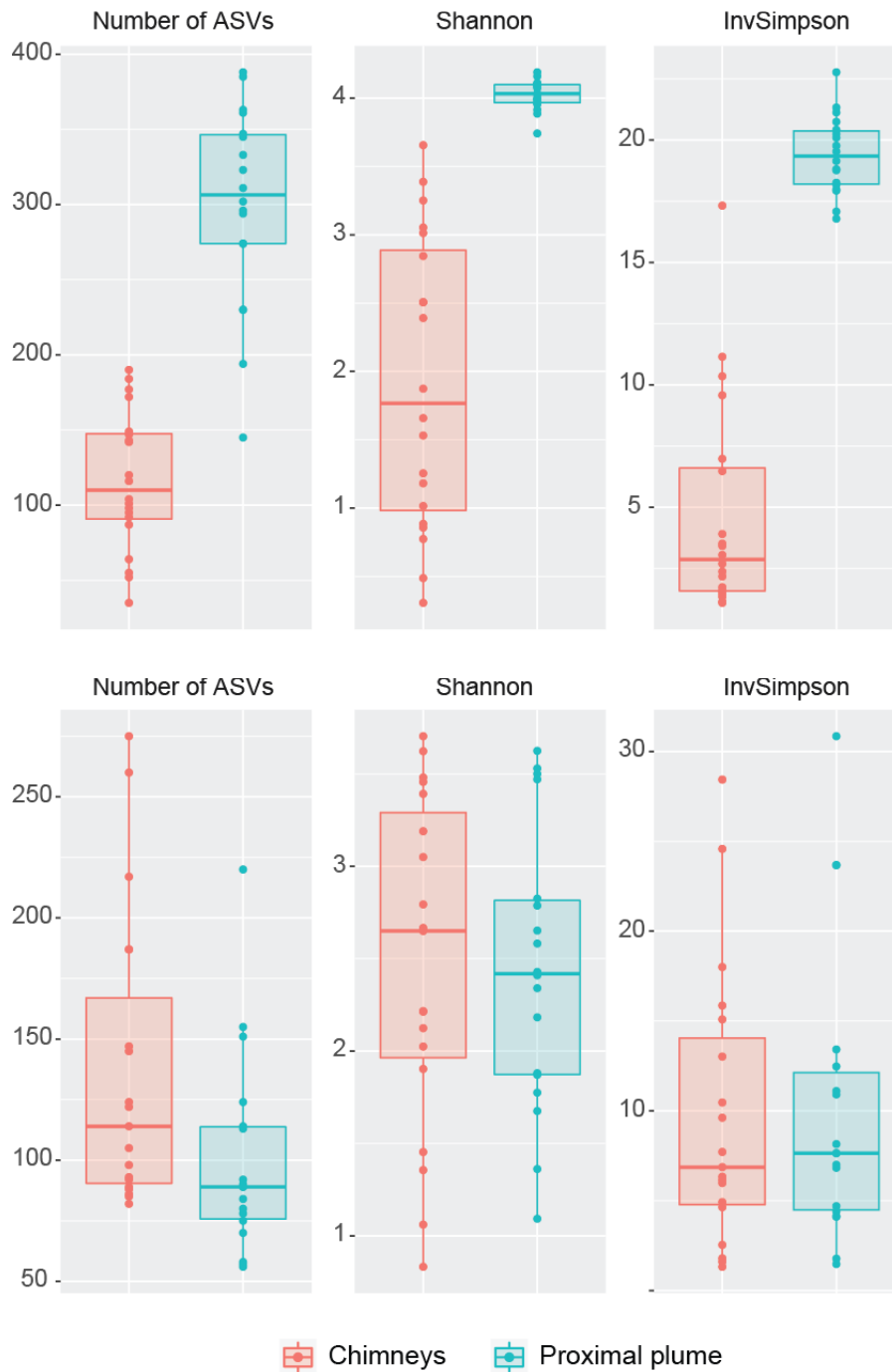


Figure 48 : Boxplots presenting the numbers of ASVs (Observed) and alpha-diversity indices (Shannon and InvSimpson) in hydrothermal chimney samples (Archaea at the top, Bacteria at the bottom). Samples are grouped according the mineralogical composition of the samples.

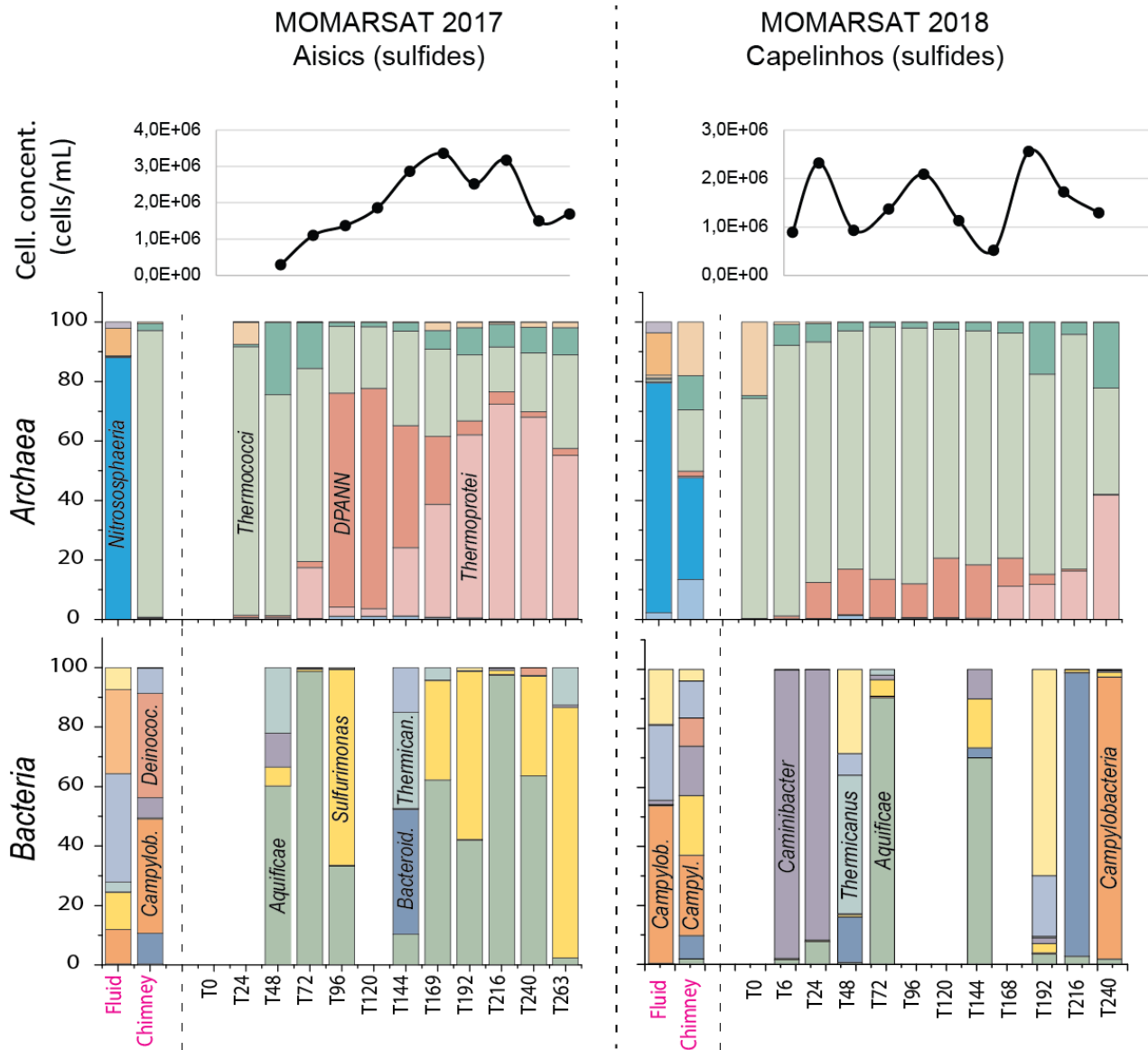
6) Enrichment of microbial communities in bioreactors

Continuous enrichment cultures in a gas-lift bioreactor (Godfroy *et al.*, 2006) were performed on board during the oceanographic cruises MOMARSAT2017, MOMARSAT2018 and MOMARSAT2019 to study the culturable microbial communities in settings that are closest as possible as the *in situ* conditions. These cultures were designated M17_Ferm, M18_Ferm and M19_Ferm, respectively. Hydrothermal chimney samples (120 to 150 mL) were used as an inoculum, and proximal plume samples (temperature > 80°C) of the same site were used as culture medium. The same culture conditions were applied in the three incubations (incubation temperature 80°C, gas flushing with N₂:CO₂:H₂ 75:20:5, pH 6.5, detail in section *Cultures en bioréacteur*) so the only differences were the inoculum and culture media (hydrothermal chimneys and plume samples).

In 2017, 2018 and 2019 the bioreactor was inoculated with the samples M17 Ais 2 (sulfide part of Aisics chimney), M18 Cap 2 (sulfide part of Capelinhos chimney) and M19 Ais 1 (sulfate part of Aisics chimney), respectively. The proximal plume samples were collected at the same time that the chimney samples or a few days later on the same sites. In 2017 and 2018, the incubations were maintained for 11 days, and 18 days in 2019.

Because of the continuous renewal of the culture medium, we could collect daily the liquid part of the culture that was conserved at -80°C for DNA extractions, cell counts and anionic chromatography analyses. The microbial communities grown in each incubation were then identified by 16S rRNA genes high throughput sequencing.

Description of microbial communities enriched in continuous culture



Legends

- | | | | |
|-----------------|-----------------------------------|---------------------|------------------------------|
| Archaea | Thermoplasmatota MG-III | Archaeoglobi | Thermoprotei |
| | Thermoplasmatota MG-II | Thermococci | Nitrososphaeria |
| | Thermoplasmatota/Acidiprofundales | DPANN | Archaea_unclassified |
| Bacteria | Campylobacteria/Sulfurimonas | SAR324 | Bacilli/Thermicanus |
| | Other Campylobacteria | Alphaproteobacteria | Deinococci |
| | Bacteroidia | Other Bacteria | Campylobacteria/Caminibacter |
| | Aquificae | | |
| | | | |

MOMARSAT 2019 Aisics (sulfates)

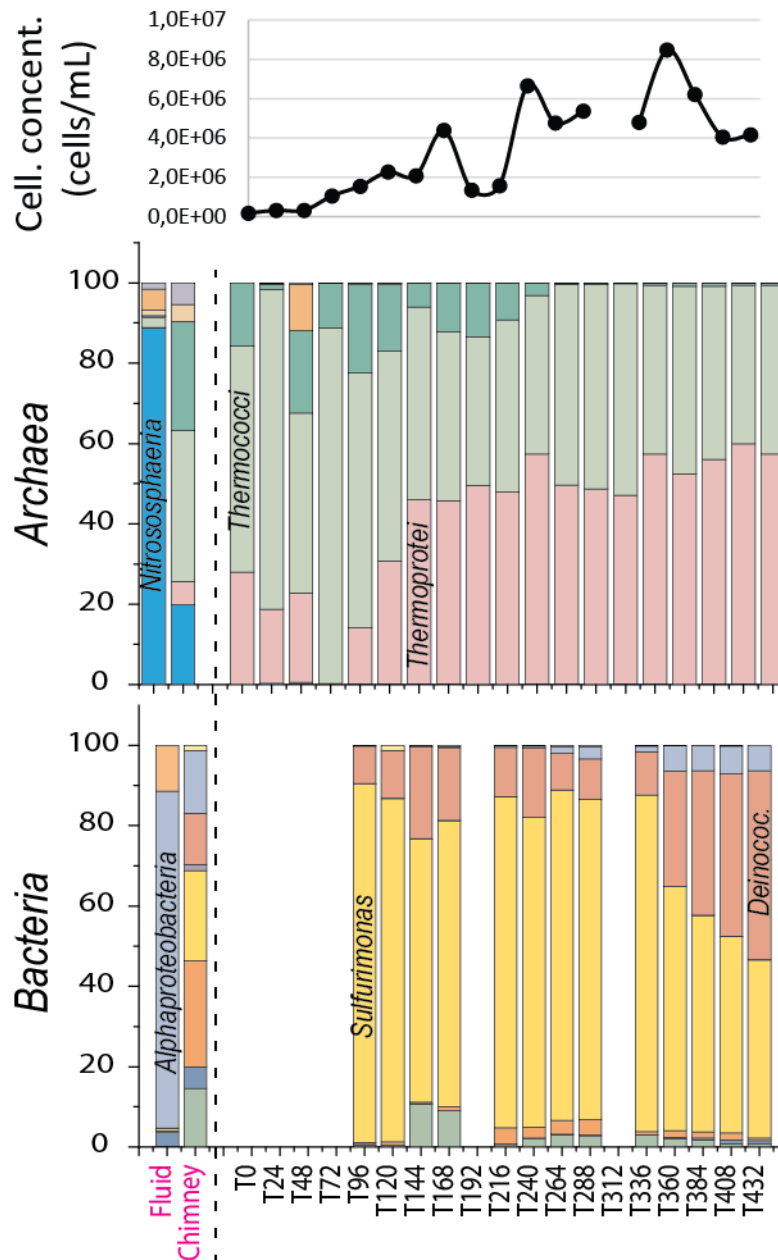


Figure 49 : Barplots presenting the relative abundance of Archaea and Bacteria enriched in the continuous cultures in bioreactor. The values in axis represent the incubation time (hours). The diversity in the chimney samples used as inoculates and proximal plume used as culture medium are also presented. The missing barplots indicate that sequencing reactions failed or produced a low number of sequences. The cell counts at each sampling time are presented above the barplots.

The cell counts of microbial communities enriched in the continuous cultures in bioreactor are presented on the **Figure 49**. It is important to keep in mind that the cell concentrations reported correspond to the total cell counts, that do not discriminate archaeal or

bacterial cells. An overall increase of the cell concentration was observed over time in the cultures of 2017 and 2019, which indicates that the microbial communities could grow in these culture conditions. However, in 2018 the cell concentration varied greatly, that can be explained by technical issues with the feeding and outlet pumps encountered during this incubation. The cell concentration reached 8.10^6 cells/mL in 2019 and was the highest value observed, probably because the incubation time was longer (432 hours vs. 263 hours in 2017). The decrease in microbial concentration at 92 and 240 hours in 2017, and at 192, 264 and 384 hours in 2019 were not explain by a change in the culture conditions so it was possibly due to the dynamics of microbial communities.

The taxonomic diversity is also presented on the **Figure 49**. The data that are presented correspond to relative abundance of the most representative taxa based on the proportion of sequences. Hence, it is not necessarily correlated to the abundance of these taxa in the enrichment cultures because metabarcoding data are not quantitative. An increase of the relative abundance of a group (like *Thermoprotei* after T144 in the culture M17_Ferm) could indicate not only the growth of this taxon but could also indicate the decrease of the growth of another taxa. Thus, these data show above all the presence of absence of archaeal and bacterial taxa at different incubation times rather than quantitative variations.

The archaeal communities enriched in 2017 and 2018 (inoculated with the sulfide parts of chimneys Aisics and Capelinhos, respectively) were rather similar. The dominant taxa were *Thermococci*, *Thermoprotei*, DPANN and *Archaeoglobi*. Almost all the *Thermococci* were affiliated to the genus *Thermococcus* and the DPANN were also dominated by a few ASVs, whereas *Thermoprotei* and *Archaeoglobi* were represented by different lineages. However, they could not be accurately identified for the reasons described in the section *Microbial communities in active hydrothermal chimneys*. *Thermococci* and *Archaeoglobi* were detected at each time of the incubations, whereas the DPANN were detected after 24 to 72 hours, and the *Thermoprotei* especially after 144 and 166 hours.

In the enrichment culture M19_Ferm, the *Thermococcus* were also present during all the time of the incubation. What differs from the two other cultures is the absence of *Archaeoglobi* after 264 hours, and the presence of *Thermoprotei* at each time (except a very low relative abundance at 72 hours). Moreover, the phylotypes affiliated to DPANN were not enriched from this sulfate chimney sample unlike in 2017 and 2019 (when sulfide chimney samples were used as inoculum). The number of reads affiliated to the DPANN lineage was

very low in the chimney samples used as inoculum in 2017 and 2018 (< 400 reads), but the contrasting high proportion of reads at some sampling times of the incubations indicates that they were enriched. On the contrary, this lineage was not detected in the chimney sample M19 Ais 1 used for inoculating the bioreactor in 2019. This explains why this taxon was not enriched in 2019.

It is noticeable that in the three cultures, phylotypes affiliated to the thermo-acidophilic genus *Aciduliprofundum boonei* (Reysenbach *et al.*, 2006) were present in the chimney samples or at the first sampling time. However, they were not detected anymore during the incubations, indicating that the culture conditions did not allow their growth. This is consistent with the fact that *A. boonei* grows at pH between 3.3 and 5.8 whereas the pH was regulated at approximately 6.5 in the bioreactor. The same tendency was observed with the marine *Archaea* of lineages MG-I (*Nitrososphaeria*) and MG-II (*Thermoplasmata*) that were present in the plume samples used as culture medium but were not enriched in the bioreactors probably because the incubation temperature was too high to allow their growth.

With the exception of the absence of ASVs affiliated to DPANN in the sample M19 Ais 1 and so in the culture M19_Ferm, the three continuous cultures resulted in the growth of the same archaeal taxa (mainly *Thermococcus*, *Archaeoglobi* and *Thermoprotei*). These taxa are represented by hyperthermophilic strains, which explains their growth at an incubation temperature of 80°C. *Archaeoglobi* and *Thermoprotei* comprise various species, that perform different metabolisms including autotrophy, heterotrophy or mixotrophy so they could use various carbon sources and electron donors for growth, provided by the hydrothermal fluid or by the gas flushing (hydrogen or carbon dioxide). All the described *Thermococcus* strains perform chemoorganotrophic metabolisms so we can assume that the phylotypes affiliated to this genus have grown using organic matter provided by the proximal plume or produced by autotrophic microorganisms.

Unlike the archaeal enriched communities that were composed of three main classes, a higher taxonomic diversity was observed for the bacterial communities. However, compared to the *Archaea* that could be identified in almost all samples (except at T0 in culture M17_Ferm), the *Bacteria* could not be identified in 12 samples. Either the sequencing reaction failed, or the number of sequences was too low after removing the contaminants to analyse the bacterial diversity.

In the culture M17_Ferm, the *Aquificae* (including mostly *Persephonella* related phylotypes, and a few *Hydrogenivirga*) and *Sulfurimonas* were the most abundant taxa detected.

Only the sample collected at 144 hours presented a contrasting taxonomic diversity, mainly composed of *Bacteroidia*, *Thermicanus* and *Alphaproteobacteria*.

Unlike the enrichment of 2017, in the culture M19_Ferm the *Aquificae* composed only a few percent of the reads, instead *Deinococci* (mainly *Vulcanithermus* and *Oceanithermus*) were detected in all the samples for which sequencing data were available. Most of the reads were affiliated to the genus *Sulfurimonas*. Except the decrease of the number of sequences assigned to *Aquificae* and the presence of *Alphaproteobacteria* after 264 hours, few differences were observed over time.

On the opposite, in the culture M18_Ferm the taxonomic diversity was very different across the samples, even at successive sampling times. The taxonomic diversity was dominated by *Caminibacter* at 6 and 24 hours, being replaced by *Thermicanus* and other taxa at 48 hours and then by *Aquificae*. The group designed as “other *Bacteria*” contained uncultured lineages like *Parcubacteria* and *Gracillibacteria* and sequences affiliated to the genus *Coprothermobacter*. At 216 and 240 hours, the sequences were mostly affiliated to *Bacteroidia* and various *Campylobacteria* respectively. As it was presented earlier, technical issues happened with feeding pump during this enrichment culture. Moreover the sampling of proximal plume could not be realized as expected so we also had to use as culture medium the fluid contained in the chimney recovery box. These issues may explain the high variability of bacterial communities at the different sampling times.

Most bacterial taxa that were enriched belong to taxa that perform autotrophic metabolisms using hydrogen as a potential electron donor, including *Aquificae* (*Persephonella*, *Hydrogenivirga*) and *Campylobacteria* (*Sulfurimonas*, *Lebetimonas*, *Sulfurovum*, *Nitratifactor*, *Nitratiruptor*). Heterotrophs or mixotrophs were also enriched, like *Bacilli* (*Thermicanus*) and *Deinococci* (*Vulcanithermus*, *Oceanithermus*). Most of these microorganisms are facultative anaerobes that can use other inorganic electron acceptors than oxygen, including nitrate, elemental sulfur or sulfate. These substrates were probably provided by the hydrothermal chimneys or plume samples. The range of growth temperature of these *Bacteria* and the comparison to the incubation temperature in the continuous culture is discussed in the following section.

Comparison to microbial communities from chimneys and plume samples

The microbial communities enriched in continuous cultures were compared to the communities from all the hydrothermal chimneys and proximal plume samples. The distance between these communities is represented on PCA plots in the **Figure 50**.

The archaeal communities enriched in bioreactors in 2017 and 2018 were more similar to the communities from hydrothermal chimneys used as inoculum than to the communities from the proximal plume used as culture medium. This is consistent with the taxonomic diversity presented in the **Figure 49**. The marine *Archaea* (MG-I, MG-II and MG-III) were not enriched in the bioreactor, which explains the important difference between the archaeal communities from plumes samples and enrichment cultures. Even if the enriched archaeal communities were closer to the communities of the chimneys, they presented differences as some of the *Archaea* of the chimneys could not be enriched under the chosen culture conditions. It mainly concerned the ASVs affiliated to the genus *Aciduliprofundum*, which were often detected in the chimney samples but did not grow in the bioreactor, probably due to a too high pH.

For the bacterial communities enriched in the continuous cultures in bioreactor, the results were very contrasted compared to the *Archaea* because the bacterial communities from cultures of 2017 and 2018 were more similar to the communities from proximal plume samples than to the chimney samples. Thus, even if the taxonomic diversity between the bacterial communities of the three types of samples (chimneys, plume and enrichments) seemed to be similar at the scale of the class or genus, an analysis performed at the level of ASV allowed a much better resolution.

Unlike the cultures of 2017 and 2018, archaeal and bacterial communities from the incubation M19_Ferm were different from the chimneys and plume microbial communities. On the ordination plots (**Figure 50**), this incubation was also separated from the two other continuous cultures. The main difference was that the chimney used as inoculum in 2019 was a sulfate upper part of the chimney Aisics whereas in 2017 and 2018 it was respectively the sulfide parts of the chimneys Aisics and Capelinhos.

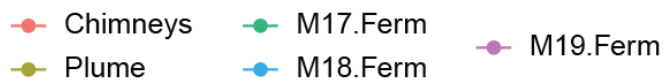
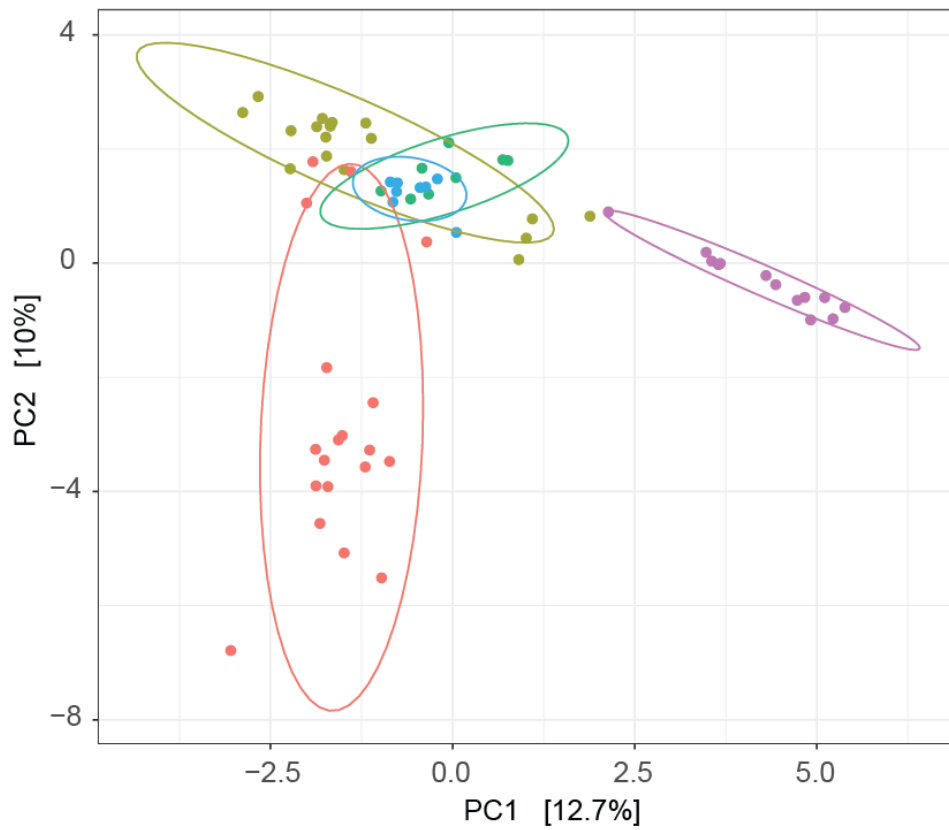
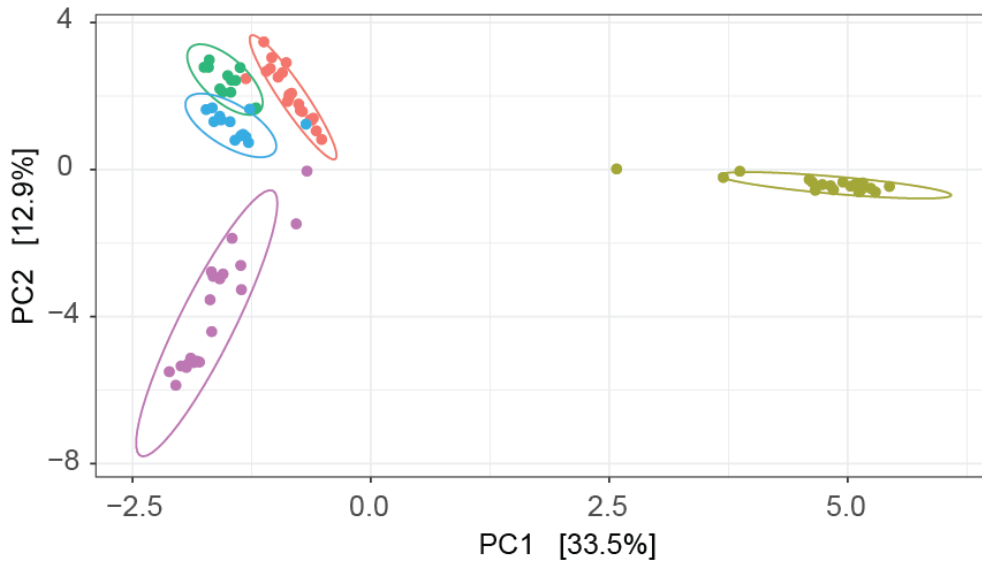


Figure 50 : Principal Components Analysis (PCA) plots of archaeal (top) and bacterial (bottom) communities from enrichments in bioreactor, hydrothermal chimneys or proximal plume using Euclidean distance with CLR-transformed data.

As it was presented in the section *Comparison of microbial communities of hydrothermal chimneys and proximal plume*, 29 bacterial ASVs were differentially abundant between the hydrothermal chimneys and proximal plume samples. The fact of detecting mainly bacterial ASVs from plume in the enrichment culture raises the question of whether these *Bacteria* were enriched in the bioreactor or if we have simply detected the *Bacteria* that were brought by the continuous feeding of the bioreactor by plume sample used as culture medium.

The *Aquificae* and *Vulcanithermus* grow optimally at temperatures above 70°C so it is likely that they grew at 80°C in the continuous cultures. However, the other taxa only contain moderate thermophilic or mesophilic species. The moderate thermophiles (optimal growth temperature around 55-60°C) include *Oceanithermus* (Miroshnichenko *et al.*, 2003, Mori *et al.*, 2004), *Thermicanus* (Göbner *et al.*, 1999), *Lebetimonas* (Nagata *et al.*, 2017) or *Nitratiruptor* (Nakagawa *et al.*, 2005), and the most abundant mesophiles are *Sulfurimonas* that grow at temperature around 25-30°C (Inagaki *et al.*, 2003, Takai *et al.*, 2006). Thus, it is surprising to detect these taxa in an enrichment culture incubated at 80°C, which is much higher than their described growth temperature. For the moderate thermophilic taxa, we can assume that they could grow in the bioreactor at slightly higher temperatures than the values described in the characterization studies (which are performed in batch culture). Nevertheless, for the genus *Sulfurimonas* the difference between their optimal growth temperature and the incubation temperature of the enrichment cultures is around 50°C. Even if the hydrothermal *Campylobacteria* have been shown to exhibit an important metabolic versatility, the growth temperature range is overall similar between the strains of a same genus. Based on this principle it would be unlikely that *Sulfurimonas* strains may grow at 80°C. The similarity between bacterial communities in cultures of 2017 and 2018 and the plume samples may suggest that mesophilic *Bacteria* detected in the bioreactor were present in the plume samples used as culture medium. In that case, the fact to detect these *Bacteria* would not indicate that they have grown at high temperature. However, the major proportion of the ASVs detected in the culture M19_Ferm were affiliated to this genus, and the ordination in **Figure 50** has shown that the microbial communities present in the bioreactor were different from the plume communities. Also, almost all the ASVs present in the plume sample M19 Ais 100-150 (used as culture medium in the culture M19_Ferm) were affiliated to *Alphaproteobacteria*. Hence it contradicts the assumption that the *Bacteria* detected in the bioreactor would just be passively brought by the plume samples. Moreover, it was the sole continuous culture in which we have observed consistent results for the bacterial diversity at successive sampling times, as for the *Archaea*. We can therefore assume that the high proportion of ASVs affiliated to *Sulfurimonas* in culture

M19_Ferm result from the growth of *Bacteria*, and not just from the input of *Bacteria* from the plume samples even if it does not explain the growth of *Sulfurimonas* at 80°C. An alternative hypothesis may be that another bacterial lineage shares a similar region of the 16S rRNA genes with the genus *Sulfurimonas*, leading to a wrong taxonomic affiliation.

7) Discussion

The metabarcoding approach implemented in this study has produced interesting data but also raise a lot of technical constraints and methodological questions. First, the variability between the sequencing runs prevented the comparison of some samples. This was especially an issue for the hydrothermal chimney samples. Indeed, due to the low number of remaining samples it is likely that certain tendencies could not be observed or confirmed. Moreover, it is highly probable that various factors drive the microbial communities of chimneys or plume, hence the variability between the communities of the samples may not be easily explained due to the lack of information on the samples. The bacterial contaminations were also a significant issue because it lowered the size of 16S rRNA gene libraries for bacterial communities.

Despite these limitations, the different types of samples (hydrothermal chimneys and proximal plume samples, continuous cultures) have brought information on the microbial communities present in the different habitats of the hydrothermal vents.

In hydrothermal chimneys, the archaeal communities were dominated by hyperthermophiles (*Thermococcus*, *Archaeoglobi*, *Thermoprotei*) and thermo-acidophiles (*Aciduliprofundum*). The bacterial communities comprised a higher taxonomic diversity, including thermophiles (*Aquificae*, *Deinococci*, some *Campylobacteria*) and mesophiles (mainly *Campylobacteria*). The presence of hyperthermophiles, thermophiles and mesophiles has already been explained by different studies that have shown a spatial separation of these communities caused by the thermal gradient in the chimneys structure (Takai *et al.*, 2001, Schrenk *et al.*, 2003, Pagé *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2014).

Our results have shown that only 13 ASVs were differentially abundant between the sulfate and sulfide chimney samples, and we did not observe significant relations between the taxonomic diversity of the microbial communities and the mineralogical class of the samples. It indicates that all the taxa detected were present in both types of chimneys, and that there was no specific taxa to sulfate or sulfide chimneys. However, a significantly higher alpha-diversity

was observed for the archaeal communities in the sulfide chimney samples compared to the sulfate chimneys. This tendency was not observed for the *Bacteria*, possibly because the alpha-diversity measurements were biased by the size of the libraries. For both archaeal and bacterial communities, we have shown that the variability of communities among the samples was higher for the sulfide chimney samples. This observation may be explained by the mineralogical composition of the chimneys. In the sulfate samples, that presented similar mineralogical compositions the physico-chemical conditions were probably similar. On the contrary, sulfide chimney samples presented very different mineralogical compositions. As it was discussed in the previous chapter, the samples from mineralogical class 2 were probably associated to high-temperature zones of the chimneys whereas the samples from class 4 seemed to come from external parts of the chimneys in contact with seawater. Hence, we can assume that the sulfide chimney samples were associated to various conditions of temperature, oxygen and substrates availability. It would explain why the archaeal diversity was higher compared to sulfate chimney samples, and also why the microbial communities exhibited a higher diversity.

In the proximal plume samples, archaeal communities were dominated by taxa that mainly originate from seawater, and that were rarely detected in the chimney samples. These plume communities were very similar when compared at the class or genus level because they were almost only composed of MG-I, MG-II and MG-III. On the contrary, most of the bacterial taxa of plume samples were shared with chimneys communities, including *Campylobacteria*, *Deinococci* and *Alphaproteobacteria*. The spatial origin of the plume samples (the hydrothermal sites) was a main driver of the archaeal and bacterial communities and explained more than 20% of the variance observed. For the *Archaea* it concerned mainly marine taxa whereas almost all the bacterial taxa were concerned. We can explain this observation by the composition of the hydrothermal fluid which differs among the sites (Chavagnac *et al.*, 2018), as the influence of fluid composition on microbial communities was already shown in previous studies (Flores *et al.*, 2011, Takai & Nakamura, 2011, Dahle *et al.*, 2018). This feature was not observed for the archaeal communities from hydrothermal chimney samples, and was observed as a tendency for the *Bacteria* but was not statistically confirmed. It suggests that other factors drove the microbial communities in the chimneys, possibly the thermal gradient resulting from their heterogeneous structure, or the minerals that could be used as substrates.

It is worth noting that even if almost all the archaeal ASVs detected in the plumes were affiliated to only three main taxa (MG-I, MG-II and MG-III) their alpha-diversity was significantly higher than the diversity of *Archaea* in chimney samples. On the opposite the

alpha-diversity of bacterial communities from chimneys or plume samples was similar, which confirms the similarity between the *Bacteria* living in these two habitats. Despite the global similarities of microbial communities from these habitats, their comparison has shown that 29 ASVs were differentially abundant between chimneys and plume samples (mainly *Sulfurimonas* and *Caminibacter*). Hence, even if these ASVs belong to the same taxa, their differential abundance between the two types of samples suggest that they present different metabolic or physiologic characteristics to live preferentially in one type of habitat.

The aim of the continuous cultures in bioreactor was to identify microbial communities living in hydrothermal vents that can grow at high temperature and in the presence of H₂ and CO₂, by using chimney samples as inoculum, and proximal plume sample as culture medium. The other parameters, like temperature, pH, composition of the gas phase and renewal rate of the medium were fixed during the three cultures. A striking result was the enrichment of phylotypes affiliated to the superphylum DPANN, since this lineage is almost only composed of uncultured *Archaea*. It would be informative to perform similar experiments to study the culture conditions that enhance their growth in order to obtain functional data about these poorly known microorganisms.

The enriched archaeal communities from cultures of 2017 and 2018 were mainly composed of taxa detected in the chimneys whereas *Bacteria* were closer to the plume communities. Interestingly, the communities enriched from the sulfate chimney samples in the culture M19_Ferm were different from the communities of the cultures inoculated with sulfide chimney samples. Hence, even if we have shown that the hydrothermal site may have an influence on the bacterial and archaeal communities of the proximal plumes, it was the mineralogical composition of the chimney samples used as inoculum that was the main driver of the microbial communities enriched in the continuous cultures. Two hypotheses can be proposed, first we can assume that the microbial communities between sulfate or sulfide chimney samples used as inoculum were contrasted although we did not observe significant taxonomic differences between the microbial communities of the samples except for the DPANN that were absent from the sample M19 Ais 1. We may also explain these results in the enrichment cultures by the different input of substrates in the form of minerals. Indeed, the sample M19 Ais 1 has probably brought sulfate in the culture, which is a potential electron acceptor, whereas samples M17 Ais 2 and M18 Cap 2 were mainly composed of sulfide, that could have provided electron donors. This type of microbe-mineral interactions in similar continuous culture in bioreactor has already been described (Callac *et al.*, 2015).

The results obtained from the diversity study and the continuous cultures in bioreactor are further discussed in the *Chapter VII* and compared to the results obtained by MPN enrichments and activity measurements experiments.

Chapter V - Functional diversity of microbial communities from deep sea hydrothermal chimneys

Cultural methods for studying microbial communities of hydrothermal chimneys

The metabarcoding approach presented in the previous chapter has brought information about the phylogenetic diversity and structure of microbial communities from hydrothermal chimneys and proximal plume of the vent field Lucky Strike. However, because it is a molecular method, it does not bring functional information about the microbial communities, or these remain putative.

Therefore, we have completed the results from the molecular study by setting up two cultural approaches. First, Most Probable Number (MPN) enrichment cultures were realized to estimate the concentration of viable and culturable microorganisms in hydrothermal chimney samples. We have then measured the rates of autotrophic and heterotrophic carbon fixation by using radiolabelled substrates.

[Description of the hydrothermal chimney samples](#)

Four hydrothermal chimney samples, M19 Ais 1, M19 DEAFS, M19 Ais 2 and M19 Cap 2 were collected, crushed and prepared as slurries in artificial anoxic seawater and kept at 4°C to be used as inoculum for MPN enrichments, and as culture medium and inoculum for activity measurements. These samples were collected during the cruise MOMARSAT2019 from the chimneys Aisics, Montserrat (sample DEAFS) and Capelinhos. The chimneys Aisics and Montserrat are localised at the south-east of Lucky Strike and the hydrothermal fluid originates from the same endmember, whereas Capelinhos is separated from the other sites and its fluid is enriched in iron (section *Le champ hydrothermal Lucky Strike*). The aim of this sampling was to collect the sulfate-dominating upper parts and the sulfide-dominating parts of the chimneys to compare the microbial communities from samples presenting contrasted mineralogical compositions. Unfortunately, we initially planned to compare the two types of samples (sulfate- or sulfide-dominating) from the chimneys Aisics and Capelinhos, but the

sample M19 Cap 1 (from the upper part of the chimney Capelinhos) was broken during the transfer from the ship to the laboratory. Instead, we used the sample M19 DEAFS in MPN enrichments, that has been conserved in the same conditions as the other samples so we could compare the results. However, the volume of sample M19 DEAFS was not sufficient to be used for the activity measurements experiments.

As it was presented in the **Figure 39**, the samples M19 Ais 1 and M19 DEAFS that were collected from the upper parts of the chimneys were composed of more than 95% anhydrite (mineralogical class 1). In contrast, the samples M19 Ais 2 and M19 Cap 2 were dominated by sulfides (> 85%), including marcasite, pyrite, chalcopyrite and sphalerite. The proportion of these minerals correspond to the mineralogical class 4, suggesting that the samples M19 Ais 2 and M19 Cap 2 samples were collected from an external part of the chimneys. Thus, we can conclude that the sampling procedure was successful and should allow a comparison of microbial communities between samples representative of sulfate and sulfide chimneys.

1) MPN enrichments

We have chosen to perform MPN enrichments because this method allows the quantification of viable and culturable microorganisms in hydrothermal chimneys slurries. Because the mass of chimneys used for preparing the samples was known, we could estimate the number of culturable cells per gram of hydrothermal chimney. Moreover, with this method it is possible to impose defined culture conditions, like incubation temperature or substrates availability depending on the metabolisms of interest. Different conditions were combined to study microorganism that present various physiological and metabolic characteristics, and to investigate the influence of environmental parameters on microbial communities from hydrothermal chimneys.

Two possible carbon sources were tested. Sodium bicarbonate was provided as inorganic carbon source for autotrophic microorganisms (in the presence of CO₂ in the gas phase) or different organic carbon sources (yeast extract and peptone supplemented with formate, acetate, pyruvate, propionate in the medium containing sulfate) were provided for heterotrophic microorganisms.

Three possible electron donors were provided for comparing the concentration of microorganisms growing under microaerophilic conditions or under anaerobic conditions in

reduced medium containing elemental sulfur or sulfates. In inorganic carbon containing media, the electron donors were provided depending on the electron acceptors provided (hydrogen with sulfate or elemental sulfur, or hydrogen and thiosulfate with oxygen).

As a reminder, the **Table 11** resumes the carbon sources and electron donors and acceptors provided in the 6 designed culture media. The detail is presented in the **Table 7**.

Table 11 : Characteristics of culture media used in MPN enrichments.

Medium	Carbon source	Electron acceptors	Electron donors
M3	Inorganic	Sulfate	Hydrogen
M4	Organic		Yeast extract, Acetate, Pyruvate, Butyrate, Propionate
M2	Inorganic	Elemental sulfur	Hydrogen
M1	Organic		Yeast extract
M5	Inorganic	Oxygen	Hydrogen, thiosulfate
M6	Organic		Yeast extract

The cultures were incubated at four temperatures (30, 60, 80 and 95°C). These values were chosen because they correspond to the growth temperatures ranges of numerous microorganisms previously isolated from hydrothermal vents. The aim was to enrich a largest fraction as possible of the culturable microbial communities. Only psychrophilic microorganisms could not grow under those conditions.

All those conditions (temperature, carbon source, electron acceptor) were combined and incubations were performed in triplicate after five tenfold dilutions.

After the incubations, consumption of substrates and production of metabolites were measured by anionic chromatography and micro-gas chromatography in the last positive dilutions vial. Also, the enriched microorganisms were identified by 16S rRNA genes Sanger sequencing.

Statistical analyses were performed to study the links between MPN counts and culture conditions. Analysis of variance (Anova) were performed when the required conditions were satisfied (normality and homogeneity of variances). When normality or variance homogeneity were not validated, the average values of MPN counts were tested by Kruskal-Wallis statistical (KW) test.

Preliminary methodological assessments

The limitations of the methods are discussed in the present section before presenting the results to avoid improper interpretation of the data.

First, we can also remind that the MPN enrichments are a cultural method. Hence the data acquired only concern the viable and culturable fraction of the microbial communities. It presents limitations, because it cannot produce data on the non-culturable microorganisms, which can however have an important function in the ecosystem. On the other hand, the advantage is the ability to control the culture conditions, that brings information on the physiological and metabolic characteristics of the culturable microbial communities.

The quantitative results from MPN enrichments must also be interpreted with caution, because it contains imprecisions due to the statistical estimation of the initial microbial concentration in the samples. Moreover, some microorganisms which present a versatile metabolism may grow in different conditions (for example facultative anaerobes that can use oxygen, sulfur or sulfate as electron acceptor). Thus, the results from different media cannot be summed and this method cannot be used to estimate the total cell concentration in a sample. Instead, we present estimations of the concentration of cells that can grow in defined culture conditions.

Because the initial concentration of culturable microorganisms was sometimes higher than expected, in some conditions a growth was observed until the last dilution (10^{-5}). It was therefore not possible to estimate accurately the cellular concentration in the raw samples since the MPN calculation requires dilution to extinction. In those cases, we retained the calculated value as the minimal cellular concentration that could be present in the sample. It is not possible to compare the initial concentration between the conditions in which an enrichment was observed up to the last dilution because the actual concentration was possibly higher. However, we could compare these values to the other conditions that were diluted to extinction.

The highest concentration of viable culturable microorganisms observed was $1.46 \cdot 10^6$ cells per gram of chimney. In comparison, Takai *et al.* reported concentration from $9.3 \cdot 10^1$ to $1 \cdot 10^7$ viable cells per gram of chimney in various MPN enrichment conditions (Takai *et al.*, 2001, Takai *et al.*, 2008). Also, cell counts realised in different studies estimated the cell concentration in hydrothermal chimneys as ranging from $1 \cdot 10^4$ to $1 \cdot 10^8$ cells per gram (Harmsen *et al.*, 1997, Takai *et al.*, 2001, Schrenk *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2014). The maximal concentration of viable cells reported in our experimentations is in the range of these values. Considering that all the cells detected by microscopic observation are probably not viable and culturable, we can

thus assume that the maximal cell concentration reported in our study was near to the initial concentration in the samples.

It would have been very informative to determine the total microbial concentration in the samples, including the non-culturable fraction of the microbial communities. Cell counts were carried out using different fluorescent DNA markers like SYBR Green. Despite an optimization work, the cell counts could not be realized because the minerals present in the chimney samples presented an important non-specific fluorescence. Hence, it was not possible to visually separate the cells and minerals under microscopic observations and to determine the culturable fraction of the microbial communities from the four chimney samples. Cell counting in chimney samples is presently under development at LM2E using CARD-FISH techniques.

The production of several metabolites and the consumption of substrates were measured by anion chromatography (thiosulfate, sulfate, propionate, pyruvate, oxalate, lactate, formate, acetate) and micro-gas chromatography (CO_2 , H_2S). Some technical issues, described below, prevented us from identifying substrates consumption and metabolites production in all the culture conditions.

Micro-gas chromatography also allowed measurements of the concentration of O_2 , H_2 and N_2 . However, to calculate the quantity of each gas in the gas phase of the vials, it is necessary to include the measure of pressure. Pressure was accurately measured in each case, but during the long period of incubation the vials lost a part of the gas pressure by leaks from the butyl septa. Therefore, we could only identify the production of a gas when it was initially absent from the media (for example we could detect the production of H_2S because this gas was not introduced during the preparation of the medium).

Also, numerous abiotic reactions were observed in the control vials that were not inoculated, especially for control vials incubated at high temperature. It was therefore necessary to identify and to subtract consumption of substrates or production of metabolites that are due to abiotic chemical reactions. For example, in media containing elemental sulfur, an important production of thiosulfate was measured, up to 2.4 mM at 95°C. H_2S production in the gas phase was also recorded. In media containing only inorganic carbon source (sodium bicarbonate), acetate and formate productions increasing with temperature were measured, up to 185 μM at 95°C. Independently of temperature, a great sulfate concentration (up to 30 mM) was recorded in the vials inoculated by the sample M19 DEAFS. We hypothesized that it was caused by the dissolution of anhydrite (CaSO_4) that was the main mineral composing this chimney sample. This mineral is one of the main components of the sample M19 DEAFS. This was confirmed

by the sulfate concentration that was often reduced by a factor 10 among successive dilutions. When it was not possible to determine if the variations of chemicals compounds concentrations were due to abiotic processes, the corresponding reactions were removed prior to analysis.

Sanger sequencing on PCR products of genes encoding 16S rRNA was performed to identify the microorganisms (*Archaea* or *Bacteria* separately) enriched in the last positive dilution vials. However, this sequencing method requires to have pure cultures otherwise it would produce overlapping peaks on the chromatograms. In most cases the quality of the sequences was high enough to allow the identification. In some cases, PCR amplifications failed or sequence quality was too low and did not permit to identify the enriched microorganisms. The identification of the enriched microorganisms was possible for 168 of the 254 positive enrichment culture.

In many vials both *Archaea* and *Bacteria* were detected so in these cases the cultures were not pure. However, it was possible to identify archaeal and bacterial phylotypes because the PCR amplifications were performed using primers targeting those domains separately.

1) Microbial concentration in hydrothermal chimney samples

The complete results of MPN enrichments are presented in *Appendix 2* and will not be discussed in detail because it represents an important quantity of data. Instead, the main results were synthesized in boxplots (**Figure 51**).

Microbial growth was observed in most conditions except in some cases in the presence of oxygen at high temperatures, and especially when an organic carbon source was provided. Differences in cell concentration were observed according to the culture conditions including the chimney samples used as inoculum, the mineralogical compositions of the chimney samples, the incubation temperature, the carbon source and electron acceptors provided.

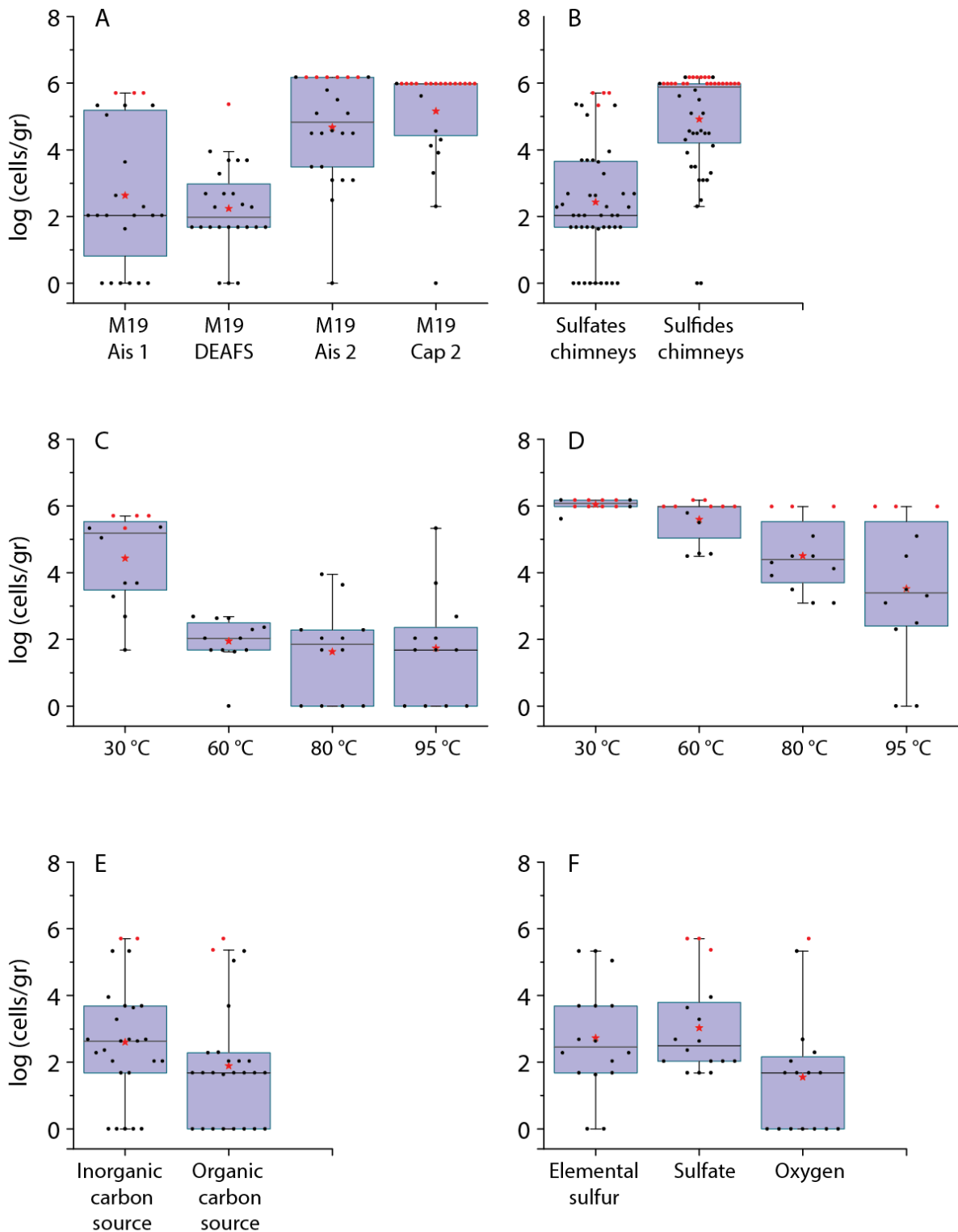


Figure 51 : Boxplots of the decimal logarithm of culturable cell concentration (cells per gram) according to the sample (A), mineralogical composition of the chimneys (B), temperature (C and D), carbon source (E) and electron acceptors provided (F). Plots A and B include all the samples. Plots C and D include respectively sulfate of sulfide chimney samples. Plots E and F only include sulfate chimney samples. Red stars represent average value of cell concentration for each boxplot. Red points represent the values that may be underestimated because dilution to extinction was not reached.

Figure 51 A shows that the average cell concentrations in samples M19 Ais 1 and M19 DEAFS were very similar, and lower than values of samples M19 Ais 2 and M19 Cap 2 when all the conditions are considered (temperature, carbon source and electron acceptor). By grouping the samples according to their mineralogical composition (**Figure 51 B**) it shows a significant difference of cell concentrations between sulfate or sulfide chimney samples (p-value $1.01 \cdot 10^{-8}$ in KW test). This difference was also significant when the culture conditions (temperature, culture media) were analysed separately.

Moreover, the difference between the microbial concentration values from sulfate and sulfide chimney samples was probably underestimated because in many cases a growth was observed until the last dilution in sulfide chimney samples (red points on **Figure 51**), suggesting that cells concentration in these samples are higher than the concentration obtained from MPN counts.

Results were compared between the different culture conditions used for the enrichments. Because microbial communities from sulfate or sulfide chimney samples did not exhibit the same response to temperature or substrate availability, analyses were done separately (**Figure 51 C and D**).

For all the samples, a significant difference in cell concentration was observed between the four incubation temperatures (p-values $6.34 \cdot 10^{-6}$ and $3.85 \cdot 10^{-5}$ in KW test). Globally the cell concentration decreased with increasing of temperature. For sulfate chimney samples (M19 Ais 1 and M19 DEAFS, **Figure 51 C**), an important decrease of cell concentration was observed between 30 and 60°C. For sulfide chimneys the tendency was less clear because of the conditions for which we could not dilute the cultures to extinction. That was the case of almost all conditions at 30 and 60°C, hence the average cell concentration at 30 and 60°C was probably higher than the estimated value.

Cell concentration from sulfate chimney samples also varied according to the substrates provided in the culture media. The cell concentration was higher in the presence of inorganic carbon source than with the organic carbon sources provided (p-value 0.002 with KW test, **Figure 51 E**). The values were also higher when elemental sulfur or sulfate was provided compared to oxygen in microaerophilic conditions (p-value 0.02 with KW test, **Figure 51 F**).

For sulfide chimney samples, no significant difference in MPN counts values were observed according to the substrates provided, excepted at 95°C, where cells concentrations were lower in the presence of oxygen as electron acceptor than with sulfate or elemental sulfur.

2) Taxonomic identification of enriched microorganisms

The **Figure 52** shows the taxonomic affiliation of microorganisms enriched in the last positive dilutions. Different taxonomic ranks are presented depending on the precision of taxonomic affiliation that was possible to obtain. With lower quality sequences or for several taxa (such as *Desulfurococcales*) the deepest affiliation was made at the order level. It was not possible to identify the phylotypes more accurately because the 16S rRNA genes sequences seem to be highly conserved between the different genera as BLAST results often reported 100% identity with different species and genera as it was already described in the section *Taxonomic diversity*.

The archaeal genus that was enriched in the most conditions was *Thermococcus* (43 occurrences by counting separately the occurrence in triplicates from the same condition). Members of class *Thermoprotei* (including mainly *Desulfurococcales*) were detected in 35 conditions. *Archaeoglobaceae* and *Haloferax* related phylotypes were detected in respectively 9 and 3 conditions.

A higher number of bacterial taxa were enriched, the most represented being *Sulfurimonas* and *Persephonella* with 33 and 25 occurrences, respectively. *Paenibacillus* were observed in 11 conditions, *Oceanithermus* in 13 conditions, and *Hydrogenivirga* (which are members of phylum *Aquificota* such as *Persephonella*) in 6 conditions. Other bacterial genera were detected occasionally, such as *Bacillus*, *Sunxiqinia*, *Thiomicrospira*, *Vulcanithermus* and members of the *Deltaproteobacteria*, *Spirochaetes*, and *Cellulomonadaceae*.

Those bacterial and archaeal taxa were not equally distributed among the different culture conditions. Relations between temperature, substrates availability and samples used as inoculum were studied by performing statistical analysis. The results are presented simultaneously with the results of substrates consumption and metabolites production measurements in the section *Correlation between culture conditions, taxonomic diversity and metabolism data*.

	M2	M3	M5	M1	M4	M6
Incubation temperature (°C)	Inorganic carbon source			Organic carbon source		
	Electron acceptor			Electron acceptor		
	Sulfur	Sulfate	Oxygen	Sulfur	Sulfate	Oxygen
	MOM19 Aisics 1			MOM19 Aisics 1		
30	<i>Sulfurimonas</i>	<i>Sulfurimonas</i>	<i>Sulfurimonas</i>	<i>Sulfurimonas</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Sunxiqinia</i>
60	<i>Persephonella</i> <i>Thermococcus</i>	<i>Persephonella</i>	<i>Sulfurimonas</i> <i>Desulfurococcales</i>	<i>Thermococcus</i>	<i>Aquifex Planifilum</i> <i>Haloferax</i>	<i>Vulcanithermus</i> <i>Desulfurococcales</i>
80	<i>Thermococcus</i>	<i>Desulfurococcales</i>	-	-	<i>Deltaproteobacteria</i>	-
95	<i>Thermococcus</i>	<i>Haloferax</i>	-	-	<i>Archaeoglobaceae</i>	-
	MOM19 DEAFS			MOM19 DEAFS		
30	<i>Sulfurimonas</i>	<i>Sulfurimonas</i>	<i>Thiomicrospira</i>	<i>Sulfurimonas</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Thiomicrospira</i>
60	<i>Sulfurospirillum</i> <i>Archaeoglobaceae</i>	<i>Desulfurococcales</i>	<i>Thiomicrospira</i> <i>Oceanithermus</i> <i>Thermococcus</i>	<i>Persephonella</i> <i>Thermococcus</i>	ND	-
80	<i>Thermococcus</i>	ND	<i>Thermococcus</i>	<i>Thermococcus</i>	ND	-
95	<i>Archaeoglobaceae</i>	<i>Thermococcus</i>	<i>Thermococcus</i>	<i>Thermococcus</i> <i>Desulfurococcales</i>	ND	-
	MOM19 Aisics 2			MOM19 Aisics 2		
30	<i>Sulfurospirillum</i> <i>Sulfurimonas</i>	<i>Sulfurimonas</i> <i>Lutibacter</i>	<i>Sulfurimonas</i>	<i>Sulfurimonas</i> <i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Cellulomonadaceae</i> <i>Oceanibacillus</i>
60	<i>Persephonella</i>	<i>Persephonella</i>	<i>Persephonella</i> <i>Thermococcus</i>	<i>Persephonella</i> <i>Thermococcus</i>	<i>Oceanithermus</i>	<i>Oceanithermus</i> <i>Desulfurococcales</i> <i>Thermofilum</i>
80	<i>Persephonella</i> <i>Thermococcus</i>	<i>Desulfurococcales</i>	<i>Hydrogenivirga</i> <i>Desulfurococcales</i>	<i>Thermococcus</i>	<i>Bacillus</i> <i>Thermococcus</i>	<i>Desulfurococcales</i>
95	<i>Thermococcus</i> <i>Desulfurococcales</i>	<i>Haloferax</i>	<i>Thermococcus</i>	<i>Thermococcus</i>	<i>Desulfurococcales</i>	-
	MOM19 Cap 2			MOM19 Cap 2		
30	ND	<i>Sulfurimonas</i>	<i>Sulfurimonas</i>	<i>Spirochaete</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>
60	<i>Persephonella</i> <i>Thermococcus</i>	<i>Persephonella</i> <i>Geoglobus</i>	<i>Persephonella</i> <i>Thermopetrobacter</i> <i>Desulfurococcales</i>	<i>Persephonella</i> <i>Thermococcus</i>	<i>Oceanithermus</i> <i>Thermococcus</i> <i>Calorithricaceae</i>	<i>Oceanithermus</i> <i>Thermococcus</i> <i>Desulfurococcales</i>
80	<i>Thermococcus</i> <i>Desulfurococcales</i>	<i>Persephonella</i> <i>Hydrogenivirga</i> <i>Geoglobus</i> <i>Thermoprotei</i>	<i>Aquificales</i> <i>Hydrogenivirga</i> <i>Thermococcus</i> <i>Desulfurococcales</i>	<i>Thermococcus</i>	<i>Bacillus</i> <i>Psychrobacillus</i> <i>Geoglobus</i> <i>Desulfurococcales</i>	<i>Oceanithermus</i> <i>Rhodothermus</i> <i>Desulfurococcales</i>
95	<i>Thermococcus</i>	<i>Desulfurococcales</i>	<i>Thermococcus</i> <i>Desulfurococcales</i>	<i>Desulfurococcales</i>	<i>Archaeoglobaceae</i>	-

Figure 52 : Taxonomic affiliation of microorganisms enriched in last positive dilutions. - : No growth was observed in the condition ; ND: Taxonomic affiliation could not be determined. Results from triplicates were merged. Pink background corresponds to the lowest concentrations, and black background to the highest concentrations (detail of the values in Appendix 2).

3) Substrates consumption and metabolites production

Canonical correspondence analyses were performed to explain the substrates consumption and the metabolites production according to the culture conditions or the enriched phylotypes.

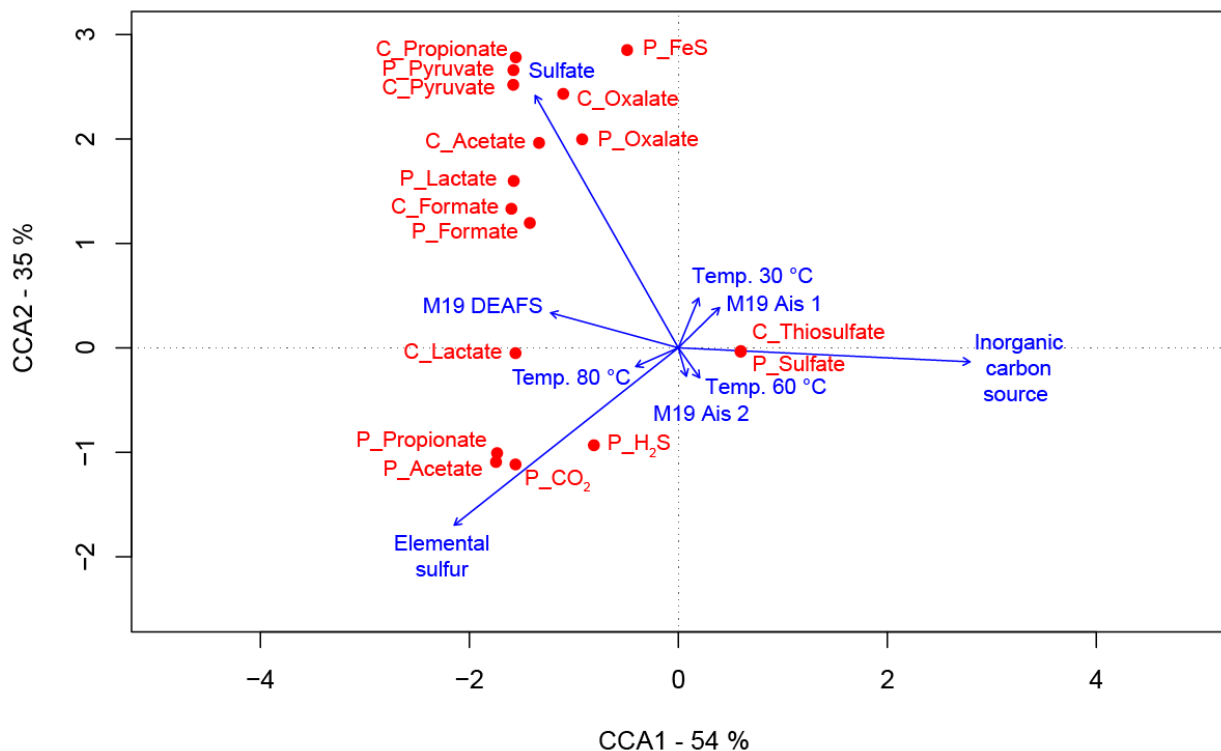


Figure 53 : Biplot of canonical correspondence analyses (CCA). The culture conditions are shown as blue arrows. The consumptions (C_substrate) and productions (P_metabolite) are shown as red points. Contribution of canonical axis 1 and 2 to explanation of variance is respectively 54 % and 35 %. Culture conditions taken into account are incubation temperature, electron acceptor, carbon source and samples used as inoculum.

The culture conditions explained a high proportion of the variance (89% for the first two axis, **Figure 53**). The variation of substrates and metabolites concentrations was mainly explained by the carbon source and the electron donors provided. Incubation temperature and samples used as inoculum explained a lower proportion of the variance.

According to these results and the substrates provided in the 6 culture media, we could identify metabolic reactions catalysed by microorganisms in each media.

The presence of elemental sulfur and H₂S production (P_H₂S) were correlated, also with CO₂, propionate and acetate production. It indicates that in the two sulfur containing media (M1 and M2), sulfur was reduced to H₂S. Acetate and propionate may have been produced by autotrophic microorganisms or resulted from the degradation of yeast extract by heterotrophs whereas CO₂ production can be explained by the degradation of organic matter by heterotrophs.

Thiosulfate consumption and sulfate production were correlated to an inorganic carbon source and to the presence of oxygen (not displayed on the **Figure 53**), indicating that in medium M5 the main metabolism performed by autotrophic microorganisms was aerobic thiosulfate oxidation, producing sulfate.

The presence of sulfate was correlated with the production of FeS (P_FeS). FeS is produced in the presence of FeSO₄ (present in the media M3 and M4) and H₂S, suggesting that sulfate reduction to H₂S was performed by microorganisms that grew in media M3 and M4. The consumption of lactate, formate, oxalate, propionate and pyruvate was also correlated with this electron acceptor because these substrates were provided only in the medium M4 containing sulfate and organic carbon sources.

CCA were also performed to check if the substrates consumption and metabolites production data could be explained by the identification of enriched microorganisms (data not shown). Although it explained a lower proportion of the variance than culture conditions, those data were used to identify the metabolism performed by the most abundant taxa in each media. The results of correlations between enriched taxa and substrates consumption and metabolites production are presented in the next section.

4) Correlation between culture conditions, taxonomic diversity and metabolism data

Several canonical correspondence analyses (CCA) were performed to study the link between culture conditions and taxonomic diversity of the enriched microorganisms. Occurrence of phylotypes was used as community data matrix and culture conditions were used as constraining matrix. Phylotypes that presented similar distribution and that were phylogenetically close were grouped into a higher taxonomic rank: *Bacillus* and *Psychrobacillus* into *Bacillales*, *Geoglobus* were integrated to *Archaeoglobaceae*, *Thermofilum* to *Desulfurococcales* and *Hydrogenivirga* to *Aquificales*. Phylotypes detected in only one condition were removed prior to analyses.

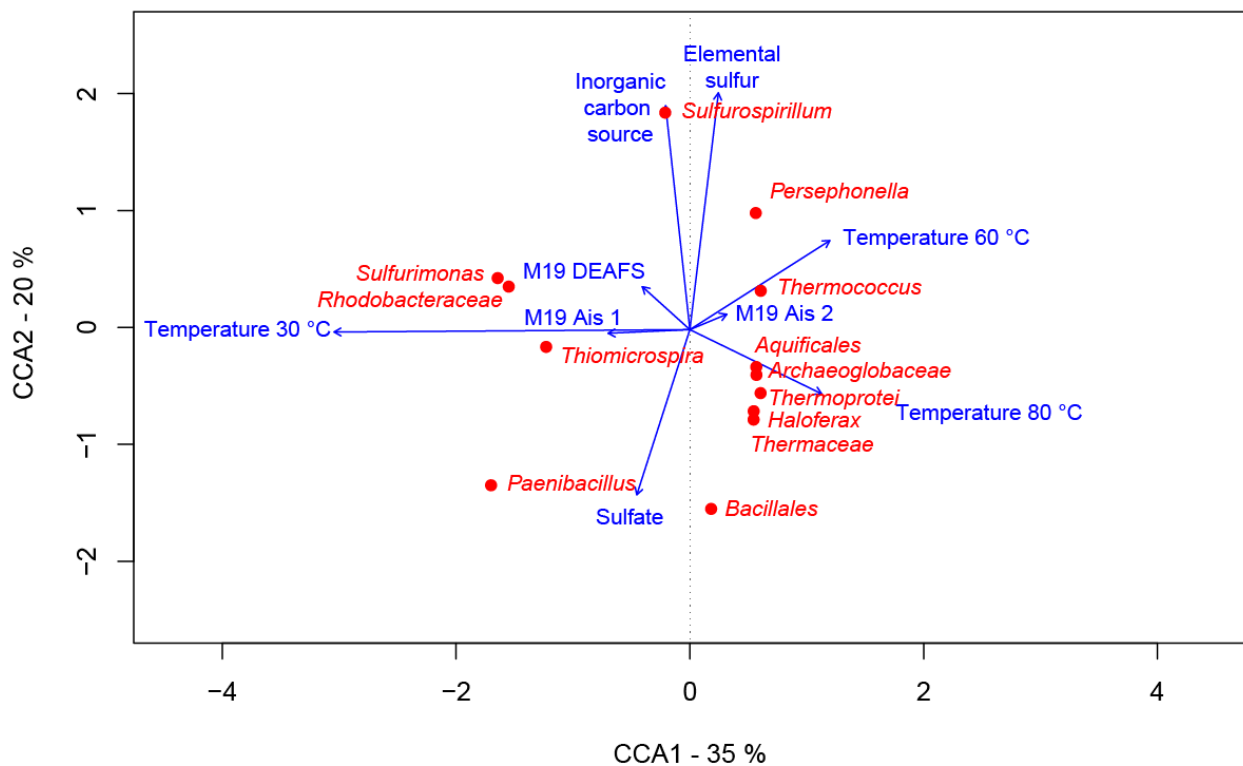


Figure 54 : Biplot of canonical correspondence analyses (CCA). The culture conditions are shown as blue arrows. The phylotypes detected in last positive dilutions are shown as red points. Contribution of canonical axis 1 and 2 to explanation of variance was respectively 35 % and 20 %. Culture conditions considered are incubation temperature, electron acceptor, carbon source and samples used as inoculum.

The first two axis of the CCA explained 55% of the variance. The biplot in the **Figure 54** shows that the main factors that separate enriched phylotypes were the temperature, the electron acceptor and the carbon source provided (the corresponding vectors are the longest ones).

The first CCA axis is mainly driven by incubation temperature. The lowest incubation temperature (30°C) being opposite to higher temperatures (60 and 80°C). The second axis is mainly defined by the substrates provided (sulfate, elemental sulfur and inorganic carbon source). The samples used as inoculum explained a lower proportion of variance. It indicates that temperature and substrates were the main drivers of microbial diversity in enrichment cultures, whereas the samples used as inoculum were only secondary factors.

The vectors associated to substrates availability (“Inorganic carbon source”, “Elemental sulfur”, “Sulfate”) were almost orthogonal with the vectors associated to incubation temperature (“Temperature 30°C”, “Temperature 60°C”, “Temperature 80°C”), meaning that there was no link between the temperature at which the phylotypes grew and the substrates they used for growth.

Some taxa were grouped on the CCA plot, while others were separated. The position of the points on the plots indicate correlations between the occurrence of these taxa and the culture conditions. To verify if these tendencies were statistically significant, chi-square independence tests were performed. Because this method requires a great number of observations the analyses were made on the whole dataset, without separating the conditions. The significant correlations (p-values < 0.05) are presented in the **Figure 55**.

Taxa	Mineralogy of chimney samples		Incubation temperature (°C)				Carbon source		Electron acceptor		
	Sulfate	Sulfur	30	60	80	95	Inorganic	Organic	Sulfur	Sulfate	Oxygen
<i>Sulfurimonas</i>	■						■				
<i>Paenibacillus</i>								■		■	
<i>Persephonella</i>				■			■				
<i>Thermaceae</i>				■				■		■	■
<i>Aquificales</i>					■					■	■
<i>Bacillales</i>								■		■	
<i>Thermococcus</i>				■		■			■		
<i>Archaeoglobaceae</i>		■								■	
<i>Thermoprotei</i>									■	■	

Figure 55 : Schematic representation of significant correlations observed between the enriched taxa and culture conditions (background in colours means that p-values were below 0.05).

The vectors “Temperature 30°C” and “M19 Ais 1” were collinear on the **Figure 54**, and the vectors “M19 DEAFS” and “Temperature 80°C” were opposite. It indicates that microbial communities enriched from sulfate chimneys were mainly composed of mesophilic microorganisms. The Chi-square independence tests have confirmed this observation because the occurrence of the genus *Sulfurimonas* was correlated with the sulfate chimney samples and with an incubation temperature of 30°C (**Figure 55**).

The occurrence of genus *Sulfurimonas* was also correlated with the presence of inorganic carbon source. This is congruent with the characteristics of described strains

belonging to this genus. Indeed, *Sulfurimonas* (Inagaki *et al.*, 2003, Han & Perner, 2015) are described as mesophilic chemolithoautotrophs oxidizing hydrogen or sulfur compounds, that are able to reduce different electron acceptors (oxygen, nitrate, nitrite).

When phylotypes affiliated to the genus *Sulfurimonas* were detected in the medium M5 (containing carbon dioxide, hydrogen, thiosulfate and oxygen), thiosulfate consumption (up to 1.1 mM) and sulfate production were measured. The stoichiometry corresponded to aerobic thiosulfate oxidation with production of sulfate, which is a commonly described metabolism for the genus *Sulfurimonas*. Aerobic hydrogen oxidation was probably also performed but could not be detected. When *Sulfurimonas* were enriched in medium M2 (containing carbon dioxide, hydrogen and elemental sulfur), a low production of H₂S was measured, probably caused by the reduction of sulfur although this metabolism has not been described for this genus.

Sulfide chimney samples were correlated with the occurrence of two archaeal taxa, *Archaeoglobaceae* and *Thermoprotei*. They were both also correlated with high incubation temperatures (60, 80 and 95°C) which is congruent with the hyperthermophilic traits described for the strains of these taxa.

Archaeoglobaceae were only detected in the anaerobic media containing sulfur or sulfate as electron acceptor (M1, M2, M3, M4). In the presence of sulfate they grew heterotrophically by consuming all the organic acids provided (acetate, lactate, formate, propionate, oxalate and pyruvate in medium M4) or autotrophically probably using hydrogen as electron donor (medium M3). In both cases they reduced sulfate to H₂S. In the presence of elemental sulfur and carbon dioxide they also produced H₂S, meaning that they likely oxidized hydrogen and reduced sulfur. Those anaerobic metabolisms are in accordance with the traits of described *Archaeoglobaceae* such as *Archaeoglobus* (Stetter, 1988, Burggraf *et al.*, 1990, Mori *et al.*, 2008) and *Geoglobus* (Kashefi *et al.*, 2002, Slobodkina *et al.*, 2009) that are, for some, mixotrophic sulfate-reducers.

Thermoprotei were enriched in all the culture media, as this class includes several genera and species that present different metabolic capacities. In media M1 and M4, containing organic carbon source and respectively sulfur or sulfate, consumption of formate and production of acetate or pyruvate was observed, with the production of H₂S. It corresponds to anaerobic oxidation of organic matter coupled to reduction of sulfur or sulfate. Heterotrophic growth and sulfur reduction are performed by described species such as *Pyrodictium abyssii* or *Staphylothermus marinus*, and sulfate reduction by *Pyrodictium delaneyi* strain Hulk (Demey *et al.*, 2017). In medium M6, microaerophilic heterotrophic growth was observed with

production of CO₂, which is congruent with the metabolic capacities of *Aeropyrum camini* (Nakagawa *et al.*, 2004), the sole hyperthermophilic *Archaea* isolated from hydrothermal vent that uses oxygen as sole terminal electron acceptor. In media M2 and M3 (containing carbon dioxide, hydrogen and respectively sulfur or sulfate) H₂S production was observed. This correspond with the autotrophic metabolisms of sulfur or sulfate reduction performed by *Ignicoccus islandicus* and *I. pacificus* (Huber *et al.*, 2000) or *Pyrodictium delaneyi* strain Hulk (Demey *et al.*, 2017). In the medium M5 (containing carbon dioxide, thiosulfate and oxygen), significant thiosulfate consumption (up to 3.7 mM) and sulfate production was measured, indicating microaerophilic thiosulfate oxidation but this metabolism was not described for *Thermoprotei*, instead the chemolithoautotrophic strains oxidize hydrogen. In most conditions, at 60 and 80°C *Persephonella* or *Hydrogenivirga* were also enriched so they probably realized the thiosulfate oxidation instead of *Thermoprotei*.

Indeed, the phylotypes related to *Persephonella* and *Aquificales* oxidized thiosulfate and produced sulfate in the medium M5. With hydrogen oxidation (that could technically not be measured) this is a common metabolism for members of *Aquificae* (Reysenbach *et al.*, 2001, Gupta, 2014).

The occurrence of *Persephonella* was correlated to an inorganic carbon source and a growth temperature of 60°C, which correspond to the described species *P. marina* (Götz *et al.*, 2002) that is an autotrophic sulfur or hydrogen oxidizer able to reduce oxygen, sulfate or elemental sulfur (the other species do not reduce sulfate (Götz *et al.*, 2002, Nakagawa *et al.*, 2003, François *et al.*, 2020)). If the enriched phylotype share these versatile metabolic capacities it may explain why no correlation was observed between the occurrence of this genus and the electron acceptors provided.

The occurrence of phylotypes belonging to the *Aquificales* was correlated with the presence of sulfate and oxygen and with an incubation temperature of 80°C, which is in the growth temperature range of described species. However *Aquificales* were shown to oxidize hydrogen or sulfur compounds and to reduce oxygen or nitrate but not sulfate. The enriched phylotypes have grown in the presence of hydrogen and sulfate so they seem to perform a metabolism which was not yet described for this taxon.

Bacillales occurrence was also correlated with an incubation temperature of 80°C, and with organic carbon sources as this order is known to be composed of heterotrophs. The growth

of *Bacillus* strains isolated from hydrothermal vents at 75°C has already been described (Marteinsson *et al.*, 1996). The growth of this taxa was correlated with sulfate as electron acceptor because they have only been detected on the medium M4 (containing sulfate and various organic carbon sources). However, they did not reduce sulfate as iron sulfide production was not observed. Hence, we can assume that these phylotypes performed fermentative metabolisms by oxidizing the organic acids (consumption of acetate, lactate, formate, propionate and pyruvate were recorded).

The culture condition that differentiated the *Paenibacillus* from *Bacillales* was their incubation temperature. Indeed, the phylotypes affiliated to the genus *Paenibacillus*, were enriched at 30°C in the presence of organic carbon sources and sulfate. This genus contains numerous mesophilic heterotrophic species. Some of these were isolated from marine sediments at different depths from coastal to abyssal sites (Lee *et al.*, 2013, Romanenko *et al.*, 2013, Huang *et al.*, 2014). As *Bacillales*, they likely grew by performing a fermentative metabolism (oxidizing acetate, propionate and possibly yeast extract or peptone) because sulfate was not reduced to H₂S.

The occurrence of phylotypes affiliated to *Thermaceae* was also correlated with organic carbon sources, and sulfate and oxygen, and an incubation temperature of 60°C. Thermophilic, aerobic heterotroph or mixotroph *Thermaceae* were isolated from hydrothermal vents like strains from the genera *Oceanithermus* and *Vulcanithermus* (Miroshnichenko *et al.*, 2003, Miroshnichenko *et al.*, 2003). They were mainly grown in medium M6 (containing yeast extract, peptone and oxygen) where acetate and CO₂ productions were detected, indicating a microaerophilic and heterotrophic metabolism. In the medium M4 (containing organic carbon sources and sulfate), phylotypes affiliated to *Thermaceae* performed fermentation (consuming formate, acetate and possibly yeast extract or peptone). Hence, such as for *Bacillales* and *Paenibacillus*, the occurrence of *Thermaceae* was correlated to the presence of sulfate however they did not consume this substrate. Hence, their occurrence in the medium M4 was only explained by the presence of organic carbon sources, and the statistical correlation of these taxa with sulfate as electron acceptor does not represent a real link. Hence, it shows the importance to experimentally check the substrates consumption and the metabolites production by the enriched microorganisms.

The last taxon that presented a correlation with culture conditions are microorganisms of the genus *Thermococcus*. Their occurrence was correlated with high incubation temperatures (60, 80 and 95°C) and elemental sulfur as electron acceptor. These conditions correspond to those described for numerous *Thermococcus* species that were described, as hyperthermophilic chemoorganotrophic sulfur reducing *Archaea*. Most *Thermococcus* phylotypes were detected in the medium M1 (containing yeast extract, peptone and elemental sulfur). Formate and lactate were consumed, and high concentrations of acetate and propionate (in average 1400 and 400 µM) were produced with CO₂ and H₂S, indicating that the enriched phylotypes also consumed yeast extracts or peptone and reduced elemental sulfur. It correspond to the most common metabolism (heterotrophic sulfur reduction) operated by *Thermococcus* (Schut *et al.*, 2014). The growth of *Thermococcus* in the media M2 and M5 (containing inorganic carbon sources) is not easy to explain because this genus is only represented by heterotrophic strains. The hypotheses proposed are described below.

A global view of these correlations shows that occurrence of mesophilic (*Sulfurimonas*, *Paenibacillus*), thermophilic (*Thermaceae*, *Persephonella*) or hyperthermophilic (*Aquificales*, *Bacillales*) taxa was correlated with only one temperature (respectively 30, 60 and 80°C). On the opposite, phylotypes that grew at 95°C were also correlated with temperatures of 60 and 80°C, indicating a wide range of growth temperature for these taxa (*Archaeoglobaceae*, *Thermococcus* and *Thermoprotei*).

The taxa which the abundance was correlated with either organic (*Paenibacillus*, *Bacillales*, *Thermaceae*) or inorganic carbon sources (*Sulfurimonas*, *Persephonella*) or oxygen (*Thermaceae*, *Aquificales*) were also correlated with incubation temperatures of 30, 60 or 80°C. On the contrary, all the phylotypes correlated with the temperature range of 60 to 95°C (*Archaeoglobaceae*, *Thermococcus*, *Thermoprotei*) were not correlated to a specific carbon source and were mainly grown in anaerobic media.

The phylotype which occurrence was correlated with the presence of sulfate were enriched in the whole temperature range whereas the phylotypes correlated with elemental sulfur (*Thermococcus*, *Thermoprotei*) were correlated with high temperatures (60 to 95°C).

Most results are congruent with the physiological and metabolic traits of described species. However, we also observed unexpected results for some taxa. For example *Thermococcus* were enriched in many conditions with CO₂ as sole carbon source whereas the numerous isolates of this genus require organic carbon source for growth. We may explain this

unusual growth in several cases by the co-occurrence of *Thermococcus* with *Bacteria* such as *Persephonella* or *Hydrogenivirga* at incubation temperatures allowing their growth (60 or 80°C). A possible syntrophy between chemolithoautotrophic *Bacteria* and heterotrophic *Thermococcus* may be considered to interpret those results. Growth of *Bacteria* and *Archaea* in the same vials was also observed at 60 and 80°C implying other taxa (*i.e.* *Oceanithermus*, *Bacillus*, *Psychrobacillus*, and *Geoglobus* or *Thermoprotei*).

However, in some cases there was no co-occurrence that could explain the growth of heterotrophic organisms in inorganic carbon containing media. Two explanations may be proposed. It is possible that an autotrophic community has grown and produced organic matter before being replaced by heterotrophic microorganisms. Otherwise maybe we have enriched strains that present particular metabolic capacities compared to the described strains of the same taxa.

5) Discussion

MPN enrichments allowed us to study the viable culturable fraction of the microbial communities from four hydrothermal chimney samples representing two main stages of maturation of black smokers. Sulfate samples (M19 Ais 1 and M19 DEAFS) represented the youngest parts of the chimneys so they were expected to bring data about the early microbial communities living in the chimneys. Sulfide chimney samples (M19 Ais 2 and M19 Cap 2) probably took several months or years to precipitate thus they were expected to provide an insight on the microbial communities that are present in the mature hydrothermal chimneys. The results were used to compare microbial communities from three hydrothermal sites of the Lucky Strike vent field.

The methodological approach set up in our study produced quantitative and qualitative data. First, we could determine the concentration of viable and culturable microorganisms from chimney samples. Then, the taxa were identified and the culture condition has brought information on their physiological characteristics. For the most abundant taxa, we could also determine the metabolic reactions they catalyzed.

The enriched microbial communities differed quantitatively (*i.e.* initial cell concentration) and qualitatively (*i.e.* taxonomic diversity, physiological and metabolic traits) depending on the culture conditions (temperature and substrates availability) and also on the mineralogical composition of the chimney samples used as inoculum.

Taxonomic, physiological and metabolic diversity

Statistical analyses of the data have shown that the main factor that shaped the taxonomic diversity of the enriched communities were the temperature and the available substrates. We can point out that almost all the taxa detected were enriched independently from the two types of samples (sulfate or sulfide chimneys). The only exceptions concerned *Bacillales* (*Bacillus* and *Psychrobacillus*) that were only detected in 5 vials inoculated from sulfide chimney samples, and rare taxa that grew in one to three vials so it was not a significance of their absence in the other chimney samples. It confirms the metabarcoding results which indicated that the taxonomic diversity was similar between these chimney samples (at the exception of the sample M19 DEAFS for which the metabarcoding results were not considered as reliable, see detail in section *Taxonomic diversity in the samples studied for cultural and activity measurements approaches*). ASVs affiliated to the genus *Methanopyrus* were detected in the sample M19 Ais 1 but were not enriched in MPN experiments. This is consistent with previous studies that shown the absence, or low abundance of methanogenic *Archaea* on Lucky Strike compared to ultramafic sites like Rainbow (Nercessian *et al.*, 2005, Flores *et al.*, 2011).

Neither have we observed links between the hydrothermal site and the taxonomy of the enriched microorganisms except for *Thiomicrospira* related phlotypes that were only enriched from the sample M19 DEAFS. It suggests that almost all the taxa enriched in our study were not specific to the sulfate or sulfide-dominating growth stage of the chimneys or the site where the samples were collected. Independently of the taxonomic diversity, no correlation was shown between the chimney samples and the metabolism data. It indicates that the metabolisms capacities of microbial communities from the different sites or types of samples (sulfate or sulfide chimneys) were similar.

It is noteworthy that in most cases only one taxon was enriched from the sulfate chimney samples in the three replicates of each condition, and we rarely observed the co-occurrence of *Bacteria* and *Archaea* in the same vial (**Figure 52**).

Instead, in sulfide chimney samples we often observed the enrichment of at least two taxa among the three replicates of each condition, or the co-occurrence of *Bacteria* and *Archaea* in the same vial. It suggests that the number of different taxa was higher in sulfide chimney samples. Even if the amount of data was not sufficient to verify if this observation is statistically

significant, this trend seems reasonably clear because it concerns numerous conditions inoculated with the four samples.

Even though the same taxa were detected from sulfate or sulfide chimneys with the exception of *Bacillales*, the taxa did not seem to be equally distributed among these two types of samples. Indeed, the statistical analyses have shown a positive correlation between the occurrence of *Sulfurimonas* and the sulfate chimney samples, and between the occurrence of *Thermoprotei* and *Archaeoglobi* and the sulfide chimney samples.

Microbial cells concentration

Besides these qualitative differences, significant variations in cell concentrations were observed, depending on the samples used as inoculum and culture conditions. Indeed, the concentration of viable and culturable microorganisms was significantly higher in the sulfide chimney samples regardless of the incubation temperature, carbon source or electron donor provided. In addition, we observed a growth up to the last dilution in 24 conditions (on 48 conditions) for sulfide chimney samples for only 4 conditions in sulfate chimney samples, meaning that the difference in microbial concentration in sulfide chimneys was probably higher than our estimation.

The responses of microbial communities to the different culture conditions (incubation temperature, carbon source and electron acceptors) varied according to the mineralogical composition of the chimney samples used as inoculum.

In sulfate chimney samples, the concentration of mesophilic microorganisms growing at 30°C was significantly higher than the concentration of thermophiles or hyperthermophiles growing at 60, 80 or 95°C (**Figure 51 C**). A higher concentration of anaerobes was also indicated by comparisons of the cell concentration between the anaerobic media containing elemental sulfur or sulfate as electron acceptor and the two media containing oxygen (**Figure 51 F**). However, this assumption should be weighted because in some cases at 30°C, the microorganisms detected in anaerobic media were facultative anaerobes that could also grow in microaerophilic conditions, using oxygen as electron acceptor. This was the case of phylotypes affiliated to *Sulfurimonas*, that grew in the presence of the three electron acceptors provided. Thus, it may be rather a higher concentration of anaerobes or facultative anaerobes compared to strict aerobes. The lower concentration of aerobic microorganisms was mostly

observed at high temperatures in the presence of organic carbon sources because no growth was observed at 80 or 95°C in the two samples. Another difference concerned the carbon source, as cell concentration was higher in the media containing inorganic carbon source in almost all conditions of incubation temperature and electron acceptor (**Figure 51 E**).

In the sulfide chimney samples, we also observed a decrease of microbial concentration with the increase of temperature, but the tendency was less clear because of the conditions for which we could not dilute the cultures to extinction. The sole exception was in the presence of inorganic carbon source and elemental sulfur, because in these conditions the cell concentration was higher at 95°C than at 80°C. This is consistent with the fact that the elemental sulfur is present in hydrothermal fluid. So in the high-temperatures zones in the chimneys, the elemental sulfur is probably an important electron acceptor for anaerobes. The substrates availability (carbon source or electron acceptor) was not linked to significant variation in the MPN counts values when sulfide chimney samples were used as inoculum. However, as for the temperature, the comparison between the different conditions was uneasy because of the conditions for which we could not dilute the cultures to extinction so we cannot exclude that the tendencies were similar to what we have shown with sulfate chimney samples.

Even if we have not shown an influence of the hydrothermal site on the taxonomy of enriched communities except for the genus *Thiomicrospira*, quantitative differences were observed between samples M19 Ais 2 and M19 Cap 2, that presented similar mineralogical compositions. Indeed, in most conditions we could not dilute the culture to dilution when the sample M19 Cap 2 was used as inoculum. Hence, the initial cell concentration was likely higher than in the sample M19 Ais 2. It may be explained by the different chemical composition of the hydrothermal fluid emitted at these sites (Chavagnac *et al.*, 2018). Except this observation, it seems that the microbial communities were more constrained by the stage of growth of the chimneys than by the site.

Both qualitative and quantitative data acquired during MPN enrichments provided an insight about the temporal and spatial dynamics of culturable microbial communities from hydrothermal vents. Because the mineralogical composition and structure of the hydrothermal chimneys vary over time, these concepts are discussed together.

Our results indicate that the most abundant viable culturable microorganisms present in the hydrothermal chimneys at the first stage of their formation (sulfate-dominating stage) were strict or facultative anaerobes living at temperatures around 30°C. It concerned in majority autotrophic *Sulfurimonas* related phylotypes that consumed thiosulfate and possibly hydrogen, and also *Thiomicrospira* in sample M19 DEAFS. This is similar to the results presented in several studies implying *in situ* colonizers, that have mainly detected *Epsilonbacteraeota* after short-term deployments (Corre *et al.*, 2001, López-García *et al.*, 2003, Alain *et al.*, 2004, Sylvan *et al.*, 2012). Heterotrophic and mesophilic taxa such as *Paenibacillus* and *Sunxiqinia* were also present at high concentration in sulfate chimney samples, which is consistent with the results of Li *et al.* that have detected taxa described as heterotrophs living at low temperature such as *Bacteroidetes* and *Firmicutes* (Li *et al.*, 2017).

Unlike these studies that have only detected mesophilic *Bacteria* in the first days or weeks following the installation of *in situ* colonizers, we have shown the presence of thermophilic and hyperthermophilic microorganisms growing at 60, 80 and 95°C in the sulfate chimney samples. The thermophiles were mainly assigned to *Persephonella* and *Deinococci* (*Vulcanithermus*, *Oceanithermus*) whereas the hyperthermophiles detected were mainly *Archaea* like *Thermococcus*, *Archaeoglobaceae* and *Desulfurococcales* that perform various metabolisms. Those bacterial and archaeal taxa have already been described as early colonizers in previous studies (Nercessian *et al.*, 2003, McCliment *et al.*, 2006, Callac *et al.*, 2013).

Li *et al.* have suggested that the porous structure of anhydrite chimneys maintains the temperature lower in the sulfate structures, explaining the absence of thermophilic and hyperthermophilic *Archaea* (Li *et al.*, 2017). Even if their concentration was much lower than the mesophiles, thermophiles and hyperthermophiles were present in the sulfate chimney samples of our study. Thus the thermal gradient was sufficiently widespread in the samples M19 Ais 1 and M19 DEAFS to allow the growth of microorganisms adapted to a wide range of temperatures, possibly because the sulfate structure contained zones of higher temperature.

The concentration of thermophiles and hyperthermophiles estimated by MPN enrichments was higher in the sulfide chimneys compared to the sulfate chimneys. It could be explained by the structure of sulfide chimneys, that present a central conduit which is well established, and surrounded by pyrite and chalcopyrite (**Figure 37**). The presence of chalcopyrite in sulfide chimney samples indicates that there were very high temperature zones (> 250°C) in the chimney before or at the time of sampling, where the hydrothermal fluid was poorly mixed with seawater. Hence, the thermal gradient is probably broader than in sulfate chimneys, and the zones of high temperature (80 - 120°C) that allow the growth of thermophiles and hyperthermophiles could represent an important volume of the chimneys, as it was presented in the **Figure 17** (Li *et al.*, 2014).

In addition to the thermal gradient, a redox gradient is created by the mixing between anoxic hydrothermal fluid and oxygenated seawater. It could explain the correlation observed between sulfide chimney samples and the occurrence of anaerobic hyperthermophilic *Archaea* (*Archaeoglobaceae* and *Thermoprotei*).

However, by focusing only on the sulfide chimney samples (M19 Ais 2 and M19 Cap 2), we still observed a higher concentration of mesophilic microorganisms growing at 30 and 60°C compared to 80 and 95°C. The link between temperature and microbial concentration was already described in different studies (Harmsen *et al.*, 1997, Takai *et al.*, 2001, Schrenk *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2014). It was shown that the microbial concentration varied among the different parts of the chimneys, from low cell concentration of hyperthermophiles in the inner parts, close to the hot central conduit, to higher concentration of mesophiles and moderate thermophiles in the external parts of chimneys in contact cooled by seawater. According to the mineralogical composition of class 4 sulfide samples, it is highly likely that we sampled different zones of the chimneys, including internal high-temperature zones and mainly external parts, that would explain the higher concentration of mesophilic microorganisms.

Concerning temporal dynamics of microbial communities, the results from previous studies concerning the colonization of hydrothermal vents have detected different taxa as early colonizers of hydrothermal chimneys, whether *Bacteria* or *Archaea*, or both, and either autotrophs or heterotrophs (section *Colonisateurs in situ*).

Even if we have set up a different methodological approach, we could compare our data to these results and try to explain why we observed different tendencies.

Unlike the previous studies implying *in situ* colonizers that, for most, have reported a low taxonomic or metabolic diversity, our results indicate that various bacterial and archaeal taxa were present in the young sulfate chimneys, and they implement autotrophic or heterotrophic metabolisms using diverse electron donors and acceptors. The previous studies that have only detected *Bacteria* suggested that the temperature in the *in situ* colonizers was possibly too low (Corre *et al.*, 2001, Alain *et al.*, 2002). This explanation cannot be used in our study because our culture conditions allowed the growth of diverse hyperthermophilic *Archaea* at 80 and 95°C, indicating that hyperthermophiles were present in the chimneys.

The second hypothesis proposed by the authors of these studies was the short deployment time that could not have allowed the colonization by *Archaea*. In the case of the present study, it is likely that we did not only detect the very first colonizers. Instead, we have studied the microbial communities of two hydrothermal chimneys when sulfates are still the dominant minerals (> 95% anhydrite). We have brought data on microbial communities inhabiting two sulfate chimneys that have possibly grown over periods of weeks or months (at most one year, that was the period between two samplings) so we could not study the first steps of microbial colonization.

Previous studies suggested an early colonization by autotrophic microorganisms and a later replacement by heterotrophic communities (Reysenbach *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2017). As it was presented earlier, the concentration of autotrophic microorganisms was significantly higher in sulfate chimney samples compared to heterotrophs (**Figure 51 E**). Moreover, the heterotrophic thermophiles *Bacillias* were only detected in sulfide chimney samples, which supports the observations of the cited studies.

We can also point out that we have detected the presence of taxa that were described as heterotrophs in the media containing inorganic carbon source. This was the case of *Thermococcus* related phylotypes, that were enriched in media without organic matter. Due to the numerous *Thermococcus* strains that were isolated and described as heterotrophs, it would be very unlikely that we have enriched the first autotrophic *Thermococcus* strains. Instead, we have suggested a possible syntrophic growth with autotrophic *Bacteria* because they were sometimes detected in the same vials. In the cases where we have enriched *Thermococcus* without detecting a co-occurrence of *Bacteria*, it may be explained by a replacement in a very short time of the autotrophic bacterial communities by fast growing *Thermococcus*.

2) Activity measurements

To complete the results of MPN enrichments, activity measurements were performed to compare the autotrophic and heterotrophic carbon fixation rates of microbial communities from hydrothermal chimneys at different temperatures. As it was described at the beginning of the chapter, the same chimney samples were used for these experiments with the exception of M19 DEAFS for which the volume was not sufficient. The slurries were used both as culture medium and inoculum.

For autotrophic metabolisms ^{14}C -labelled bicarbonate was provided as inorganic carbon source, and hydrogen and oxygen were added to the gas phase as potential electron donor and acceptor (respectively 10 and 4 %, 1.4 bar). For heterotrophic metabolisms ^3H -labelled leucine was provided as organic carbon source, and oxygen was added to the gas phase as a potential electron acceptor (4 %, 1.4 bar). The pressure was lowered compared to microaerophilic MPN enrichments media for safety reasons because the handling of pressured vials containing unsealed radioactive source can be hazardous. We did not perform activity measurements in anaerobic media because the volume of samples was not sufficient to set up more conditions. We assumed that at temperatures above 60°C the dissolved concentration of oxygen is low enough to allow the growth of anaerobes. The cultures were incubated in triplicates at 30, 60, 80 and 95°C , as these incubation temperatures were used for the MPN enrichments. The incubation time for each experiment is presented in the following section. After incubation, the cultures were killed by adding borated formaldehyde. The liquid phase was filtered and the total activity of the filters was measured using a liquid scintillation counter.

1) Determination of the optimal incubation time

The optimal incubation time was first determined by realizing kinetics. The aim was to determine the incubation time for which the carbon fixation rates were highest to avoid an underestimation. This preliminary experiment also allowed us to verify that the quantity of radiolabelled substrates added to the cultures was sufficient for the activity to be detectable and quantifiable after incubation at different temperatures.

We hypothesized that there was a correlation between the cell concentration estimated by MPN enrichments and the metabolic activity of carbon incorporation. Hence, for realizing kinetics we have chosen samples and incubation temperatures for which the initial cell

concentration estimated by MPN enrichment were among the lowest and the highest (*Appendix 2*). They were expected to provide an estimation of the probable minimal and maximal values of carbon fixation rates.

During the preliminary experiments with ^{14}C -labelled bicarbonate, the samples M19 Ais 1 and M19 Ais 2 were respectively incubated at 95 and 30°C in triplicates during 0, 15, 46 and 112 hours. For the preliminary experiments with ^3H -labelled leucine, the sample M19 Cap 2 was incubated at 60°C in triplicates during 0, 6, 24 and 53 hours.

For the preliminary experiments with ^{14}C -labelled bicarbonate, the optimal rate of autotrophic carbon fixation was recorded after 15 hours of incubation for the samples M19 Ais 1 and M19 Ais 2 incubated at 95 and 30°C. At 45 and 112 hours the rate decreased. Hence, we have chosen an incubation time of 15 hours for end-point incubations.

For the preliminary experiments with ^3H -labelled leucine, the optimal rate of heterotrophic carbon fixation was recorded after 24 hours of incubation for the sample M19 Cap 2 incubated at 60°C. After a longer incubation time, the rate decreased. Hence, we have chosen an incubation time of 24 hours for end-point cultures.

2) Autotrophic and heterotrophic carbon fixation rates

The results of autotrophic and heterotrophic carbon fixation rates are presented in the **Figure 56**. The concentration of viable culturable cells in the chimney samples estimated from MPN enrichments are recalled on this figure to compare the results from both approaches (section *Carbon fixation rates and cell concentration*).

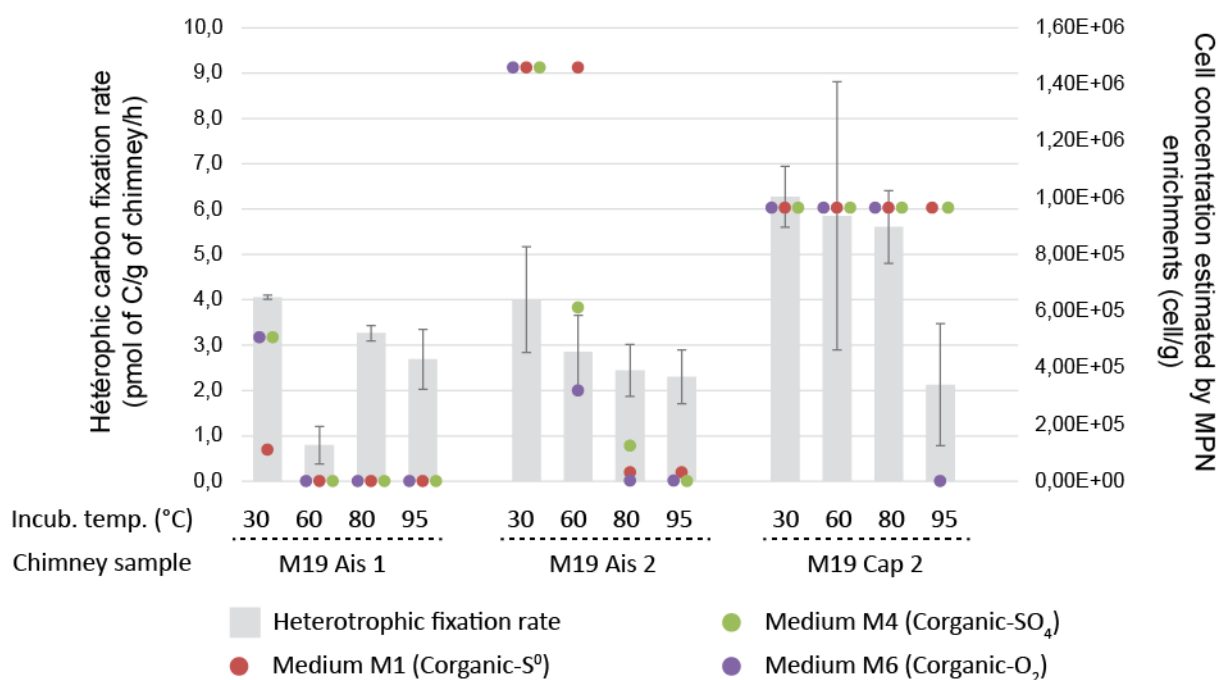
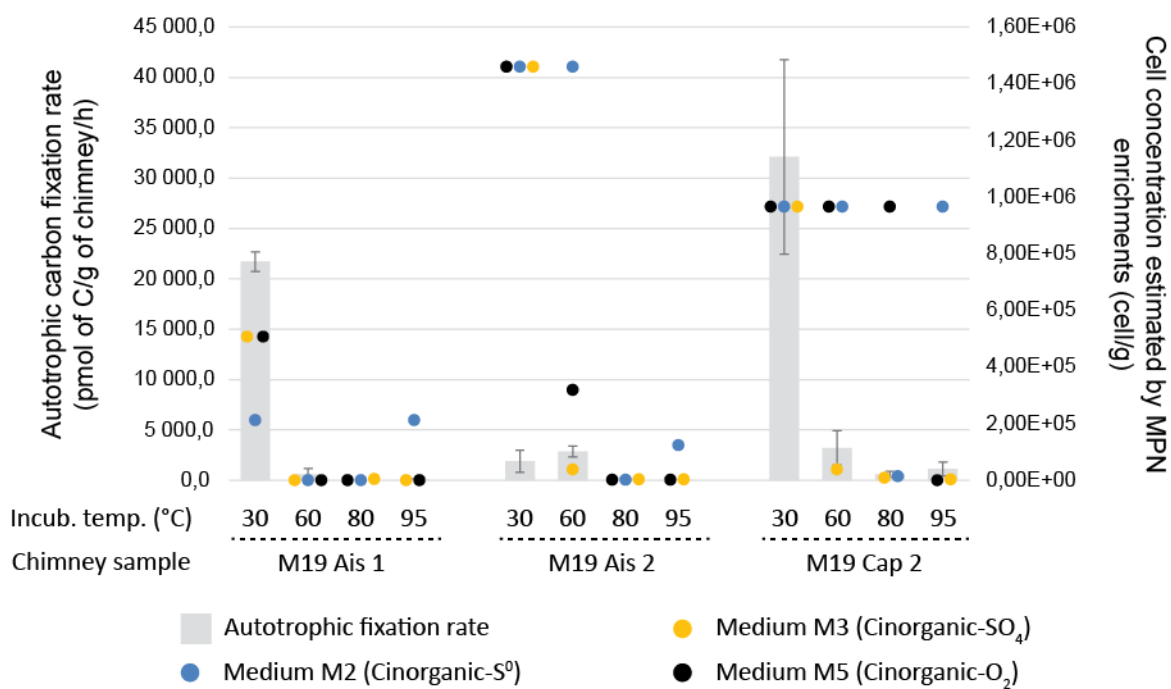


Figure 56 : Autotrophic (top) and heterotrophic (bottom) carbon fixation rates and culturable cell concentration in chimney samples estimated by MPN enrichments. The barplots (left axis) represent the fixation rates (vertical scales are different). Error bars on the barplots represent the standard errors. The points (right axis) represent the culturable cell concentration estimated from the 6 culture media (indicated by the colour of the points). As it was presented in the section **MPN enrichments**, the culturable cell concentration estimated by MPN enrichments was likely higher when the cultures were not diluted to extinction.

Carbon fixation rate by microbial communities from hydrothermal chimneys

Autotrophic carbon fixation rates

The highest autotrophic carbon fixation rate was measured in the cultures inoculated by the sample M19 Cap 2 incubated at 30°C (32100 pmol of C/g of chimney/h). The highest rate from the sample M19 Ais 1 (21700 pmol of C/g of chimney/h) was also measured at an incubation temperature of 30°C. In comparison, the rates were much lower at 60, 80 and 95°C for both samples (up to 3200 pmol of C/g of chimney/h). The results obtained from the cultures inoculated by the sample M19 Ais 2 were contrasted compared to the other samples, as the rate at 30°C was lower than at 60°C (respectively 1880 and 2850 pmol of C/g of chimney/h). In one condition (sample M19 Ais 1, 80°C) the activity measured was lower than the activity of the non-incubated controls, so we considered that no carbon was incorporated by the cells.

Heterotrophic carbon fixation rates

Compared to the autotrophic carbon fixation rate, the heterotrophic rates presented less differences among the incubation temperatures or samples. Indeed, the values were similar between the samples M19 Ais 1 and M19 Ais 2 (from 0,79 to 4,06 pmol of C/g of chimney/h). The rates measured in the cultures inoculated by the sample M19 Cap 2 were higher, by approximately a factor 2 (from 2,1 to 6,3 pmol of C/g of chimney/h). With the exception of the cultures inoculated by the sample M19 Ais 1 incubated at 60°C, the heterotrophic carbon fixation rate globally decreased with the increase of incubation temperature.

Comparison of the autotrophic and heterotrophic carbon fixation rates

The results from the two experiments (with ^{14}C -labelled bicarbonate and ^3H -labelled leucine) were presented in two charts because the scales were different, and mainly because these data should be compared with caution.

Indeed, many experimental parameters have an influence on the measured carbon fixation rates. In the present study, most parameters were similar between the two experiments (incubation temperature, mass of samples used for preparing the slurries...). The main difference concerned the substrates added to the cultures. Indeed, for measuring the autotrophic and heterotrophic carbon fixation rates, we added a few quantity of ^{14}C -labelled bicarbonate or

^3H -labelled leucine that could be considered as negligible and we can assume that it does not bring a sufficient quantity of substrates to stimulate microbial growth. However, the slurries were prepared using artificial anoxic seawater (section *Préparation du milieu de culture*) that contained 30 mM of bicarbonate. Compared to the concentration of bicarbonate in seawater sampled from Lucky Strike vent field (approximately 2 mM, Erwan Roussel personal communication) this concentration is high and it has possibly enhanced the growth of autotrophs. Moreover, the addition of hydrogen as an electron donor could also stimulate the growth of autotrophic hydrogenotrophs and bias the results in favour of autotrophic communities.

Nevertheless, the concentration of bicarbonate in the chimneys slurries was in the same range as the concentration reported in the proximal plume at 80°C of hydrothermal sites from Lucky Strike (Erwan Roussel personal communication). Also, 10 % of hydrogen were present in the gas phase of the vials, at a pressure of 1.4 bar which corresponds to a dissolved concentration of approximately 71 μM . The dissolved concentration of hydrogen in the proximal plume ranged from 20 μM to 600 μM (Erwan Roussel personal communication). Hence the concentrations of substrates added to the cultures (bicarbonate and hydrogen) are similar to the values that can be present in the hydrothermal environment.

Olins *et al.* have reviewed the values of autotrophic carbon fixation rates reported by previous studies (Olins *et al.*, 2013). Due to the influence of the experimental conditions on measured activity (described above) our results will not be compared in detail with the data of previous studies. However, a brief comparison shows that the rates measured in our study are within the range of results reported by previous studies, suggesting that the values obtained with our methods are consistent.

Thus we can compare the results between autotrophic and heterotrophic carbon fixation rates by keeping in mind that the values of carbon fixation rates measured in our experiments do not exactly reflect the metabolic capacities of microbial communities in *in situ* conditions.

The autotrophic carbon fixation rates were comprised between 0 and 32100 pmol of C/g of chimney/h, with an average value of 5360 pmol of C/g of chimney/h. The heterotrophic carbon fixation rates were comprised between 0,8 and 6,3 pmol of C/g of chimney/h with an average value of 3,5 C/g of chimney/h.

Hence we can assume that in the hydrothermal chimneys studied the autotrophic metabolisms contribute to a greater part of the carbon fixation than the heterotrophic metabolisms. Even if these values are concerned by experimental biases, the difference is

significant enough to assume that this tendency likely represents a real phenomenon. Although this tendency seems reasonably clear the experiments were realized in microaerophilic conditions, which only represent the zones of the chimneys that are influenced by seawater. It would also be interesting to reproduce the same experiments without oxygen in order to compare the autotrophic and heterotrophic carbon fixation rates in strict anaerobic conditions.

3) Carbon fixation rates and cell concentration

The **Figure 56** presents the rates of autotrophic and heterotrophic carbon fixation and the cell concentrations estimated by MPN enrichments in media containing inorganic or organic carbon sources.

As it was discussed previously, the initial cell concentration in the chimney samples estimated by MPN enrichments must be interpreted with caution because it only concerns the culturable fraction of the microbial communities, which depend on the culture conditions. However, the results of these two approaches can be put into perspective because some of the culture conditions were similar (chimney samples, artificial seawater as a basis of the culture media and slurries, incubation temperatures...).

Comparison of culture conditions

In some cases the same tendencies were observed between the carbon fixation rates and the results of MPN enrichments, whereas discrepancies were observed in other conditions. The differences can be explained by the culture conditions. Indeed, even if we compare autotrophic and heterotrophic metabolisms in both experiments, a part of the substrates provided varied between the two approaches.

Indeed, for measuring the autotrophic carbon fixation rate we added carbon dioxide, hydrogen and oxygen. The most similar MPN enrichment condition was the medium M5 which contained carbon dioxide, hydrogen, thiosulfate and oxygen. The most relevant difference was the presence of thiosulfate. Even if many hydrogen oxidizers are also sulfur oxidizers (such as *Sulfurimonas* and *Aquificae*) the oxidation of these two substrates does not provide the same amount of energy for metabolic processes (Amend & Shock, 2001) so it could impact the autotrophic carbon fixation rate. The concentrations in carbon dioxide were similar, but the concentrations of hydrogen and oxygen were lower in the activity measurement experiments.

This is especially noticeable in the case of oxygen, that inhibits the growth of strict anaerobes. The oxygen concentration in the gas phase was 4 % in both experiments, but the total gas pressure was lower in the activity measurement experiments (1.4 bar instead of 2 bar). Hence, it is possible that the growth of strict anaerobes was not observed in medium M5 whereas the same microorganisms may have grown and fixed carbon dioxide in the activity measurement experiments. Also, in activity measurement experiments the chimneys slurries were used as culture media whereas in MPN enrichments the slurries were only used as inoculum and were diluted. Thus, it is likely that chimney samples have been an important source of mineral substrates (particularly sulfates or sulfides) in activity measurement experiments compared to MPN enrichments. In this case the supply of substrates by the samples was not determined or measured.

The MPN enrichments conditions that were the most similar to the heterotrophic carbon fixation rate measurement experiments were in the medium M6, in which organic carbon source was provided in the presence of oxygen. The oxygen concentration was lower in activity measurement experiments as it was described above. Also, the organic carbon sources differed because in the medium M6, yeast extract and peptone were provided whereas the sole carbon source in activity measurement experiments was leucine.

Autotrophic carbon fixation rates

The autotrophic carbon fixation rates and culturable cell concentration estimated by MPN enrichments presented similar tendencies as the carbon fixation rates and estimated cell concentration globally decreased with the increase of temperature.

This was especially clear for the sample M19 Ais 1. Indeed, the carbon fixation rate decreased sharply between 30 and 60°C (from 21700 to 580 pmol of C/g of chimney/h) such as the average cell concentration (the mean of results from the three media) which decreased from $4.1 \cdot 10^5$ to $3.18 \cdot 10^2$ cells/g of chimney. At 95°C the carbon fixation rate was much lower (75 pmol of C/g of chimney/h), and it was considered to be zero at 80°C. At these temperatures, no growth was observed in MPN enrichments in the medium M5 containing oxygen.

For the sample M19 Ais 2, the decrease of carbon fixation rate between 30 and 60°C was not observed as the values were similar at these temperatures. Such as for the other samples, the rates were much lower at 80 and 95°C but unlike the sample M19 Ais 1, culturable cell concentration was estimated at approximately $1.2 \cdot 10^3$ cells/g of chimney (medium M5). Hence,

hyperthermophilic and microaerophilic autotrophs were present in the sample but their carbon fixation activity was lower than for mesophiles and thermophiles.

For the sample M19 Cap 2, the carbon fixation rates measured were in the same range as for the sample M19 Ais 1 but the cell concentration estimated by MPN enrichments was much higher. It was not possible to compare the carbon fixation rates and the culturable cell concentration between the different temperatures, because in most cases a growth was observed up to the last dilution.

Heterotrophic carbon fixation rates

As for the autotrophic carbon fixation rates, the heterotrophic rates globally decreased with the increase of temperature, but this decrease was more gradual for the heterotrophic rates and was similar for the three samples.

The heterotrophic carbon fixation rates were very similar for the samples M19 Ais 1 and M19 Ais 2, except for the sample M19 Ais 1 at 60°C that presented a lower rate. However, the cell concentration estimated by MPN enrichments was much higher in the sample M19 Ais 2.

In the sample M19 Ais 1, no growth was observed in MPN enrichments in the media M1 and M6 containing organic carbon sources and respectively elemental sulfur or oxygen as electron acceptor. The cell concentration was estimated to be approximately 1.10^2 cell/g of chimney (medium M4 containing organic carbon sources and sulfate). Hence, we can assume that the heterotrophic carbon fixation was performed by heterotrophic sulfate-reducers that used as electron acceptor the sulfate brought by the slurry sample (by dissolution of anhydrite).

The highest heterotrophic carbon fixation rates at 30, 60 and 80°C were observed with the sample M19 Cap 2. However, as it was described for the autotrophic carbon fixation rates, it was not possible to compare the carbon fixation rates and the culturable cell concentration between the different temperatures because the initial cell concentration was likely higher than our estimation.

4) Discussion

Activity measurement experiments allowed us to estimate the carbon fixation rates by autotrophic and heterotrophic metabolisms. These experiments produced interesting data but these could be influenced by numerous experimental biases because it is challenging to reproduce *in situ* conditions of hydrothermal chimneys. Hence, we could compare the

autotrophic and heterotrophic carbon fixation rates even if these data must be interpreted with caution. On the opposite, the comparison of autotrophic carbon fixation rates between the samples at different temperatures was more reliable because the experiments were conducted in the same conditions. The same applies for heterotrophic carbon fixation rates. A rough comparison to the autotrophic carbon fixation rates reported by previous studies was realized and has shown that the rates measured in our study were in the same range. We also compared the carbon fixation rates to the culturable cell concentration estimated in hydrothermal chimney samples by MPN enrichments. Despite some discrepancies, global tendencies between carbon fixation rates and estimated cell concentration were similar, especially according to the temperature.

For both autotrophic and heterotrophic carbon fixation rates, we have shown that the rates decreased with the increase of temperature excepted for the autotrophic rate with the sample M19 Ais 2.

This decrease was sharp between 30 and 60°C for the autotrophic carbon fixation rates with the samples M19 Ais 1 and M19 Cap 2 (respectively by a factor 37 and 10), and the rate was even lower after incubation at 80 and 95°C. The physico-chemical conditions in hydrothermal vents may explain this observation. Indeed, the hot and anoxic hydrothermal fluid mixes with cold and oxygenated seawater. Hence, with the increase of temperature, the oxygen concentration decreases. We could assume that the autotrophic microbial communities are dominated by microaerophilic mesophiles due to a depletion of oxygen at high temperature. It would be a good explanation for our observations because the experiments were performed in microaerophilic conditions. However, Olins *et al.* have reported similar results with incubations performed in anaerobic conditions (Olins *et al.*, 2013). Chimneys slurries from the Juan de Fuca Ridge were incubated at 4, 25, 50 and 90°C in the presence of sulfide (2 mM) and sulfate (14 mM) without oxygen. The autotrophic carbon fixation rate also decreased with the increase of incubation temperature, and a factor of approximately 10 was reported between the incubations at 25 and 50 or 90°C. This factor is in the same range as what we have reported.

Hence, the decrease of autotrophic carbon fixation rates with the increase of temperature seems to concern both aerobic and anaerobic metabolisms. We can therefore assume that it was not only the oxygen concentration which was limiting in the carbon fixation processes at temperatures higher than 30°C. Moreover, numerous autotrophs isolated from hydrothermal vents are facultative anaerobes than can also grow and incorporate inorganic carbon in the absence of oxygen if other electron acceptors like sulfate, nitrate or elemental sulfur are present.

The results of MPN enrichments have shown that the culturable cell concentration significantly decreased with the increase of temperature. For the sulfate chimney samples (like M19 Ais 1), the decrease was sharp between 30 and 60°C. For the sulfide chimney samples (M19 Ais 2 and M19 Cap 2) the decrease was also significant but this tendency was less clear because the cell concentration was possibly higher than our estimations. Moreover, previous studies have already reported a lower concentration of thermophiles and hyperthermophiles in chimneys compared to mesophiles (Harmsen *et al.*, 1997, Takai *et al.*, 2001, Schrenk *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2014). Hence we can assume that it is probably the high concentration of mesophilic microorganisms that explain the higher carbon fixation rate at 30°C than at 60, 80 and 95°C.

The decrease of heterotrophic carbon fixation rates with the increase of temperature was more gradual than for the autotrophic rates. However, the link between culturable cell concentration and temperature estimated by media containing inorganic or organic carbon sources was similar. Hence the results of MPN enrichments do not explain this observation.

A comparison of autotrophic and heterotrophic carbon fixation rates has shown that the autotrophic metabolisms seemed to be the dominant processes of carbon fixation in hydrothermal chimneys. However, these data must be compared with caution because the experimental protocols were different, and were only realized in the presence of oxygen thus it does not necessarily represent the carbon fixation rates by microbial communities from an hydrothermal chimney in *in situ* conditions.

Although MPN enrichments results have shown significant qualitative and quantitative differences between microbial communities from sulfate and sulfide chimney samples, this tendency was not reported by the activity measurement experiments.

Instead, the heterotrophic carbon fixation rates were similar between samples M19 Ais 1 and M19 Ais 2, and the autotrophic carbon fixation rate at 30°C was even higher for the sample M19 Ais 1. In most conditions the carbon fixation rates were higher for the sample M19 Cap 2 compared to the two other samples. However this difference was low compared to the difference in culturable cell concentration estimated by MPN enrichments, because in many cases the cultures inoculated by the sample M19 Cap 2 were not diluted to extinction after 5 tenfold dilutions, indicating that the initial cell concentration was much higher in this sample compared to M19 Ais 1 and M19 Ais 2.

The data obtained by MPN enrichments and activity measurements experiments are discussed in relation to the metabarcoding results and discussed in the *Chapter VII*.

Chapitre VI - Enrichissement et caractérisation de nouveaux phylotypes

1) Enrichissement et isolement de *Bacteria* sulfo-oxydantes

1) Contexte de l'étude

Il a été décidé de réaliser des cultures d'enrichissement et d'isolement suite à des résultats préliminaires obtenus durant mon stage de Master 2 (François, 2017). Une étude de diversité avait été menée par clonage-séquençage des gènes codant les ARNr 16S sur trois échantillons prélevés sur la cheminée Aisics (M15 Aisics, M16 Ais 2 et MM1E2) afin d'identifier les communautés de *Bacteria* et d'*Archaea*. Parmi les communautés de *Bacteria*, la majorité des séquences (59 %) étaient affiliées à des *Gammaproteobacteria*, dont une partie (21 % des séquences totales) ont été identifiées par le programme d'analyse Mothur comme appartenant à des phylotypes proches du genre *Thiomicrospira* (Kuenen & Veldkamp, 1972), des *Bacteria* chimio-autotrophes sulfo-oxydantes mésophiles faisant partie des premiers microorganismes isolés des sources hydrothermales (Jannasch et al., 1985). La taxonomie de ce genre a ensuite été actualisée, et les espèces ont été reclassées parmi les genres *Thiomicrospira*, *Thiomicrothrix* et *Hydrogenovibrio* (Boden et al., 2017).

La réalisation d'arbres phylogénétiques à partir des séquences de la banque de clones a permis de préciser la position phylogénétique des phylotypes présents dans les échantillons de cheminées hydrothermales. La **Figure 57** montre que ces phylotypes ne semblent pas appartenir au genre *Thiomicrospira*, mais sont regroupés entre eux, et avec des séquences environnementales provenant également de milieux hydrothermaux. La séquence environnementale la plus proche des OTUs de la banque de clone (KX133706) provient également d'un échantillon du site Lucky Strike (Rommevaux *et al.*, 2019). Ces résultats indiquent que ces microorganismes pourraient appartenir à un nouveau genre non décrit, proche des genres *Thiomicrospira*, *Thiomicrothrix* et *Hydrogenovibrio*.

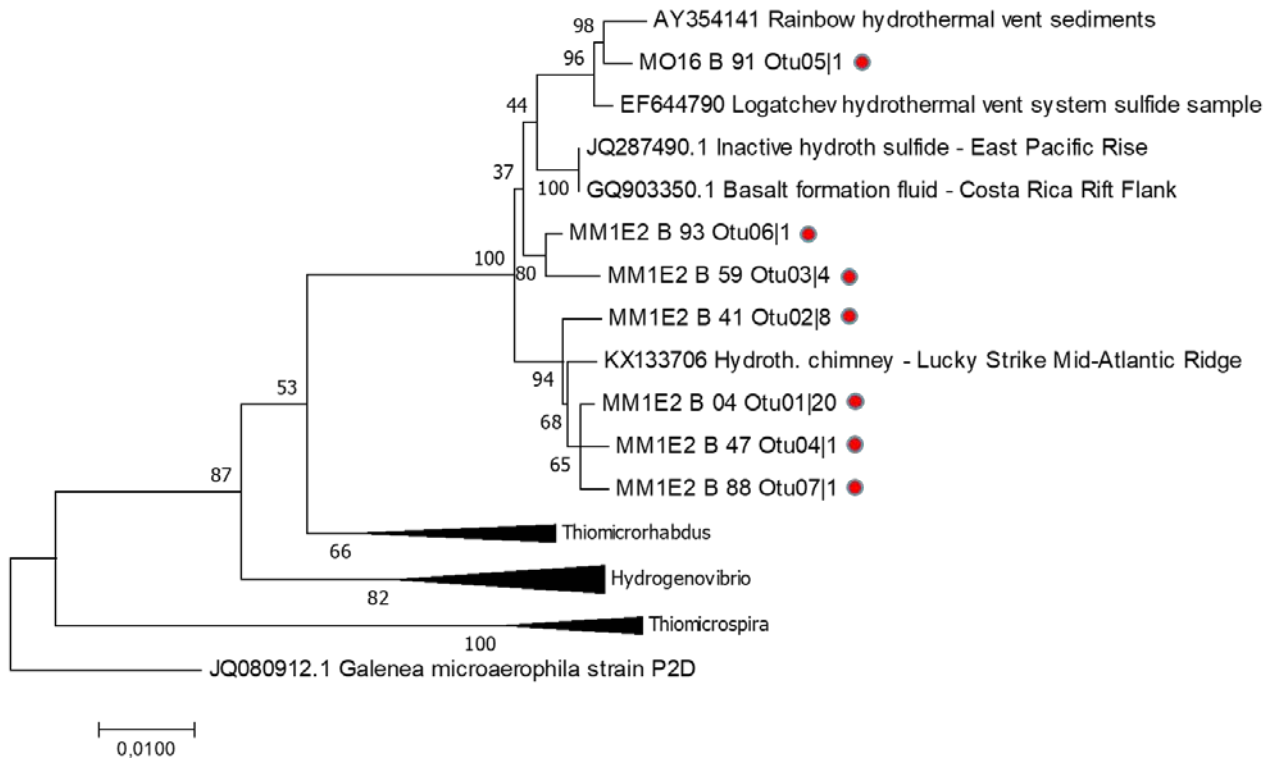


Figure 57 : Arbre phylogénétique construit à partir des séquences des gènes codant les ARNr 16S (726 pb) de souches proches du genre *Thiomicrospira*, réalisé avec la méthode du Neighbor-Joining et la correction de Jukes-Cantor, en réalisant 500 bootstraps. Les séquences provenant de la banque de clones sont accolées d'un point rouge. Le nombre à droite du numéro d'OTU indique le nombre de séquences composant l'OTU. Les séquences environnementales provenant des bases de données sont nommées d'après leur numéro d'accèsion, et leur origine géographique ainsi que le type d'échantillon dont elles proviennent sont précisés. Les séquences appartenant aux genres *Thiomicrospira*, *Thiomicrorhabdus* et *Hydrogenovibrio* ont été regroupées afin de faciliter la visualisation.

Etant donné que ces phylotypes étaient majoritaires dans la banque de clones de *Bacteria* de l'échantillon MM1E2 (la base de la cheminée Aisics prélevée en 2008, constituée majoritairement de sulfures) et qu'ils appartiennent potentiellement à un nouveau genre bactérien, des cultures d'enrichissement ont été mises en place afin d'obtenir des informations fonctionnelles les concernant, et de mieux comprendre leur rôle dans l'écosystème.

La première étape de cette étude était de choisir des conditions de culture, qui favoriseraient la croissance de ces microorganismes. A partir de leur position phylogénétique, nous avons émis l'hypothèse que leurs conditions optimales de croissance seraient proches de celles des membres des genres *Thiomicrospira*, *Thiomicrorhabdus* et *Hydrogenovibrio*. Une étude bibliographique a permis de réunir ces informations (Brinkhoff & Muyzer, 1997, Brinkhoff *et al.*, 1999, Brinkhoff *et al.*, 1999, Takai *et al.*, 2004, Knittel *et al.*, 2005, Sorokin *et al.*, 2006, Watsuji *et al.*, 2016). Les températures optimales de croissance des souches décrites

sont comprises entre 10 et 40 °C, et le pH optimal entre 6 et 8. La majorité des espèces appartenant à ces genres utilisent comme source d'énergie des composés soufrés (thiosulfate, tétrathionate, soufre élémentaire ou sulfite) et réduisent l'oxygène en conditions microaérophiles (concentration en oxygène inférieure à la concentration dans l'air, 21 %). L'eau de mer artificielle (section *Préparation du milieu de culture*) a été choisie comme base de milieu de culture, afin de fournir une salinité adéquate pour des microorganismes marins, et pour apporter du carbone inorganique sous forme de bicarbonate nécessaire à la croissance des autotrophes. Les conditions de culture décrites dans la section *Enrichissement et isolement de Bacteria sulfo-oxydantes* ont été déterminées en compilant toutes ces informations.

2) Identification des phylotypes cultivés

1) Cultures d'enrichissement

Un criblage des cultures par PCR a été réalisé en utilisant des amorces spécifiques aux phylotypes d'intérêt afin de déterminer si l'un de ces phylotypes avait été enrichi. Une identification par clonage-séquençage aurait permis une identification plus précise, cependant cette approche n'a pas été sélectionnée car elle était trop onéreuse et longue à mettre en place à cause des nombreuses conditions de culture. Après avoir sélectionné *in silico* des couples d'amorces spécifiques (**Tableau 4**), les conditions de PCR ont été optimisées afin d'améliorer la spécificité des amplifications et éviter les faux-positifs. La mise au point a consisté à déterminer expérimentalement la température d'hybridation pour laquelle les amorces sont spécifiques aux séquences des gènes codant les ARNr 16S des phylotypes ciblés. Les amorces ont été testées pour des températures de 58 °C à 63 °C avec un pas de 1 °C en intégrant un témoin négatif et un témoin positif (respectivement des plasmides portant les gènes codant les ARNr 16S d'un phylotype associé au genre *Nitratiruptor* et à un phylotype proche du genre *Thiomicrospira*). Les résultats des tests d'optimisation des couples d'amorces Tms469F-Tms641R et Tms439F-Tms642R sont présentés sur la **Figure 58**. Les couples d'amorces pour lesquels des hybridations non spécifiques ont été obtenues, pour toutes les températures testées (de 52 à 63 °C), n'ont pas été conservés.

Le couple d'amorces Tms469F-Tms641R (**Figure 58**) a permis d'amplifier le témoin positif, mais des bandes aussi intenses ont été obtenues pour le témoin négatif jusqu'à une température de 61 °C. A 62 et 63 °C, le témoin négatif est toujours amplifié, mais les bandes

sont moins intenses. A l'inverse, le couple Tms439F-Tms642R (**Figure 58**) a amplifié de manière très spécifique le témoin positif à des températures de 62 et 63 °C et les bandes aspécifiques obtenues aux températures inférieures sont très faibles.

Une fois la température d'hybridation optimale déterminée, la spécificité des couples d'amorces a été testée sur tous les plasmides disponibles (3 témoins positifs : phylotypes proches du genre *Thiomicrospira* ; 9 témoins négatifs : phylotypes proches des genres *Thiomicrospira*, *Nitratiruptor*, : *Persephonella*, *Desulfobulbus*, *Vulcanithermus*, *Thioprofundum* ou appartenant aux taxa *Gammaproteobacteria*, *Rhodobacteraceae* ou *Gammaproteobacteria*). Les résultats pour le couple d'amorces Tms439F-Tms642R sont présentés sur la **Figure 59**, suite à une PCR réalisée en présence d'autres témoins négatifs, avec une température d'hybridation de 64 °C. Les amorces amplifient correctement les témoins positifs (puits 1 à 3) mais également plusieurs témoins négatifs (puits 4, 5, 6, 8 et 9), pour lesquels les bandes sont moins intenses.

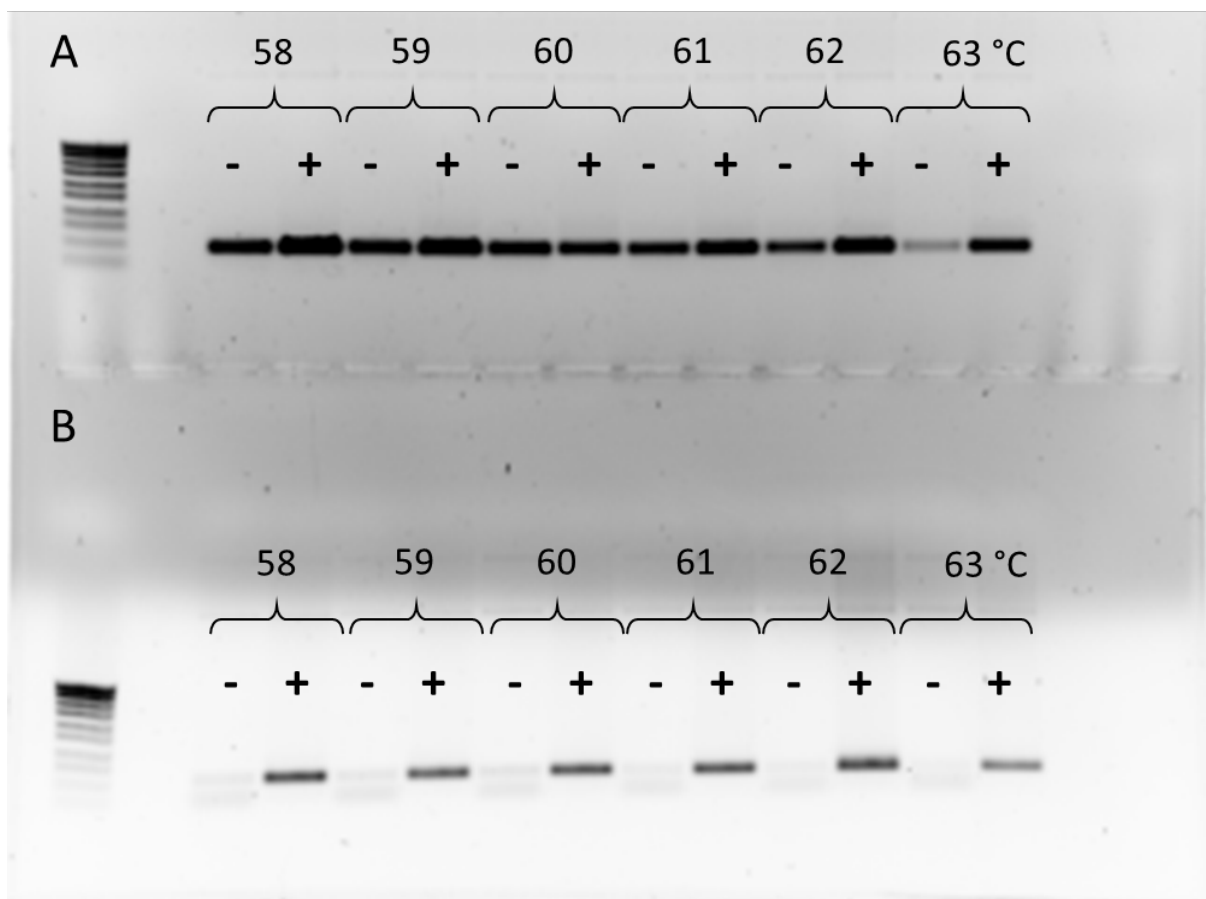


Figure 58 : Photographie d'un gel d'électrophorèse. A : amorces Tms469F-Tms641R ; B : amorces Tms439F-Tms642R ; la température d'hybridation testée est notée au-dessus des puits ; - : témoins négatifs ; + : témoins positifs. Marqueurs de taille sur la gauche : SmartLadder SF (Eurogentec)

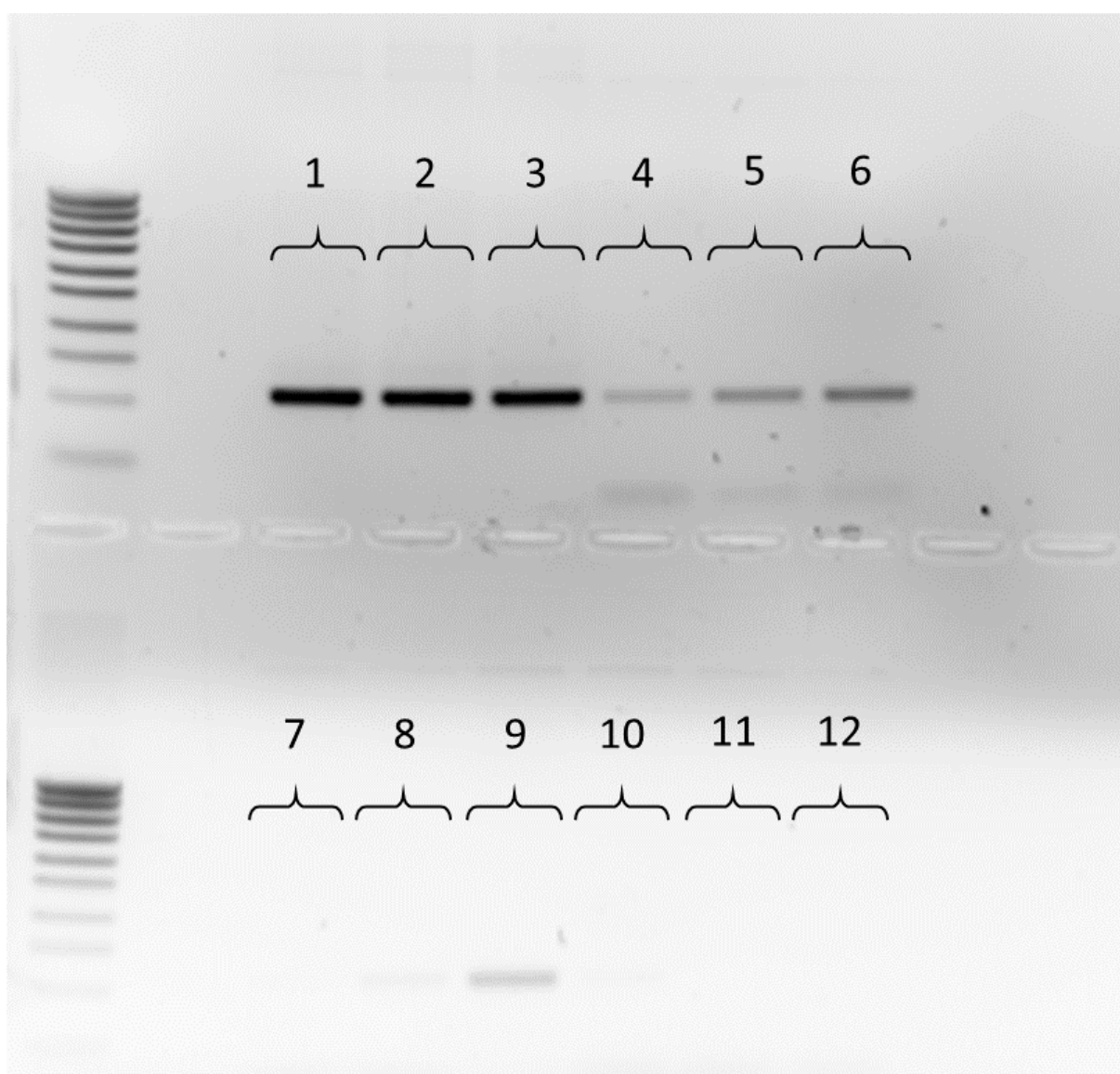


Figure 59 : Photographie d'un gel d'électrophorèse. Les numéros correspondent aux plasmides testés en PCR avec le couple d'amorces Tms439F-Tms642R : 1 à 3 : Phylotypes proches du genre *Thiomicrospira* ; 4 : *Nitratiruptor* ; 5 : *Persephonella* ; 6 : *Desulfobulbus* ; 7 : *Vulcanithermus* ; 8 : *Gammaproteobacteria* ; 9 : *Rhodobacteraceae* ; 10 : *Gammaproteobacteria* ; 11 et 12 : *Thiopfundum*. Marqueurs de taille sur la gauche : *SmartLadder SF* (Eurogentec)

Ces tests étant réalisés sur des ADN plasmidiques concentrés (10 à 80 ng/μL), les conditions sont différentes lorsque les PCR sont réalisées sur des ADN extraits à partir de cultures d'enrichissement dont la concentration mesurée est de l'ordre de 1 ng/μL. Afin de continuer la mise au point dans des conditions expérimentales plus proches des conditions de criblage des cultures, les plasmides ont été dilués au 1/20^{ème} et la spécificité des amorces a été de nouveau testée.

Dans ces conditions, les couples d'amorces Tms469F-Tms641R et Tms439F-Tms642R ont amplifié de manière spécifique les plasmides contenant les séquences de gènes codant les ARNr16S affiliées au genre *Thiomicrospira*, et n'ont pas amplifié les témoins négatifs. Les cultures d'enrichissement ont donc été criblées à l'aide de ces amorces, cependant aucune amplification n'a été observée, indiquant que les phylotypes ciblés n'ont probablement pas été enrichis. Trois causes sont envisagées : les conditions de culture mises en place n'étaient pas adaptées à ces phylotypes, ce qui invaliderait notre hypothèse de travail selon laquelle ces phylotypes se développent dans des conditions adaptées aux genres *Thiomicrospira*, *Thiomicrothabodus* et *Hydrogenovibrio*. La seconde possibilité est que la méthode de criblage par PCR n'a pas permis d'identifier les phylotypes, même s'ils ont été enrichis et ce, malgré les étapes d'optimisation des amorces. Enfin, il est possible que d'autres microorganismes se soient développés plus rapidement et aient empêché la croissance des phylotypes ciblés.

Plusieurs solutions peuvent être envisagées afin de poursuivre cet effort d'enrichissement. Une approche de métagénomique, réalisée sur des échantillons où ces phylotypes sont détectés permettrait de reconstruire les génomes de ces phylotypes à partir des métagénomes. À partir des génomes, des informations putatives sur le métabolisme ou la physiologie peuvent être obtenues, notamment la capacité à utiliser certains substrats. Cela servirait à mettre en place des conditions de culture plus propices à leur croissance. Pour éviter une concurrence avec d'autres souches se développant dans les mêmes conditions, les cultures d'enrichissement peuvent être réalisées à partir de volumes d'inoculum plus faibles. Ainsi, les phylotypes seraient séparés de manière aléatoire dès les premières étapes d'enrichissement et n'entreraient pas en compétition. Une telle approche nécessiterait de multiplier les réplicats afin d'augmenter les probabilités d'enrichir les phylotypes d'intérêt. Afin de détecter leur présence dans les cultures d'enrichissement, l'approche suivie précédemment qui impliquait l'utilisation d'amorces spécifiques en PCR pourrait être améliorée en réalisant des PCR quantitatives avec ces mêmes amorces.

2) Cultures d'isolement

Parallèlement à l'identification par criblage PCR avec les amorces spécifiques dans les cultures d'enrichissement, trois d'entre elles ont été sélectionnées pour réaliser des cultures d'isolement :

- Une culture (N°12) incubée à 30 °C, sous une atmosphère composée de N₂:CO₂:O₂ (40:40:20), comprenant du thiosulfate (2 g/L) comme source d'énergie

- Une culture (N°12) incubée à 30 °C, sous une atmosphère composée de N₂:CO₂:O₂ (40:40:20), comprenant du thiosulfate (10 g/L) comme source d'énergie. Les microorganismes enrichis dans les cultures N°12 et N°14 présentaient des morphologies de spirilles, ce qui est également le cas des souches appartenant aux genres ciblés (*Thiomicrospira*, *Thiomicrothabodus* et *Hydrogenovibrio*).

- Une culture (N°12) incubée à 60 °C sous une atmosphère composée de N₂:CO₂ (80:20) dans laquelle 1 mL d'air avait été ajouté à la seringue, comprenant du thiosulfate (2 g/L) comme source d'énergie. Les microorganismes enrichis dans cette condition présentaient principalement des morphologies de coques ou de courts bacilles.

Les séquences obtenues par séquençage Sanger des gènes codant les ARNr 16S des isolats issus des enrichissements 12 et 14 ont permis de déterminer leur position phylogénétique. Ces deux isolats sont affiliés au genre *Thiopfundum* (**Figure 60**). Ce genre comporte 2 espèces décrites : *T. lithotrophicum* et *T. hispidum* (Takai *et al.*, 2009, Mori *et al.*, 2011) qui ont été isolées de cheminées hydrothermales, comme certains représentants des genres *Thiomicrospira*, *Thiomicrothabodus* et *Hydrogenovibrio* (Boden *et al.*, 2017). Ce sont des microorganismes chimiolithoautotrophes qui oxydent les composés soufrés en conditions de micro-aérophilie ou en anaérobiose en réduisant les nitrates. Leurs températures optimales de croissance sont supérieures à celles des membres des genres *Thiomicrospira*, *Thiomicrothabodus* et *Hydrogenovibrio*, 50 °C et 39 °C respectivement. Ces caractéristiques physiologiques expliquent pourquoi les isolats N°12 et N°14 ont été enrichis et isolés dans des conditions de culture ciblant les trois genres cités précédemment. De par leur proximité phylogénétique à l'espèce *T. lithotrophicum* (respectivement 99,72 et 99,58 % de similarité pour les séquences des gènes codant les ARNr 16S), les isolats N°12 et N°14 n'appartiennent probablement pas à une nouvelle espèce du genre *Thiopfundum*, ils n'ont donc pas fait l'objet de caractérisation (le seuil accepté pour séparer les espèces sur la base de leurs séquences des gènes ribosomiaux 16S étant de 98,7 % (Chun *et al.*, 2018)). Ces isolats ont été ajoutés à la collection de microorganismes du LM2E, sous les appellations MO1338 et MO1339 respectivement.

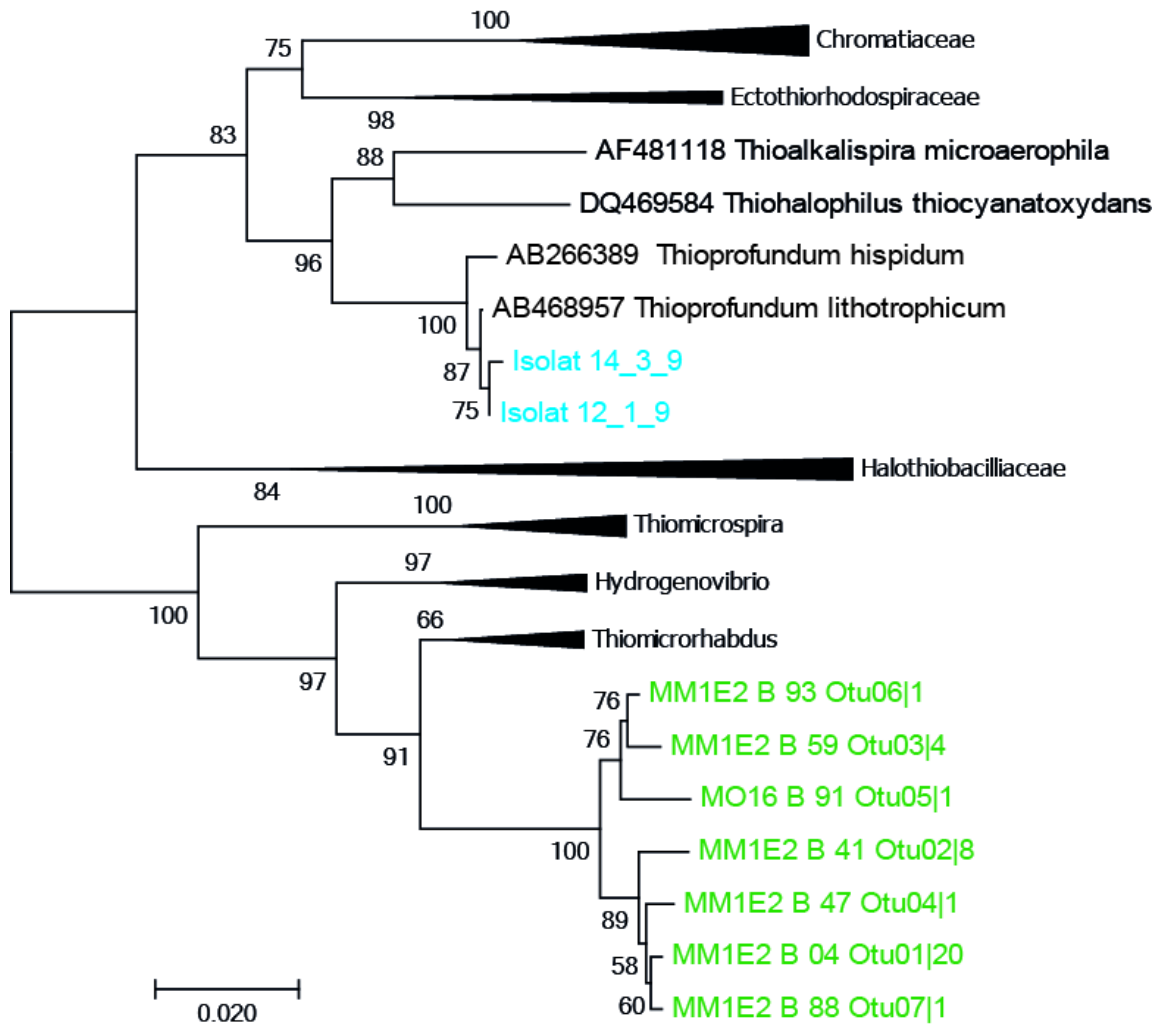


Figure 60 : Arbre phylogénétique des séquences des gènes ribosomiaux 16S (726 pb), réalisé avec la méthode du Neighbor-Joining et la correction de Jukes-Cantor, en réalisant 500 bootstraps. Les séquences provenant de la banque de clones sont notées en vert. Les noms des séquences des souches isolées sont notés en bleu. Les noms des séquences issues des bases de données sont notés en noir, avec leur numéro d'accèsion. Des séquences ont été regroupées par genre ou famille afin de faciliter la visualisation.

La souche isolée à partir de la culture N°26 a été identifiée comme appartenant au genre *Persephonella* (Götz et al., 2002). Le pourcentage de similarité entre les gènes codant les ARNr 16S de la souche isolée et de la souche décrite la plus proche, *P. hydrogeniphila* (Nakagawa et al., 2003) étant de 95,5 %, cette souche pouvait potentiellement représenter une nouvelle espèce du genre *Persephonella* et a donc fait l'objet d'un travail de caractérisation. Cette souche a été déposée dans la collection de microorganismes de l'Ifremer sous l'appellation MO1340, à l'UBO Culture Collection¹ (= UBOCC-M-3359)⁷ et à la Japan Collection of Microorganisms (= JCM 34026).

⁷ <https://www.univ-brest.fr/ubocc/>

2) Description de la souche *Persephonella* MO1340

1) Caractéristiques morphologiques

Des observations au microscope à contraste de phase ont régulièrement été réalisées afin de vérifier la pureté de la souche MO1340, repérable par sa morphologie de bacille de petite taille. Lors de ces observations, le caractère motile de la souche a été mis en évidence. La proportion de cellules motiles était plus élevée lorsque la souche était cultivée dans un milieu contenant du soufre élémentaire, en comparaison aux autres substrats (thiosulfate ou hydrogène).

Les observations réalisées au microscope électronique à transmission ont permis de confirmer que la souche MO1340 présente une morphologie de type bacille. C'est également le cas des espèces précédemment caractérisées, *P. marina* et *P. guaymasensis*, et de *P. hydrogeniphila* lorsque cette dernière est cultivée sous agitation (Götz *et al.*, 2002, Nakagawa *et al.*, 2003). Tout comme ces trois souches, MO1340 présente une ciliature monotriche (**Figure 61**). Même si environ un tiers des cellules observées au microscope électronique à transmission possédaient un flagelle après incubation en présence de thiosulfate, le caractère motile a rarement été observé en comparaison de la souche *P. hydrogeniphila* 29^T (=DSM 15103) dont quasiment toutes les cellules étaient motiles. C'est lors des incubations en présence de soufre élémentaire que la plus forte proportion de cellules motiles a été observée chez la souche MO1340. Les dimensions moyennes des cellules sont de 1,4 à 2,2 µm de longueur pour 0,5 à 0,8 µm de largeur et sont ainsi plus petites que les cellules des trois autres souches caractérisées (**Tableau 1** de l'article présenté dans la section *Valorisation des travaux de caractérisation de la souche *Persephonella atlantica* MO1340*).

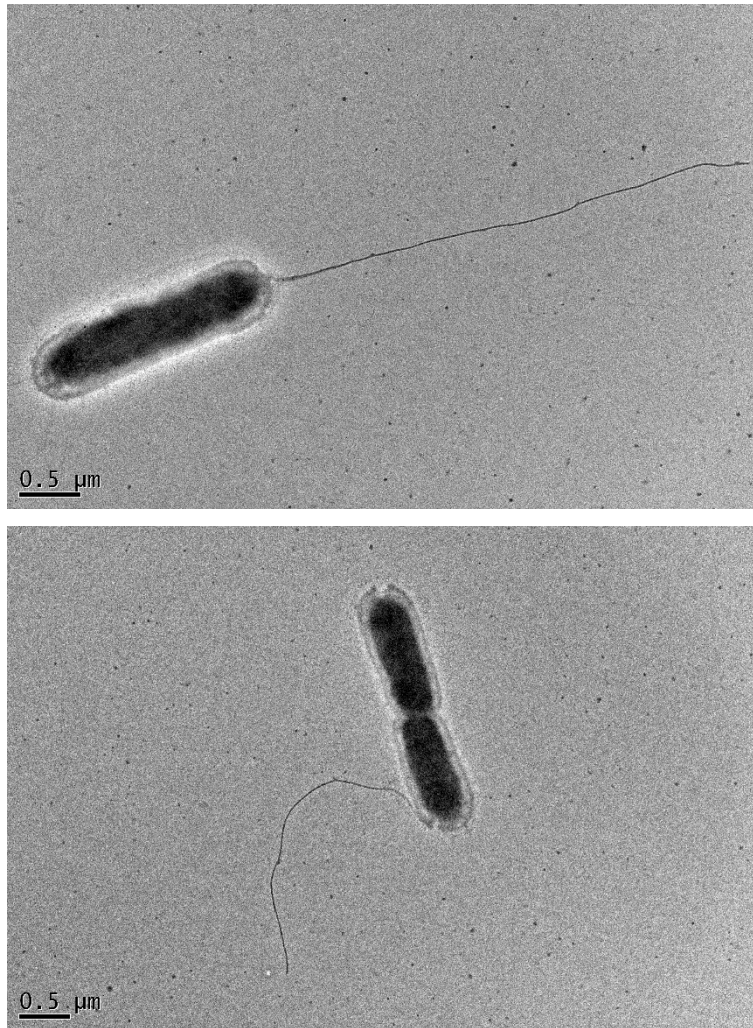


Figure 61 : Cellules de la souche MO1340 observées au microscope électronique à transmission ; en haut : cellule seule avec un flagelle ; en bas : cellule en division avec un flagelle ; barre d'échelle : 0,5 μm

2) Caractéristiques physiologiques et métaboliques

1) Détermination des conditions optimales de croissance

Une première détermination des conditions optimales de croissance de la souche MO1340 a été réalisée sur le milieu d'eau de mer artificielle présenté précédemment, supplémenté en thiosulfate (10 mM), en commençant par la détermination de la température optimale de croissance. Le taux de croissance le plus élevé ($0,38 \text{ h}^{-1}$) a été observé pour une température de $70 \text{ }^\circ\text{C}$. En deçà de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ et au-delà de $80 \text{ }^\circ\text{C}$, la souche ne se développe plus et les cellules sont de plus petite taille, en forme de coccobacilles.

La tolérance et les besoins en oxygène de la souche ont ensuite été déterminés en point final par dénombrement cellulaire au microscope après une nuit d'incubation à 70 °C. Dans ces conditions, la souche MO1340 croît de manière optimale pour une concentration en oxygène de 7 % (concentration dans la phase gazeuse, à une pression de 1,5 bar soit 59,8 µM d'oxygène dissous) et la limite de tolérance à l'oxygène est de 20 % (170,9 µM dissous). Le pH optimal et la concentration optimale en NaCl ont également été déterminés en point final. Les limites minimale et maximale de pH permettant la croissance de la souche sont respectivement de 5,3 et 7 et le pH optimal est de 6,5. Une croissance est observée pour des concentrations en NaCl de 1,5 à 4,5 %, avec un optimum à 2,5 %, ce qui correspond à environ la concentration en NaCl de l'eau de mer.

Par la suite, une nouvelle expérimentation a été mise en place pour déterminer la température optimale de croissance en présence de substrats différents. De l'hydrogène a été utilisé comme donneur d'électrons (phase gazeuse composée de H₂:CO₂ ; 80:20 ; 2 bar soit 820,7 µM d'hydrogène dissous) et du nitrate (8 mM) comme accepteur d'électrons, en condition anaérobie. Contrairement à la première expérimentation, avec le couple S₂O₃²⁻/O₂, le taux de croissance le plus élevé (0,50 h⁻¹) a été observé pour une température de 75 °C.

Enfin, la concentration optimale en oxygène ainsi que la température optimale de croissance ont été déterminées pour deux autres couples d'oxydo-réduction : S⁰/O₂ et H₂/O₂. En présence de soufre élémentaire et d'oxygène, la souche présente un taux de croissance optimal (0,56 h⁻¹) à 65 °C pour une concentration optimale en oxygène de 14 % (119,7 µM dissous). En présence d'hydrogène et d'oxygène, la souche présente un taux de croissance optimal (0,22 h⁻¹) à 70-75 °C pour une concentration optimale en oxygène de 1 % (11,4 µM dissous). Les limites minimale et maximale de température, ainsi que la tolérance à l'oxygène sont également différentes dans ces deux conditions : 50 à 75 °C et croissance avec 21 % d'oxygène (179,5 µM dissous) dans la condition S⁰/O₂ ; et 55 à 80 °C avec une tolérance à 5 % d'oxygène (57 µM dissous) dans la condition H₂/O₂. L'analyse détaillée de ces résultats ainsi que les implications écologiques sont détaillées dans les sections *Physiologie de la souche MO1340 et implications écologiques*. Ces résultats expérimentaux sont résumés dans le **Tableau 12**.

Tableau 12 : Valeurs optimales de croissance et gammes de tolérance de la souche MO1340 pour quatre paramètres (température, concentration en O₂, pH et salinité) en fonction des substrats.

Paramètres	Substrats	Gamme / Tolérance	Optimum
Température (°C)	S ⁰ /O ₂	50 - 75	65
	S ₂ O ₃ ²⁻ /O ₂	45 - 80	70
	H ₂ /O ₂	55 - 80	70 - 75
	H ₂ /NO ₃	45 - 80	75
[O ₂] (µM dissous / % phase gazeuse)	S ⁰ /O ₂	> 179,5 / > 21	119,7 / 14
	S ₂ O ₃ ²⁻ /O ₂	170,9 / 20	59,8 / 7
	H ₂ /O ₂	57 / 5	11,4 / 1
pH	S ₂ O ₃ ²⁻ /O ₂	5,3-7	6,5
[NaCl] (%)	S ₂ O ₃ ²⁻ /O ₂	1,5-4,5	2,5

2) Caractéristiques métaboliques

a) Sources de carbone et donneurs d'électrons

Seuls les couples d'oxydo-réduction cités précédemment (S₂O₃²⁻/O₂; S⁰/O₂; H₂/O₂; H₂/NO₃) ont permis une croissance autotrophe de la souche MO1340, avec du CO₂ comme source de carbone. Les autres donneurs d'électrons (formate, acide succinique, fer ferreux, acétate, chlorure d'ammonium) ou accepteurs d'électrons (sulfite, nitrite, fer ferrique, soufre élémentaire, acétate, thiosulfate) n'ont pas été utilisés par la souche MO1340. Aucune croissance hétérotrophe ou mixotrophe n'a été observée avec les sources de carbone organique testées (extrait de levure, peptone, glucose, sucrose, fructose, lactose, sorbitol).

En absence de vitamines, une croissance a été observée, elle est comparable à la croissance en présence de vitamines. Cette souche pratique donc un métabolisme autotrophe strict selon la définition de Srinivasan *et al.*, c'est-à-dire qu'elle ne nécessite pas d'apport de vitamines ni de chélateurs organiques pour sa croissance (Srinivasan *et al.*, 2012).

b) Etude des voies métaboliques

Les réactions métaboliques catalysées par la souche MO1340 ont été étudiées en quantifiant les métabolites dans des cultures en phase stationnaire à l'état d'équilibre, c'est-à-dire lorsque la consommation des substrats et la production des produits métaboliques sont en proportions stœchiométriques. Les résultats expérimentaux sont présentés dans le **Tableau 13**. Les moyennes des quantités de matière de chaque métabolite ainsi que les écart-types ont été calculés à partir des mesures réalisées sur 3 à 10 réplicats. La consommation et la production des métabolites ont été calculées en soustrayant la quantité initiale (dans des fioles témoin non inoculées) à la quantité finale (dans les cultures après incubation).

Tableau 13 : Quantités initiales et finales mesurées des métabolites consommés et produits pendant les cultures en point final de la souche MO1340.

Substrats	Substrat Produit	Etat initial		Etat final		Consommation / Production n (mmol)
		n (mmol)	écart-type	n (mmol)	écart-type	
S ₂ O ₃ ²⁻ /O ₂	S ₂ O ₃ ²⁻	0,123	0,002	0,110	0,004	-0,013
	O ₂	0,051	0,001	0,024	0,021	-0,027
	<u>SO₄²⁻</u>	0,000	0,000	0,027	0,009	0,027
S ⁰ /O ₂	O ₂	0,358	0,001	0,263	0,004	-0,095
	<u>SO₄²⁻</u>	0,001	0,000	0,075	0,002	0,075
H ₂ /O ₂	H ₂	0,752	0,016	0,743	0,001	-0,009
	O ₂	0,011	0,000	0,000	0,000	-0,010
H ₂ /NO ₃	H ₂	0,771	0,001	0,518	0,036	-0,254
	NO ₃ ⁻	0,163	0,001	0,061	0,019	-0,102
	<u>N₂</u>	0,013	0,003	0,065	0,008	0,053

A partir des données présentées dans le **Tableau 13**, les rapports entre la consommation et la production des métabolites ont été calculés. Ces valeurs ont ensuite été comparées aux rapports stœchiométriques des réactions décrites dans la littérature. Un exemple est présenté ci-dessous pour la réaction d'oxydation de l'hydrogène, avec réduction du nitrate en azote.

Quantités de substrats consommés et de métabolites produits :

H₂ consommé : - 0,254 mmol

NO₃⁻ consommé : - 0,102 mmol

N₂ produit : 0,053 mmol

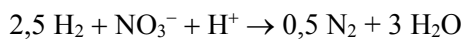
Rapports stœchiométriques calculés :

Rapport H₂ / N₂ : - 0,254 / 0,053 = - 4,79

Rapport H₂ / NO₃⁻ : - 0,254 / - 0,102 = 2,49

Rapport NO₃⁻ / N₂ : - 0,102 / 0,053 = - 1,92

Une réaction d'oxydation de l'hydrogène, avec réduction du nitrate en azote est présentée par Amend et al. (Amend & Shock, 2001) selon l'équation réactionnelle ci-dessous :



En calculant les mêmes rapports que précédemment, les valeurs suivantes sont obtenues :

Rapport H₂ / N₂ : - 2,5 / 0,5 = - 5

Rapport H₂ / NO₃⁻ : - 2,5 / - 1 = 2,5

Rapport NO₃⁻ / N₂ : - 1 / 0,5 = - 2

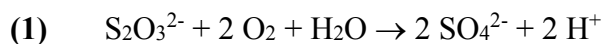
Les rapports calculés à partir des valeurs expérimentales sont similaires à ceux calculés à partir des rapports stœchiométriques de la réaction proposée par Amend *et al.* (Amend & Shock, 2001). Cela démontre que la souche MO1340 oxyde l'hydrogène et réduit les nitrates en catalysant la réaction décrite ci-dessus. Les faibles écarts constatés (inférieurs à 5 %) sont dus aux imprécisions des expérimentations. Par exemple les volumes de milieu distribué dans les tubes pouvaient être légèrement différents.

En appliquant cette méthode à chaque couple de substrats, il a été possible d'identifier les réactions métaboliques correspondantes :

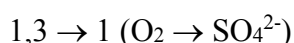
➤ Oxydation du thiosulfate avec réduction de l'oxygène :



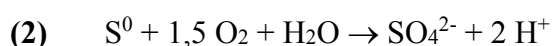
Cela correspond à la stœchiométrie de la réaction **(1)** (Amend & Shock, 2001)



➤ Oxydation du soufre élémentaire avec réduction de l'oxygène :

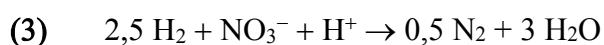


La stœchiométrie est proche de celle de la réaction **(2)** (Amend & Shock, 2001) mais le rapport est légèrement différent (1,3 pour 1,5). Il est néanmoins acceptable de valider cette réaction car il s'agit de la seule équation réactionnelle proposée dans la littérature pour expliquer l'oxydation du soufre élémentaire en sulfate par l'oxygène. De plus, aucun autre métabolite contenant du soufre ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$, HS^- , H_2S) n'a été détecté par chromatographie ionique ou gazeuse, on peut donc exclure les autres réactions dans lesquelles ces métabolites interviennent.

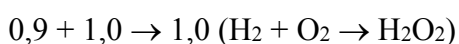


➤ Oxydation de l'hydrogène avec réduction du nitrate en azote :

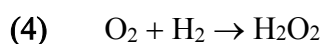
La réaction **(3)** (Amend & Shock, 2001) a été identifiée dans l'exemple.



➤ Oxydation de l'hydrogène avec réduction de l'oxygène :

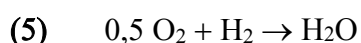


Ces rapports stœchiométriques sont proches de ceux de la réaction **(4)** présentée par Thauer et al. (Thauer *et al.*, 1977), qui mène à la production de peroxyde d'hydrogène.



Afin de vérifier que la souche MO1340 réalisait cette réaction, deux méthodes ont été utilisées pour détecter une éventuelle production de peroxyde d'hydrogène : une titration au permanganate de potassium et un dosage par le kit MyQubit Amplex™ Red Peroxyde Assay (Invitrogen). Lors de l'application de la première méthode sur des cultures incubées en présence d'hydrogène et d'oxygène, la solution de permanganate a été décolorée indiquant son oxydation, potentiellement par du peroxyde d'hydrogène. Cependant la deuxième méthode, basée sur une réaction enzymatique spécifique, n'a pas montré la présence de peroxyde d'hydrogène dans les cultures. L'oxydation du permanganate de potassium était probablement liée à la présence d'un autre composé, qui a réagi de manière aspécifique avec le permanganate.

La souche MO1340 ne produisant pas de peroxyde d'hydrogène, il a été déduit qu'elle pratiquait la réaction de Knallgas **(5)**, qui semble être énergétiquement favorable dans les écosystèmes hydrothermaux sous certaines conditions (LaRowe *et al.*, 2014), et qui est réalisée par les *Aquificales* microaérophiles (Reysenbach & Shock, 2002, Gupta, 2014).



Concernant la stœchiométrie déterminée par analyse de la phase gazeuse des cultures, qui ne correspond pas à la stœchiométrie de la réaction **(5)**, il est probable que la valeur calculée expérimentalement soit erronée à cause des faibles quantités de gaz consommées. En effet, les variations de concentration en hydrogène et oxygène dans la phase gazeuse sont inférieures à 1 %, ce qui est trop faible par rapport à la précision des expérimentations ainsi que des mesures faites par micro-chromatographie en phase gazeuse. Des techniques analytiques plus précises seraient nécessaires pour déterminer la stœchiométrie de la réaction de manière expérimentale, par exemple avec l'emploi d'une sonde à oxygène.

c) Métabolisme de la souche *P. hydrogeniphila* 29W^T

Les couples de substrats qui ont été testés pour la souche MO1340, l'ont également été pour la souche *P. hydrogeniphila* 29W^T (Nakagawa *et al.*, 2003). Les résultats obtenus ont confirmé sa capacité à croître avec de l'hydrogène comme donneur d'électrons et de l'oxygène ou du nitrate comme accepteurs d'électrons. Cependant, une croissance a également été observée en présence de thiosulfate (10 mM) et d'oxygène (1,4 % ; 1,5 bar), ce qui contredit les résultats présentés dans l'article de caractérisation (Nakagawa *et al.*, 2003). Le nom de

l'espèce *P. hydrogeniphila* est d'ailleurs lié à sa capacité présumée à n'utiliser que de l'hydrogène comme donneur d'électrons.

La **Figure 62** représente la croissance de la souche *P. hydrogeniphila* 29W^T ainsi que les quantités de substrats et produits en fonction du temps, lors d'une incubation en présence de thiosulfate et oxygène. Cette souche oxyde le thiosulfate en réduisant l'oxygène, et produit du sulfate. Elle pratique donc la réaction **(1)** décrite précédemment.

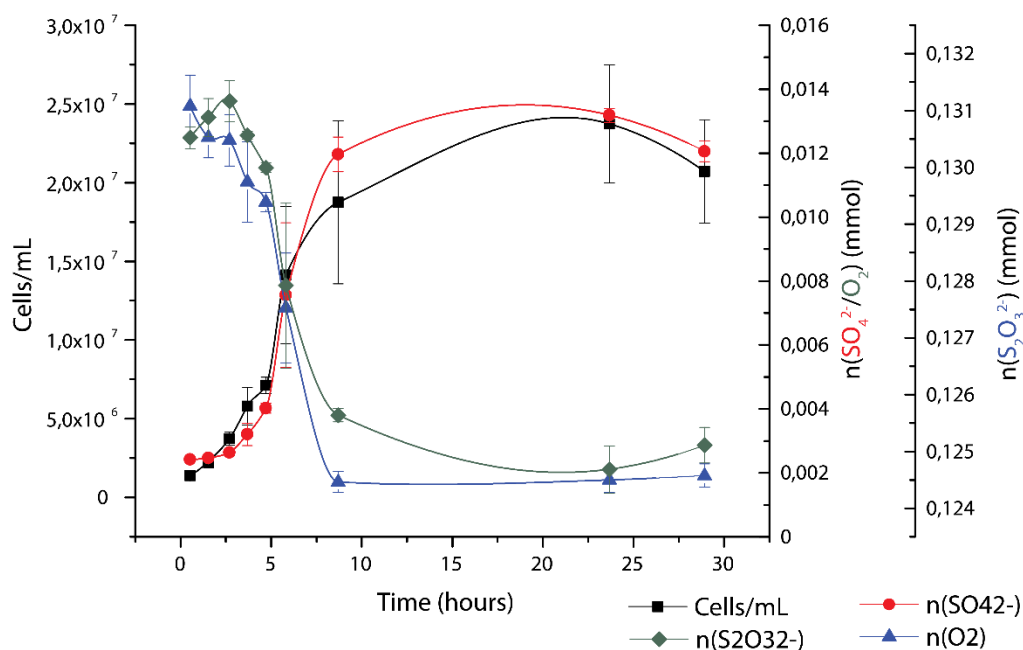


Figure 62 : Cinétique de croissance de la souche *Persephonella hydrogeniphila* 29W^T (carrés) incubée en présence de thiosulfate et oxygène. Les quantités d'oxygène (losanges) et de sulfate (ronds) sont représentées, ainsi que les erreurs standards basées sur les expérimentations en triplicats.

3) Caractéristiques phylogénétiques et génomiques

4) Position phylogénétique

La position phylogénétique de la souche MO1340 a été déterminée en étudiant la séquence du gène codant les ARNr 16S et en réalisant un arbre phylogénétique à partir de cette séquence. Celui-ci est représenté par la **Figure 63** et confirme l'appartenance de la souche MO1340 au genre *Persephonella*, dans la famille des *Hydrogenothermaceae* et l'ordre des *Hydrogenothermales*. Les souches caractérisées les plus proches sont *P. hydrogeniphila* 29W^T,

P. marina EX-H1^T et *P. guaymasensis* EX-H2^T avec respectivement 95,5 %, 93,8 % and 94,0 % de similarité de séquences.

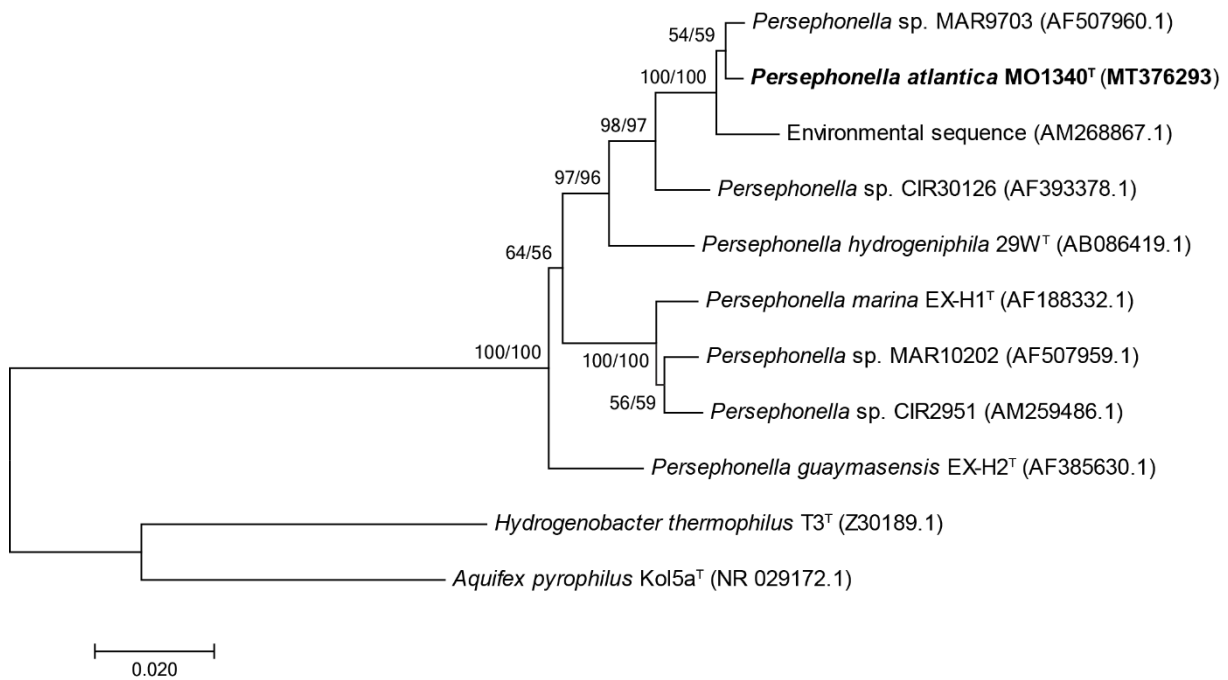


Figure 63 : Arbre phylogénétique de l'ordre des Aquificales, basé sur les séquences des gènes codant les ARNr 16S (1364 pb). L'arbre a été construit en utilisant les méthodes du neighbor-joining (NJ) et du maximum de vraisemblance (ML), qui ont produit la même topologie. Les valeurs de bootstrap correspondantes (notées dans l'ordre NJ/ML) sont représentées à chaque nœud. La bar d'échelle représente 0,02 changements par position nucléotidique. Les numéros d'accèsion des séquences GenBank/EMBL/DDBJ sont notés entre parenthèses.

Ces valeurs sont inférieures au seuil de 98,7 %, publié précédemment pour la définition des espèces microbiennes (Chun *et al.*, 2018). Sur la base de ses données physiologiques, métaboliques et avec les informations phylogénétiques, nous avons proposé par la présente étude que la souche MO1340 représente une nouvelle espèce du genre *Persephonella*, pour laquelle nous suggérons le nom *Persephonella atlantica* sp. nov. L'épithète *atlantica* provient de l'Océan Atlantique, où est situé le site hydrothermal Lucky Strike dont a été isolée la souche MO1430.

5) Caractéristiques génomiques

➤ Caractéristiques générales du génome

Le génome de la souche MO1340 ayant été séquencé par la technologie Illumina HiSeq qui produit des séquences courtes. Cependant, il n'a pas été possible de circulariser le génome lors de son assemblage. Celui-ci est constitué de 1.892.283 nucléotides assemblés en 5 contigs (> 840 pb, couverture 840 x). Le numéro d'accèsion du génome dans les banques de données internationales GenBank, EMBL et DDBJ est **JAACYA000000000**. La complétion et la contamination sont estimées à respectivement 99,59 % et 1,68 %. Le génome contient 2028 séquences codantes et le contenu en bases G et C est de 37,07 mol%.

➤ Identification des voies génétiques

L'analyse du génome de la souche MO1340 a permis d'identifier les voies métaboliques impliquées dans son métabolisme et sa physiologie. La comparaison aux génomes disponibles des autres souches du genre *Persephonella* dont les génomes sont disponibles (*P. hydrogeniphila* et *P. marina*) montre que les voies génétiques sont similaires, et que les clusters de gènes décrits ci-dessous sont fortement conservés chez les trois souches.

➤ Oxydation des composés soufrés

Le génome de la souche MO1340 contient un cluster de gènes, *soxABXYZ*, impliqué dans l'oxydation de plusieurs composés soufrés. Cette voie métabolique a été décrite chez *Paracoccus pantotrophus*, une *Alphaproteobacteria* (Friedrich *et al.*, 2001), puis comparée à des souches appartenant à d'autres taxa (Friedrich *et al.*, 2005), ce qui a montré une large distribution de ce cluster parmi les *Bacteria* sulfo-oxydantes. Cette voie métabolique est présentée dans la **Figure 64 A** publiée par Frigaard *et al.* (Frigaard & Dahl, 2008). Cette voie métabolique permet, selon les microorganismes, d'oxyder les sulfites, le tétrathionate, le soufre élémentaire et le thiosulfate, ces deux molécules étant des donneurs d'électrons utilisés par la souche MO1340.

Contrairement à la voie décrite chez *P. pantotrophus*, la souche MO1340 ne possède pas les gènes *soxCD*. Cette voie incomplète a déjà été décrite, notamment chez *Chlorobium tepidum* et *Allochromatium vinosum*, qui sont incapables de réaliser une oxydation complète du thiosulfate en sulfate, mais à la place accumulent des granules de soufre élémentaire (**Figure 64 B**) (Hensen, 2006, Frigaard & Dahl, 2008, Sievert *et al.*, 2008). Néanmoins, les résultats expérimentaux ont montré que la souche MO1340 réalisait une oxydation complète d'une molécule de thiosulfate en deux molécules de sulfates, sans accumulation de soufre malgré l'absence des gènes *soxCD*. Elle doit donc posséder une voie métabolique alternative qui assure le même rôle que celle codée par les gènes *soxCD* de *P. pantotrophus* (Friedrich *et al.*, 2005).

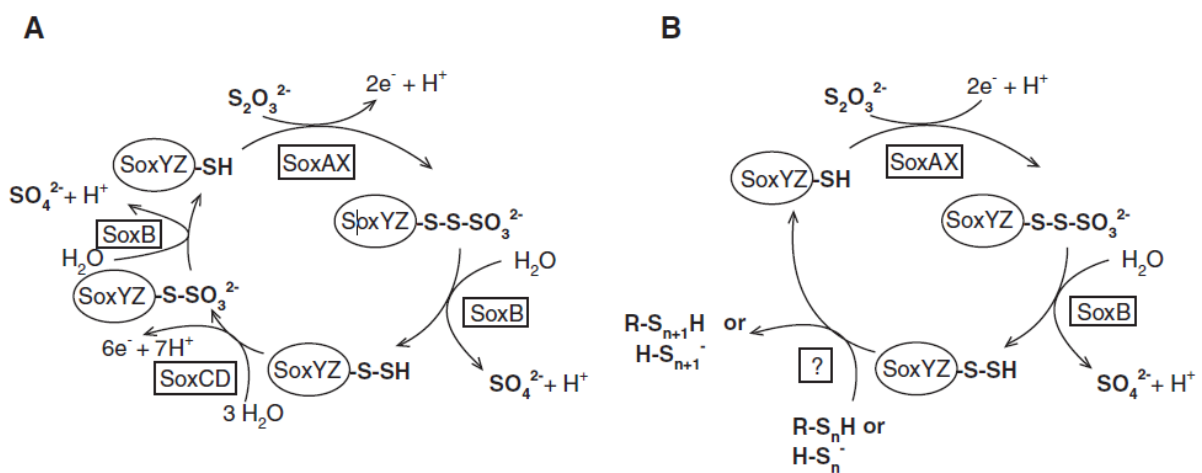


Figure 64 : Voie d'oxydation du thiosulfate et d'autres composés soufrés (A) par la voie de Kelly-Friedrich établie pour *Paracoccus* spp. (Friedrich *et al.*, 2001) ; (B) par les organismes formant des globules de soufre comme intermédiaire métabolique. Figure publiée par Frigaard *et al.* (Frigaard & Dahl, 2008).

➤ Oxydation de l'hydrogène

De nombreux gènes impliqués dans l'oxydation de l'hydrogène sont présents dans le génome de la souche MO1340 et sont organisés en deux principaux clusters. L'annotation réalisée par l'outil PGAP a révélé qu'il s'agissait d'hydrogénases [NiFe]. Ces enzymes sont connues pour être plus résistantes à l'oxygène que d'autres hydrogénases comme les [Fe]-hydrogénases (Brugna-Guiral *et al.*, 2003), ce qui est cohérent avec le métabolisme aérobie facultatif de la souche MO1340.

➤ Métabolisme aérobie

Des gènes codant des cytochromes et des oxydases ont été détectés, ainsi que des gènes impliqués dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène, comme une peroxydase, une catalase et une superoxyde dismutase.

➤ Métabolisme anaérobie

Une voie de réduction complète du nitrate en diazote codée par quatre gènes (nitrate réductase, nitrite réductase, oxyde nitrite réductase et oxyde nitreux réductase) est présente et permet à la souche MO1340 de croître en conditions anaérobies par oxydation de l'hydrogène et réduction du nitrate en diazote.

➤ Fixation du carbone

Tous les gènes codant les enzymes du Cycle de Krebs inverse (ou reverse Tricarboxylic Acid Cycle, rTCA) sont présents dans le génome. Cette voie de fixation du carbone est partagée par toutes les Aquificae connues et est la plus répandue dans les environnements hydrothermaux avec le cycle de Calvin-Benson-Bassham (CBB) (Hügler & Sievert, 2011, Mangiapià & Scott, 2016). Contrairement au CBB qui est surtout opéré par des *Bacteria* mésophiles, le rTCA est plus adapté à des environnements à haute température contenant peu d'oxygène (Nakagawa & Takai, 2008, Berg, 2011, Hügler & Sievert, 2011), ce qui correspond aux conditions physico-chimiques du milieu hydrothermal, d'où a été isolée la souche MO1340 et les autres représentants du genre *Persephonella*.

Bien qu'étant partagé par les Aquificae, le cycle rTCA diffère à l'étape de clivage du citrate en acétyl-coa et en oxaloacétate selon les lignées phylogénétiques (Figure 65). Les Aquificaceae ne possèdent pas les gènes *acl*, mais à la place les gènes *ccs* et *ccl*, tandis que les Hydrogenothermaceae et les Desulfurobacteriaceae possèdent à la fois les gènes *aclA*, *aclB* et *ccl*. C'est cette seconde voie qui est présente dans le génome de la souche MO1340, tout comme chez les autres membres du genre *Persephonella* de la famille Hydrogenothermaceae.

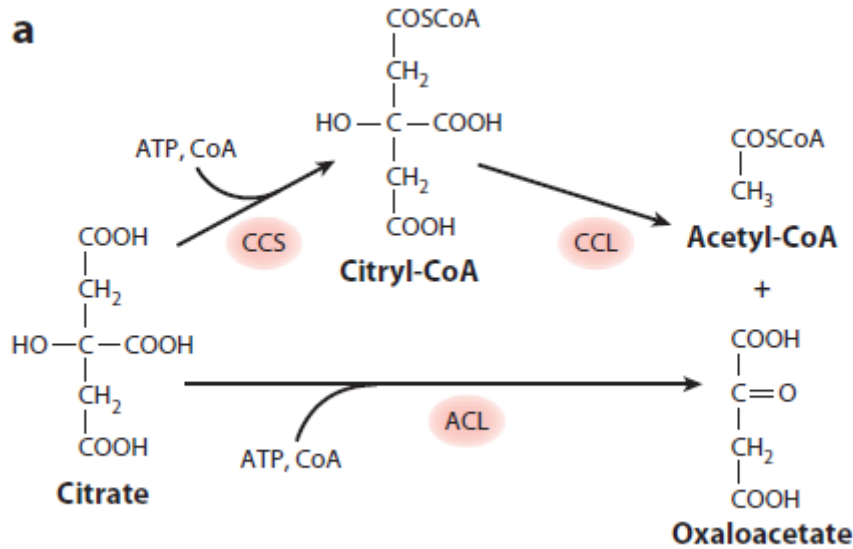


Figure 65 : Schéma de la réaction de clivage d'une molécule de Citrate par le cycle rTCA. CCS : Citryl-Coa Synthétase ; CCL : Citryl-Cia Lyase ; ACL : ATP-Citrate Lyase. Figure publiée par Hügler et al. (Hügler & Sievert, 2011)

➤ Motilité

Le caractère motile de la souche MO1340 a été observé sur des cultures fraîches et confirmé par l'observation d'un flagelle monotriche au microscope électronique à transmission. Plusieurs gènes impliqués dans la synthèse du flagelle sont présents sous forme de clusters dans son génome : *FlgGAHIJBC*, *FlhAFB*, *FliGMNEFR*. Parmi ces clusters, des gènes codant des régulateurs transcriptionnels comme des facteurs sigma ont été identifiés, ainsi que des gènes impliqués dans le chimiotactisme (*CheZ*, *CheA*, *CheW* et *CheV*).

Un système de régulation génétique similaire a été étudié chez *Acidithiobacillus* spp. (Yang *et al.*, 2019) : suite à la délétion du gène *rpoF* encodant un facteur sigma, les mutants ne synthétisaient plus de flagelle leur permettant d'accéder aux substrats. De ce fait, le taux de croissance par rapport à la souche sauvage était plus faible, et il a été observé que les cellules adhérant au soufre élémentaire présent étaient plus nombreuses. Il est également intéressant de préciser que pour les souches du genre *Acidithiobacillus* étudiées dans cette publication, un lien a été établi entre la présence du cluster génétique codant le flagelle et la présence du cluster de gènes *soxABXYZ*.

Les observations faites sur la souche MO1340 (proportion de cellules motiles plus importante en présence de soufre élémentaire), ainsi que les résultats présentés par Yang *et al.* concernant les clusters de gènes impliqués dans la production de flagelle, suggèrent un lien fort

entre la présence de soufre et la motilité selon un système de régulation génétique qui pourrait être proche entre les genres *Thiobacillus* et *Persephonella*. Une approche similaire à celle réalisée par Yang *et al.* appliquée à la souche MO1340 apporterait des informations quant à cette relation entre le métabolisme et la motilité.

3) Physiologie de la souche MO1340 et implications écologiques

En plus des manipulations classiques de caractérisation d'une souche bactérienne, des expérimentations supplémentaires ont été réalisées afin de mieux comprendre l'adaptation et l'écologie de la souche MO1340 dans le contexte hydrothermal océanique profond. Dans la majorité des articles de caractérisation de souches, les conditions optimales de croissances sont déterminées en réalisant des cultures de la souche sur un milieu contenant un couple de donneur et accepteur d'électrons, mais les informations concernant les autres substrats ne sont pas disponibles. Lors de la description de la souche MO1340, la température optimale de croissance et la concentration optimale en oxygène ont été déterminées pour chacun des quatre couples de donneurs et accepteurs d'électrons utilisés par la souche ($S_2O_3^{2-}/O_2$; S^0/O_2 ; H_2/O_2 ; H_2/NO_3).

1) Température optimale de croissance

Comme il a été présenté dans la section *Détermination des conditions optimales de croissance*, le taux de croissance de la souche MO1340 en fonction de la température est différent selon les donneurs et accepteurs d'électrons fournis. Le taux de croissance en fonction de la température pour chaque couple de substrats est présenté dans la **Figure 66**.

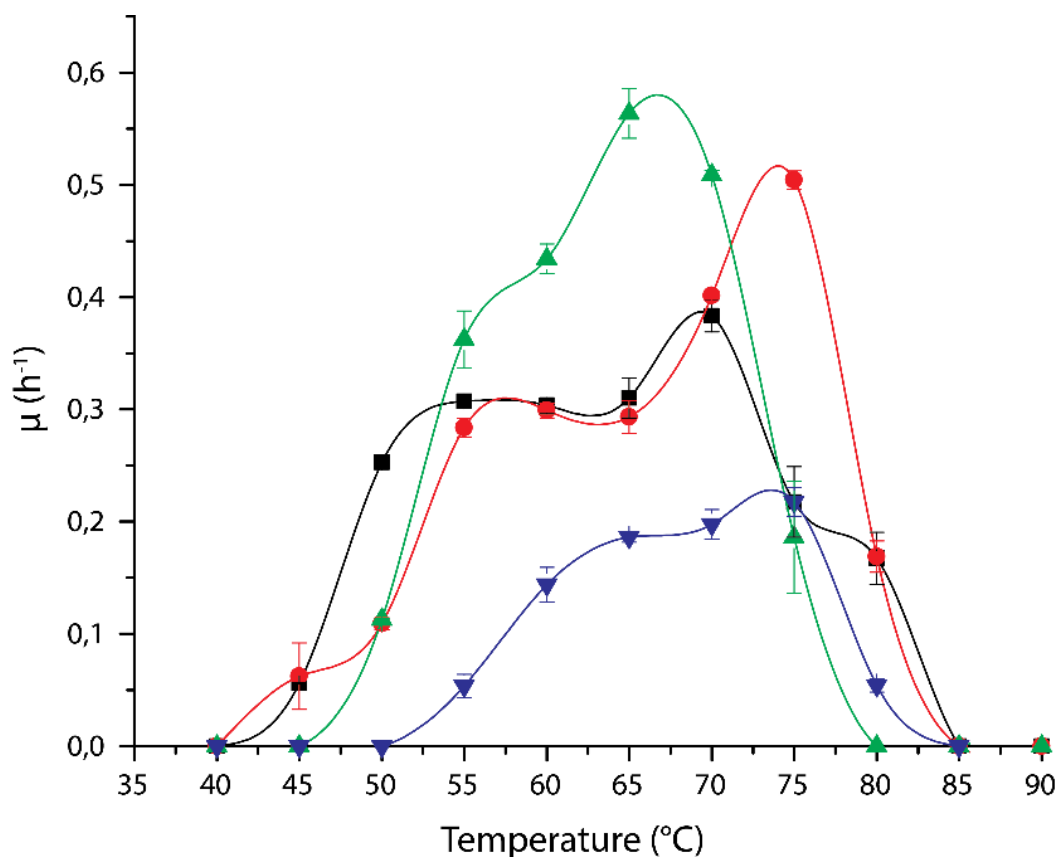


Figure 66 : Effet de la température (°C) sur le taux de croissance (h⁻¹) de la souche MO1340. Couples de substrats fournis : (vert) S₀/O₂; (noir) S₂O₃²⁻/O₂; (bleu) H₂/O₂; (rouge) H₂/NO₃⁻. Les erreurs standards sont présentées sous forme de barres d'erreur selon le même code couleur

Chaque courbe présente un plateau dans les températures inférieures à la température optimale de croissance, qui est plus ou moins marqué selon les conditions : le plateau est peu marqué (entre 55 et 60 °C) en présence de soufre élémentaire et d'oxygène, pour un optimum à 65 °C, mais est très étalé (entre 50 et 65 °C) en présence de thiosulfate et d'oxygène, pour un optimum à 70 °C. Une courbe similaire a été présentée en supplementary data (**Figure 67 A**) lors de la caractérisation de la souche *Persephonella hydrogeniphila* par Nakagawa *et al.* en 2003 (la souche décrite la plus proche de MO1340) (Nakagawa *et al.*, 2003) mais le phénomène n'avait pas été discuté. Il ne semble pas que ce soit le cas chez *P. marina*, et il est difficile de conclure concernant *P. guaymasensis* car le taux de croissance n'est pas présenté à 55 °C (**Figure 67 B**). Lors de ces expérimentations, les trois souches avaient été incubées en présence d'hydrogène et de nitrate.

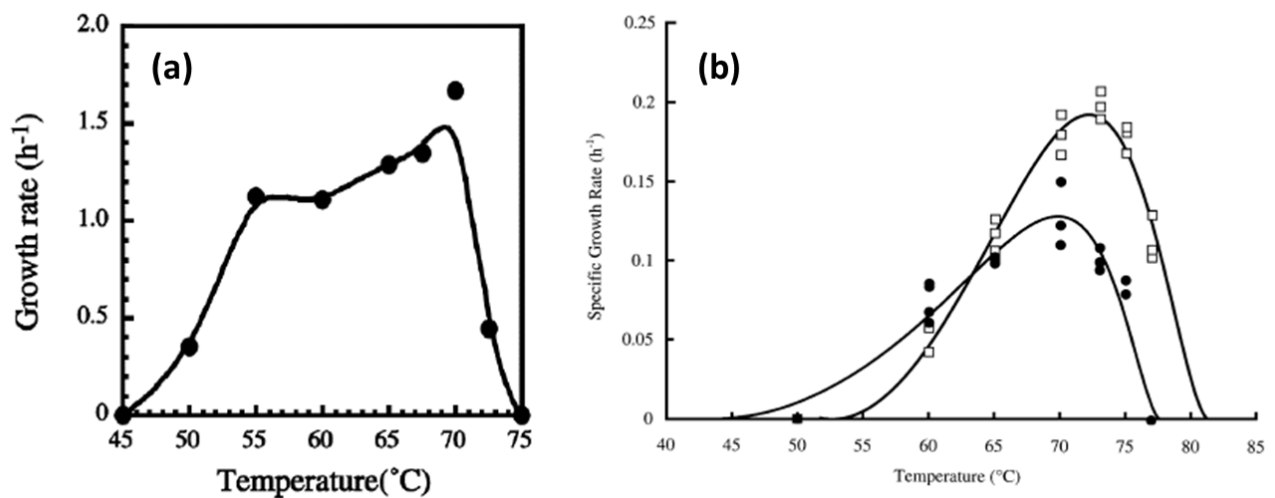


Figure 67 : Effet de la température ($^{\circ}C$) sur le taux de croissance (h^{-1}) des souches (a) *P. hydrogeniphila* et (b) *P. marina* (carrés) et *P. guaymasensis* (ronds) en présence d'hydrogène et de nitrate. Figures publiés par (a) (Nakagawa *et al.*, 2003) et (b) (Götz *et al.*, 2002).

Une autre façon de visualiser l'influence de la température sur le taux de croissance est d'appliquer la loi d'Arrhenius pour faire une représentation graphique des données, en présentant le logarithme népérien du taux de croissance en fonction de l'inverse de la température. La loi d'Arrhenius est à l'origine décrite pour des réactions chimiques mais a déjà été appliquée à des métabolismes microbiens (Robador *et al.*, 2009, Robador *et al.*, 2016) ainsi qu'à des taux de croissance cellulaire. Cette façon de représenter graphiquement les données a montré que la partie de la courbe qui correspond aux températures inférieures à la température optimale de croissance est composée de deux pentes chez certaines souches mésophiles et thermophiles (*B. stearothermophilus* et *B. coagulans*, **Figure 68**), alors qu'elle est généralement linéaire (*T. aquaticus*, **Figure 68**) (Mohr & Krawiec, 1980). Ce phénomène a ensuite été observé chez des psychrophiles (Guillou & Guespin-Michel, 1996, Tarpgaard *et al.*, 2006, Nevot *et al.*, 2008) et semble ainsi être répandu parmi des souches qui se développent pourtant dans des gammes de températures différentes. La température qui sépare les deux segments linéaires de la courbe a été qualifiée de « température critique » par Nevot *et al.* (Nevot *et al.*, 2008).

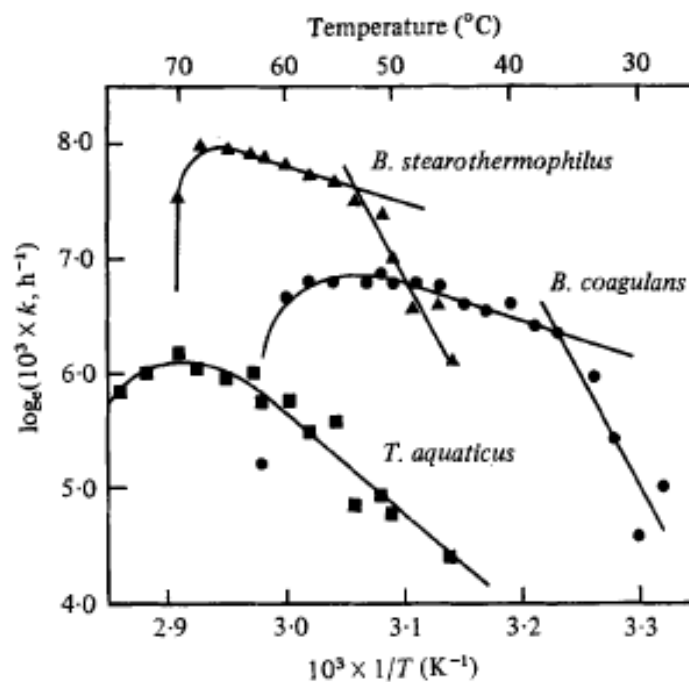


Figure 68 : Courbes d'Arrhenius de *Thermus aquaticus* (carrés), *Bacillus coagulans* (ronds) et *Bacillus stearothermophilus* (triangles). Figure publiée par Mohr et al. (Mohr & Krawiec, 1980).

Les courbes d'Arrhenius réalisées à partir des taux de croissance de la souche MO1340 sont présentées dans la **Figure 69**. Comme pour les souches citées précédemment, le segment de la courbe qui est généralement linéaire (correspondant aux températures inférieures à la température de croissance) présente deux pentes distinctes. Cependant, par rapport aux souches présentées dans la **Figure 68**, les courbes d'Arrhenius de la souche MO1340 présentent un plateau particulièrement marqué en présence de thiosulfate et d'oxygène, mais aussi en présence d'hydrogène et de nitrate.

Ce type de plateau, également observé sur les courbes de croissance en fonction de la température des souches MO1340 et *P. hydrogeniphila* 29W^T, a déjà été reporté par Wiegel *et al.* chez la souche *Clostridium thermohydrosulfuricum* (**Figure 70**), une *Clostridia* anaérobie fermentaire thermophile (Wiegel *et al.*, 1979).

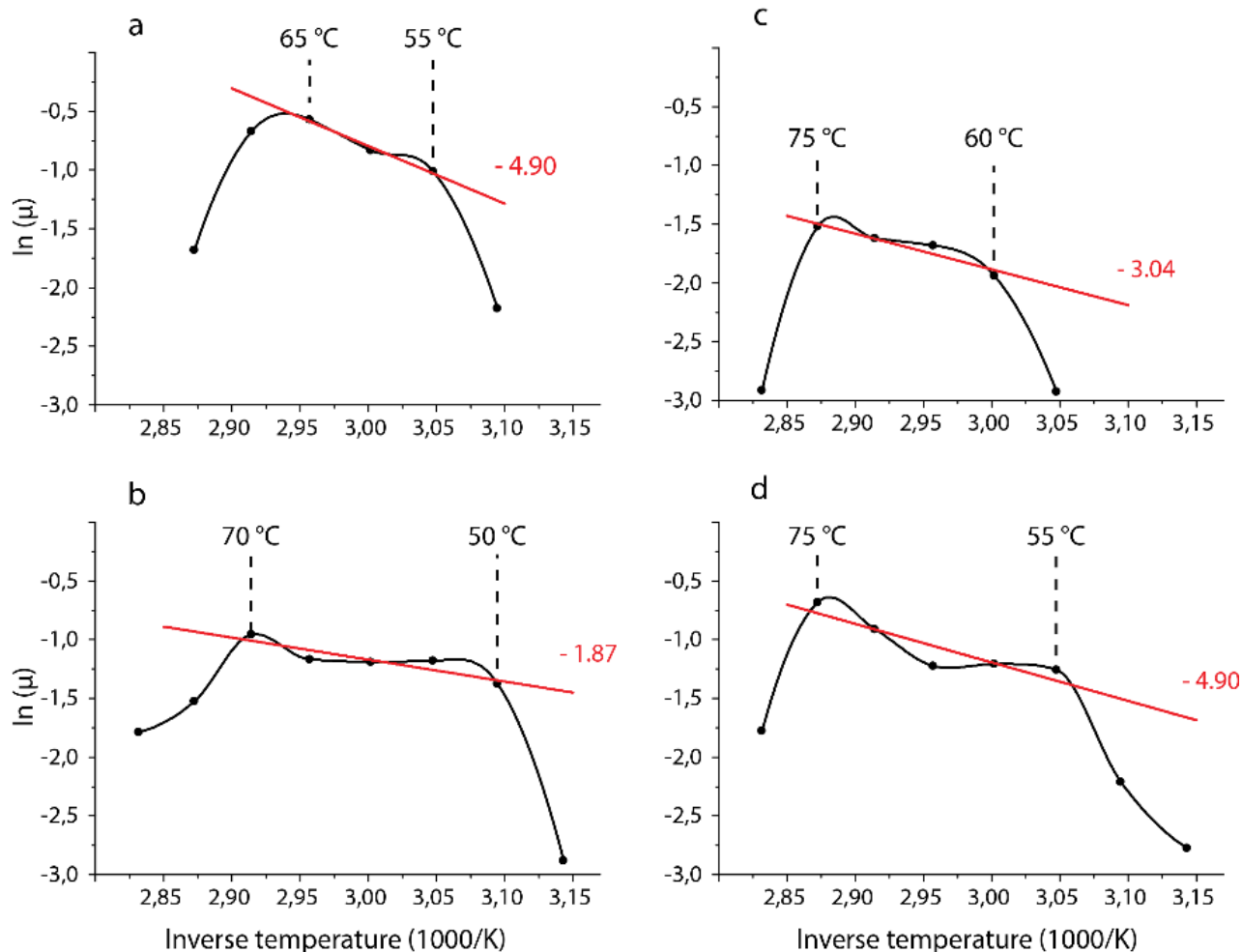


Figure 69 : Courbes d'Arrhenius réalisées à partir des données expérimentales sur le taux de croissance de la souche MO1340 en fonction de la température. Couples de substrats fournis : (a) S_0/O_2 ; (b) $S_2O_3^{2-}/O_2$; (c) H_2/O_2 ; (d) H_2/NO_3^- . Les températures optimales de croissance et les températures critiques sont notées au-dessus des courbes. Les droites rouges sont le résultat de régressions linéaires calculées dans la gamme de linéarité présentée dans le **Tableau 2** de l'article dans la section Valorisation des travaux de caractérisation de la souche *Persephonella atlantica* MO1340.

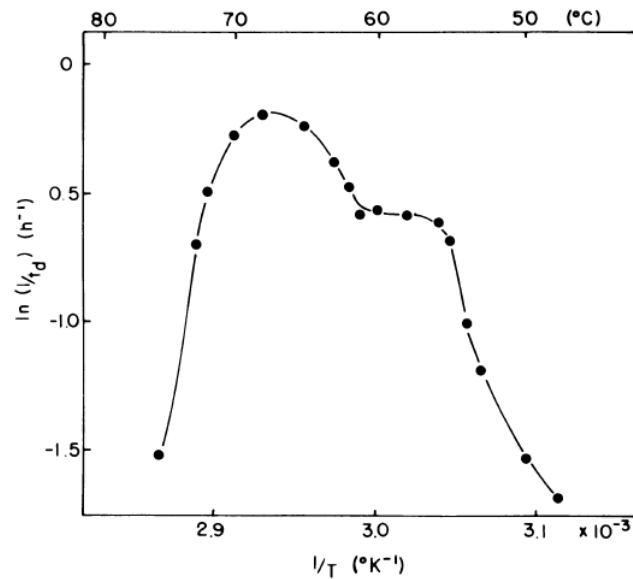


Figure 70 : Courbe d'Arrhenius de *Clostridium thermohydrosulfuricum*. Figure publiée par Wiegel et al. (Wiegel et al., 1979).

Des travaux réalisés par la suite sur les organismes présentant une gamme de température de croissance plus étendue que la moyenne ont permis de proposer des hypothèses concernant ce phénomène (Wiegel, 1990, Wiegel & Michael, 1998). Bien que la majorité des microorganismes se développent dans une gamme de température comprise entre 25 et 30 °C, certaines souches tolèrent une gamme de température de plus de 35 °C, jusqu'à 55°C pour *Methanobacterium thermoautotrophicum* (cette gamme étant de 25 à 35 °C pour la souche MO1340 selon les substrats). Toutes les souches étudiées dans ces travaux de synthèse qui présentaient cette caractéristique montraient également une réponse à la température similaire à celle de la souche MO1340, avec une courbe d'Arrhenius comprenant un plateau en deçà de la température optimale de croissance. Les auteurs soulignent que le même phénomène est observé vis-à-vis du pH chez des souches qui tolèrent une large gamme de pH.

La principale hypothèse avancée par Wiegel *et al.* est la présence de deux jeux d'enzymes ayant une fonction similaire, mais tolérant différentes gammes de température : un set d'enzymes adapté aux températures inférieures à la température critique (qui sépare les deux pentes de la courbe d'Arrhenius), et un jeu d'enzymes adapté aux températures supérieures. D'autres enzymes, protéines ou lipides ne seraient pas concernés et auraient simplement une large gamme de tolérance à la température. Si chaque enzyme qui limite la croissance d'une souche à basse ou haute température est ainsi suppléée par une enzyme plus stable qui assure la même fonction, la gamme de température de croissance de la souche est ainsi élargie. Des résultats expérimentaux confortent cette hypothèse, comme par exemple la synthèse de deux

glucose-6-phosphate isomérases par *Bacillus caldotenax* dépendamment de la température : une enzyme est produite entre 30 et 50 °C, et l'autre entre 60 et 70 °C. Seule la seconde enzyme est thermostable et supporte une température supérieure à 55 °C. Le second jeu d'enzyme, adapté à une température différente du premier jeu, pourrait avoir été acquis soit par transfert horizontal, soit en étant issu de la duplication puis de la modification d'un gène, ce qui permettrait à une souche thermophile de tolérer une température plus basse ou inversement.

Bien que cette hypothèse soit envisageable dans le cas des résultats observés chez la souche MO1340, de tels jeux de gènes n'ont pas été détectés durant de l'analyse de son génome, il n'est donc pas possible, avec les données disponibles, de valider cette hypothèse pour expliquer les courbes biphasiques sur les graphiques d'Arrhenius.

Afin de mieux visualiser les deux phénomènes observés chez la souche MO1340 (influence du substrat sur la température, et présence d'un plateau sur les courbes d'Arrhénius), un modèle bimodal a été appliqué sur les courbes de croissance en fonction de la température (**Figure 2** de l'article présenté dans la section *Valorisation des travaux de caractérisation de la souche Persephonella atlantica MO1340*).

Les paires de courbes bimodales peuvent ainsi être groupées selon le type de donneur d'électron fourni à la souche (composé soufré ou hydrogène). En effet, pour les donneurs d'électrons soufrés (soufre élémentaire ou thiosulfate), les deux pics sont compris entre 52,7 et 56,3 °C (pics verts) et 67,4 et 68,8 °C (pics rouges), tandis que pour l'hydrogène les pics sont compris entre 59,8 et 63,7 °C (pics verts) et 74,1 et 74,2 °C (pics rouges). Il y a donc un décalage d'environ 7 °C entre ces deux paires de pics selon la source d'énergie. Sachant que les composés soufrés et l'hydrogène sont pris en charge par deux voies métaboliques et deux systèmes enzymatiques différents (enzymes Sox ou hydrogénases), ce décalage pourrait être dû à une différence de gamme de température tolérée par les enzymes Sox et les hydrogénases.

Des résultats soutenant cette hypothèse ont été obtenus chez *Hydrogenobacter thermophilus*, un autre membre des *Aquificales*, qui est également capable d'utiliser du thiosulfate ou de l'hydrogène comme source d'énergie. Sano *et al.* ont montré que les enzymes impliquées dans l'oxydation du thiosulfate (potentiellement les enzymes de la voie Sox dont les gènes correspondant sont présents chez la souche) sont constitutives, car elles sont transcrites dans des cultures incubées sous hydrogène, en absence de thiosulfate. L'activité d'oxydation du thiosulfate d'extraits solubles de cette souche a été mesurée à différentes températures, et présente un optimum à 60 °C *in vitro*. Un traitement thermique de 30 minutes à différentes températures (10 à 100 °C) a montré que l'activité d'oxydation du thiosulfate était

stable après un traitement de 10 à 60 °C, mais diminuait considérablement à partir de 70 °C, potentiellement suite à la dénaturation du complexe enzymatique catalysant la réaction. Les travaux de Suzuki *et al.*, portant sur la caractérisation de la nitrite réductase (impliquée dans la réduction du nitrate couplée à l'oxydation de l'hydrogène) ont montré que cette enzyme avait une activité maximale à 70-75 °C.

La comparaison de ces résultats indique qu'au moins une des enzymes impliquées dans l'oxydation anaérobie de l'hydrogène avec réduction du nitrate, présente un optimum de température supérieur à celui des enzymes réalisant l'oxydation aérobie du thiosulfate (70-75 °C pour 60 °C). Si le même phénomène est présent chez la souche MO1340, qui présente un métabolisme proche impliquant les mêmes voies métaboliques que *H. thermophilus*, cela pourrait expliquer pourquoi la température optimale de croissance de MO1340 est inférieure en présence de composés soufrés par rapport à celle observée en présence d'hydrogène.

Plusieurs expérimentations complémentaires permettraient de mieux comprendre les deux phénomènes observés chez la souche MO1340 :

- Les courbes d'Arrhenius à deux pentes et comprenant un plateau
- L'influence des substrats sur la température optimale de croissance

L'analyse des transcriptomes et des protéomes exprimés en présence des différents couples de substrats et à différentes températures (inférieures ou supérieures à la température critique) mettrait en évidence la présence des différents sets d'enzymes, qui sont possiblement la cause des plateaux observés sur les courbes d'Arrhenius, comme il a été suggéré par Wiegel *et al.* (Wiegel, 1990). Une analyse ciblée du génome, réalisée conjointement à ces expérimentations, mettrait en évidence les gènes correspondant à ces enzymes.

Les travaux de Tarpgaard *et al.* ont observé chez *Desulfobacter psychrotolerans* une courbe d'Arrhenius à deux pentes, à la fois pour le taux de croissance mais aussi pour l'activité de sulfato-réduction. Ils ont également constaté que ces deux paramètres ont une différence de 6 °C pour leur température optimale (20 °C pour le taux de croissance, 26 °C pour l'activité de sulfato-réduction). La comparaison de ces deux taux a mis en évidence que la croissance cellulaire était plus fortement impactée par une hausse de la température que l'activité de réduction des sulfates. Les enzymes impliquées dans la croissance cellulaire sont plus nombreuses et il est probable qu'au moins l'une d'elles ait une tolérance plus faible à la chaleur que les enzymes de la sulfato-réduction, limitant alors le taux de croissance à haute température. En appliquant cette méthodologie avec la souche MO1340, il serait possible de déterminer l'influence de la température sur les différents métabolismes (oxydation des composés soufrés,

de l'hydrogène, réduction de l'oxygène, du nitrate) indépendamment de la croissance. Cela indiquerait ainsi si la tolérance à la température est limitée par un métabolisme énergétique en particulier ou par une autre voie du métabolisme.

2) Concentration optimale en oxygène

Tout comme la température optimale de croissance, la concentration optimale en oxygène ainsi que la tolérance à l'oxygène de la souche MO1340 sont différentes selon le donneur d'électron présent dans le milieu. En présence d'hydrogène, la croissance est optimale avec 11,4 μM d'oxygène dissous (0,7 mM dans la phase gazeuse), ce qui est comparable aux autres souches décrites du genre *Persephonella* (0,73 à 1,21 mM dans la phase gazeuse) (Götz *et al.*, 2002, Nakagawa *et al.*, 2003). Cependant cette valeur est 5 à 11 fois supérieure lorsque la source d'énergie est du thiosulfate ou du soufre (optimum à 59,8 et 119,7 μM dissous respectivement).

En présence d'hydrogène ou de thiosulfate, la souche MO1340 tolère une concentration en O_2 dans la phase gazeuse inférieure à 20 % ou 5 % respectivement (à 1,5 bar et 2 bar, soit 170,9 ou 57 μM d' O_2 dissous dans les conditions testées). Néanmoins en présence de soufre, une croissance a été observée jusqu'à 21 % d' O_2 (179,5 μM dissous). Ces valeurs sont cohérentes avec les concentrations en oxygène dissous mesurées dans le panache hydrothermal proximal de la cheminée Aisics, qui étaient comprise entre 103 et 205 μM dans le gradient de fluide de 5 à 153 °C.

Tout comme l'effet du substrat sur la température optimale de croissance, il serait intéressant d'étudier les mécanismes contrôlant le lien entre la concentration en oxygène et le taux de croissance, comme par exemple la résistance à l'oxygène des enzymes impliquées dans les différentes voies métaboliques.

3) Implications écologiques

La comparaison des données présentées précédemment a montré que la température optimale de croissance et la concentration optimale en oxygène de la souche MO1340 pour chaque substrat étaient inversement corrélées (**Tableau 14**). En effet, en présence de composés soufrés (soufre élémentaire ou thiosulfate) le taux de croissance est plus élevé aux températures les plus basses et pour des concentrations en oxygène plus fortes (respectivement 65/70 °C et 59,8/119,7 μM d' O_2 dissous). A l'inverse, la croissance par oxydation de l'hydrogène se produit

en microaérophilie (11,4 μM d' O_2 dissous) et à des températures plus élevées (70-75 $^\circ\text{C}$). Enfin, en présence d'hydrogène et de nitrate, en anaérobiose, la température optimale de croissance de la souche est la plus élevée (75 $^\circ\text{C}$) en comparaison des trois métabolismes aérobies. Ces résultats sont présentés de manière schématiques dans la **Figure 71 A**.

Cette relation inversée, entre la température et la concentration en oxygène, correspond au gradient physico-chimique observé dans les sources hydrothermales, où le fluide hydrothermal chaud et anoxique se mélange progressivement à l'eau de mer froide et oxygénée. En effet, les donneurs d'électrons (hydrogène, thiosulfate, soufre élémentaire) sont apportés par le fluide réduit et les accepteurs d'électrons (oxygène, nitrate) par l'eau de mer. Ces gradients sont représentés de manière schématique dans la **Figure 71 B** et les concentrations des substrats utilisés par la souche MO1340 y sont exposées (valeurs maximales mesurées *in situ* ou simulées).

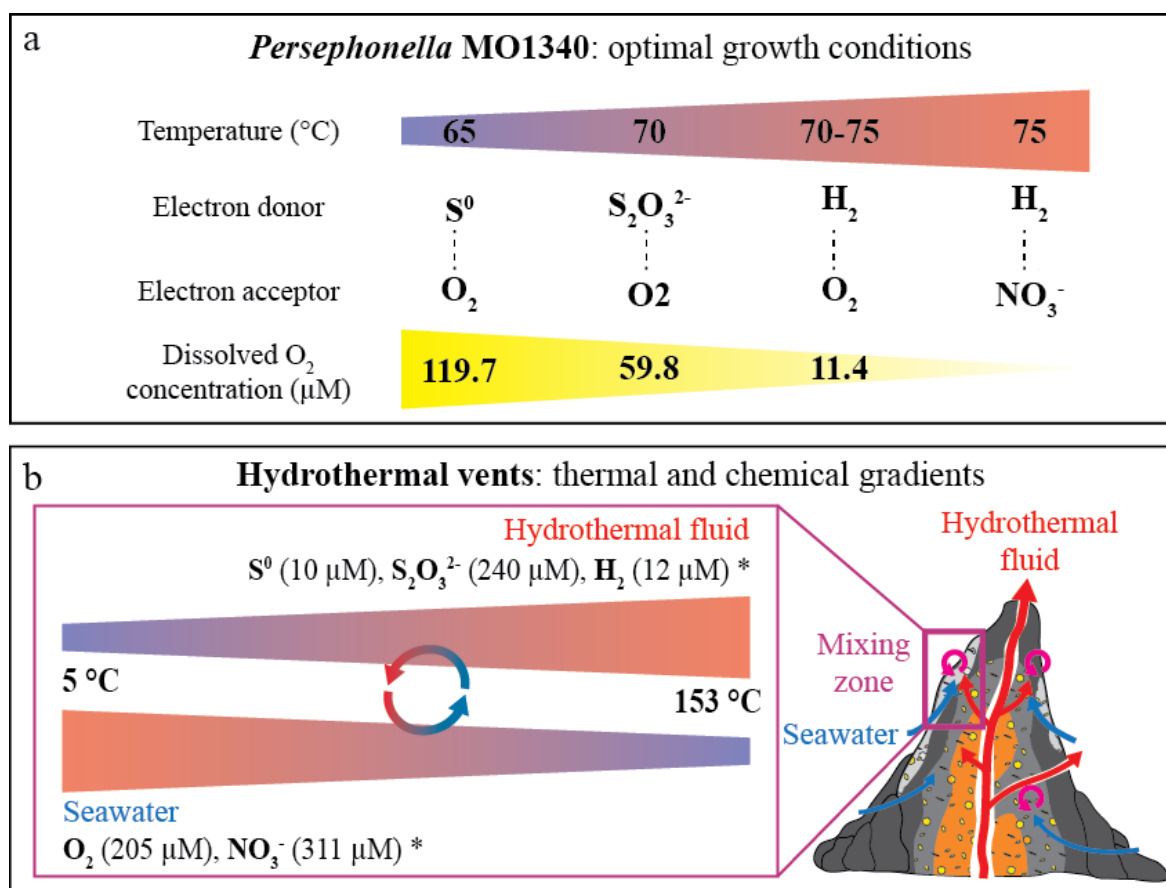


Figure 71 : (a) Représentation schématique des données obtenues sur les températures et concentration en oxygène optimales de la souche MO1340 selon les substrats ; (b) Représentation schématique des gradients physico-chimiques observés durant le mélange entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer. * Les valeurs présentées correspondent aux concentrations les plus élevées mesurées dans le gradient hydrothermal, ou mesurées par le modèle de dilution entre 5 et 153 $^\circ\text{C}$.

Afin d'apporter des données complémentaires sur l'écologie de la souche MO1340, des calculs thermodynamiques ont été réalisés en collaboration avec Cécile Cathalot du laboratoire Cycles Géochimiques et ressources (unité Géosciences Marines, Ifremer). L'enthalpie libre des quatre réactions catalysées par la souche a été calculée dans le gradient thermique entre 5 et 153 °C, à partir de données mesurées *in situ* (concentration en oxygène, thiosulfate, sulfate, nitrate) ou en utilisant un modèle numérique simulant la dilution du fluide hydrothermal et de l'eau de mer (concentration en soufre élémentaire, azote, hydrogène).

Tableau 14 : Résumé des réactions cataboliques réalisées par la souche MO1340 et des paramètres physiologiques en fonction des couples de substrats. Les valeurs de DeltaGr présentées ont été calculées pour une température de 72 °C dans le gradient hydrothermal.

Réaction	Température optimale de croissance (gamme) °C	Concentration optimale en O ₂ dissous (gamme) µM	DeltaGr (kJ/mol)
$S^0 + 1.5 O_2 + H_2O \rightarrow SO_4^{2-} + 2 H^+$	65 (55-80)	119,7 (8,5-> 179,5)	-517
$S_2O_3^{2-} + 2 O_2 + H_2O \rightarrow 2 SO_4^{2-} + 2 H^+$	70 (45-80)	59,8 (8,5-170,9)	-731
$2 H_2 + O_2 + \rightarrow 2 H_2O$	70-75 (55-80)	11,4 (ND-< 57)	-280
$2.5 H_2 + NO_3^- + H^+ \rightarrow 0.5 N_2 + 3 H_2O$	75 (45-80)	-	-271

Les enthalpies libres de chaque réaction, calculées dans le gradient hydrothermal à 72 °C (dans la gamme de température optimale de croissance de la souche MO1340), sont présentées dans le **Tableau 14**. Les valeurs calculées dans le gradient hydrothermal entre 5 et 153 °C sont présentées dans la **Figure 72**.

Les valeurs de DGr calculées à 72 °C, une température proche des températures optimales de croissance de la souche MO1340, indiquent que les réactions d'oxydation du soufre élémentaire et du thiosulfate (respectivement -517 et -731 kJ/mol) sont plus énergétiques que les réactions d'oxydation aérobie et anaérobie de l'hydrogène (-280 et -270 kJ/mol). Cette tendance est conservée sur toute la gamme de température étudiée, cependant l'énergie fournie par les réactions d'oxydation des composés soufrés diminue avec l'augmentation de la température (**Figure 72 b et c**). Cette diminution peut être causée par la déplétion en oxygène lors de la dilution de l'eau de mer avec le fluide hydrothermal anoxique. A l'inverse, la réaction

d'oxydation anaérobie de l'hydrogène est plus énergétique avec l'augmentation de la température ; ce qui est dû à la concentration croissante en hydrogène dans le gradient.

Ces données thermodynamiques sont cohérentes avec les paramètres physiologiques déterminés expérimentalement chez la souche MO1340. En effet, en présence de soufre élémentaire ou de thiosulfate le taux de croissance est optimal à plus basse température qu'en présence d'hydrogène. Dans le cas de l'oxydation aérobie de l'hydrogène, la valeur de DGr décroît avec l'augmentation de température, elle est minimale vers 72 °C puis augmente pour les températures supérieures. C'est donc à cette température que la réaction est la plus énergétiquement favorable dans les conditions *in situ*. C'est également à cette température (70-75 °C) que la souche présente le plus fort taux de croissance en présence d'hydrogène et d'oxygène.

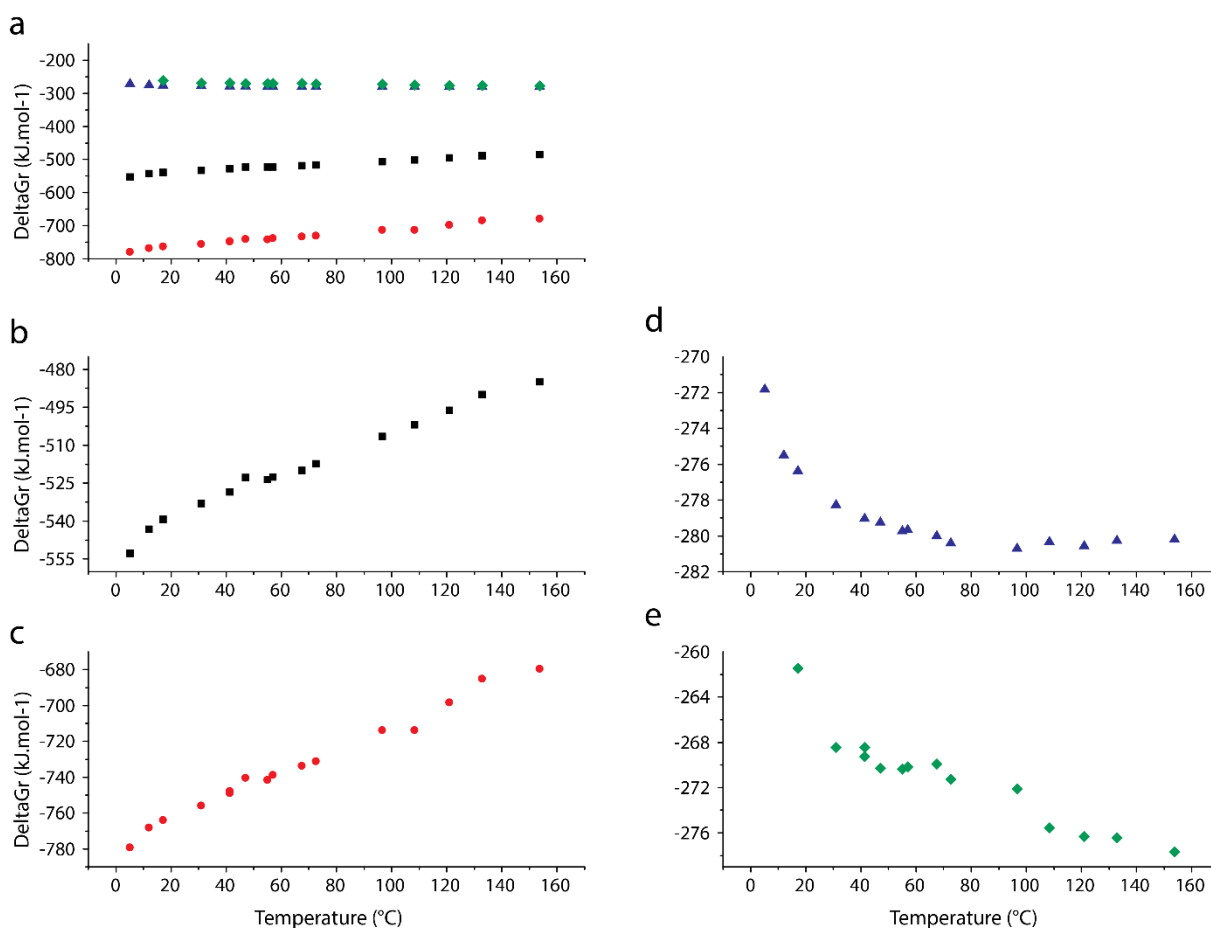


Figure 72 : Valeurs de DeltaGr calculées pour les réactions métaboliques réalisées par la souche MO1340 dans le gradient thermique du mélange entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer. (a) inclus les quatre réactions ; (b) oxydation du soufre élémentaire ; (c) oxydation du thiosulfate ; (d) oxydation aérobie de l'hydrogène ; (e) oxydation anaérobie de l'hydrogène avec réduction du nitrate

Cependant, même si ces résultats sont fortement corrélés pour cette réaction d'oxydation aérobie de l'hydrogène ($2 \text{H}_2 + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$), les données présentées ont été obtenues en se basant sur une simulation qui est une simplification des conditions *in situ* réelles. C'est pourquoi dans le cas des trois autres réactions, les valeurs d'enthalpie libre calculées ne donnent que des tendances et n'expliquent pas tous les résultats obtenus expérimentalement. En effet, les concentrations en espèces chimiques utilisées pour calculer les DeltaGr ont en partie été prédites par une simulation qui se base sur des valeurs mesurées dans le fluide hydrothermal pur, ou dans l'eau de mer du site de la cheminée Aisics (azote, hydrogène) ou d'un autre site (soufre élémentaire). Ces concentrations constituent donc un ordre de grandeur de référence plutôt que des valeurs précises. De plus, la simulation est réalisée en se basant sur un mélange simple entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer et ne prend pas en compte deux phénomènes : tout d'abord l'interaction entre ces deux éléments n'est pas libre au niveau d'une cheminée hydrothermale, mais est influencée par la structure de la cheminée et sa porosité. De plus, des réactions chimiques, biotiques ou abiotiques, peuvent avoir lieu notamment par le biais de précipitation et de solubilisation de minéraux, ce qui modifie la concentration des espèces chimiques dans le gradient de mélange. La réalisation d'un modèle complet prenant en compte ces paramètres permettrait de déterminer avec plus de précisions les concentrations de ces espèces chimiques (LaRowe *et al.*, 2014). Néanmoins, malgré les simplifications que comprend le modèle par rapport aux conditions environnementales, la comparaison de la concentration en sulfate simulée dans le gradient thermique par rapport aux valeurs mesurées *in situ* montre que les données produites par le modèle restent cohérentes (**Figure 73**). Les différences sont plus ou moins marquées selon la température, toutefois la tendance globale est similaire.

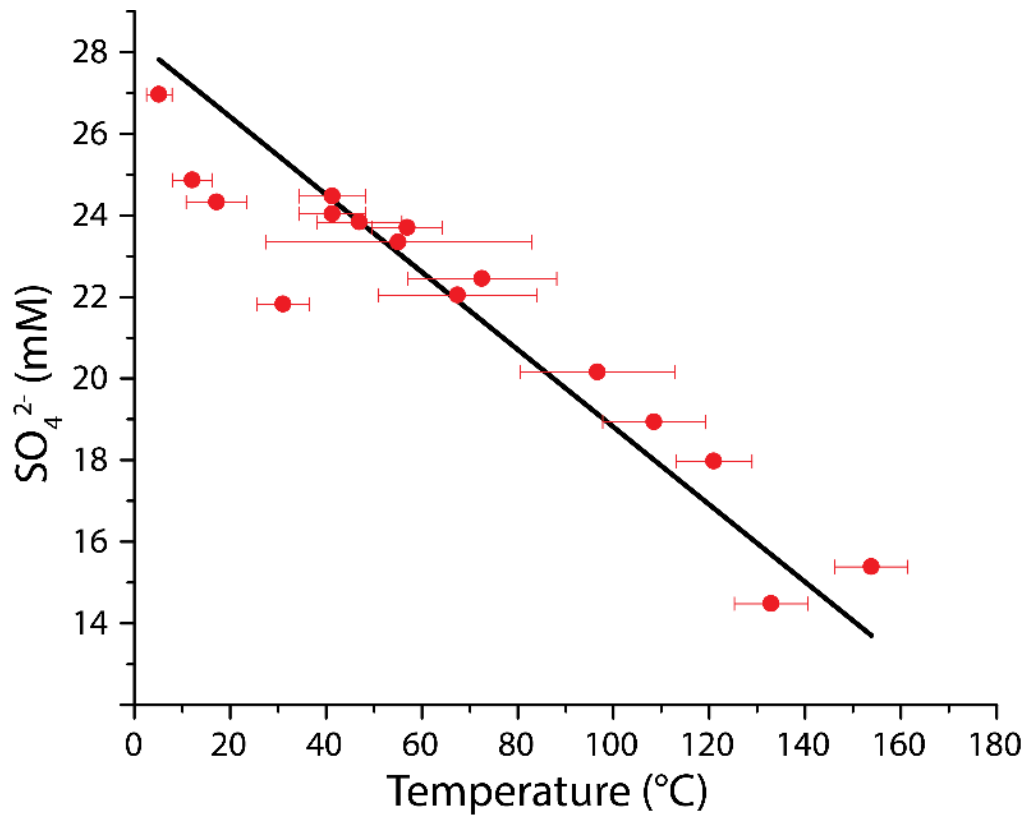


Figure 73 : Comparaison des données de concentration en sulfates dans le gradient thermique, données simulées (droite noire) et des valeurs mesurées in situ durant la campagne MOMARSAT 2015 (points rouges). L'erreur standard liée aux mesures de températures est présentée en rouge.

3) Conclusions

Les enrichissements réalisés à partir d'échantillons de cheminées hydrothermales avaient pour but d'isoler des *Bacteria* sulfo-oxydantes proches des genres *Thiomicrospira*, *Thiomicrothabodus* et *Hydrogenovibrio*. Une approche d'amplification par PCR avec des amorces spécifiques a été mise en place pour cribler les cultures et vérifier si un des phylotypes ciblés avait été enrichi. Cependant, par manque de temps les enrichissements n'ont pas permis de cultiver ces microorganismes.

Des cultures d'isolement de *Bacteria* sulfo-oxydantes ont également été réalisées et ont mené à l'isolement de la souche MO1340. Cette souche a été identifiée comme appartenant potentiellement à une nouvelle espèce et a fait l'objet d'un travail de caractérisation. Une étude approfondie du métabolisme de la souche MO1340 a ensuite été menée et a permis d'identifier les réactions métaboliques qu'elle pratique.

Les conditions de température et de concentration en oxygène optimales de croissance de la souche MO1340 ont été déterminées pour les quatre couples de donneurs et accepteurs d'électrons utilisés par la souche MO1340. La température optimale de croissance et la concentration optimale en oxygène de la souche MO1340 pour chaque substrat étaient inversement corrélées. Il s'agit à notre connaissance d'un résultat qui n'a pas encore été présenté pour d'autres souches de *Bacteria* ni d'*Archaea*.

De plus, cette relation entre la température, l'oxygène et les autres substrats est cohérente avec le gradient physico-chimique créé par le mélange entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer. Il semble donc qu'il s'agisse d'une adaptation de la souche MO1340 aux écosystèmes hydrothermaux, d'où les trois autres espèces du genre *Persephonella* ont été isolées.

4) Valorisation des travaux de caractérisation de la souche *Persephonella atlantica* MO1340

Les travaux de caractérisation de la souche *Persephonella atlantica* ainsi que l'étude de son métabolisme ont été valorisés sous la forme d'un article accepté le 18 décembre 2020 dans la revue *Systematic and Applied Microbiology*. Cet article est présenté dans les pages suivantes.

Persephonella atlantica sp. nov.: How to adapt to physico-chemical gradients in high temperature hydrothermal habitats

David X. François, Anne Godfroy, Clémentine Mathien, Johanne Aubé, Cécile Cathalot, Françoise Lesongeur, Stéphane L'Haridon, Xavier Philippon, Erwan G. Roussel



Persephonella atlantica sp. nov.: How to adapt to physico-chemical gradients in high temperature hydrothermal habitats



David X. François^a, Anne Godfroy^a, Clémentine Mathien^a, Johanne Aubé^a,
Cécile Cathalot^b, Françoise Lesongeur^a, Stéphane L'Haridon^a, Xavier Philippon^a,
Erwan G. Roussel^{a,*}

^a Univ Brest, Ifremer, CNRS, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes UMR6197, F-29280, Plouzané, France

^b Ifremer, Laboratoire Cycle Géochimique et Ressources (LCG/GM/REM), F-29280, Plouzané, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 October 2020

Received in revised form

18 December 2020

Accepted 18 December 2020

Keywords:

Aquificota

Persephonella

hydrothermal

chemolithoautotroph

temperature

thermophile

ABSTRACT

A novel thermophilic, microaerophilic and anaerobic, hydrogen- sulphur- and thiosulphate-oxidising bacterium, designated MO1340^T, was isolated from a deep-sea hydrothermal chimney collected from the Lucky Strike hydrothermal vent field on the Mid-Atlantic Ridge. Cells were short, motile rods of 1.4–2.2 μm length and 0.5–0.8 μm width. Optimal growth was observed for a NaCl concentration of 2.5 % (w/v) at pH 6.5. As for other members of the genus *Persephonella*, strain MO1340^T was strictly chemolithoautotrophic and could oxidise hydrogen, elemental sulphur or thiosulphate using oxygen as electron acceptor. Anaerobic nitrate reduction using hydrogen could also be performed. Each catabolic reaction had a different optimal growth temperature (65 to 75 °C) and an optimal dissolved oxygen concentration (11.4 to 119.7 μM at 70 °C for aerobic reactions) that varied according to the electron donors utilised. These experimental results are consistent with the distribution of these catabolic substrates along the temperature gradient observed in active hydrothermal systems. They strongly suggest that this adaptive strategy could confer a selective advantage for strain MO1340^T in the dynamic part of the ecosystem where hot, reduced hydrothermal fluid mixes with cold, oxygenated seawater. Phylogenetic analysis indicated that strain MO1340^T was a member of the genus *Persephonella* within the order *Hydrogenothermales* as it shared a 16S rRNA gene sequence similarity <95.5 % and ANI respectively 75.66 % with closest described *Persephonella* (*P. hydrogeniphila* 29W^T). On the basis of the physiological and genomic properties of the new isolate, the name *Persephonella atlantica* sp. nov. is proposed. The type strain is MO1340^T (=UBOCC-M-3359^T =JCM 34026^T).

© 2021 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Hydrothermal chimneys are mineral structures resulting from the precipitation of various chemical species during the mixing between the hot, reduced hydrothermal fluid and the cold, oxygenated seawater [31,34]. These structures and the surrounding seawater are characterized by steep gradients: (1) chemical gradients due to the mixing of reduced compounds (e.g. H₂, CH₄, H₂S, S₂O₃²⁻, Fe²⁺) from the hydrothermal fluid, and oxidised compounds from the surrounding seawater (e.g. O₂, NO₃⁻, SO₄²⁻); and (2) thermal gradients decreasing from the inner parts of chimneys heated

by hydrothermal fluid circulation (> 300 °C), to the external parts in contact with seawater (2–4 °C) [45,51].

These gradients cause a chemical disequilibrium that supports chemoautotrophic microorganisms that oxidise reduced compounds from hydrothermal fluid using oxidised species from seawater. Hence, adaptation of these microorganisms to the thermal and chemical gradients shapes their spatial distribution across hydrothermal habitats [10,11,51,74]. For example, dissolved oxygen concentrations are inversely correlated with temperature and usually separate aerobic mesophiles from anaerobic hyperthermophiles [1,41,45,46]. At temperatures exceeding 80 °C, a majority of microorganisms in these environments seem to have specifically adapted to conditions that are present only at small spatial scales in the hydrothermal chimney (e.g. *Methanococcales*, *Thermococcales*) [11,45]. However, at lower temperatures, the diversity of reactants (e.g. oxygen, nitrate, sulphides) seem to favour metabolic versatili-

* Corresponding author at: Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, Univ Brest, Ifremer, CNRS, Plouzané, France.
E-mail address: Erwan.Roussel@ifremer.fr (E.G. Roussel).

ity as it was described for *Epsilonbacteraeota*, one of the dominant lineages in these habitats [5].

Members of phylum *Aquificota* are another illustration of chemoautotrophic microorganisms metabolically versatile that are ubiquitous in deep-sea hydrothermal vents [18,25,47,50,58]. The phylum *Aquificota* (previously known as *Aquificae*) was first described in 2001 and contains now two classes according to the Genome Taxonomy Database [55], *Desulfurobacteriia* and *Aquificae*. *Aquificae* are divided in two orders: *Aquificales* and *Hydrogenothermales* [14,28,39,55]. All members of the phylum *Aquificota* are thermophilic or hyperthermophilic Gram-negative rods *Bacteria*, isolated from terrestrial hot ecosystems, coastal, or deep sea hydrothermal vents [29]. They share an obligate or facultative chemolithoautotrophic metabolism by fixing carbon dioxide using reductive tricarboxylic acid cycle (rTCA) [32], with hydrogen or reduced sulphur compounds as electron donors and nitrate as electron acceptors, also oxygen is used as electron acceptor by members of the class *Aquificae*. *Aquificota* mostly diverge from other phyla by displaying distinct 16S rRNA gene sequences and genomic conserved signature indels [29]. Members of genus *Persephonella*, and other genera in the family *Hydrogenothermaceae* (*Hydrogenothermus*, *Sulfurihydrogenibium* and *Venenivibrio*) share the common traits described above, and show an extensive genomic diversity exhibiting a biogeographic distribution pattern [47]. Although endemic and widely distributed among deep sea hydrothermal vents the genus *Persephonella* is, to date, only composed of three described species isolated from hydrothermal vents in the Pacific ocean: *P. marina* EX-H1^T, *P. guaymasensis* EX-H2^T and *P. hydrophilila* 29W^T [25,50].

In this study, we report the isolation of a novel thermophilic, microaerophilic to anaerobic, chemolithoautotrophic *Persephonella* species obtained from an Atlantic deep-sea hydrothermal vent. Characterization of this novel strain demonstrates metabolic adaptation to a wide range of physical and chemical conditions.

Material and methods

Culture, enrichment and isolation

The bottom part of the Aisics chimney (sample Chem08; 1690 m depth) [61] was sampled using the ROV *Victor 6000* during the MOMAR2008 oceanographic cruise [16] at the Lucky Strike hydrothermal vent field on the Mid-Atlantic Ridge (37° 17' 20.26" N, 32° 16' 32.05" W). Chimney sample was brought to the sea surface in a dedicated decontaminated insulated sample box. On board, chimney fragments were crushed under anoxic conditions using an anaerobic chamber and stored at 4 °C in sterile serum vials filled with artificial sterile seawater (Sea salts, Sigma Aldrich) under a N₂ atmosphere. Ten years later, 0.5 mL of hydrothermal chimney slurry was used to inoculate the medium described below. X-ray diffraction analysis showed that chimney sample was mainly composed of sulphides including chalcopyrite, pyrite and marcasite (Ewan Pelleter, personal communication).

Enrichment cultures were performed in 50 mL glass bottles sealed with butyl septa, and containing 20 mL of the medium described by Parkes et al. omitting Na₂S and FeCl₂ solutions [54]. This medium contained per liter: NaCl (24.3 g), MgCl₂·6H₂O (10 g), CaCl₂·2H₂O (1.5 g), KCl (0.66 g). Trace elements were provided by SL-10 solution (1 mL), Selenite-Wolfram solution (0.2 mL), and 1 mL of KBr (0.84 M), H₃BO₃ (0.4 M), SrCl₂ (0.15 M), NH₄Cl (0.4 M), KH₂PO₄ (0.04 M) and NaF (0.07 M) solutions. The medium was sterilized by autoclaving for 30 minutes at 100 °C and was buffered by adding NaHCO₃ (2.52 g).

Thiosulphate was added at a final concentration of 10 mM as electron donor. Gas phase was composed of N₂:CO₂ (80:20,

150 kPa) and 1 mL of sterile air was added with a syringe in order to create microaerophilic conditions. After 12 days incubation at 30 °C without agitation, subcultures from positive enrichment were consecutively incubated 7 days at 50 °C and 7 days at 60 °C. Strain MO1340^T was isolated by three consecutive tenfold dilutions in Hungate anaerobic tubes incubated at 60 °C in the same medium as for the enrichment step. Five successive transfers were also performed on medium solidified with 1 % gellan gum (Sigma Aldrich) incubated at 70 °C in serum vials with hydrogen as energy source (gas phase H₂:CO₂ 80:20, 200 kPa) and nitrate as electron acceptor (8 mM). Purity of the strain was regularly checked by microscope observation and 16S rRNA gene sequencing.

Morphological characterization

Cells morphology and motility of strain MO1340^T were observed under an Olympus BX60 phase contrast microscope. Transmission electron microscopy observations were performed without staining on exponential phase cultures grown on thiosulphate and oxygen at 70 °C (JEM-1400, JEOL; *Plateforme d'Imagerie et de Mesures en Microscopie*, University of Brest).

Physiology and growth requirements

Unless otherwise stated, all physiological characterizations were done in anaerobic Belco tubes (Belco Glass Inc., Vineland N.J.) in triplicate filled with 15 mL of the medium described above at pH 6.8, incubated without agitation at 70 °C. Uninoculated media blanks were used as negative controls for each culture condition. Growth was determined from cell counting by microscope observation using Thoma cell counting chamber (depth: 0.02 mm). Flow cytometry counting was also performed on cells fixed with 2.5 % (w/v) glutaraldehyde and stored at 4 °C. Cell samples were diluted 10 to 100 times in a saline solution with 2.5 % (w/v) NaCl and stained with SYBRGreen I (Sigma Aldrich). Cells were counted using a Cyflox Space (Sysmex, Partec).

Dissolved oxygen requirement was determined by increasing oxygen concentration in the gas phase from 0 to 21 % at 150 kPa (0 to 179.5 μM of dissolved oxygen) in 3 different media containing respectively (1) thiosulphate (10 mM); (2) colloidal elemental sulphur 1 % (w/v); or (3) hydrogen (80 % in the gas phase, 200 kPa; 820.7 μM of dissolved hydrogen) as electron donors. The influence of temperature on growth was determined for temperatures ranging from 40 to 85 °C in 4 different culture conditions: in the presence of (1) thiosulphate (10 mM) under N₂:CO₂:O₂ gas phase (77.5:20:2.5, 150 kPa; 21.4 μM of dissolved oxygen); (2) elemental sulphur (1 %, w/v), under N₂:CO₂:O₂ gas phase (66:20:14, 150 kPa; 119.7 μM of dissolved oxygen); (3) hydrogen in anoxic conditions with nitrate (8 mM) as electron acceptor under H₂:CO₂ gas phase (80:20, 200 kPa; 820.7 μM of dissolved hydrogen); and (4) hydrogen in microaerophilic conditions under H₂:CO₂:O₂ gas phase (79:20:1, 200 kPa; 820.7 μM of dissolved hydrogen; 11.4 μM of dissolved oxygen). NaCl concentration and pH optimum and range were determined on thiosulphate (10 mM) containing medium, under N₂:CO₂:O₂ (77.5:20:2.5, 150 kPa) gas phase. NaCl concentrations tested ranged from 0 to 5.5 % (w/v). pH was adjusted from 4.5 to 6 by adding increasing volumes of sterile solutions of 1% (w/v) NaHCO₃ to medium without buffer. For pH above 6, 2 % (w/v) Na₂CO₃ was added to medium buffered with 2 mM NaHCO₃ (instead of 30 mM in standard medium).

Electron donor and acceptor requirement

Electron donors were tested by supplementing mineral medium (artificial seawater described above, without Na₂S nor FeCl₂) with: hydrogen (80 % in the gas phase, 200 kPa), formate (10 mM), suc-

cinat (10 mM), ferrous iron (10 mM), acetate (1 mM), ammonium chloride (15 mM) or elemental sulphur (1 % w/v). Oxygen (1.5 or 7 % in the gas phase, 150 kPa) or nitrate (10 mM) were added as electron acceptors in all conditions. The following electron acceptors were tested in presence of H₂:CO₂ (80:20, 200 kPa): sulphate (10 mM), sulphite (10 mM), nitrite (1 or 14 mM), ferric iron (10 mM), elemental sulphur (1 % w/v), acetate (1 mM) or thiosulphate (10 mM). Organic carbon sources were tested in presence of N₂:CO₂:O₂ (73:20:7, 150 kPa) at a final concentration of 2 g/L (yeast extract or peptone) or 5 g/L (glucose, sucrose, fructose, lactose or sorbitol). Mixotrophic growth was tested using yeast extract (0.5 g/L), peptone (0.5 g/L) and glucose (1 g/L) as carbon sources and sodium bicarbonate was replaced by PIPES disodium salt (6 g/L). Hydrogen (200 kPa) and nitrate (10 mM), or thiosulphate (10 mM) or sulphur (1 % w/v) in the presence of oxygen (7 % in the gas phase, 150 kPa) were provided as energy sources.

Consecutive positive cultures were transferred three times on the same medium to ensure that growth was not due to substrate carry-over from the inoculum. Controls containing no electron acceptor or donor were performed. Utilisation of various electron donors and acceptors were also performed on the closest relative to strain MO1340^T, *Persephonella hydrogeniphila* 29W^T (DSM 15103) provided by the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. Growth in the absence of Balch vitamins solution was tested (as recommended in [71]) using the standard medium in the presence of thiosulphate and oxygen. In order to identify the metabolic reactions performed by strain MO1340, end-point cultures were carried out and both substrates consumption and metabolic by-products were quantified. Four couples of substrates were tested (S₂O₃²⁻/O₂; S⁰/O₂; H₂/O₂; H₂/NO₃⁻) in the same conditions as described above. At least three negative controls and 3 to 10 culture replicates were performed and incubated at 70 °C.

Analytical techniques

Hydrogen, nitrogen and carbon dioxide concentration in the headspace phase were measured using a modified INFICON/Micro GC FUSION Gas Analyser (INFICON, Basel, Switzerland) fitted with a pressure gauge (CTE8005AY0, Sensortech GmbH) and two conductivity detectors. Separation was performed using two columns: molecular sieve 10 m column and argon as a carrier gas; and a RT-Q 12 m using helium as a carrier gas. Gas concentrations were calculated using the method of Mah et al. [42]. Concentrations of dissolved oxygen and hydrogen in the experimental conditions were calculated for seawater at 70 °C as described respectively by Weiss et al. [81] and Crozier et al. [9].

Thiosulphate, nitrate and sulphate concentrations were quantified by anion chromatography using a Dionex ICS-2000 Reagent-Free Ion Chromatography System (Thermo Fisher Scientific) as described by Webster et al. [80]. A potential hydrogen peroxide production was assayed by using the MyQubit AmplexTM Red Peroxyde Assay (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendation. Stoichiometry of the reactions were calculated from experimental data and then compared to metabolic reactions described in literature [2,78].

Thermodynamic calculations and Arrhenius parameters

To quantify the energy gained from each reactional pathway considered, we calculated the overall Gibbs free energy of the reaction derived from the following expression (Eq. 1)

$$\Delta_r G = \Delta_r G_0 + RT \ln Q_r \quad (1)$$

Where $\Delta_r G_0$ represents the standard state Gibbs free energy of reaction, R is the gas constant, T is temperature in Kelvins and

Q_r stands for the activity product for the natural conditions. The activity product Q_r is given by Eq. (2)

$$Q_r = \prod a_i^{\gamma_{i,r}} \quad (2)$$

Where a_i stands for the activity of the i^{th} constituent of the reaction r , and $\gamma_{i,r}$ represents the stoichiometric reaction coefficient (negative for reactants, positive for products). Activities are derived from concentrations through the extended Debye-Huckel equation for activity coefficients. Thermodynamic and hydrodynamic modelling were performed on R [77] using the CHNOSZ database [12] and ReacTran [69], gsw [37] and marelac [70] packages. The metabolic pathways and reactions considered in this work are listed in Table 2.

Concentrations of the chemical species at various temperatures were determined following two approaches. 1) When available, we used *in situ* data collected along the mixing gradient between end member hydrothermal fluid at Aisics chimney and surrounding seawater using the PEPITO water sampler [8], coupled to an oxygen Aanderaa optode and the CHEMINI *in situ* chemical analyser for total sulphide concentrations [79]. 2) When not available, a simple hydrodynamic model was used to predict dilution processes along the mixing gradient and calculate concentrations assuming simple mixing (i.e. no reaction) between the hydrothermal fluid and the surrounding seawater. Values of the end-member fluid are based on the literature [6,61] or inferred from other hydrothermal sites when no data are available on Aisics ([19] for elemental sulphur). *In situ* data were collected during the MOMARSAT 2015 cruise on board R/V Pourquoi Pas? [65]. Fluid samples were analysed back on shore for nitrate, sulphate and thiosulphate concentrations using anion chromatography as described by Webster et al. [80].

Concentrations of the end-member fluid might have changed since the strain was initially collected in 2008. However reported concentrations of Aisics high temperature fluids show limited variability [6,61] and we therefore expect only minor alteration of the distribution of chemical species along the mixing gradient over the years.

The effect of temperature on specific growth rate was studied using Arrhenius plots and Q_{10} values that were calculated as described by Roussel et al. 2015 [62]. Statistical analysis and multiple peak fitting were performed using Origin 2016 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) with the multiple peak fit tool using the Gauss peak function.

Genome sequencing and analysis

Genomic DNA of strain MO1340^T was isolated by PCI extraction [82] from cells grown on thiosulphate and oxygen at 70 °C. 16S rRNA gene was amplified by PCR using bacterial primers E8F and U1492R [13]. The gene was sequenced in triplicate using Sanger technology (Eurofins, Germany). Gene sequence (1444 bp) was deposited in the GenBank/EMBL/DDBJ databases under accession number MT376293.

The 16S rRNA sequences from strain MO1340^T and 11 of the closest *Hydrogenothermales* obtained by BLASTN search were then edited (1364 bases) in the Geneious v10.2.3 program and aligned using MUSCLE program [15,36]. Phylogenetic reconstructions were made on the basis of evolutionary distance using neighbour-joining [63] and maximum-likelihood methods with Tamura-Nei correction (respectively modelled with G and G+I parameters) using the MEGA 7 software [38,75]. The reliability of internal branches was assessed using the bootstrap method with 1000 replicates [17].

Genome sequence determination of strain MO1340^T was carried out using Illumina HiSeq technology (Eurofins Scientific, Germany). Genome assembly was performed using spades v.3.13.0 ([3]). Completion and contamination were assessed using CheckM

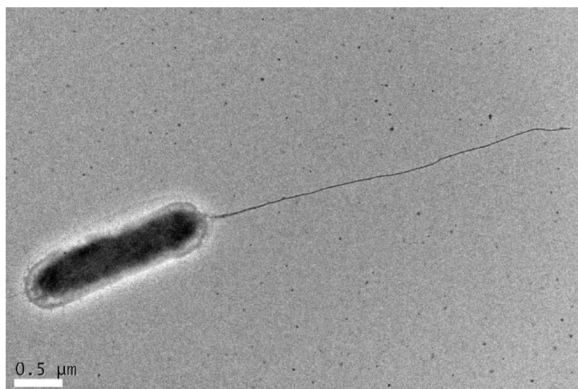


Fig. 1. Transmission electron micrograph of a cell of *Persephonella atlantica* strain MO1340^T showing the polar flagellum. Scale bar represents 0.5 μm.

[56] and quality of the genome sequence was checked using the Quality Assessment Tool for Genome Assemblies (QUAST) [30]. Genome was annotated using PGAP (Prokaryotic Genome Annotation Pipeline) [76]. Average Nucleotide Identity (ANI) values were calculated with the OrthoANLu algorithm [87] and can accurately replace DNA–DNA hybridization values for strains for which genome sequences are available [24].

Results and discussion

Morphology and physiology of strain MO1340^T

Strain MO1340^T morphological, physiological, genomic and metabolic features and those of its closest relatives within the phylum *Aquificota*, family *Hydrogenothermaceae* are presented in Table 1. Cells of strain MO1340^T were Gram-negative short rods from 1.4–2.2 (SD = 0.42 μm, n = 33) μm length and from 0.5–0.8 μm width (SD = 0.13 μm, n = 33), and were in the range of cell sizes reported for the other *Persephonella* species (Table 1). Irregular cocci were frequently observed at temperatures close to the limits for growth. TEM observation showed that one-third of the cells had a single polar flagellum (Fig. 1). However, motility was rarely observed, in most cases for dividing cells and in medium containing elemental sulphur. On solid media, round and orange colonies (1 mm in diameter) were observed after 1 to 3 days whereas cultures in liquid media were colourless.

Growth was observed for strain MO1340^T at NaCl concentrations ranging from 1.5 to 3.5 % (w/v) with an optimum at 2.5 % and at pH between 5.3 and 7.0 with an optimum around 6.5, suggesting these microorganisms are mostly adapted to habitats where the hydrothermal fluid mixes with the seawater. Although strain MO1340^T was characterized for these parameters in presence of thiosulphate and dioxygen, optimal NaCl concentration and pH for growth were similar to those obtained for all of *Persephonella* species grown with hydrogen and nitrate (i.e. NaCl : 2.5 % ; pH : 6.0 to 7.2; Table 1). However, as detailed in the last section “Physiological and metabolic adaptation to a contrasted environment”, the optimal growth temperature (i.e. 65 to 75 °C) and dioxygen dissolved concentration (i.e. 11.4 to 119.7 μM) were substrate-dependent.

Insights into the metabolism of *Persephonella* strain MO1340^T

Like other *Persephonella* isolates, strain MO1340^T was able to grow chemolithoautotrophically on various inorganic catabolic substrates. This includes oxidation of reduced-sulphur compounds, hydrogen-oxidation, aerobic respiration or nitrate-reduction [25,50]. The isolate grew in microaerophilic conditions with thio-

sulphate (10 mM), elemental sulphur (1 % w/v) or hydrogen (dissolved concentration 820.7 μM). Interestingly, the optimal oxygen concentrations varied according to electron donor and acceptor (optimum dissolved concentrations from 11.4 to 119.7 μM at 70 °C). Strain MO1340^T was also able to grow anaerobically with hydrogen as electron donor (dissolved concentration 820.7 μM) using nitrate (8 mM) as final electron acceptor. In order to compare strain MO1340^T to its closest relative, growth requirements were also tested in the same conditions using *P. hydrogeniphila* 29W^T (DSM 15103). Although *P. hydrogeniphila* 29W^T was initially described as only capable of using hydrogen as electron donor [50], growth kinetic showed it could also oxidise thiosulphate to sulphate with oxygen as electron acceptor (Fig. SM 1, Table 2), which is congruent with the presence in its genome of core genes *soxABXYZ* (GenBank accession number: PRJEB22457). Moreover, no aerobic or anaerobic growth was observed for *Persephonella* strain MO1340^T in the presence of all tested organic carbon sources (yeast extract, peptone, glucose, sucrose, fructose, lactose, or sorbitol) even in presence of carbon dioxide. In the absence of vitamins, growth was not inhibited, even after five subcultures, showing strain MO1340^T is a strict autotroph using only carbon dioxide as sole carbon source as defined by Srinivasan et al. [71].

Substrates consumption and metabolites production by strain MO1340^T were measured in order to establish stoichiometry of each catabolic reaction and infer the associated standard Gibbs energy. Measured stoichiometry were consistent with the reactions described by Amend et al. [2] (Table 2), excepted for aerobic elemental sulphur oxidation where discrepancies were observed. We hypothesize that it might result from unquantified intracellular metabolic intermediates accumulation. For anaerobic hydrogen-dependent denitrification, strain MO1340^T realised a complete reduction of nitrate to nitrogen without accumulation of nitrite, nitrous oxide or ammonium which is consistent with previous studies on *P. hydrogeniphila* 29W^T [50]. Moreover, in order to accurately determine the reaction involved in aerobic hydrogen oxidation, as the end-product of aerobic hydrogen oxidation can either be water ($2 \text{H}_2 + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$) or hydrogen peroxide ($\text{H}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$) [78], hydrogen peroxide production was assessed. As no production of hydrogen peroxide was detected, strain MO1340^T can probably perform the Knallgas reaction as commonly described for other *Aquificota* [27,28]. Thermodynamic calculations based on the geochemical conditions measured *in situ* at Lucky Strike vent field showed that energy provided by this reaction could reach -280 kJ/mol (Table 2), suggesting aerobic hydrogen oxidation could be a significant metabolism in hydrothermal ecosystems [44,66].

Physiological and metabolic adaptation to a contrasted environment

Growth rate measurements showed that strain MO1340^T exhibited different responses to temperature depending on the catabolic reactions involved. Optimal growth temperatures were respectively 65, 70, 70–75 and 75 °C for the following redox couples: S^0/O_2 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}/\text{O}_2$, H_2/O_2 , H_2/NO_3^- . All curves for the determination of optimal growth temperature presented a plateau between 5 and 15 °C below the optimal growth temperature (Fig. 2). This curve shape was also previously observed for *P. hydrogeniphila* 29W^T (supplementary data in ref. [50]) that is the closest relative of strain MO1340^T. Arrhenius plots obtained from data of optimal growth temperature experiments on strain MO1340^T also revealed two distinct slopes at sub-optimum temperatures separated by a “critical temperature” instead of a single linear slope (Fig. SM 2). Various microorganisms exhibiting growth that does not meet the square root equation [57] have also been described in studies of mesophilic and thermophilic and psychrophilic *Bacteria* [26,48,53]. Wiegel et al. suggested that these broken Arrhenius

Table 1

Comparison of some characteristics of strain MO1340^T with other closest marine strains within the family *Hydrogenothermaceae*. Strain MO1340^T (this study); *Persephonella hydrogeniphila* 29W^T [50]; *P. marina* EX-H1^T [25]; *P. guaymasensis* EX-H2^T [25]; *Hydrogenothermus marinus* VM1^T [72]; +, positive; -, negative; *, only with O₂ as electron acceptor; **, shown in this study; ^a, culture grown with S⁰/O₂; ^b, culture grown with S₂O₃²⁻/O₂; ^c, culture grown with H₂/O₂; ^d, culture grown with H₂/NO₃⁻; Inconsistent growth; ND, not determined. Oxygen concentration presented was calculated in gas phase. DNA G + C content was calculated from genome analysis.

Characteristics	Strain MO1340	<i>P. hydrogeniphila</i> 29W ^T	<i>P. marina</i> EX-H1 ^T	<i>P. guaymasensis</i> EX-H2 ^T	<i>Hydrogenothermus marinus</i> VM1 ^T
Cell morphology	rods	rods - cocci	rods	rods	rods
Cell size (length/width μm)	1.4-2.2 / 0.5-0.8	2.3-2.7 / 0.9-1	2-4 / 0.3-0.4	2-4 / 0.3-0.4	2-4 / 1-1.5
Motility	+	+	+	+	+
Temperature range	50-75 ^a ; 45-80 ^{bd} ; 55-80 ^c	50-72.5 ^d	55-90 ^d	60-80 ^d	65 ^c
Temperature optimum (°C)	65 ^a ; 70 ^b ; 70-75 ^c ; 75 ^d	70 ^d	70 ^d	75 ^d	45-80 ^c
pH optimum	6.5 ^b	7.2 ^d	6 ^d	6 ^d	5-7 ^c
pH range	5.30 - 7 ^b	5.5-7.6 ^d	4.7-7.5 ^d	4.7-7.5 ^d	5-7 ^c
NaCl optimum (% w/v)	2.5 ^b	2.5 ^d	2.5 ^d	2.5 ^d	2-3 ^c
NaCl range (% w/v)	1.5-3.5 ^b	1.5-5.0 ^d	1.0-4.5 ^d	1.0-4.5 ^d	0.5-6 ^c
O ₂ optimum (mM)	7.36 ^a ; 3.68 ^b ; 0.7 ^c	0.63-0.84 ^c	0.97-1.45 ^c	0.97-1.45 ^c	0.69-1.38 ^c
O ₂ range (mM)	0.52-> 11 ^a ; 0.52-10.5 ^b ; ND-3.5 ^c	0.10-1.05 ^c	ND-< 4.53 ^c	ND-< 5.32 ^c	0.34-5.53 ^c
Electron donors	H ₂ , S ₂ O ₃ ²⁻ *, S ⁰ *	H ₂ , S ₂ O ₃ ²⁻ **	H ₂ , S ₂ O ₃ ²⁻ *, S ⁰ *	H ₂ , S ₂ O ₃ ²⁻ *, S ⁰ *	H ₂
Electron acceptors	NO ₃ ⁻ , O ₂	NO ₃ ⁻ , O ₂	NO ₃ ⁻ , O ₂ , S ⁰ , SO ₄ ²⁻ , acetate	NO ₃ ⁻ , O ₂	O ₂
Genome accession number	JAACYA000000000	NZ_OBEI000000000	NC.012440	-	NZ_REF000000000
G + C content (mol%)	37.1	35.1	37.1	-	27.7
Size (Mb)	1.89	2.0	1.98	-	1.60
No. of contigs	5	19	2	-	19
No. of ORFs	2028	2130	2083	-	1713

Table 2

Summary of catabolic reactions performed by *Persephonella atlantica* strain MO1340^T and physiological parameters according to substrates couples. Optimal temperature corresponding to the two peaks observed by bimodal Gauss fitting of growth curves reported in Fig. 3. Putative *in situ* ΔGr values at 72 °C were calculated at optimal growth temperature of the reactions, using the high concentration range from Rommeveaux et al [61].

Reaction	Optimal growth temperature (range) °C	1 st and 2 nd peak from bimodal fitted curves (°C) [⊠]	Optimal O ₂ concentration in gas phase (range) mM	Optimal dissolved O ₂ concentration (range) μM	Q ₁₀ (range of linearity on Arrhenius plot, °C)	ΔGr (kJ/mol)
S ⁰ + 1.5 O ₂ + H ₂ O → SO ₄ ²⁻ + 2 H ⁺	65 (55-80)	56.3-67.4	7.36 (0.52-> 11)	119.7 (8.5-> 179.5)	1,53 (55-65)	-517
S ₂ O ₃ ²⁻ + 2 O ₂ + H ₂ O → 2 SO ₄ ²⁻ + 2 H ⁺	70 (45-80)	52.7-68.8	3.68 (0.52-10.5)	59.8 (8.5-170.9)	1,18 (50-70)	-731
2 H ₂ + O ₂ + H ⁺ → 2 H ₂ O	70-75 (55-80)	63.7-74.1	0.7 (ND-< 3.5)	11.4 (ND-< 57)	1,3 (60-75)	-280
2.5 H ₂ + NO ₃ ⁻ + H ⁺ → 0.5 N ₂ + 3 H ₂ O	75 (45-80)	59.8-74.2	ND	ND	1,33 (55-75)	-271

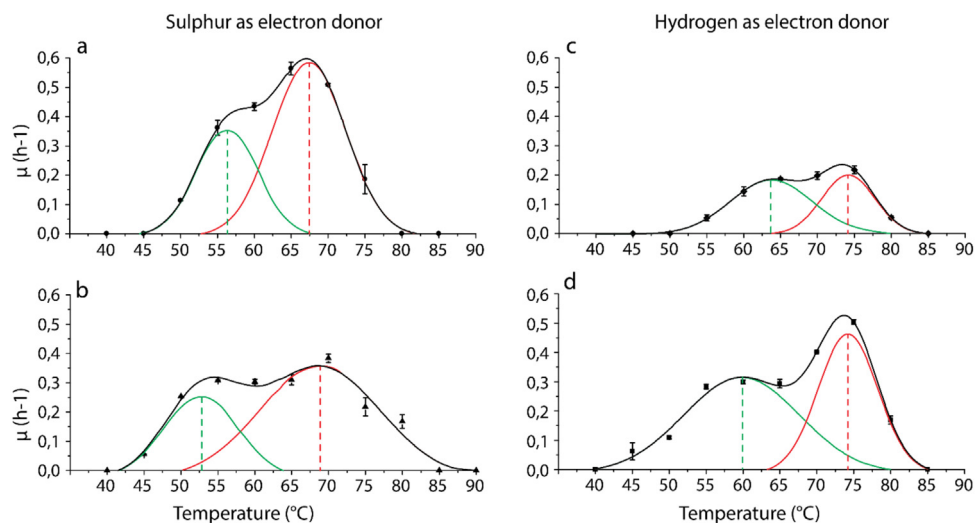


Fig. 2. Effect of temperature (°C) on the specific growth rate (h⁻¹) of *Persephonella atlantica* strain MO1340^T. Cells were grown on (a) S⁰/O₂; (b) S₂O₃²⁻/O₂; (c) H₂/O₂; (d) H₂/NO₃⁻. Black lines correspond to experimental curves. Green and red lines correspond to bimodal fitted curves. Standard errors based on triplicate experiments are shown for each condition.

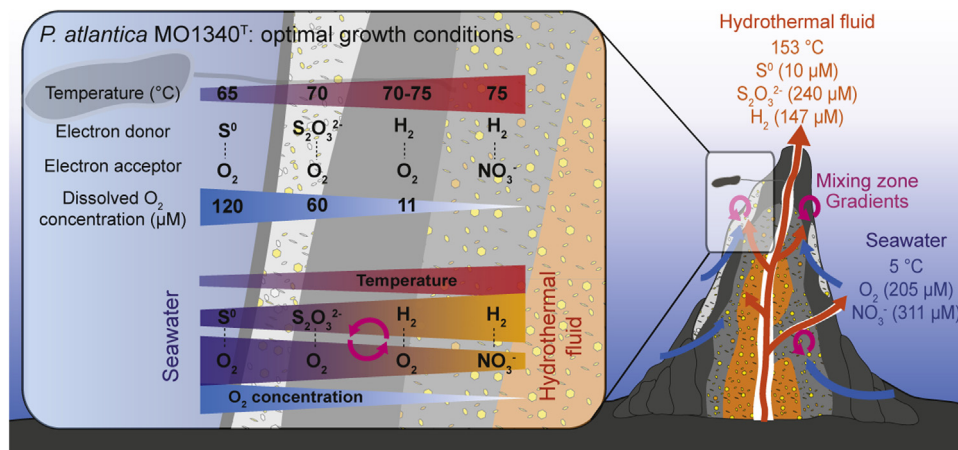


Fig. 3. Schematic comparison of optimal temperatures and O₂ concentrations for *Persephonella atlantica* strain MO1340^T depending on catabolic substrates and *in situ* thermal and chemical gradients observed during the mixing of hydrothermal fluid and seawater. Concentration of chemical species correspond to the maximal concentrations measured *in situ* or calculated for the hydrothermal physico-chemical gradient between 5 and 153 °C (details in section *Thermodynamic calculations and Arrhenius parameters*).

plots could be the consequence of the expression of different sets of key enzymes capable of undergoing conformational changes at different temperatures [83–85]. Moreover, the effect of temperature on the specific growth rate fitted different bimodal Gaussian patterns ($R^2 = 0.96$ to 1) depending on the catabolic pathway (Fig. 2). Each bimodal pair could be grouped according to the composition of the electron donor involved (i.e. sulphur or hydrogen; Fig. 2). For sulphur based electron donors (i.e. elemental sulphur and thiosulphate) both peaks were comprised between 52.7–56.3 and 67.4–68.8 °C, whereas for hydrogen both peaks were comprised between 59.8–63.7 and 74.1–74.2 (Table 2 and Fig. 2), suggesting that the ≈ 7 °C shift depending on the electron donor could be the consequence of a different temperature range for the enzymes involved in each catabolic pathways (Sox enzymes or hydrogenases). For example, it was shown for *Hydrogenobacter thermophilus*, another member of phylum *Aquificota*, but in the order *Aquificales*, which presents physiological characteristics close to those of strain MO1340^T [35], that the Sox enzymes implied in aerobic thiosulphate oxidation exhibited an optimal activity at lower temperature than the nitrite reductase (respectively 60 and 70–75 °C) [64,73].

Oxygen requirements of strain MO1340^T also depended on the electron donor used. The optimal dissolved oxygen concentration was 11.4 μM (0.7 mM in gas phase) for hydrogen oxidation, and was comparable to other *Persephonella* species (0.73 to 1.21 mM in gas phase) in the same culture conditions [25,50]. However this value was 5 to 11 fold higher in the presence of thiosulphate or elemental sulphur, respectively 59.8 and 119.7 μM (3.68 and 7.36 mM in gas phase). Comparison of growth parameters of each catabolic reaction performed by strain MO1340^T showed that optimal growth temperature and optimal oxygen concentration were inversely correlated (Table 2 and Fig. 3). For example, oxidation of sulphur species such as thiosulphate and elemental sulphur allowed growth at higher oxygen concentration and at lower temperature (respectively 59.8 and 119.7 μM dissolved oxygen and 65/70 °C) whereas hydrogen oxidation coupled to oxygen reduction was optimal with only 11.4 μM oxygen at 70–75 °C. Anaerobic hydrogen oxidation coupled to nitrate reduction was optimal at a higher temperature (75 °C) compared to microaerophilic metabolisms. This inverse relationship between temperature and oxygen concentration was congruent with the geochemical gradients observed *in situ* where oxygen depletion occurs as temperature increases along the mixing gradient between the cold deep seawater and the hot hydrothermal fluid that is expelled at the seafloor (Fig. 3).

In order to estimate the energy provided by catabolic reactions performed by strain MO1340^T in natural settings, thermodynamic calculations were taken into consideration. We used *in situ* data collected along the mixing between seawater and the hydrothermal fluid from Lucky Strike, the site from which the strain was isolated. When data were not available, we used a numerical model to predict dilution of the substrates considered along the mixing gradient. The observed and predicted thermal and chemical gradients in the mixing zone were used as proxies to determine the geochemical settings of hydrothermal chimneys, in order to calculate the Gibbs free energy under *in situ* conditions (ΔG_r) for each catabolic reaction of strain MO1340^T at its optimal temperature (Table 2). Elemental sulphur and thiosulphate oxidation reactions were the most energetic (respectively -517 and -731 kJ/mol) compared to aerobic and anaerobic hydrogen oxidation reactions (respectively -280 and -271 kJ/mol). Comparison of the ΔG_r values over a large temperature range from 5 to 153 °C (Fig. SM 3) showed that energy gained from elemental sulphur and thiosulphate oxidation decreased as the temperature increased due to oxygen depletion, in contrast to aerobic and anaerobic hydrogen oxidation, which was more energetic at higher temperature. This is consistent with optimal temperature measurements of strain MO1340^T that showed a faster growth for oxidation of sulphur compounds at lower temperature than for aerobic and anaerobic hydrogen oxidation. Moreover, for aerobic hydrogen oxidation, the optimal ΔG_r value was reached at temperature above 72 °C (-280 kJ/mol, Fig. SM 3), which was congruent with the experimental results on strain MO1340^T that presented an optimal growth temperature at 70–75 °C when grown on these substrates. However, the calculated Gibbs free energies in *in situ* conditions do not fully explain this phenomenon but rather provide tendencies. Several reasons may explain slight discrepancies. First, the temperatures and substrate concentrations used in the ΔG_r calculations are predicted from the mixing gradient between the end-member hydrothermal fluid expelled at the seafloor and the surrounding seawater, i.e. within an open media. This might not exactly reproduce the conditions prevailing in a hydrothermal chimney, where chemical and thermal gradient are squeezed due to the structure and porosity of the chimneys [11]. For species derived from the simple dilution model (elemental sulphur, hydrogen and nitrogen), biotic and abiotic reactions may occur early along the mixing gradient including precipitation and solubilisation processes further altering the distribution of electron donors and acceptors along dilution [40]. However, good convergence between theoretical and *in situ* sulphate distribution

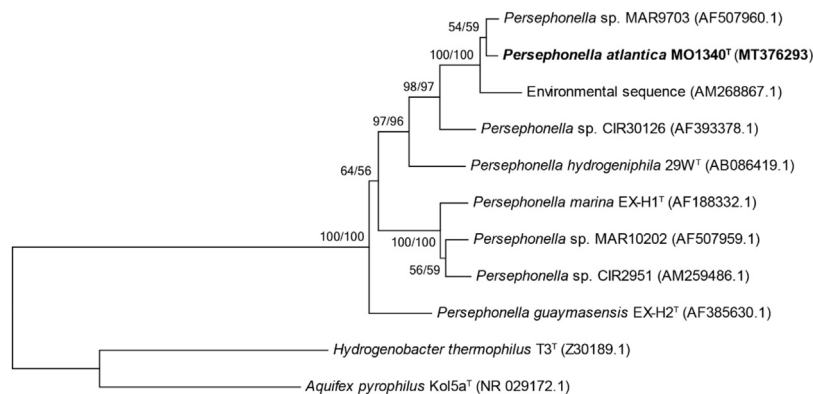


Fig. 4. Phylogenetic tree of members of order Aquificales based on 16S rRNA gene sequences (1364 bp) showing the position of *Persephonella atlantica* strain MO1340^T among related species. Trees reconstructed using the neighbour-joining (NJ) and maximum-likelihood (ML) methods displayed the same topology. Bootstrap values (shown in the order NJ/ML) are given to the left of each node. Bar represents 0.02 changes per nucleotide position. Numbers in parentheses are GenBank/EMBL/DDJB accession numbers.

(Fig. SM 4) gives us confidence that model outputs are sufficient to set a reliable baseline for thermodynamic calculations. More complex thermodynamic modelling including anabolic and dissipation energy requirements and effect of substrate availability would be necessary to fully resolve microbial growth rates close to incubation observations.

The physical and chemical conditions along the hydrothermal gradient shape the taxonomic and functional distribution of microbial communities in hydrothermal vents [41,45,46]. For example, aerobic mesophiles are frequently observed in the periphery of chimneys whereas anaerobic hyperthermophiles are present in inner parts [10,74], with some exceptions depending on the structure and porosity of chimneys [52]. Unlike strict aerobes or anaerobes that could only colonize specific microhabitats in hydrothermal chimneys, metabolically versatile *Aquificota* strain MO1340^T could settle in contrasted parts of chimneys due to its ability to use different electron acceptors (i.e. oxygen or nitrate). This capacity to colonize numerous microhabitats in hydrothermal ecosystems was confirmed by microbial diversity analysis using high-throughput sequencing that showed the presence of phylogenotypes related to strain MO1340^T in chimneys and associated fluids from the gradient at five sites of the Lucky Strike vent field (unpublished results). As for *Aquificota*, *Campylobacterota* (previously included in the former phylum *Epsilonbacteraeota*) also exhibit similar catabolisms such as oxidation of reduced sulphur compounds and hydrogen with both oxygen and nitrate [5]. Hence, these versatile chemolithoautotrophic microbial communities thrive in a wide range of habitats along the hydrothermal gradient and therefore probably drive a significant fraction of the primary production at deep-sea hydrothermal systems [5,49,60,68]. Moreover, it has also been suggested that a specific distribution within these different taxonomic groups could also occur along the hydrothermal fluid gradient. For example, within *Campylobacterota*, *Campylobacterales* seem to thrive at lower temperatures (i.e. from 20 °C to 40 °C) whereas *Nautiliales* could colonise habitats between 40 °C to 60 °C [5,20]. *Aquificota* could dominate niches exceeding 60 °C as they also show a wide catabolic and temperature adaptation that follows the hydrothermal gradient as for strain MO1340^T. This metabolic versatility and their broad temperature range could therefore provide an ecological advantage in colonizing such a dynamic part of the ecosystem compared to other chemoautotrophic microorganisms (Fig. 3). More comprehensive studies should be conducted using combination of physiological, genomic, and ecological approaches focusing this strain and others members of phylum *Aquificota* and *Epsilonbacteraeota*.

Genomic features and phylogenetic position

The draft genome of strain MO1340^T (5 contigs > 500 bp, coverage 840 x) has been deposited in GenBank/EMBL/DDJB under the accession number JAACYA000000000. The genome characteristics such as size (1.892.283 bp, 99.59 % completion, 1.68 % contamination) average DNA G + C content (37.07 mol%) and number of coding sequences (2028 CDS) were comparable with those of previously sequenced genomes of *Persephonella* strains (Table 1). ANI values with *P. hydrogeniphila* 29W^T and *P. marina* EX-H1^T (respectively 75.66 % and 72.97 %) were well below the threshold (95–96 %) for differentiating species [7].

Analysis of draft genome of strain MO1340^T also provided details on the metabolic pathways involved in sulphur and hydrogen oxidation, nitrogen and oxygen reduction, and in carbon fixation. Thiosulphate oxidation may be performed by the sox pathway [21,22] as all core genes soxABXYZ were present, excepted for soxCD genes that were not detected. Although it was shown that organisms that lack soxCD genes are often unable to completely oxidise thiosulphate to sulphate [23,67], strain MO1340^T produced sulphate in stoichiometric quantities to the amount of thiosulphate added, suggesting an alternative pathway that could complete oxidation to sulphate. Numerous genes encoding hydrogenases were also detected, including [Ni-Fe]-Hydrogenases-genes, which is consistent with the ability of the strain to oxidise hydrogen. More than 30 genes encoding for cytochromes (bc, c, c1, c3, cbb3 and d -type) were detected and were probably specific to the strain microaerophilic lifestyle. In anaerobic conditions, a complete reduction of nitrate was achieved as genes encoding nitrate reductase (NapAGH), nitrite reductase (NirS), nitrite oxide reductase (Nor) and nitrous oxide reductase (NosZD) were present. Autotrophic carbon dioxide fixation is performed using the “A-type” reductive tricarboxylic acid (rTCA) cycle, like others members of genus *Persephonella* and family *Hydrogenothermaceae* [32,59]. As for the Calvin-Benson-Bassham cycle, the rTCA cycle is one of the dominant carbon fixation pathways in hydrothermal vents [33,43], although it seems more adapted to high-temperature and low oxygen environments, which is congruent with the physiology of strain MO1340^T [4,33,49].

In dynamic hydrothermal ecosystems, the flagella-mediated motility and chemotaxis are essential for microorganisms to respond to variation of environmental conditions (e.g. pH, temperature) and to find substrates for growth (for e.g. [86]). Microscopic observations showed motile cells were mainly observed in medium containing elemental sulphur, suggesting a close relationship between flagella and sulphur-oxidizing systems as previously

Table 3
Description of *Persephonella atlantica* sp. nov.

Genus name	<i>Persephonella</i>
Species name	<i>Persephonella atlantica</i>
Specific epithet	<i>atlantica</i>
Species status	sp. nov.
Species etymology	at.lan'ti.ca. L. fem. adj. atlantica for being isolated from the Atlantic Ocean
Description of the new taxon and diagnostic traits	Gram-negative cells, motile short rods with a mean length of 1.4–2.2 µm and a width of 0.5–0.8 µm. Colonies are orange, round and regular with a diameter of 1 mm. Strict chemolithoautotroph growing in microaerophilic or anaerobic conditions. No heterotrophic or mixotrophic growth was observed. Vitamins or organic chelators are not necessary for growth. Uses hydrogen, thiosulphate or elemental sulphur with oxygen as electron acceptor. Sulphate is produced from oxidation of sulphur compounds. Hydrogen can also be coupled to nitrate reduction, producing nitrogen. Growth was observed for strain MO1340 ^T at NaCl concentrations ranging from 1.5 to 4.5 % (w/v) with an optimum at 2.5 % and at pH between 5.3 and 7.0 with an optimum around 6.5. Optimal growth temperature is respectively 65, 70, 70–75 and 75 °C, and optimal dissolved oxygen concentration is 119.7, 59.8, 11.4 and <0.2 µM for the following redox couples: S ⁰ /O ₂ , S ₂ O ₃ ²⁻ /O ₂ , H ₂ /O ₂ , H ₂ /NO ₃ ⁻ .
Country of origin	EEZ Portugal
Region of origin	Lucky Strike hydrothermal field
Date of isolation (dd/mm/yyyy)	29/01/2018
Source of isolation	Black smoker chimney
Sampling date (dd/mm/yyyy)	12/08/2008
Latitude (xx°xx'xx"N/S)	37° 17' 20.26" N
Longitude (xx°xx'xx"E/W)	32° 16' 32.05" W
16S rRNA gene accession nr.	MT376293
Genome accession number	JAACYA000000000
Genome status	Incomplete (5 contigs > 500 bp)
Genome size	1,892,283 bp
GC mol%	37.07
Number of strains in study	1
Information related to the Nagoya Protocol	MOMAR 2008 oceanographic cruise. Nota verbal n°2406 June 02 2008 from ministerio dos negócios estrangeiros Portugal
Designation of the Type Strain	MO1340 ^T
Strain Collection Numbers	UBOCC-M-3359 ^T = JCM 34026 ^T

observed for *Acidithiobacillus* spp. [86]. This link was confirmed by the presence in the genome of strain MO1340^T of several genes implied in motility or chemotaxis (*FlgGAHIJBC*, *FlhAFB*, *FlhGMNEFR*) that clustered with genes encoding transcriptional regulators, such as sigma factors, or genes responsible for chemotaxis (*CheZ*, *CheA*, *CheW* and *CheV*). Regulation of motility and chemotaxis by sulphur may therefore also contribute to surface colonisation of microniches in hydrothermal chimneys.

Based on phylogenetic analyses of the 16 rRNA gene sequence (Fig. 4), strain MO1340^T belongs to the genus *Persephonella*, family *Hydrogenothermaceae* order *Hydrogenothermales*. The closest described species are *P. hydrogeniphila* 29W^T, *P. marina* EX-H1^T and *P. guaymasensis* EX-H2^T with respectively 95.5 %, 93.8 % and 94.0 % 16S rRNA gene sequence similarity. These values are below the previously published cut-off threshold of 98.7 % for species delineation, which is congruent with ANI values to other species in the genus [7]. AAI values to other *Persephonella* spp. fell into the range of interspecies AAI values confirming its novelty in the genus. On the basis of its physiological, metabolic and genomic characteristics (Table 3), we propose that strain MO1340^T (=UBOCC-M-3359^T = JCM 34026^T) represents a novel species within the genus *Persephonella*, for which we suggest the name *Persephonella atlantica* sp. nov, as a reference for being isolated from a hydrothermal vent field on the Mid-Atlantic Ridge.

CRedit authorship contribution statement

David X. François: Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Anne Godfroy:** Supervision, Writing - review & editing. **Clémentine Mathien:** Investigation, Writing - review & editing. **Johanne Aubé:** Investigation, Methodology, Writing - review & editing. **Cécile Cathalot:** Investigation, Methodology, Writing - review & editing. **Françoise Lesongeur:** Investigation, Writing - review & editing. **Stéphane L'Haridon:** Investigation, Methodology, Writing - review & editing. **Xavier Philippon:**

Investigation, Writing - review & editing. **Erwan G. Roussel:** Conceptualization, Investigation, Writing - review & editing.

Acknowledgements

The authors also thank the crew of the R/V *L'Atalante* and R/V *Pourquoi pas?* and pilots of the ROV Victor 6000 for assistance in collecting samples. We thank Philippe Elies from the Plateforme d'Imagerie et de Mesures en Microscopie (PIMM), University of Brest for the transmission electron microscopy pictures. This work was supported by the ABYSS project with Ifremer.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126176>.

References

- [1] Amend, J.P., McCollom, T.M., Hentscher, M., Bach, W. (2011) Catabolic and anabolic energy for chemolithoautotrophs in deep-sea hydrothermal systems hosted in different rock types. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 75, 5736–5748.
- [2] Amend, J.P., Shock, E.L. (2001) Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic *Archaea* and *Bacteria*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 175–243.
- [3] Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Pribelski, A.D. (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477.
- [4] Berg, I.A. (2011) Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1925–1936.
- [5] Campbell, B.J., Engel, A.S., Porter, M.L., Takai, K. (2006) The versatile *ε*-proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 458.
- [6] Chavagnac, V., Ali, H.S., Jeandel, C., Leleu, T., Destrigneville, C., Castillo, A., Cotte, L., Waelles, M., Cathalot, C., Laes-Huon, A. (2018) Sulfate minerals control dissolved rare earth element flux and Nd isotope signature of buoyant hydrothermal plume (EMSO-Azores, 37° N Mid-Atlantic Ridge). *Chem. Geol.* 499, 111–125.

- [7] Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahall, D.R., da Costa, M.S., Rooney, A.P., Yi, H., Xu, X.-W., De Meyer, S. (2018) Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 461–466.
- [8] Cotte, L., Waeles, M., Pernet-Coudrier, B., Sarradin, P.-M., Cathalot, C., Riso, R.D. (2015) A comparison of in situ vs. ex situ filtration methods on the assessment of dissolved and particulate metals at hydrothermal vents. *Deep Sea Res. (I Oceanogr. Res. Pap.)*, 105, 186–194.
- [9] Crozier, T.E., Yamamoto, S. (1974) Solubility of hydrogen in water, sea water, and sodium chloride solutions. *J. Chem. Eng. Data*, 19, 242–244.
- [10] Dahle, H., Bauer, S.L.M., Baumberger, T., Stokke, R., Pedersen, R.B., Thorseth, I.H., Steen, I.H. (2018) Energy landscapes in hydrothermal chimneys shape distributions of primary producers. *Front. Microbiol.* 9, 1570.
- [11] Dick, G.J. (2019) The microbiomes of deep-sea hydrothermal vents: distributed globally, shaped locally. *Nat. Rev. Microbiol.* 1.
- [12] Dick, J.M. (2019) CHNOSZ: Thermodynamic calculations and diagrams for geochemistry. *Front. Earth Sci.* 7, 180.
- [13] Eden, P.A., Schmidt, T.M., Blakemore, R.P., Pace, N.R. (1991) Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 41, 324–325.
- [14] Eder, W., Huber, R. (2002) New isolates and physiological properties of the *Aquificales* and description of *Thermocrinis albus* sp. nov. *Extremophiles*, 6, 309–318.
- [15] Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- [16] Escartin, J. 2008 MoMAR'08—Leg 1 (Lucky Strike). Cruise Report. 9-24 Aug 2008. N/O Atalante—Victor 6000. <http://dx.doi.org/10.17600/8010110>.
- [17] Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783–791.
- [18] Ferrera, I., Banta, A.B., Reysenbach, A.-L. (2014) Spatial patterns of *Aquificales* in deep-sea vents along the Eastern Lau Spreading Center (SW Pacific). *Syst. Appl. Microbiol.* 37, 442–448.
- [19] Findlay, A.J., Estes, E.R., Gartman, A., Yücel, M., Kamyshny, A., Luther, G.W. (2019) Iron and sulfide nanoparticle formation and transport in nascent hydrothermal vent plumes. *Nat. Commun.* 10, 1–7.
- [20] Foustoukos, D.I., Houghton, J.L., Seyfried, W.E., Jr, Sievert, S.M., Cody, G.D. (2011) Kinetics of H₂–O₂–H₂O redox equilibria and formation of metastable H₂O₂ under low temperature hydrothermal conditions. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 75, 1594–1607.
- [21] Friedrich, C.G., Bardischewsky, F., Rother, D., Quentmeier, A., Fischer, J. (2005) Prokaryotic sulfur oxidation. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 253–259.
- [22] Friedrich, C.G., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A., Fischer, J. (2001) Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2873–2882.
- [23] Frigaard, N.-U., Dahl, C. (2008) Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 54, 103–200.
- [24] Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P., Tiedje, J.M. (2007) DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 81–91.
- [25] Götz, D., Banta, A., Beveridge, T., Rushdi, A., Simoneit, B., Reysenbach, A. (2002) *Persephonella marina* gen. nov., sp. nov. and *Persephonella guaymasensis* sp. nov., two novel, thermophilic, hydrogen-oxidizing microaerophiles from deep-sea hydrothermal vents. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1349–1359.
- [26] Guillou, C., Guespin-Michel, J. (1996) Evidence for two domains of growth temperature for the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens* MF0. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3319–3324.
- [27] Guiral, M., Prunetti, L., Aussignargues, C., Ciaccava, A., Infossi, P., Ilbert, M., Lojou, E., Giudici-Orticoni, M.-T. 2012 The hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*: from respiratory pathways to extremely resistant enzymes and biotechnological applications. In: *Adv. Microb. Physiol.*, Elsevier, pp. 125–194.
- [28] Gupta, R.S. 2014 The Phylum *Aquificae*. In: *The Prokaryotes*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 417–445.
- [29] Gupta, R.S., Lali, R. (2013) Molecular signatures for the phylum *Aquificae* and its different clades: proposal for division of the phylum *Aquificae* into the emended order *Aquificales*, containing the families *Aquificaceae* and *Hydrogenothermaceae*, and a new order *Desulfurobacteriales* ord. nov., containing the family *Desulfurobacteriaceae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 104, 349–368.
- [30] Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G. (2013) QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29, 1072–1075.
- [31] Hannington, M.D., Jonasson, I.R., Herzig, P.M., Petersen, S. (1995) Physical and chemical processes of seafloor mineralization at mid-ocean ridges. *Geoph. Monog. Am. Geophys. Union*, 91, 115.
- [32] Hüglér, M., Huber, H., Molyneux, S.J., Vetriani, C., Sievert, S.M. (2007) Autotrophic CO₂ fixation via the reductive tricarboxylic acid cycle in different lineages within the phylum *Aquificae*: evidence for two ways of citrate cleavage. *Environ. Microbiol.* 9, 81–92.
- [33] Hüglér, M., Sievert, S.M. (2011) Beyond the Calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 3, 261–289.
- [34] Janecky, D., Seyfried, W., Jr (1984) Formation of massive sulfide deposits on oceanic ridge crests: Incremental reaction models for mixing between hydrothermal solutions and seawater. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 48, 2723–2738.
- [35] Kawasumi, T., Igarashi, Y., Kodama, T., Minoda, Y. (1984) Hydrogenobacter thermophilus gen. nov., sp. nov., an extremely thermophilic, aerobic, hydrogen-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 34, 5–10.
- [36] Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C. (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 1647–1649.
- [37] Kelley, D.E., Richards, C. 2015 The gsw package.
- [38] Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* msw054.
- [39] L'Haridon, S., Reysenbach, A.-L., Tindall, B., Schönheit, P., Banta, A., Johnsen, U., Schumann, P., Gambacorta, A., Stackebrandt, E., Jeanthon, C. (2006) *Desulfurobacterium atlanticum* sp. nov., *Desulfurobacterium pacificum* sp. nov. and *Thermovibrio guaymasensis* sp. nov., three thermophilic members of the *Desulfurobacteriaceae* fam. nov., a deep branching lineage within the *Bacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2843–2852.
- [40] LaRowe, D.E., Dale, A.W., Aguilera, D.R., L'Heureux, I., Amend, J.P., Regnier, P. (2014) Modeling microbial reaction rates in a submarine hydrothermal vent chimney wall. *Geochim. Cosmochim. Acta* 124, 72–97.
- [41] Lin, T., Ver Eecke, H., Breves, E., Dyar, M., Jamieson, J., Hannington, M., Dahle, H., Bishop, J., Lane, M., Butterfield, D. (2016) Linkages between mineralogy, fluid chemistry, and microbial communities within hydrothermal chimneys from the Endeavour Segment, Juan de Fuca Ridge. *Geom. Geophys. Geosy.* 17, 300–323.
- [42] Mah, R., Smith, M., Baresi, L. (1978) Studies on an acetate-fermenting strain of *Methanosarcina*. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 1174–1184.
- [43] Mangiapia, M., Scott, K. (2016) From CO₂ to cell: energetic expense of creating biomass using the Calvin–Benson–Bassham and reductive citric acid cycles based on genome data. *FEMS Microbiol. Lett.* 363, fnw054.
- [44] McCollom, T.M. (2000) Geochemical constraints on primary productivity in submarine hydrothermal vent plumes. *Deep Sea Res. (I Oceanogr. Res. Pap.)*, 47, 85–101.
- [45] McCollom, T.M. (2007) Geochemical constraints on sources of metabolic energy for chemolithoautotrophy in ultramafic-hosted deep-sea hydrothermal systems. *Astrobiology* 7, 933–950.
- [46] McCollom, T.M., Shock, E.L. (1997) Geochemical constraints on chemolithoautotrophic metabolism by microorganisms in seafloor hydrothermal systems. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 61, 4375–4391.
- [47] Mino, S., Maikita, H., Toki, T., Miyazaki, J., Kato, S., Watanabe, H., Imachi, H., Watsuji, T.-o., Nunoura, T., Kojima, S. (2013) Biogeography of *Persephonella* in deep-sea hydrothermal vents of the Western Pacific. *Front. Microbiol.* 4, 107.
- [48] Mohr, P.W., Krawiec, S. (1980) Temperature characteristics and Arrhenius plots for nominal psychrophiles, mesophiles and thermophiles. *Microbiology* 121, 311–317.
- [49] Nakagawa, S., Takai, K. (2008) Deep-sea vent chemoautotrophs: diversity, biochemistry and ecological significance. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65, 1–14.
- [50] Nakagawa, S., Takai, K., Horikoshi, K., Sako, Y. (2003) *Persephonella hydrogeniphila* sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 863–869.
- [51] Nakagawa, S., Takai, K., Inagaki, F., Chiba, H., Ishibashi, J.-i., Kataoka, S., Hirayama, H., Nunoura, T., Horikoshi, K., Sako, Y. (2005) Variability in microbial community and venting chemistry in a sediment-hosted backarc hydrothermal system: impacts of seafloor phase-separation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 141–155.
- [52] Nakagawa, S., Takai, K., Inagaki, F., Hirayama, H., Nunoura, T., Horikoshi, K., Sako, Y. (2005) Distribution, phylogenetic diversity and physiological characteristics of epsilon-*Proteobacteria* in a deep-sea hydrothermal field. *Environ. Microbiol.* 7, 1619–1632.
- [53] Nevot, M., Deroncele, V., Montes, M.J., Mercade, E. (2008) Effect of incubation temperature on growth parameters of *Pseudoalteromonas antarctica* NF3 and its production of extracellular polymeric substances. *J. Appl. Microbiol.* 105, 255–263.
- [54] Parkes, R.J., Sass, H., Webster, G., Watkins, A.J., Weightman, A.J., O'Sullivan, L.A., Cragg, B.A. 2010 Methods for studying methanogens and methanogenesis in marine sediments. In: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Springer, pp. 3799–3826.
- [55] Parks, D.H., Chuvpochina, M., Waite, D.W., Rinke, C., Skarshewski, A., Chaumeil, P.-A., Hugenholtz, P. (2018) A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nat. Biotechnol.* 36, 996–1004.
- [56] Parks, D.H., Imelfort, M., Skennerton, C.T., Hugenholtz, P., Tyson, G.W. (2015) CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* 25, 1043–1055.
- [57] Ratkowsky, D., Lowry, R., McMeekin, T., Stokes, A., Chandler, R. (1983) Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J. Bacteriol.* 154, 1222–1226.
- [58] Reysenbach, A.-L., Götz, D., Banta, A., Jeanthon, C., Fouquet, Y. (2002) Expanding the distribution of the *Aquificales* to the deep-sea vents on Mid-Atlantic Ridge and Central Indian Ridge. *Cah. Biol. Mar.* 43, 425–428.
- [59] Reysenbach, A.-L., Hamamura, N., Podar, M., Griffiths, E., Ferreira, S., Hochstein, R., Heidelberg, J., Johnson, J., Mead, D., Pohorille, A. (2009) Complete and draft genome sequences of six members of the *Aquificales*. *J. Bacteriol.* 191, 1992–1993.
- [60] Reysenbach, A.-L., Shock, E. (2002) Merging genomes with geochemistry in hydrothermal ecosystems. *Science* 296, 1077–1082.
- [61] Rommevaux, C., Henri, P., Degboe, J., Chavagnac, V., Lesongeur, F., Godfroy, A., Boulart, C., Destigneville, C., Castillo, A. (2019) Prokaryote Communities at Active Chimney and In Situ Colonization Devices After a Magmatic Degassing

- Event (37 degrees N MAR, EMSO-Azores Deep-Sea Observatory). *Geochemistry Geophysics Geosystems*. 20, 3065–3089.
- [62] Roussel, E.G., Cragg, B.A., Webster, G., Sass, H., Tang, X., Williams, A.S., Gorra, R., Weightman, A.J., Parkes, R.J. (2015) Complex coupled metabolic and prokaryotic community responses to increasing temperatures in anaerobic marine sediments: critical temperatures and substrate changes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, fiv084.
- [63] Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- [64] Sano, R., Kameya, M., Wakai, S., Arai, H., Igarashi, Y., Ishii, M., Sambongi, Y. (2010) Thiosulfate oxidation by a thermo-neutrophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus*. *Biosci. Biotechnol., Biochem.* 74, 892–894.
- [65] Sarradin, P.-M., Cannat, M. 2015 MOMARSAT2015 cruise (Lucky Strike). Cruise Report. 8–29 Aug 2015. N/O Pourquoi pas?–Victor 6000, <http://dx.doi.org/10.17600/15000200>.
- [66] Shock, E.L., Holland, M.E. (2004) Geochemical energy sources that support the subsurface biosphere. *GMS*. 144, 153–165.
- [67] Sievert, S.M., Hügler, M., Taylor, C.D., Wirsén, C.O. 2008 Sulfur oxidation at deep-sea hydrothermal vents. In: *Microbial Sulfur Metabolism*, Springer, pp. 238–258.
- [68] Sievert, S.M., Vetriani, C. (2012) Chemoautotrophy at deep-sea vents: past, present, and future. *Oceanography* 25, 218–233.
- [69] Soetaert, K., Meysman, F. (2012) R-package Reactran: Reactive Transport Modelling in R. *Environ. Model. Softw.* 32, 49–60.
- [70] Soetaert, K., Petzoldt, T., Meysman, F. 2010 Marelac: Tools for aquatic sciences. In: *Citeseer*.
- [71] Srinivasan, V., Morowitz, H.J., Huber, H. (2012) What is an autotroph? *Arch. Microbiol.* 194, 135–140.
- [72] Stohr, R., Waberski, A., Völker, H., Tindall, B.J., Thomm, M. (2001) *Hydrogenothermus marinus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, recognition of *Calderobacterium hydrogenophilum* as a member of the genus *Hydrogenobacter* and proposal of the reclassification of *Hydrogenobacter acidophilus* as *Hydrogenobaculum acidophilum* gen. nov., comb. nov., in the phylum 'Hydrogenobacter/Aquifex'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1853–1862.
- [73] Suzuki, M., Hirai, T., Arai, H., Ishii, M., Igarashi, Y. (2006) Purification, characterization, and gene cloning of thermophilic cytochrome cd1 nitrite reductase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 391–397.
- [74] Takai, K., Komatsu, T., Inagaki, F., Horikoshi, K. (2001) Distribution of archaea in a black smoker chimney structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3618–3629.
- [75] Tamura, K., Nei, M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512–526.
- [76] Tatusova, T., DiCuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E.P., Zaslavsky, L., Lomsadze, A., Pruitt, K.D., Borodovsky, M., Ostell, J. (2016) NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res.* 44, 6614–6624.
- [77] Team, R. 2013 R: A language and environment for statistical computing, Vienna, Austria.
- [78] Thauer, R.K., Jungermann, K., Decker, K. (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41, 100.
- [79] Vuillemin, R., Le Roux, D., Dorval, P., Bucas, K., Sudreau, J., Hamon, M., Le Gall, C., Sarradin, P. (2009) CHEMINI: A new in situ CHEMical MINIaturized analyzer. *Deep Sea Res. (I Oceanogr. Res. Pap.)*. 56, 1391–1399.
- [80] Webster, G., Rinna, J., Roussel, E.G., Fry, J.C., Weightman, A.J., Parkes, R.J. (2010) Prokaryotic functional diversity in different biogeochemical depth zones in tidal sediments of the Severn Estuary, UK, revealed by stable-isotope probing. *FEMS Microbiol. Ecol.* 72, 179–197.
- [81] Weiss, R.F. 1970 The solubility of nitrogen, oxygen and argon in water and seawater. In: *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts*, Elsevier, pp. 721–735.
- [82] Wery, N., Lesongeur, F., Pignet, P., Derennes, V., Cambon-Bonavita, M.-A., Godfroy, A., Barbier, G. (2001) *Marinitoga camini* gen. nov., sp. nov., a rod-shaped bacterium belonging to the order *Thermotogales*, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 495–504.
- [83] Wiegel, J. (1990) Temperature spans for growth: hypothesis and discussion. *FEMS Microbiol. Rev.* 6, 155–169.
- [84] Wiegel, J., Ljungdahl, L., Rawson, J. (1979) Isolation from soil and properties of the extreme thermophile *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *J. Bacteriol.* 139, 800–810.
- [85] Wiegel, J., Michael, A.W. 1998 *Thermophiles: The Keys to the Molecular Evolution and the Origin of Life?* CRC Press.
- [86] Yang, C.-L., Chen, X.-K., Wang, R., Lin, J.-Q., Liu, X.-M., Pang, X., Zhang, C.-J., Lin, J.-Q., Chen, L.-X. (2019) Essential role of σ factor RpoF in flagellar biosynthesis and flagella-mediated motility of *Acidithiobacillus caldus*. *Front. Microbiol.* 10, 1130.
- [87] Yoon, S.-H., Ha, S.-m., Lim, J., Kwon, S., Chun, J. (2017) A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie van Leeuwenhoek*. 110, 1281–1286.

Supplementary material: *Persephonella atlantica* sp. nov. : how to adapt to physico-chemical gradients in high temperature hydrothermal habitats

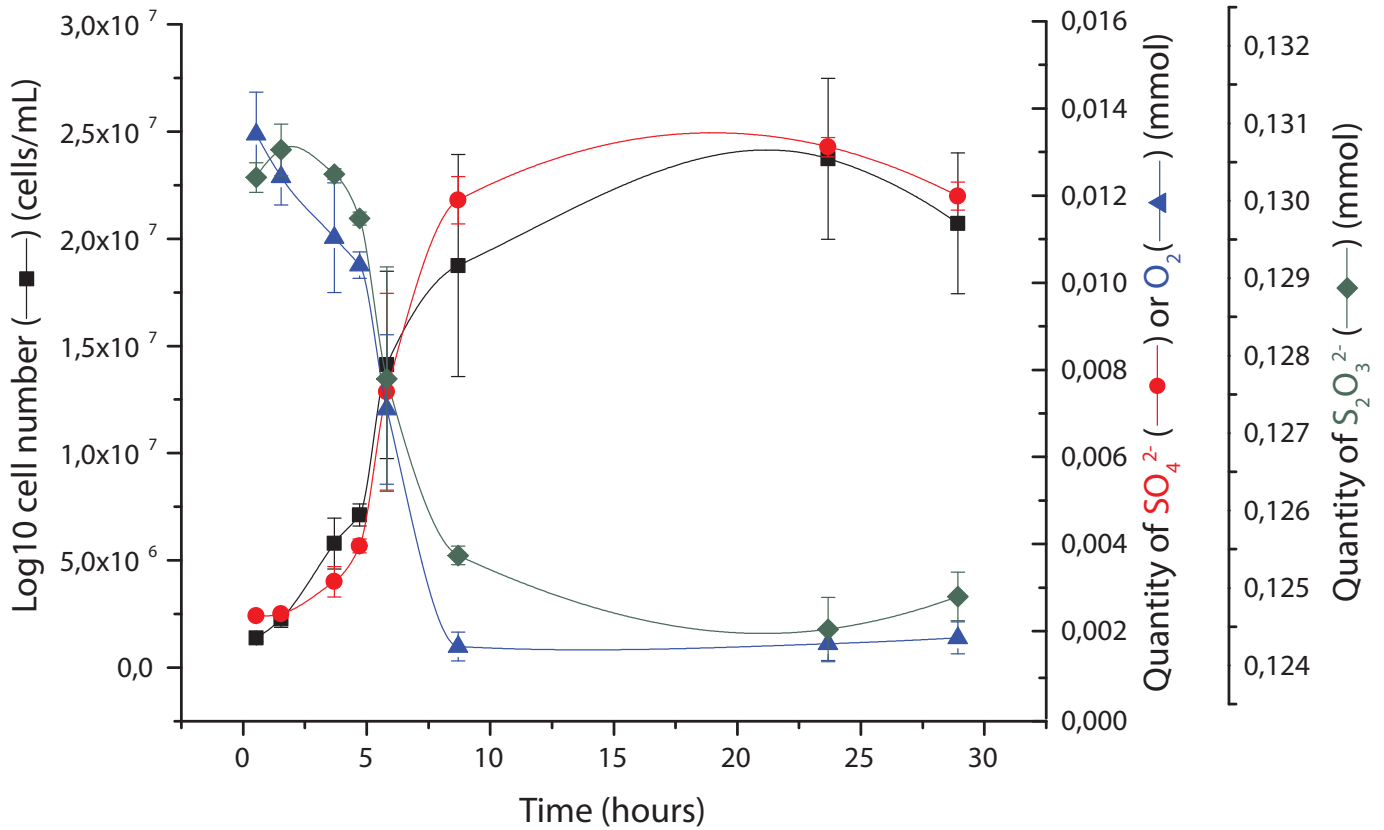


Figure SM 1: Growth kinetic of strain *P. hydrogeniphila* 29WT (squares) grown on S₂O₃²⁻ and O₂ ; S₂O₃²⁻ (triangles), O₂ (diamonds) and SO₄²⁻ (rounds) quantities over time. Errors bars based on triplicate experiments are shown.

Supplementary material: *Persephonella atlantica* sp. nov. : how to adapt to physico-chemical gradients in high temperature hydrothermal habitats

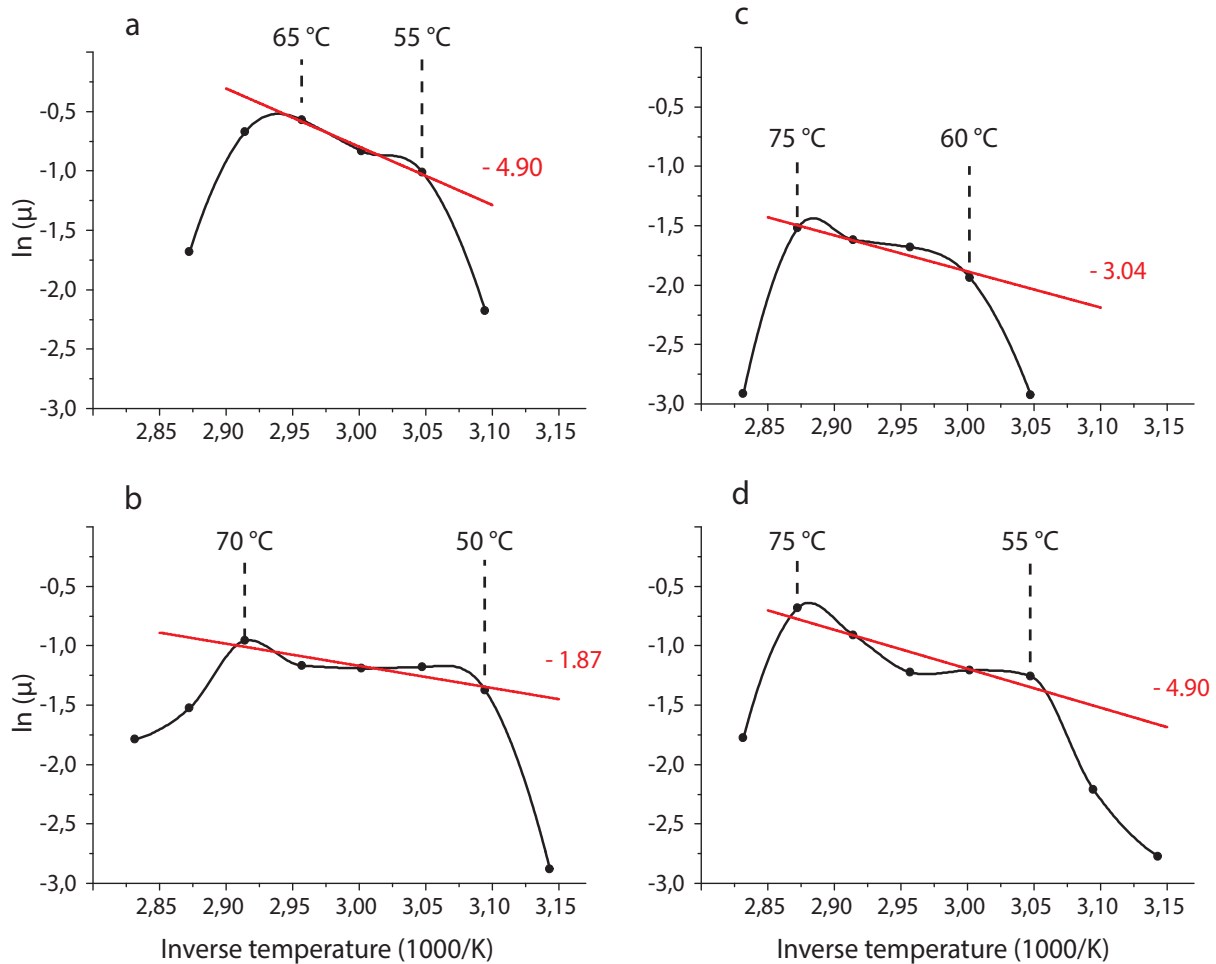


Figure SM 2: Arrhenius plots calculated from the optimal growth temperature experiments for strain MO1340^T. Cultures were grown on (a) S⁰/O₂; (b) S₂O₃²⁻/O₂; (c) H₂/O₂; (d) H₂/NO₃⁻. Optimal growth temperature and critical temperature are reported above the curves. Red lines represent linear regression in the range of linearity reported in table 2. Slope value is indicated on the right.

Supplementary material: *Persephonella atlantica* sp. nov. : how to adapt to physico-chemical gradients in high temperature hydrothermal habitats

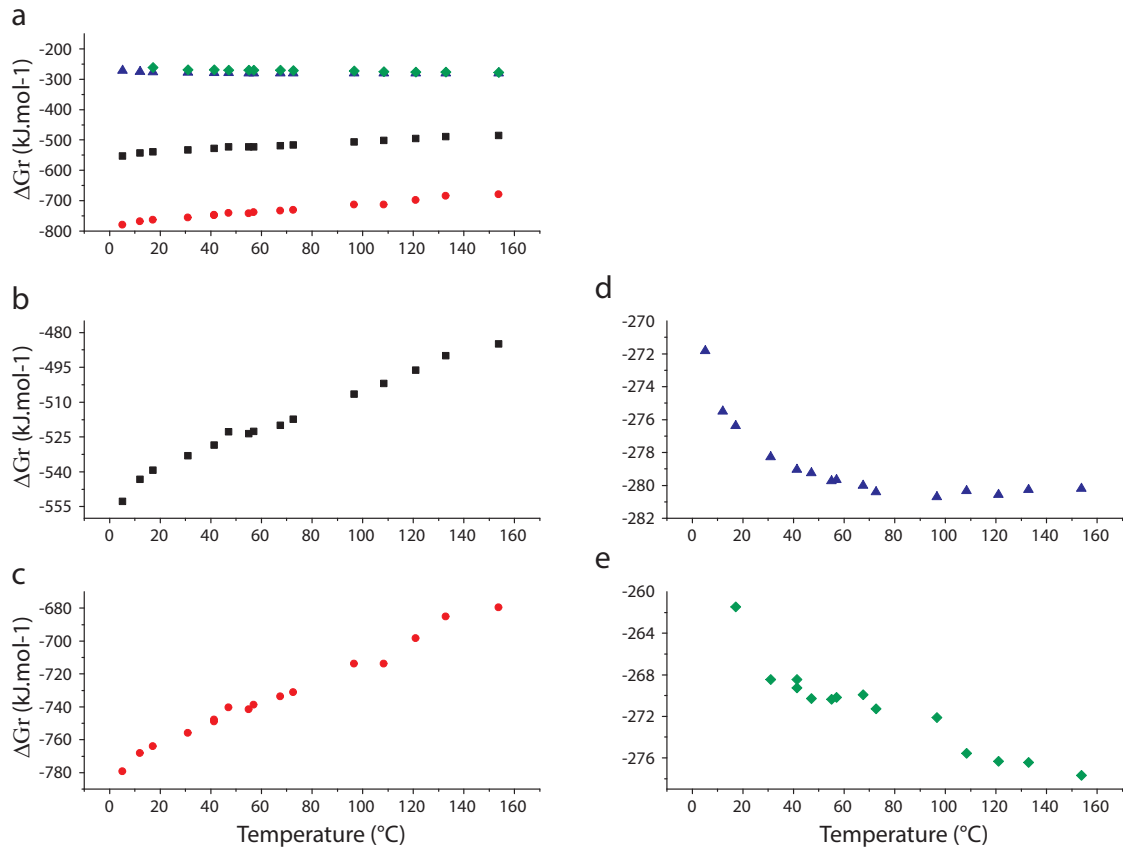


Figure SM 3: Calculated ΔG_r values for metabolic reactions performed by strain MO1340^T in the thermal gradient during mixing of hydrothermal fluid with seawater, using the high concentration range from Rommeveaux et al [62]. Reactions from the following substrates: (a) includes all reactions considered; (b) elemental sulphur oxidation; (c) thiosulphate oxidation; (d) aerobic hydrogen oxidation; (e) hydrogen oxidation coupled to nitrate reduction

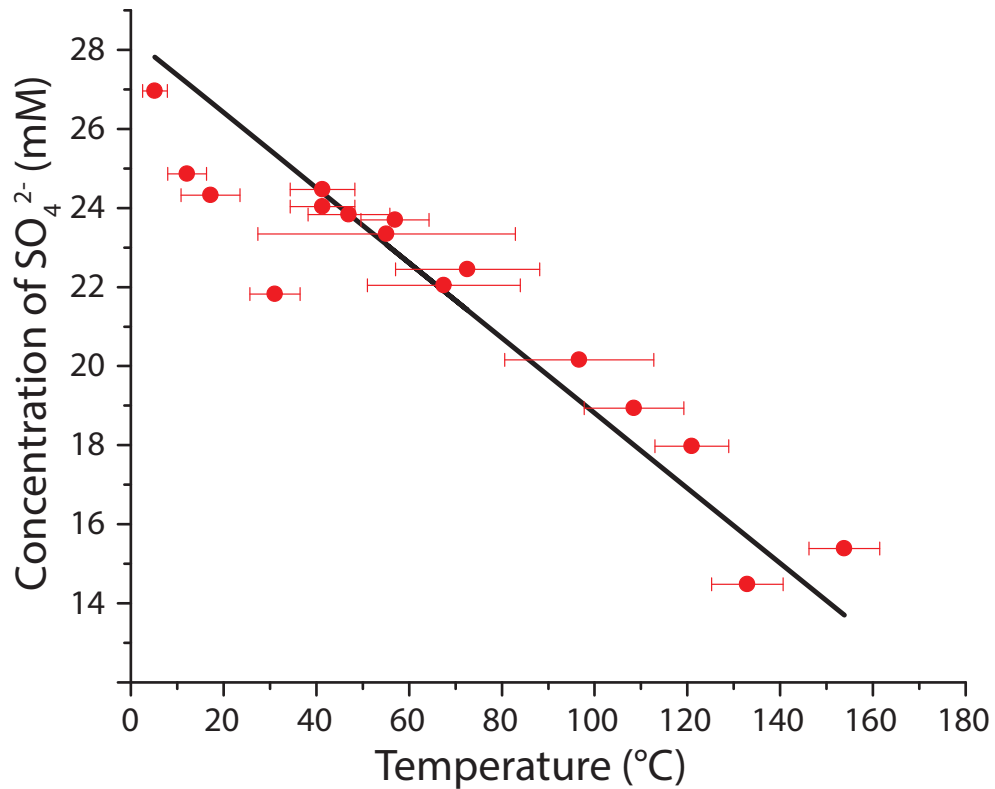


Figure SM 4: Model validation. Predicted SO₄²⁻ concentrations from our simple hydrodynamic mixing model (black solid line) are compared against measured values (red dots) collected along the mixing gradient during the MOMAR2015 cruise. For more details refer to the materials and methods section. Errors bar concerning temperature measurements are shown in red.

Chapter VII - Discussion, perspectives and conclusion

Background and objectives of the study

Deep-sea hydrothermal vents represent a unique ecosystem based on chemosynthetic microbial communities. The mixing between hot, anoxic and reduced hydrothermal fluid and cold and oxygenated seawater creates a thermal gradient and a chemical disequilibrium that gathers various potential electron donors and acceptors. This mixing also results in the precipitation of minerals which leads to the formation of hydrothermal chimneys.

Hydrothermal chimneys are heterogeneous structures composed of minerals presenting various chemical compositions and a different porosity. The mineralogical composition and structure of the chimneys evolve over time due to the successive dissolution and precipitation of the minerals depending on the temperature.

Chemolithoautotrophic microorganisms gain energy from the oxidation of reduced compounds present in the hydrothermal fluid, and chemoorganotrophic microorganisms consume organic compounds produced in the ecosystem or by abiotic reactions.

Numerous culture-based studies have led to the isolation of about 200 species of both *Bacteria* and *Archaea*, and their description provided an insight on their metabolic and physiological capacities. Molecular studies shed light on non-culturable lineages, that represent an important fraction of the microbial diversity. Studies implying culture-based and culture-independent approaches have brought information about the ecology of these microbial communities.

However, accessing to the deep-sea hydrothermal vents represent a technical challenge which slows down scientific progress in this domain. Hence, temporal and spatial dynamics as well as colonization processes of hydrothermal chimneys by microorganisms are still not widely understood.

Methodological approaches

The objective of this thesis was to expand the knowledge about these topics. For this purpose, we implemented different approaches, which all presented advantages and limitations. The value of implementing different approaches was their complementarity.

Also, we had the rare opportunity to work with samples that were collected from 2008 to 2019 on the same sites or even on the same chimneys at the hydrothermal vent field Lucky Strike.

Hydrothermal chimneys and proximal plume samples were collected from the sites Tour Eiffel (Aisics), Cypres, Y3, White Castle, Montsegur (DEAFS) and Capelinhos, and some of these samples were used for realizing continuous cultures in bioreactor on-board.

The advantage of working with samples collected from the same vent field is that some settings like pressure or geological substrates were similar in all the samples. Thus, a comparison of the microbial communities was facilitated because fewer parameters had to be taken into account.

A mineralogical characterization of the hydrothermal chimney samples was first realized to determine their mineralogical composition, which informed us about the stage of growth of the chimneys and the spatial position of the samples inside the structure of the chimneys.

Microbial communities were enriched in three continuous cultures in bioreactor using hydrothermal chimney samples as inoculum and proximal plume samples as culture medium. The aim was to study culturable hyperthermophilic anaerobes in controlled conditions, and to study the influence of the chimneys and proximal plume samples on the structure of enriched communities. Compared to classic batch cultures, complex communities have been enriched and maintained from 11 to 19 days.

A molecular study implying 16S rRNA genes sequencing was set up to identify the *Archaea* and *Bacteria* from hydrothermal chimneys and proximal plumes samples, and also from the communities enriched in bioreactor. We could study and compare the structure and diversity of the microbial communities from these three types of samples. It produced data about the culturable and non-culturable microorganisms, however, being a molecular approach we could not acquire reliable functional information about microbial communities.

MPN enrichments were performed to estimate the concentration of viable and culturable microorganisms from four hydrothermal chimney samples representative of the two main

growth stages of chimneys. Various conditions of temperature and substrates availability were set up to allow the growth of microorganisms presenting different metabolic and physiological characteristics. Because it is a cultural approach, only a small fraction of the microbial diversity could be assessed by this method.

Activity measurements were realized using three chimney samples, the same as for MPN enrichments. It allowed us to determine the autotrophic and heterotrophic carbon fixation rates by microbial communities at four temperatures. Being also a cultural approach, only the culturable microorganisms contributed to carbon fixation rates measurements.

Enrichment and isolation cultures targeting sulfur-oxidizing *Bacteria* were performed and led to the isolation of a strain of the genus *Persephonella*. This strain was described as the type strain of a new species, *Persephonella atlantica*. A detailed study of its physiological and metabolic capacities was realized. The results were then compared to the physico-chemical conditions prevailing in hydrothermal vents, to study the adaptation of strain MO1340 to the hydrothermal environments.

The results of these different approach are compared and discussed in the present chapter.

Discussing the terms temporal and spatial dynamics in the context of our study

The subject of this thesis concerned the spatial and temporal dynamics of microbial communities from hydrothermal chimneys. The terms “spatial and temporal dynamics” are generic and must be defined before completing the discussion.

Spatial dynamics of microbial communities from hydrothermal chimneys can be studied at different scales. In the case of the present study, the sampling was realized on chimneys from six hydrothermal sites of Lucky Strike, sampled over several years. Hence, we do not compare the microbial communities of different vent fields. Instead, we compared the communities between different sites within the same vent field. Also, the methodology employed made possible a comparison of microbial communities between the different parts of hydrothermal chimneys, and between the communities from hydrothermal chimneys and proximal plume.

The sampling of hydrothermal chimneys consisted in collecting the upper part (sulfate-dominant) and basis (sulfide-dominant) of the chimneys. We did not subsampled the different parts of the chimneys (central conduct, external parts...) so we could not accurately identify which parts of the basis of chimneys were sampled. However, the mineral composition of the chimney samples has brought information to infer the zones where they were likely collected.

The use of the term “temporal dynamics” may be questioned because we did not really study the evolution of microbial communities from hydrothermal chimneys over time. Even if the samples were collected over different years, from 2008 to 2019, a comparison of the microbial communities according to the year of sampling should not be realized for different reasons. First, the time scale of approximately one year is not consistent with the time scale of microbial growth (from tenth of minutes to hours or days), or with the time scale of chimneys growth (from weeks to tenth of years). Moreover, the microbial communities from samples collected at successive years do not represent the natural succession of microbial communities because, at each sampling, a part of the chimneys was removed and a different part was sampled the next year.

Instead, we determined the mineralogical composition of the hydrothermal chimney samples to identify the stage of growth of the chimneys. The evolution of the mineralogy of chimneys was documented by different studies so it represents a reliable information (Haymon, 1983, Turner & Campbell, 1987, Humphris & Kleinrock, 1996, Xiaotong & Huaiyang, 2005, Meng *et al.*, 2018). Hence, the notion of temporality was given by the stage of growth of the chimneys rather than by the year of sampling, and we compared “young sulfate chimneys” to “mature sulfide chimneys”. We can conclude that the microbial communities were probably more influenced by changes in physico-chemical conditions of their environment than by the time strictly speaking. Because the hydrothermal chimneys evolve over time, we will continue to use the term “temporal dynamics” during the following discussion but one should keep in mind that the time scale of our study is binary in reality and concerns “young sulfate chimneys” and “mature sulfide chimneys”.

It was possible to use the results of mineralogical analyses as a basis to study the temporal and spatial dynamics of microbial communities, in some cases that are discussed in the following sections, but the methodological approach also presented limitations.

The time scale defined by sulfate- and sulfide-dominant chimney samples was clear and reliable as it corresponds to the two main stages of growth of the hydrothermal chimneys, that are well defined and correspond to contrasted structures and mineralogical composition. However, it was not possible to study the colonization of hydrothermal chimneys by microorganisms because the chimney samples were collected during variable periods after the precipitation of anhydrite, that were determined so we could not know if the microbial communities studied were the first colonizers of if a succession of communities had already

occurred. In the context of the sample M17 Ais 3 the anhydrite precipitate took 9 days to be formed so it was the sole sample for which we could study the early steps of microbial colonization. However the PCR amplification of the DNA extracted from this sample failed, so we assumed that the microbial biomass was too low.

The spatial scale was also an issue for studying the microbial communities. Indeed, the thermal and chemical gradients caused by the mixing between hydrothermal fluid and seawater is established at a small scale in the chimneys, from millimetres to centimetres. Hence, even if the link between the mineralogical composition of the samples and their position in the structure of the hydrothermal chimneys is reliable, the mass of chimneys (8 or 40 grams) used in our study corresponds to a volume that is too large as it likely gathers different microbial communities. It would explain why we did not observe clear differences between the microbial communities from the samples of the mineralogical classes 2 and 4.

Different approaches for similar results

Molecular and cultural techniques were employed during this study to benefit from their advantages and to compensate for their respective limitations. Some of the results obtained by these different methodological approaches were consistent, which supports their reliability.

First, metabarcoding results have shown that the microbial communities from sulfate and sulfide chimney samples were similar at different levels. We did not identify taxa that were specifically associated to a mineralogical class, and the ordination methods also could not discriminate the microbial communities based on the mineralogy of the chimney samples. The same observations were made regarding the sites from which the samples were taken. The results from MPN enrichments have also shown that almost all the taxa enriched were present within the sulfate chimney sampled on the Aisics and Montsegur sites and within the sulfide chimney sampled on the Aisics and Capelinhos sites, and that they implemented similar metabolisms. Hence, it indicates that there are no, or few taxa that are specific to a growth stage of the chimneys or to a site of the Lucky Strike vent field.

Even if the taxonomic diversity was similar, we observed differences among the structure of microbial communities in sulfate and sulfide chimneys. The alpha-diversity of archaeal communities was shown to be significantly higher in sulfide chimney samples compared to sulfate chimneys according to metabarcoding results. This was not observed for

the bacterial communities. However, for both *Archaea* and *Bacteria*, the communities presented a higher variability among the sulfide chimney samples compared to sulfate chimneys. In MPN enrichments, it seemed that the number of different taxa was higher in sulfide chimney samples because we often observed the enrichment of at least two taxa among the three replicates of each condition, or the co-occurrence of *Bacteria* and *Archaea* in the same vial.

This is consistent with the mineralogical composition of the chimney samples. The chimney samples of mineralogical class 1 presented homogenous composition and were mainly constituted by anhydrite. On the contrary, sulfide chimney samples were composed of diverse minerals in various proportions, which is explained by the heterogeneous structure of sulfide chimneys. Indeed, the inner parts of the chimneys are represented by high temperature zones, where the anoxic hydrothermal fluid is dominant compared to seawater. The inverse phenomenon is observed in the external parts of the chimneys in contact with cold and oxygenated seawater.

Thus, the replacement of sulfates by sulfides during the growth of the chimneys probably leads to the formations of diverse micro-habitats presenting different physico-chemicals conditions. We can assume that this evolution of the chimneys structure explains the higher diversity and variability of microbial communities in sulfide chimneys compared to the sulfate chimneys that are inhabited by similar microbial communities, composed mostly of the same phylotypes.

Results from MPN enrichments and activity measurement experiments have shown that in addition to the taxonomic diversity of the microbial communities, the concentration of culturable microorganisms and their activity also varied among the two growth stages of hydrothermal chimneys. The concentration of culturable mesophiles was higher in chimney samples according to the estimation of MPN enrichments compared to the concentration of culturable thermophiles and hyperthermophiles. This was especially noticeable for the sulfate chimney samples. The carbon fixation rates also decreased with the increase of temperature, especially for the autotrophic carbon fixation rate that dropped between 30 and 60 °C. Thus, the microbial communities from hydrothermal chimneys seemed to be dominated by autotrophic mesophiles, including the genus *Sulfurimonas*.

Independently of the taxonomy and metabolic or physiological traits of the microorganisms, MPN enrichments have shown that the culturable cell concentration was significantly higher in sulfide chimney samples compared to sulfate chimney samples. Due to

technical challenges, we could not set up more accurate quantitative methods that do not rely on a cultural approach, as quantitative PCR or total cell counts. However, some tendencies were observed when we tried to amplify by PCR the DNA extracted from chimney samples. Indeed, for the majority of the sulfide chimney samples, the DNA extracted could be amplified with the primers targeting archaeal or bacterial genes. On the contrary, most of the PCR realized using the DNA extracted from sulfate chimney samples failed, or the sequencing reactions resulted in a low number of sequences. Even it does not consist of a reliable quantitative method, it may suggest that the biomass in the sulfate chimney samples was lower, leading to the recovering of a low concentration of DNA which could not be amplified.

Once compiled, these results are disparate and do not provide a clear answer to the problematic of the subject. However, because they were confirmed by different approaches we consider that they were reliable enough to constitute the basis of our assumptions. The other results were each produced by one method but taken together they provide a better understanding of the dynamics of microbial communities in hydrothermal chimneys.

Proposal for a model for spatial and temporal dynamics of microbial communities in active hydrothermal vents

Based on the results obtained during our study and by previous studies, we propose a model for spatial and temporal dynamics of microbial communities in active hydrothermal vents. Before presenting this model we present in the following sections the diversity and structure of microbial communities from the different habitats of hydrothermal vents studied, chimneys and proximal plumes.

Microbial communities from hydrothermal proximal plume

The formation of hydrothermal chimneys results from the precipitation of minerals caused by the mixing between hydrothermal fluid and seawater. The proximal plume is the immediate result of this mixing and represents a large volume within hydrothermal habitats so it comports similar features with hydrothermal chimneys

According to the data obtained by the diversity study, the archaeal communities from the hydrothermal proximal plume were mainly composed of Marine Group-I (MG-I), renamed

as *Thaumarchaeota* (Brochier-Armanet *et al.*, 2008). The microorganisms of this lineage are present in numerous biotopes and their cultivated members, belonging the genus *Nitrosopumilus*, were described as mesophilic, aerobic and ammonia-oxidizing chemolithoautotrophs (Qin *et al.*, 2015, Qin *et al.*, 2017, Santoro *et al.*, 2019). MG-II and MG-III (in class *Thermoplasmata*) were also detected in plume samples and may perform heterotrophic metabolisms (Rinke *et al.*, 2019, Santoro *et al.*, 2019). The presence of *Archaea* affiliated to these lineages in the seawater around hydrothermal sites has already been shown by previous studies (Takai *et al.*, 2004, Crepeau *et al.*, 2011, Roussel *et al.*, 2011). Only a small proportion of the sequences was affiliated to thermophilic or hyperthermophilic *Archaea* so we assume that they were expelled from the chimneys by the flow of hydrothermal fluid and were not active at lower temperatures, which has already been proposed as a scenario for dispersal of hydrothermal microorganisms (Dick *et al.*, 2013, Lesongeur *et al.*, 2014, Dick, 2019).

On the contrary, bacterial communities were composed of both marine and hydrothermal *Bacteria*. *Sulfurimonas*, *Sulfurovum* and other *Campylobacteria* (formerly named *Epsilonproteobacteria* (Waite *et al.*, 2017)) were the most abundant lineages. They are representative of hydrothermal habitats including chimneys, diffuse fluids and proximal or distal plume (Campbell *et al.*, 2006, Akerman *et al.*, 2013, Djurhuus *et al.*, 2017). On the other hand some lineages detected in plume samples are more common in marine environments (close or distant to hydrothermal sites) than in hydrothermal chimneys, like SAR324 and SAR11 (Dick & Tebo, 2010, Dick *et al.*, 2013, Giovannoni, 2017).

A feature observed for both archaeal and bacterial communities from proximal plume was the influence of the hydrothermal site on the microbial community structure. Indeed, the communities of *Archaea* and *Bacteria* were significantly different among the site where the plume samples were collected (Aisics, Cypres, White Castle, Y3 and Capelinhos). It is highly likely that the main factor that has driven the communities was the chemical composition of the hydrothermal fluid, as it was already described in studies performed on nearby or distant sites (McCollom, 2007, Flores *et al.*, 2011, Takai & Nakamura, 2011, Dahle *et al.*, 2018).

Microbial communities from hydrothermal chimneys

Even if hydrothermal chimneys are in close contact with hydrothermal plume, the microbial communities of these two habitats were different, which was especially true for the archaeal communities.

The *Archaea* detected in hydrothermal chimneys were mainly affiliated to hyperthermophilic taxa, like *Thermococcus*, *Archaeoglobi*, *Thermoprotei* and to the thermo-acidophilic genus *Aciduliprofundum*. These taxa, with the exception of *Aciduliprofundum* were also enriched in MPN experiments, which supports the metabarcoding results. The MG-I, MG-II and MG-III that composed almost all the archaeal communities of the proximal plume were detected only in a few chimney samples and in low proportions. Another striking difference was the much higher alpha-diversity of the archaeal communities from proximal plume compared to the communities of the chimneys. This is consistent with the results presented by Roussel *et al.* that observed a high intralinear diversity for the MG-I present in seawater around hydrothermal sites (Roussel *et al.*, 2011).

Unlike the *Archaea*, the bacterial communities from hydrothermal chimneys were broadly similar to the communities from the plume. Indeed, numerous taxa were shared between these two habitats, including the *Campylobacteria* that was the most represented lineage in chimneys and plume. Other abundant taxa included *Aquificae*, *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Bacilli* and *Deinococci*. Due to the important taxonomic diversity of *Bacteria*, only a small fraction of the bacterial diversity was enriched in MPN experiments. Moreover, the average alpha-diversity was comparable between the bacterial communities of chimneys and plume. In contrast to the *Archaea*, we did not show that some bacterial taxa were specific to the chimneys. Instead, the differences were only observed at the level of ASVs.

Different habitats and micro-habitats

Compared to what we observed concerning the microbial communities of the proximal plume, our results did not indicate an influence of the hydrothermal site on the archaeal communities of the chimneys. Concerning the *Bacteria*, a tendency was observed but was not validated statistically. Hence, we can assume that the chemical composition of the hydrothermal fluid was not the main driver of the microbial communities in hydrothermal vents.

Because the most striking difference between the microbial communities from hydrothermal chimneys and proximal plume was the absence of hyperthermophilic *Archaea* in the plume, we can assume that the main factor that differentiated the microbial communities from these habitats was the temperature. Indeed, the emission of hydrothermal fluid in seawater generates sharp thermal and chemical gradients. Thus, it is likely that the zone of the plume where the temperature allows the growth of hyperthermophiles (approximately 70 to 120°C) is very narrow. On the contrary, in the hydrothermal chimneys the mixing between hydrothermal fluid and seawater is limited by the mineral structure. This is especially marked in the sulfide-dominant parts of the chimneys that present a lower porosity compared to young sulfate chimneys. This link between temperature and microbial communities in the hydrothermal chimneys has already been shown by different studies, as the communities are mostly composed of hyperthermophilic *Archaea* in the hot and anoxic internal areas of the chimneys, whereas abundant communities of thermophilic and mesophilic *Bacteria* are present in the external parts influenced by seawater (Harmsen *et al.*, 1997, Takai *et al.*, 2001, Schrenk *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2014).

MPN enrichments have also shown that the temperature was a main driver of the microbial communities. Hence, even if we did not separate the different parts of the chimneys during the collection of the samples we can assume that the thermal and redox gradients in the chimneys explain our observations. Indeed, we have shown with MPN enrichments and activity measurements experiments that the most abundant culturable microorganisms were mesophiles, and that the carbon fixation rate was higher at 30°C than 60, 80 and 95°C. This is consistent with the results of the studies presented above. This was especially noticeable for the sulfate chimneys in which the autotrophic mesophiles were the most abundant microorganisms according to MPN enrichments.

Even if we have not shown a difference between the taxonomic diversity of the microbial communities in sulfate and sulfide chimneys, the structure of the communities were different. The heterogeneous structure of the sulfide chimneys probably forms various microhabitats that allow the presence of a higher abundance and diversity of microorganisms. The continuous cultures in bioreactor have also shown that the mineralogical composition of the chimneys was a main driver of the enriched archaeal and bacterial communities.

Schematic summary of the results and description of the model

The results obtained during our study by different approaches are summarized in a model of spatial and temporal dynamics of microbial communities in active hydrothermal vents. This model is explained below and supported by a scheme resuming the main results (**Figure 74**).

We focused our study on two main habitats of the hydrothermal vents, that are the proximal plume and the hydrothermal chimneys. The chimneys can be separated in two distinct habitats depending on their stage of growth because the sulfate and sulfide chimneys present different mineralogical composition, porosity and structure.

The main factor that differentiates these habitats is the thermal gradient, which is sharp in proximal plume, wider in sulfate chimneys and even more extended in sulfide chimneys (represented by blue and red triangle on the **Figure 74**). Moreover, the chimneys represent a solid phase on which the microorganisms can adhere and use the minerals as substrates.

The thermal gradient is considered as a main driver of the microbial communities, and it is inversely correlated to the gradient of oxygen concentration. Hence, hyperthermophilic and anaerobic *Archaea* are absent or very scarce in proximal plume, and present in the internal high-temperature and anoxic parts of the chimneys. They are more abundant in sulfide chimneys because the thermal gradient is more extended. Inversely, the mesophilic *Archaea* from proximal plume, MG-I, MG-II and MG-III are rarely present in hydrothermal chimneys.

In contrast to the *Archaea* that require a high temperature to grow, most *Bacteria* are thermophiles or mesophiles, and facultative anaerobes or microaerophiles. They are mainly present in the external parts of the chimneys, which are cooled by seawater that also provides oxygen. Moreover, it was shown that some *Bacteria* considered are mesophiles can also thrive in low-temperature habitats, below 10°C (Perner *et al.*, 2007). Hence, the external parts of the chimneys and the proximal plume are suitable habitats for mesophilic and moderate thermophilic autotrophic *Bacteria*. These habitats represent a large part of the environment, that would explain why mesophilic autotrophic *Bacteria* are the most abundant microorganisms detected in the chimneys; and also why the autotrophic carbon fixation rate is higher at low temperature.

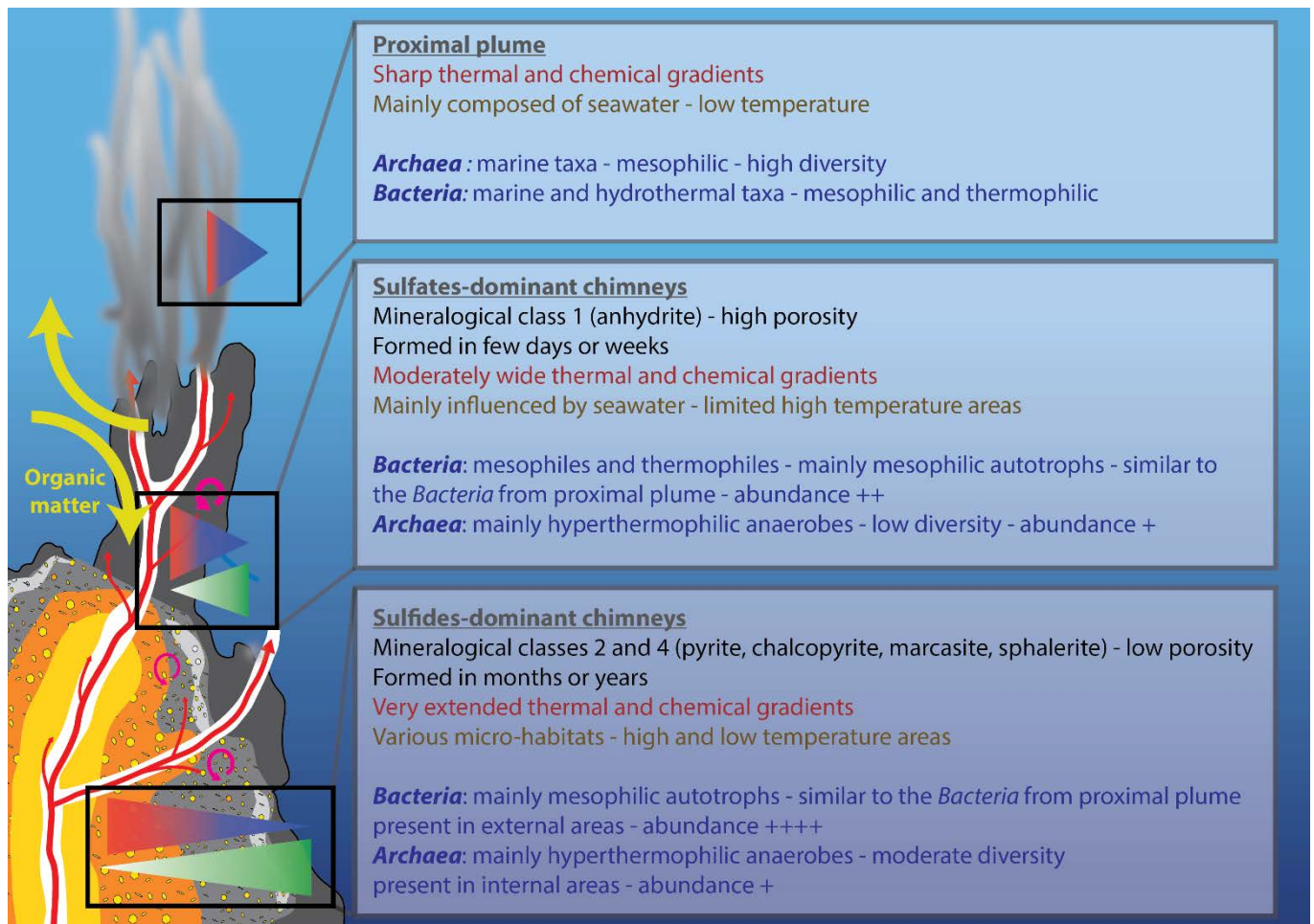


Figure 74 : Schematic summary of the model of spatial and temporal dynamics of microbial communities in active hydrothermal vents. The model is based on the results obtained from this study and previous works cited in the text. The physico-chemical gradient is shown in the form of triangles (red represent high temperature and low oxygen concentration, and blue represent low temperature and high oxygen concentration). The microbial concentration and carbon fixation activity are represented by green triangles (darker for high concentration and activity). Yellow arrows represent the exchanges of organic matter with others compartments of the ecosystem. Legends concerning the illustration of the chimney correspond to the Figure

7.

Our methodology did not allow us to really study the early steps of the colonization of hydrothermal chimneys by microorganisms, but we can propose assumptions according to our results and the data from literature. Because most *Bacteria* are present in the proximal plume and in the chimneys, it is likely that they primarily thrive in the plume where the conditions are adapted to their growth (low to moderate temperature, presence of oxygen for microaerophiles...). When a chimney precipitates, they can colonize the external zones of the chimneys, that are mainly influenced by seawater and that present similar features compared to the proximal plume.

Unlike the *Bacteria*, for hyperthermophilic *Archaea* the temperature is too low in proximal plume so they are dependent of the hydrothermal chimneys whose structure creates high-temperature zones. Hence, they only thrive in the internal parts of the chimneys and the hyperthermophilic *Archaea* detected in the plume were only expelled by the hydrothermal fluid flow and are probably inactive. These cells are then dispersed and colonize newly formed chimneys where the temperature is high enough for their growth (Wirth, 2017, Wirth *et al.*, 2018).

The temporal dynamics of microbial communities in hydrothermal chimneys is driven by the evolution over time of the mineralogical composition and structure of the chimneys. The formation of microhabitats within the sulfide chimneys allows the growth of a higher abundance and diversity of microorganisms compared to sulfate chimneys. It is likely that organic compounds produced by chemolithoautotrophs are used by heterotrophs, leading to the succession of different communities over time as described previously (Reysenbach *et al.*, 2000) and observed in MPN enrichments.

We did not extend our study to other compartments of the hydrothermal ecosystem as the macrofaunal assemblages. However, they represent an important part of the hydrothermal ecosystems because they are implied in the production of biomass, especially through the symbiotic association with chemolithoautotrophs. In this highly turbulent ecosystem, they contribute to an input of organic matter in the chimneys, enhancing the growth of heterotrophs (represented by yellow arrows on the **Figure 74**).

Adaptation of the microorganisms to the hydrothermal environment

The diversity and structure of the microbial communities of the different habitats and micro-habitats within the hydrothermal ecosystems depend on the *in situ* conditions, and on the physiological and metabolic capacities of the microorganisms. *Campylobacteria* and among the most abundant microorganisms detected. These microorganisms can use various electron donors (reduced sulfur compounds, hydrogen) and electron acceptors (oxygen, nitrate, nitrite). This metabolic versatility is therefore a real advantage in such a dynamic environment where the physico-chemical conditions vary over a very small spatial scale.

Aquificae, that are also commonly detected in hydrothermal habitats, present similar metabolic capacities but grow at higher temperature, above 60°C. The strain *Persephonella atlantica* MO1340 that was described in the present study can oxidize elemental sulfur,

thiosulfate and hydrogen, and reduce oxygen or nitrate. We have shown that its optimal growth temperature and optimal oxygen concentration were dependent on the substrates provided and were inversely correlated. This relation between substrates, temperature and oxygen matches the physico-chemical gradients created by the mixing between hydrothermal fluid and seawater. This is, to our knowledge, the first report of the adaptation of both physiological and metabolic capacities by strain to the hydrothermal environment.

Because the genus *Persephonella* is ubiquitous in hydrothermal vents, and presents numerous similarities with the *Campylobacteria*, we can wonder if other microorganisms present similar adaptations to this environment. It would thus be an important matter to investigate if this phenomenon is observed among other strains of different taxa.

Conclusion and perspectives

Since the discovery of hydrothermal vents, the ecosystems associated to this unique environment have been the subject of numerous studies. Because these ecosystems are mainly based on primary production by chemolithoautotrophic microorganisms, the microbiology of hydrothermal vents has also been extensively studied. However, due to technical limitations and due to the complexity of these ecosystems, the spatial and temporal dynamics of the microbial communities and their interactions with the hydrothermal environment remain unclear.

In the present study, we implemented different methodological approaches to describe the environment constituted by the hydrothermal chimneys, and to investigate the structure and dynamics of the microbial communities in chimneys and proximal plume. The use of different approaches produced complementary results that allowed us to propose a model for spatial and temporal dynamics of microbial communities in active hydrothermal vents.

Even if we could partially answer to the problematic of the subject, taking a step back on the methodological approaches allows us to propose additional methods to complete our results.

As it was discussed previously, we could not really access to the first steps of the microbial colonization of hydrothermal chimneys because the time scale is not comparable between microbial growth and chimneys growth. The sole sample for which it would have been possible was the sample M17 Ais 3, that precipitated in 9 days after a first sampling. Thus,

realize different samplings of a same chimney at intervals of a few days is a possible solution for this matter.

Another difficulty concerned the spatial scales, because we used samples of chimneys from 8 to 40 grams, whereas the micro-habitats that separate the microbial communities are probably much smaller than the volume studied. Moreover, we worked with bulk samples from the sulfide chimneys that were often heterogeneous. It would be informative to use subsamples of the chimneys by separating inner and outer parts that present different mineralogical compositions.

Also, we focused our study on the hydrothermal vent field Lucky Strike and so we did not investigate the spatial dynamics of microbial communities over distant sites. To do this we may reproduce our methodological approach on contrasting vent fields in different geological settings (*ie.* ultramafic *versus* basaltic), or at various depths. This would imply to realize a better description of the *in situ* conditions before comparing the microbial communities.

In the same perspective, it was planned to complete our study by including data about the chemical composition of the hydrothermal fluid. These data were acquired through a collaboration with colleagues from the laboratory Géosciences Environnement Toulouse but were not integrated as they have only recently become available.

It was also intended to implement methods for quantifying the *Archaea* and *Bacteria* present in the chimneys. Microscopic techniques like Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) were tested but did not produce satisfying results due to the fluorescence of the minerals. The method of Catalysed Reporter Deposition FISH (CARD-FISH) may solve this issue by enhancing the fluorescent signal of the cells. Quantitative PCR could also allow a quantification of archaeal and bacterial communities, but the concentrations of DNA extracted from chimney samples were often too low. These two methods are currently under optimization at the LM2E.

Because the metabarcoding approach do not provide functional data about microbial communities, and because cultural methods do not bring data about non-culturable microorganisms, a metagenomics approach could produce complementary results. A few metagenomes were sequenced from continuous cultures in bioreactor, and from chimney samples, and are under analysis. However, it also encounters issues with the low DNA concentrations for chimney samples, so an optimization work is still necessary to obtain DNA of high quality and concentration.

Continuous cultures in bioreactor allowed the growth of various archaeal and bacterial taxa, including uncultured members of the superphylum DPANN in the cultures M17_Ferm and M18_Ferm. Also, the most abundant *Bacteria* enriched in the culture M19_Ferm were affiliated to the genus *Sulfurimonas* whereas the incubation temperature was much higher than the optimal growth temperatures described for this genus. Due to lack of time, we could not investigate the data in detail. It includes the chemical analysis of substrates and products in the liquid phase, as well as the metagenomics data. However, according to the results presented in this manuscript the data acquired using this method are expected to bring information about diverse subjects, including the physiological and metabolic capacities of the enriched microorganisms and the description of new phyla (Roussel *et al.*, 2018).

The interactions between the microorganisms and the minerals could also be studied using this approach. It should be a main focus of the future works because the minerals that compose the hydrothermal chimneys are probably an important source of electron donors and acceptors for microorganisms. These interactions include the phenomenon of electroactivity, that concerns different microbial taxa that are commonly present in hydrothermal vents, including *Thermococcales* and *Archaeoglobales* (Pillot *et al.*, 2018).

In summary, whatever may be the focus of the future research about the microbial communities in hydrothermal vents, it will be necessary to describe the environment, and to investigate the microbial communities at different scales. Indeed, the adaptation of the microorganisms to their environment, the interactions between the microorganisms and their interactions with the environment are deeply connected. Thus, the use of different methods is the best solution to get a global vision of the ecosystem and to better understand it.

Références bibliographiques

- Adam PS, Borrel G & Gribaldo S (2018) Evolutionary history of carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, one of the oldest enzymatic complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**: E1166-E1173.
- Adam PS, Borrel G, Brochier-Armanet C & Gribaldo S (2017) The growing tree of Archaea: new perspectives on their diversity, evolution and ecology. *The ISME Journal*.
- Aitchison J (1986) *The Analysis of Compositional Data* (London. Chapman and.
- Aitken F & Foulc J-N (2018) *Des profondeurs océaniques au laboratoire 1: Les premières explorations de l'océan profond par le HMS Challenger (1872-1876)*. ISTE Group.
- Akerman NH, Butterfield DA & Huber JA (2013) Phylogenetic diversity and functional gene patterns of sulfur-oxidizing seafloor Epsilonproteobacteria in diffuse hydrothermal vent fluids. *Front Microbiol* **4**: 185.
- Alain K, Zbinden M, Le Bris N, Lesongeur F, Quérellou J, Gaill F & Cambon-Bonavita MA (2004) Early steps in microbial colonization processes at deep-sea hydrothermal vents. *Environ Microbiol* **6**: 227-241.
- Alain K, Querellou J, Lesongeur F, Pignet P, Crassous P, Raguénès G, Cuffe V & Cambon-Bonavita M-A (2002) *Caminibacter hydrogeniphilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an East Pacific Rise hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1317-1323.
- Alexander M (1983) Most probable number method for microbial populations. *Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties* **9**: 815-820.
- Alt JC (1995) Subseafloor Processes in Mid-Ocean Ridge Hydrothermal Systems. *Seafloor Hydrothermal Systems: Physical, chemical, biological, and geological interactions* 85-114.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Amann RI, Ludwig W & Schleifer K-H (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews* **59**: 143-169.
- Amend JP & Shock EL (2001) Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 175-243.
- Amend JP & LaRowe DE (2019) Minireview: demystifying microbial reaction energetics. *Environ Microbiol* **21**: 3539-3547.
- Amend JP, McCollom TM, Hentscher M & Bach W (2011) Catabolic and anabolic energy for chemolithoautotrophs in deep-sea hydrothermal systems hosted in different rock types. *Geochim Cosmochim Acta* **75**: 5736-5748.
- Amend JP, Aronson HS, Macalady J & LaRowe DE (2020) Another chemolithotrophic metabolism missing in nature: sulfur comproportionation. *Environ Microbiol* **22**: 1971-1976.
- Anantharaman K, Hausmann B, Jungbluth SP, Kantor RS, Lavy A, Warren LA, Rappé MS, Pester M, Loy A & Thomas BC (2018) Expanded diversity of microbial groups that shape the dissimilatory sulfur cycle. *The ISME journal* **1**.
- Andrews S (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. p.^pp. Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom.
- Apprill A, McNally S, Parsons R & Weber L (2015) Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology* **75**: 129-137.

- Auchtung TA, Takacs-Vesbach CD & Cavanaugh CM (2006) 16S rRNA phylogenetic investigation of the candidate division “Korarchaeota”. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5077-5082.
- Baker BJ, De Anda V, Seitz KW, Dombrowski N, Santoro AE & Lloyd KG (2020) Diversity, ecology and evolution of Archaea. *Nature Microbiology* 1-14.
- Balch W, Fox G, Magrum L, Woese C & Wolfe R (1979) Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiological reviews* **43**: 260.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S & Prjibelski AD (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* **19**: 455-477.
- Barco RA, Hoffman CL, Ramírez GA, Toner BM, Edwards KJ & Sylvan JB (2017) In-situ incubation of iron-sulfur mineral reveals a diverse chemolithoautotrophic community and a new biogeochemical role for Thiomicrospira. *Environ Microbiol*.
- Barreyre T, Escartín J, Garcia R, Cannat M, Mittelstaedt E & Prados R (2012) Structure, temporal evolution, and heat flux estimates from the Lucky Strike deep-sea hydrothermal field derived from seafloor image mosaics. *Geom Geophys Geosy* **13**.
- Bauer SLM, Roalkvam I, Steen IH & Dahle H (2016) Lutibacter profundus sp. nov., isolated from a deep-sea hydrothermal system on the Arctic Mid-Ocean Ridge and emended description of the genus Lutibacter. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**: 2671-2677.
- Beaulieu SE, Baker ET, German CR & Maffei A (2013) An authoritative global database for active submarine hydrothermal vent fields. *Geom Geophys Geosy* **14**: 4892-4905.
- Berg IA (2011) Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways. *Appl Environ Microbiol* **77**: 1925-1936.
- Bergey DH & Garrity GM (2005) *Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2, The proteobacteria. Part B, The gammaproteobacteria*. Springer.
- Bertoldo C & Antranikian G (2006) The order thermococcales. *The prokaryotes*, p. 69-81. Springer.
- Biddle JF, Cardman Z, Mendlovitz H, Albert DB, Lloyd KG, Boetius A & Teske A (2012) Anaerobic oxidation of methane at different temperature regimes in Guaymas Basin hydrothermal sediments. *The ISME journal* **6**: 1018.
- Birrien J-L, Zeng X, Jebbar M, Cambon-Bonavita M-A, Quérellou J, Oger P, Bienvenu N, Xiao X & Prieur D (2011) Pyrococcus yayanosii sp. nov., an obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 2827-2881.
- Bischoff JL & Rosenbauer RJ (1988) Liquid-vapor relations in the critical region of the system NaCl-H₂O from 380 to 415 C: A refined determination of the critical point and two-phase boundary of seawater. *Geochim Cosmochim Acta* **52**: 2121-2126.
- Blandin J & Sarradin PM (2013) MOMARSAT2013 (Lucky Strike). Cruise Report. 23 Aug - 07 Sept 2013. N/O Pourquoi pas ?–Victor 6000. doi 10.17600/13030040.
- Blöchl E, Rachel R, Burggraf S, Hafenbradl D, Jannasch HW & Stetter KO (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.
- Boden R, Scott KM, Williams J, Russel S, Antonen K, Rae AW & Hutt LP (2017) An evaluation of Thiomicrospira, Hydrogenovibrio and Thioalkalimicrobium: reclassification of four species of Thiomicrospira to each Thiomicrospira gen. nov. and Hydrogenovibrio, and reclassification of all four species of Thioalkalimicrobium to Thiomicrospira. *Int J Syst Evol Microbiol* **67**: 1140-1151.
- Brazelton WJ & Baross JA (2010) Metagenomic comparison of two Thiomicrospira lineages inhabiting contrasting deep-sea hydrothermal environments. *PloS one* **5**: e13530.

- Brazelton WJ, Schrenk MO & Lang SQ (2013) Serpentinization, carbon, and deep life. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* **75**: 575-606.
- Brazelton WJ, Schrenk MO, Kelley DS & Baross JA (2006) Methane-and sulfur-metabolizing microbial communities dominate the Lost City hydrothermal field ecosystem. *Appl Environ Microbiol* **72**: 6257-6270.
- Brinkhoff T & Muyzer G (1997) Increased species diversity and extended habitat range of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3789-3796.
- Brinkhoff T, Muyzer G, Wirsen CO & Kuever J (1999) *Thiomicrospira chilensis* sp. nov., a mesophilic obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacterium isolated from a Thioploca mat. *Int J Syst Evol Microbiol* **49**: 875-879.
- Brinkhoff T, Muyzer G, Wirsen CO & Kuever J (1999) *Thiomicrospira kuenenii* sp. nov. and *Thiomicrospira frisia* sp. nov., two mesophilic obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria isolated from an intertidal mud flat. *Int J Syst Evol Microbiol* **49**: 385-392.
- Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S & Forterre P (2008) Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 245-252.
- Brooks JP, Edwards DJ, Harwich MD, Rivera MC, Fettweis JM, Serrano MG, Reris RA, Sheth NU, Huang B & Girerd P (2015) The truth about metagenomics: quantifying and counteracting bias in 16S rRNA studies. *BMC Microbiol* **15**: 1-14.
- Brown CT, Hug LA, Thomas BC, Sharon I, Castelle CJ, Singh A, Wilkins MJ, Wrighton KC, Williams KH & Banfield JF (2015) Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria. *Nature* **523**: 208.
- Brugna-Guiral M, Tron P, Nitschke W, Stetter K-O, Burlat B, Guigliarelli B, Bruschi M & Giudici-Ortoni MT (2003) [NiFe] hydrogenases from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*: properties, function, and phylogenetics. *Extremophiles* **7**: 145-157.
- Buchan A, González JM & Chua MJ (2019) Aerobic Hydrocarbon-Degrading Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae (Roseobacter). *Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes* 93-104.
- Burggraf S, Jannasch HW, Nicolaus B & Stetter KO (1990) *Archaeoglobus profundus* sp. nov., represents a new species within the sulfate-reducing archaeobacteria. *Syst Appl Microbiol* **13**: 24-28.
- Byrne N, Lesongeur F, Bienvenu N, Geslin C, Alain K, Prieur D & Godfroy A (2009) Effect of variation of environmental conditions on the microbial communities of deep-sea vent chimneys, cultured in a bioreactor. *Extremophiles* **13**: 595-608.
- Byrne N, Strous M, Crépeau V, Kartal B, Birrien J-L, Schmid M, Lesongeur F, Schouten S, Jaeschke A & Jetten M (2009) Presence and activity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria at deep-sea hydrothermal vents. *The ISME journal* **3**: 117.
- Caldwell SL, Laidler JR, Brewer EA, Eberly JO, Sandborgh SC & Colwell FS (2008) Anaerobic oxidation of methane: mechanisms, bioenergetics, and the ecology of associated microorganisms. *Environmental science & technology* **42**: 6791-6799.
- Callac N, Rommevaux-Jestin C, Rouxel O, Lesongeur F, Liorzou C, Bollinger C, Ferrant A & Godfroy A (2013) Microbial colonization of basaltic glasses in hydrothermal organic-rich sediments at Guaymas Basin. *Front Microbiol*.
- Callac N, Rouxel O, Lesongeur F, Liorzou C, Bollinger C, Pignet P, Chéron S, Fouquet Y, Rommevaux-Jestin C & Godfroy A (2015) Biogeochemical insights into microbe–mineral–fluid interactions in hydrothermal chimneys using enrichment culture. *Extremophiles* **19**: 597-617.
- Callahan BJ, Sankaran K, Fukuyama JA, McMurdie PJ & Holmes SP (2016) Bioconductor workflow for microbiome data analysis: from raw reads to community analyses. *F1000Research* **5**.

- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA & Holmes SP (2016) DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods* **13**: 581-583.
- Campbell BJ, Engel AS, Porter ML & Takai K (2006) The versatile ϵ -proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nat Rev Microbiol* **4**: 458.
- Cannat M (2018) MOMARSAT2018 cruise (Lucky Strike). Cruise Report. 8-27 Aug 2018. N/O L'Atalante–Victor 6000. doi 10.17600/18000514.
- Cannat M & Sarradin PM (2016) MOMARSAT2016 cruise (Lucky Strike). Cruise Report. 24 Aug - 13 Sept 2016. N/O L'Atalante–Victor 6000. doi 10.17600/16001200.
- Cannat M, Briais A, Deplus C, Escartin J, Georgen J, Lin J, Mercouriev S, Meyzen C, Muller M & Pouliquen G (1999) Mid-Atlantic Ridge—Azores hotspot interactions: along-axis migration of a hotspot-derived event of enhanced magmatism 10 to 4 Ma ago. *Earth Planet Sci Lett* **173**: 257-269.
- Carrigg C, Rice O, Kavanagh S, Collins G & O'Flaherty V (2007) DNA extraction method affects microbial community profiles from soils and sediment. *Applied microbiology and biotechnology* **77**: 955-964.
- Castelle CJ, Brown CT, Anantharaman K, Probst AJ, Huang RH & Banfield JF (2018) Biosynthetic capacity, metabolic variety and unusual biology in the CPR and DPANN radiations. *Nature Reviews Microbiology* **1**.
- Castelle CJ, Wrighton KC, Thomas BC, Hug LA, Brown CT, Wilkins MJ, Frischkorn KR, Tringe SG, Singh A & Markillie LM (2015) Genomic expansion of domain archaea highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling. *Current biology* **25**: 690-701.
- Charlou J, Donval J, Fouquet Y, Jean-Baptiste P & Holm N (2002) Geochemistry of high H₂ and CH₄ vent fluids issuing from ultramafic rocks at the Rainbow hydrothermal field (36° 14' N, MAR). *Chem Geol* **191**: 345-359.
- Charlou J, Donval J, Douville E, Jean-Baptiste P, Radford-Knoery J, Fouquet Y, Dapigny A & Stievenard M (2000) Compared geochemical signatures and the evolution of Menez Gwen (37° 50' N) and Lucky Strike (37° 17' N) hydrothermal fluids, south of the Azores Triple Junction on the Mid-Atlantic Ridge. *Chem Geol* **171**: 49-75.
- Chavagnac V, Leleu T, Fontaine F, Cannat M, Ceuleneer G & Castillo A (2018) Spatial Variations in Vent Chemistry at the Lucky Strike Hydrothermal Field, Mid-Atlantic Ridge (37° N): Updates for Subseafloor Flow Geometry from the Newly Discovered Capelinhos Vent. *Geom Geophys Geosy* **19**: 4444-4458.
- Chavagnac V, Ali HS, Jeandel C, Leleu T, Destrienneville C, Castillo A, Cotte L, Waeles M, Cathalot C & Laes-Huon A (2018) Sulfate minerals control dissolved rare earth element flux and Nd isotope signature of buoyant hydrothermal plume (EMSO-Azores, 37° N Mid-Atlantic Ridge). *Chem Geol* **499**: 111-125.
- Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen H, Arahal DR, da Costa MS, Rooney AP, Yi H, Xu X-W & De Meyer S (2018) Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* **68**: 461-466.
- Cochran WG (1950) Estimation of bacterial densities by means of the "most probable number". *Biometrics* **6**: 105-116.
- Colaço A, Blandin J, Cannat M, Carval T, Chavagnac V, Connelly D, Fabian M, Ghiron S, Goslin J & Miranda J (2011) MoMAR-D: a technological challenge to monitor the dynamics of the Lucky Strike vent ecosystem. *ICES Journal of Marine Science* **68**: 416-424.
- Corbari L, Zbinden M, Cambon-Bonavita M-A, Gaill F & Compère P (2008) Bacterial symbionts and mineral deposits in the branchial chamber of the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*: relationship to moult cycle. *Aquatic Biology* **1**: 225-238.

- Corliss JB, Dymond J, Gordon LI, *et al.* (1979) Submarine thermal springs on the galapagos rift. *Science* **203**: 1073-1083.
- Corre E, Reysenbach A-L & Prieur D (2001) ϵ -Proteobacterial diversity from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. *FEMS Microbiol Lett* **205**: 329-335.
- Cotte L, Waeles M, Pernet-Coudrier B, Sarradin P-M, Cathalot C & Riso RD (2015) A comparison of in situ vs. ex situ filtration methods on the assessment of dissolved and particulate metals at hydrothermal vents. *Deep Sea Res (I Oceanogr Res Pap)* **105**: 186-194.
- Crane EJ (2019) Sulfur-dependent microbial lifestyles: deceptively flexible roles for biochemically versatile enzymes. *Current opinion in chemical biology* **49**: 139-145.
- Crawford WC, Rai A, Singh SC, Cannat M, Escartin J, Wang H, Daniel R & Combier V (2013) Hydrothermal seismicity beneath the summit of Lucky Strike volcano, Mid-Atlantic Ridge. *Earth and Planetary Science Letters* **373**: 118-128.
- Crepeau V, Cambon Bonavita MA, Lesongeur F, Randrianalivelo H, Sarradin PM, Sarrazin J & Godfroy A (2011) Diversity and function in microbial mats from the Lucky Strike hydrothermal vent field. *FEMS Microbiol Ecol* **76**: 524-540.
- Crozier TE & Yamamoto S (1974) Solubility of hydrogen in water, sea water, and sodium chloride solutions. *J Chem Eng Data* **19**: 242-244.
- Cruaud P, Vigneron A, Fradette MS, Charette SJ, Rodriguez MJ, Dorea CC & Culley AI (2017) Open the Sterivex™ casing: An easy and effective way to improve DNA extraction yields. *Limnology and Oceanography: Methods*.
- Dahle H, Bauer SLM, Baumberger T, Stokke R, Pedersen RB, Thorseth IH & Steen IH (2018) Energy landscapes in hydrothermal chimneys shape distributions of primary producers. *Front Microbiol* **9**: 1570.
- Dalmasso C, Oger P, Selva G, Courtine D, L'Haridon S, Garlaschelli A, Roussel E, Miyazaki J, Reveillaud J & Jebbar M (2016) Thermococcus piezophilus sp. nov., a novel hyperthermophilic and piezophilic archaeon with a broad pressure range for growth, isolated from a deepest hydrothermal vent at the Mid-Cayman Rise. *Syst Appl Microbiol* **39**: 440-444.
- Dalmasso Cc (2016) Approches physiologiques et génomiques d'une archée thermo-piezophile Thermococcus piezophilus. Thesis, Brest.
- de Beer G (1955) The pogonophora. *Nature* **176**: 888-888.
- De La Tour CB, Portemer C, Nadal M, Stetter K, Forterre P & Duguet M (1990) Reverse gyrase, a hallmark of the hyperthermophilic archaeobacteria. *J Bacteriol* **172**: 6803-6808.
- DeLong EF (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**: 5685-5689.
- DeMets C, Gordon RG, Argus D & Stein S (1990) Current plate motions. *Geophysical journal international* **101**: 425-478.
- Demey LM, Miller CR, Manzella MP, Spurbeck RR, Sandhu SK, Reguera G & Kashefi K (2017) The draft genome of the hyperthermophilic archaeon Pyrodictium delaneyi strain hulk, an iron and nitrate reducer, reveals the capacity for sulfate reduction. *Standards in Genomic Sciences* **12**: 47.
- Dick GJ (2019) The microbiomes of deep-sea hydrothermal vents: distributed globally, shaped locally. *Nat Rev Microbiol* **1**.
- Dick GJ & Tebo BM (2010) Microbial diversity and biogeochemistry of the Guaymas Basin deep-sea hydrothermal plume. *Environ Microbiol* **12**: 1334-1347.
- Dick GJ, Anantharaman K, Baker BJ, Li M, Reed DC & Sheik CS (2013) The microbiology of deep-sea hydrothermal vent plumes: ecological and biogeographic linkages to seafloor and water column habitats. *Front Microbiol* **4**: 124.
- Ding J, Zhang Y, Wang H, Jian H, Leng H & Xiao X (2017) Microbial Community Structure of Deep-sea Hydrothermal Vents on the Ultraslow Spreading Southwest Indian Ridge. *Front Microbiol* **8**.

- Djurhuus A, Mikalsen S-O, Giebel H-A & Rogers AD (2017) Cutting through the smoke: the diversity of microorganisms in deep-sea hydrothermal plumes. *Royal Society Open Science* **4**: 160829.
- Dombrowski N, Seitz KW, Teske AP & Baker BJ (2017) Genomic insights into potential interdependencies in microbial hydrocarbon and nutrient cycling in hydrothermal sediments. *Microbiome* **5**: 106.
- Dubilier N, Bergin C & Lott C (2008) Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 725.
- Duperron S, Bergin C, Zielinski F, Blazejak A, Pernthaler A, McKiness ZP, DeChaine E, Cavanaugh CM & Dubilier N (2006) A dual symbiosis shared by two mussel species, *Bathymodiolus azoricus* and *Bathymodiolus puteoserpentis* (Bivalvia: Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge. *Environ Microbiol* **8**: 1441-1447.
- Eden PA, Schmidt TM, Blakemore RP & Pace NR (1991) Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *Int J Syst Evol Microbiol* **41**: 324-325.
- Eder W & Huber R (2002) New isolates and physiological properties of the Aquificales and description of *Thermocrinis albus* sp. nov. *Extremophiles* **6**: 309-318.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**: 1792-1797.
- Edwards KJ, Bach W & McCollom TM (2005) Geomicrobiology in oceanography: microbe-mineral interactions at and below the seafloor. *TRENDS in Microbiology* **13**: 449-456.
- Ehrlich HL (1999) Microbes as geologic agents: their role in mineral formation. *Geomicrobiology Journal* **16**: 135-153.
- Emerson D, Rentz JA, Lilburn TG, Davis RE, Aldrich H, Chan C & Moyer CL (2007) A novel lineage of proteobacteria involved in formation of marine Fe-oxidizing microbial mat communities. *PloS one* **2**: e667.
- Escartin J (2008) MoMAR'08–Leg 1 (Lucky Strike). Cruise Report. 9-24 Aug 2008. N/O Atalante–Victor 6000. doi 10.17600/8010110.
- Escartin J & Cannat M (2009) BATHYLUCK 2009 (Lucky Strike). Cruise Report. 31 Aug - 29 Sept 2009. N/O Pourquoi pas ?–Victor 6000. doi 10.17600/9030040.
- Escartin J, Barreyre T, Cannat M, Garcia R, Gracias N, Deschamps A, Salocchi A, Sarradin P-M & Ballu V (2015) Hydrothermal activity along the slow-spreading Lucky Strike ridge segment (Mid-Atlantic Ridge): Distribution, heatflux, and geological controls. *Earth and Planetary Science Letters* **431**: 173-185.
- Euzéby JP (1997) List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Evol Microbiol* **47**: 590-592.
- Evans PN, Boyd JA, Leu AO, Woodcroft BJ, Parks DH, Hugenholtz P & Tyson GW (2019) An evolving view of methane metabolism in the Archaea. *Nature reviews Microbiology*.
- Felbeck H (1981) Chemoautotrophic potential of the hydrothermal vent tube worm, *Riftia pachyptila* Jones (Vestimentifera). *Science* **213**: 336-338.
- Ferrera I, Banta AB & Reysenbach A-L (2014) Spatial patterns of Aquificales in deep-sea vents along the Eastern Lau Spreading Center (SW Pacific). *Syst Appl Microbiol* **37**: 442-448.
- Fiala G & Stetter KO (1986) *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100 C. *Arch Microbiol* **145**: 56-61.
- Findlay AJ, Estes ER, Gartman A, Yücel M, Kamyshny A & Luther GW (2019) Iron and sulfide nanoparticle formation and transport in nascent hydrothermal vent plumes. *Nat Commun* **10**: 1-7.
- Flores GE, Campbell JH, Kirshtein JD, Meneghin J, Podar M, Steinberg JI, Seewald JS, Tivey MK, Voytek MA & Yang ZK (2011) Microbial community structure of hydrothermal

deposits from geochemically different vent fields along the Mid-Atlantic Ridge. *Environ Microbiol* **13**: 2158-2171.

Fortunato CS, Larson B, Butterfield DA & Huber JA (2017) Spatially distinct, temporally stable microbial populations mediate biogeochemical cycling at and below the seafloor in hydrothermal vent fluids. *Environ Microbiol*.

Fouhy F, Clooney AG, Stanton C, Claesson MJ & Cotter PD (2016) 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations-impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. *BMC Microbiol* **16**: 123.

Fouquet Y, Charlou J-L, Donval J-P, Radford-Knoery J, Pelle P, Ondreas H, Lourenco N, Segonzac M & Tivey M (1994) A detailed study of the Lucky-Strike hydrothermal site and discovery of a new hydrothermal site:«Menez-Gwen». Preliminary results of DIVA 1 cruise (5-29 May, 1994). *Inter-Ridge News* **3**: 14-17.

Fouquet Y, Cambon P, Etoubleau J, Charlou JL, OndréAs H, Barriga FJ, Cherkashov G, Semkova T, Poroshina I & Bohn M (2013) Geodiversity of hydrothermal processes along the Mid-Atlantic Ridge and ultramafic-hosted mineralization: A new type of oceanic Cu-Zn-Co-Au volcanogenic massive sulfide deposit. *Diversity Of Hydrothermal Systems On Slow Spreading Ocean Ridges Diversity Of Hydrothermal Systems On Slow Spreading Ocean Ridges*,p.^pp. 321-367. Wiley-Blackwell.

François D (2017) Dynamique de la diversité microbienne dans une cheminée hydrothermale active. p.^pp. Université de Bretagne Occidentale - Stage Master 2.

François DX, Godfroy A, Mathien C, Aubé J, Cathalot C, Lesongeur F, L'Haridon S, Philippon X & Roussel EG (2020) *Persephonella atlantica* sp. nov.: How to adapt to physico-chemical gradients in high temperature hydrothermal habitats. *Syst Appl Microbiol* 126176.

Friedrich CG, Rother D, Bardischewsky F, Quentmeier A & Fischer J (2001) Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Appl Environ Microbiol* **67**: 2873-2882.

Friedrich CG, Bardischewsky F, Rother D, Quentmeier A & Fischer J (2005) Prokaryotic sulfur oxidation. *Curr Opin Microbiol* **8**: 253-259.

Frigaard N-U & Dahl C (2008) Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *Adv Microb Physiol* **54**: 103-200.

Fuhrman JA & Davis AA (1997) Widespread Archaea and novel Bacteria from the deep sea as shown by 16S rRNA gene sequences. *Marine Ecology Progress Series* **150**: 275-285.

Gadd GM (2010) Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* **156**: 609-643.

Galtier N & Lobry J (1997) Relationships between genomic G+ C content, RNA secondary structures, and optimal growth temperature in prokaryotes. *Journal of molecular evolution* **44**: 632-636.

Garrity GM, Bell JA & Lilburn T (2005) Class II. Betaproteobacteria class. nov. *Bergey's manual® of systematic bacteriology*,p.^pp. 575-922. Springer.

Garrity GM, Bell JA & Lilburn T (2005) Class I. Alphaproteobacteria class. nov. *Bergey's manual® of systematic bacteriology*,p.^pp. 1-574. Springer.

Garrity GM, Holt JG, Hatchikian EC, Ollivier B & Garcia J-L (2001) Phylum BIII. Thermodesulfobacteria phy. nov. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*,p.^pp. 389-393. Springer.

Garrity GM, Holt JM, Huber H, Stetter KO, Greene AC, Patel BK, Caccavo F, Allison MJ, MacGregor BJ & Stahl DA (2001) Phylum BIX. Deferribacteres phy. nov. *Bergey's Manual «of Systematic Bacteriology*,p.^pp. 465-471. Springer.

Giovannoni SJ (2017) SAR11 bacteria: the most abundant plankton in the oceans. *Annu Rev Mar Sci* **9**: 231-255.

- Glassing A, Dowd SE, Galandiuk S, Davis B & Chiodini RJ (2016) Inherent bacterial DNA contamination of extraction and sequencing reagents may affect interpretation of microbiota in low bacterial biomass samples. *Gut pathogens* **8**: 24.
- Gloor GB, Macklaim JM, Pawlowsky-Glahn V & Egozcue JJ (2017) Microbiome datasets are compositional: and this is not optional. *Front Microbiol* **8**: 2224.
- Gloter A, Zbinden M, Guyot F, Gaill F & Colliex C (2004) TEM-EELS study of natural ferrihydrite from geological–biological interactions in hydrothermal systems. *Earth and Planetary Science Letters* **222**: 947-957.
- Godfroy A (2019) LUCKYDIVMIC cruise (Lucky Strike). Cruise Report. N/O Pourquoi pas ? Nautil. doi 10.17600/18001345.
- Godfroy A, Postec A & Raven N (2006) 4 Growth of Hyperthermophilic Microorganisms for Physiological and Nutritional Studies. *Methods in Microbiology*, Vol. 35 p.^pp. 93-108. Elsevier.
- Godfroy A, François D, Hartunians J, Moalic Y & Alain K (in press) Physiology, metabolism and ecology of thermophiles from deep-sea vents. *Deep-sea microbiology*, (Costantino V & Donato G, eds.), p.^pp. Springer - Under editing.
- Godfroy A, Lesongeur F, Raguénès G, Quérellou J, Antoine E, Meunier J-R, Guezennec J & Barbier G (1997) *Thermococcus hydrothermalis* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **47**: 622-626.
- Goodfellow M (2015) Actinobacteria phyl. nov. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* 1-2.
- Gorlas A, Jacquemot P, Guigner J-M, Gill S, Forterre P & Guyot F (2018) Greigite nanocrystals produced by hyperthermophilic archaea of Thermococcales order. *PloS one* **13**: e0201549.
- Gößner AS, Devereux R, Ohnemüller N, Acker G, Stackebrandt E & Drake HL (1999) *Thermicanus aegyptius* gen. nov., sp. nov., isolated from oxic soil, a fermentative microaerophile that grows commensally with the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 5124-5133.
- Götz D, Banta A, Beveridge T, Rushdi A, Simoneit B & Reysenbach A (2002) *Persephonella marina* gen. nov., sp. nov. and *Persephonella guaymasensis* sp. nov., two novel, thermophilic, hydrogen-oxidizing microaerophiles from deep-sea hydrothermal vents. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1349-1359.
- Guillou C & Guespin-Michel J (1996) Evidence for two domains of growth temperature for the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens* MF0. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3319-3324.
- Gupta RS (2014) The Phylum Aquificae. *The Prokaryotes*, p.^pp. 417-445. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Gupta RS & Lali R (2013) Molecular signatures for the phylum Aquificae and its different clades: proposal for division of the phylum Aquificae into the emended order Aquificales, containing the families Aquificaceae and Hydrogenothermaceae, and a new order Desulfurobacteriales ord. nov., containing the family Desulfurobacteriaceae. *Antonie Van Leeuwenhoek* **104**: 349-368.
- Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N & Tesler G (2013) QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* **29**: 1072-1075.
- Guy L & Ettema TJ (2011) The archaeal ‘TACK’ superphylum and the origin of eukaryotes. *Trends in microbiology* **19**: 580-587.
- Hafenbradl D, Keller M, Dirmeier R, Rachel R, Roßnagel P, Burggraf S, Huber H & Stetter KO (1996) *Ferroglobus placidus* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeum that oxidizes Fe²⁺ at neutral pH under anoxic conditions. *Arch Microbiol* **166**: 308-314.

- Han Y & Perner M (2015) The globally widespread genus *Sulfurimonas*: versatile energy metabolisms and adaptations to redox clines. *Front Microbiol* **6**: 989.
- Hannington MD, Jonasson IR, Herzig PM & Petersen S (1995) Physical and chemical processes of seafloor mineralization at mid-ocean ridges. *Geoph Monog Ame Geoph Un* **91**: 115-115.
- Harmsen H, Prieur D & Jeanthon C (1997) Distribution of microorganisms in deep-sea hydrothermal vent chimneys investigated by whole-cell hybridization and enrichment culture of thermophilic subpopulations. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2876-2883.
- Haro-Moreno JM, Rodriguez-Valera F, López-García P, Moreira D & Martin-Cuadrado A-B (2017) New insights into marine group III Euryarchaeota, from dark to light. *The ISME journal* **11**: 1102-1117.
- Harris JK, Kelley ST & Pace NR (2004) New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP11. *Appl Environ Microbiol* **70**: 845-849.
- Haymon RM (1983) Growth history of hydrothermal black smoker chimneys. *Nature* **301**: 695-698.
- Hedlund BP, Murugapiran SK, Alba TW, Levy A, Dodsworth JA, Goertz GB, Ivanova N & Woyke T (2015) Uncultivated thermophiles: current status and spotlight on ‘Aigarchaeota’. *Curr Opin Microbiol* **25**: 136-145.
- Henri P (2015) Etude de l’altération précoce des verres basaltiques par les microorganismes en contexte hydrothermal océanique : Exemple du site de Lucky Strike (dorsale Médio-Atlantique, 37° N). Thesis, Université Sorbonne Paris Cité (Paris, France).
- Hensen D (2006) Biochemical and genetic analysis of the Sox multienzyme complex in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. *Rhenish Friedrich Wilhelm University, Bonn*.
- Herlemann DP, Labrenz M, Jürgens K, Bertilsson S, Waniek JJ & Andersson AF (2011) Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME journal* **5**: 1571-1579.
- Hervé M & Hervé MM (2020) Package ‘RVAideMemoire’. See <https://CRAN.R-project.org/package=RVAideMemoire>.
- Hiraishi A (2015) Acidisphaera. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* 1-5.
- Hoek J, Banta A, Hubler F & Reysenbach AL (2003) Microbial diversity of a sulphide spire located in the Edmond deep-sea hydrothermal vent field on the Central Indian Ridge. *Geobiology* **1**: 119-127.
- Hohn MJ, Hedlund BP & Huber H (2002) Detection of 16S rDNA sequences representing the novel phylum “Nanoarchaeota”: indication for a wide distribution in high temperature biotopes. *Syst Appl Microbiol* **25**: 551-554.
- Holden JF & Adams MW (2003) Microbe–metal interactions in marine hydrothermal environments. *Current opinion in chemical biology* **7**: 160-165.
- Holm NG & Charlou JL (2001) Initial indications of abiotic formation of hydrocarbons in the Rainbow ultramafic hydrothermal system, Mid-Atlantic Ridge. *Earth and Planetary Science Letters* **191**: 1-8.
- Hou J, Sievert SM, Wang Y, Seewald JS, Natarajan VP, Wang F & Xiao X (2020) Microbial succession during the transition from active to inactive stages of deep-sea hydrothermal vent sulfide chimneys.
- Houghton J, Seyfried Jr W, Banta A & Reysenbach A-L (2007) Continuous enrichment culturing of thermophiles under sulfate and nitrate-reducing conditions and at deep-sea hydrostatic pressures. *Extremophiles* **11**: 371-382.

- Houghton JL & Seyfried WE, Jr. (2010) An experimental and theoretical approach to determining linkages between geochemical variability and microbial biodiversity in seafloor hydrothermal chimneys. *Geobiology* **8**: 457-470.
- Huang X-F, Wang F-Z, Zhang W, Li J, Ling J, Yang J, Dong J-D & Tian X-P (2014) *Paenibacillus abyssis* sp. nov., isolated from an abyssal sediment sample from the Indian Ocean. *Antonie van Leeuwenhoek* **106**: 1089-1095.
- Huber H, Burggraf S, Mayer T, Wyszchony I, Rachel R & Stetter KO (2000) *Ignicoccus* gen. nov., a novel genus of hyperthermophilic, chemolithoautotrophic Archaea, represented by two new species, *Ignicoccus islandicus* sp nov and *Ignicoccus pacificus* sp nov. and *Ignicoccus pacificus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 2093-2100.
- Huber H, Hohn MJ, Rachel R, Fuchs T, Wimmer VC & Stetter KO (2002) A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**: 63.
- Huber R, Wilharm T, Huber D, Trincone A, Burggraf S, König H, Reinhard R, Rockinger I, Fricke H & Stetter KO (1992) *Aquifex pyrophilus* gen. nov. sp. nov., represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol* **15**: 340-351.
- Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K, Brown CT, Probst AJ, Castelle CJ, Butterfield CN, Hermsdorf AW, Amano Y & Ise K (2016) A new view of the tree of life. *Nature Microbiology* **1**: 16048.
- Hugenholtz P, Pitulle C, Hershberger KL & Pace NR (1998) Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol* **180**: 366-376.
- Hügler M & Sievert SM (2011) Beyond the Calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean. *Annu Rev Mar Sci* **3**: 261-289.
- Hügler M, Huber H, Molyneaux SJ, Vetriani C & Sievert SM (2007) Autotrophic CO₂ fixation via the reductive tricarboxylic acid cycle in different lineages within the phylum Aquificae: evidence for two ways of citrate cleavage. *Environ Microbiol* **9**: 81-92.
- Humphris SE & Kleinrock MC (1996) Detailed morphology of the TAG Active Hydrothermal Mound: Insights into its formation and growth. *Geophysical Research Letters* **23**: 3443-3446.
- Humphris SE, Herzig P, Miller D, Alt J, Becker K, Brown D, Brüggmann G, Chiba H, Fouquet Y & Gemmill J (1995) The internal structure of an active sea-floor massive sulphide deposit. *Nature* **377**: 713.
- Hung K-S, Liu S-M, Tzou W-S, Lin F-P, Pan C-L, Fang T-Y, Sun K-H & Tang S-J (2011) Characterization of a novel GH10 thermostable, halophilic xylanase from the marine bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1. *Process Biochem* **46**: 1257-1263.
- Inagaki F, Takai K, Kobayashi H, Nealson KH & Horikoshi K (2003) *Sulfurimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing ϵ -proteobacterium isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1801-1805.
- Ishii K & Fukui M (2001) Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3753-3755.
- Janecky D & Seyfried Jr W (1984) Formation of massive sulfide deposits on oceanic ridge crests: Incremental reaction models for mixing between hydrothermal solutions and seawater. *Geochim Cosmochim Acta* **48**: 2723-2738.
- Jannasch HW & Wirsén CO (1979) Chemosynthetic primary production at East Pacific sea floor spreading centers. *Bioscience* **29**: 592-598.
- Jannasch HW, Nelson DC & Wirsén CO (1989) Massive natural occurrence of unusually large bacteria (*Beggiatoa* sp.) at a hydrothermal deep-sea vent site. *Nature* **342**: 834-836.

- Jannasch HW, Wirsén CO, Nelson DC & Robertson LA (1985) *Thiomicrospira crunogena* sp. nov., a colorless, sulfur-oxidizing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **35**: 422-424.
- Jarvis B, Wilrich C & Wilrich PT (2010) Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. *J Appl Microbiol* **109**: 1660-1667.
- Jennifer Lin T, Breves E, Dyar M, Ver Eecke H, Jamieson J & Holden J (2014) Magnetite formation from ferrihydrite by hyperthermophilic archaea from Endeavour Segment, Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent chimneys. *Geobiology* **12**: 200-211.
- Jiang L, Xu H, Shao Z & Long M (2014) *Defluviimonas indica* sp. nov., a marine bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent environment. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**: 2084-2088.
- Jones ML (1981) *Riftia pachyptila* Jones: observations on the vestimentiferan worm from the Galapagos Rift. *Science* **213**: 333-336.
- Jørgensen BB & Bak F (1991) Pathways and microbiology of thiosulfate transformations and sulfate reduction in a marine sediment (Kattegat, Denmark). *Appl Environ Microbiol* **57**: 847-856.
- Jukes TH & Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. *Mammalian protein metabolism* **3**: 132.
- Kaltin S, Haraldsson C & Anderson LG (2005) A rapid method for determination of total dissolved inorganic carbon in seawater with high accuracy and precision. *Mar Chem* **96**: 53-60.
- Karl DM, Taylor GT, Novitsky JA, Jannasch HW, Wirsén CO, Pace NR, Lane DJ, Olsen GJ & Giovannoni SJ (1988) A microbiological study of Guaymas Basin high temperature hydrothermal vents. *Deep Sea Research Part A Oceanographic Research Papers* **35**: 777-791.
- Kashefi K, Tor JM, Holmes DE, Van Praagh CVG, Reysenbach A-L & Lovley DR (2002) *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon capable of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe (III) serving as the sole electron acceptor. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 719-728.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S & Duran C (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**: 1647-1649.
- Kelley DS, Baross JA & Delaney JR (2002) Volcanoes, fluids, and life at mid-ocean ridge spreading centers. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* **30**: 385-491.
- Kelley DS, Karson JA, Früh-Green GL, Yoerger DR, Shank TM, Butterfield DA, Hayes JM, Schrenk MO, Olson EJ & Proskurowski G (2005) A serpentinite-hosted ecosystem: the Lost City hydrothermal field. *Science* **307**: 1428-1434.
- Kelly DP (1999) Thermodynamic aspects of energy conservation by chemolithotrophic sulfur bacteria in relation to the sulfur oxidation pathways. *Arch Microbiol* **171**: 219-229.
- Kim J, Lee I, Halbach P, Lee K-Y, Ko Y-T & Kim K-H (2006) Formation of hydrothermal vents in the North Fiji Basin: Sulfur and lead isotope constraints. *Chem Geol* **233**: 257-275.
- Klieve A (2008) Feeding to increase productivity and reduce greenhouse gas emissions.
- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M & Glöckner FO (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* **41**: e1-e1.
- Knittel K & Boetius A (2009) Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annual review of microbiology* **63**: 311-334.
- Knittel K, Kuever J, Meyerdierks A, Meinke R, Amann R & Brinkhoff T (2005) *Thiomicrospira arctica* sp. nov. and *Thiomicrospira psychrophila* sp. nov., psychrophilic,

obligately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacteria isolated from marine Arctic sediments. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 781-786.

Kolganova T, Kuznetsov B & Tourova T (2002) Designing and testing oligonucleotide primers for amplification and sequencing of archaeal 16S rRNA genes. *Microbiology* **71**: 243-246.

Kormas KA, Tivey MK, Von Damm K & Teske A (2006) Bacterial and archaeal phylotypes associated with distinct mineralogical layers of a white smoker spire from a deep-sea hydrothermal vent site (9 N, East Pacific Rise). *Environ Microbiol* **8**: 909-920.

Koski RA, Lonsdale PF, Shanks WC, Berndt ME & Howe SS (1985) Mineralogy and geochemistry of a sediment-hosted hydrothermal sulfide deposit from the Southern Trough of Guaymas Basin, Gulf of California. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth* **90**: 6695-6707.

Koski RA, Jonasson IR, Kadko DC, Smith VK & Wong FL (1994) Compositions, growth mechanisms, and temporal relations of hydrothermal sulfide-sulfate-silica chimneys at the northern Cleft segment, Juan de Fuca Ridge. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth* **99**: 4813-4832.

Kozhevnikova D, Taranov E, Lebedinsky A, Bonch-Osmolovskaya E & Sokolova T (2016) Hydrogenogenic and sulfidogenic growth of *Thermococcus* archaea on carbon monoxide and formate. *Microbiology* **85**: 400-410.

Krieg NR, Ludwig W, Euzéby J & Whitman WB (2010) Phylum XIV. Bacteroidetes phyl. nov. *Bergey's manual® of systematic bacteriology*, p. pp. 25-469. Springer.

Kuenen J & Veldkamp H (1972) *Thiomicrospira pelophila*, gen. n., sp. n., a new obligately chemolithotrophic colourless sulfur bacterium. *Antonie van Leeuwenhoek* **38**: 241-256.

Kuever J, Rainey FA & Widdel F (2005) Class IV. Deltaproteobacteria class nov. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, p. pp. 922-1144. Springer.

Kumar S, Stecher G & Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* msw054.

Kurr M, Huber R, König H, Jannasch HW, Fricke H, Trincone A, Kristjansson JK & Stetter KO (1991) *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110 C. *Arch Microbiol* **156**: 239-247.

L'Haridon S, Reysenbach A-L, Tindall B, Schönheit P, Banta A, Johnsen U, Schumann P, Gambacorta A, Stackebrandt E & Jeanthon C (2006) *Desulfurobacterium atlanticum* sp. nov., *Desulfurobacterium pacificum* sp. nov. and *Thermovibrio guaymasensis* sp. nov., three thermophilic members of the Desulfurobacteriaceae fam. nov., a deep branching lineage within the Bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 2843-2852.

Lahti L, Shetty S, Blake T & Salojärvi J (2017) Tools for microbiome analysis in R. Version 1.5. 28. p. pp.

Langmuir C, Charlou J-L, Colodner D, Costa I, Desbruyeres D, Desonie D, Emerson T, Fornari D, Fouquet Y & Humphris S (1993) Lucky strike-a newly discovered hydrothermal site on the Azores platform. *Ridge Events* **4**: 3-5.

Langmuir C, Humphris S, Fornari D, Van Dover C, Von Damm K, Tivey M, Colodner D, Charlou J-L, Desonie D & Wilson C (1997) Hydrothermal vents near a mantle hot spot: the Lucky Strike vent field at 37 N on the Mid-Atlantic Ridge. *Earth and Planetary Science Letters* **148**: 69-91.

LaRowe DE, Dale AW, Aguilera DR, L'Heureux I, Amend JP & Regnier P (2014) Modeling microbial reaction rates in a submarine hydrothermal vent chimney wall. *Geochim Cosmochim Acta* **124**: 72-97.

Le Guellec S (2015) Identification et caractérisation fonctionnelle de précurseurs de colonisation microbienne de sulfure massif hydrothermal. p. pp. Master « Sciences, Technologies, Santé » Mention Biologie et Santé, Université de Bretagne Occidentale.

- Lê S, Josse J & Husson F (2008) FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *Journal of statistical software* **25**: 1-18.
- Lee J, Shin N-R, Jung M-J, Roh SW, Kim M-S, Lee J-S, Lee KC, Kim Y-O & Bae J-W (2013) *Paenibacillus oceanisediminis* sp. nov. isolated from marine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**: 428-434.
- Legrand J, Sarradin P-M & Cannat M (2019) EMSO Azores Deep-sea Observatory: 9 years of operations. p.^pp.
- Lepage E, Marguet E, Geslin C, Matte-Tailliez O, Zillig W, Forterre P & Tailliez P (2004) Molecular diversity of new Thermococcales isolates from a single area of hydrothermal deep-sea vents as revealed by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting and 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1277-1286.
- Lesongeur F, Briand P, Godfroy A, Crassous P, Byrne N & Khripounoff A (2014) Export of deep-sea hydrothermal particles, indigenous thermophilic microorganisms and larvae to the surrounding Ocean. *Cah Biol Mar* **55**: 409-420.
- Li J, Zhou H, Fang J, Sun Y & Dasgupta S (2014) Microbial distribution in different spatial positions within the walls of a black sulfide hydrothermal chimney. *Marine Ecology Progress Series* **508**: 67-85.
- Li J, Cui J, Yang Q, Cui G, Wei B, Wu Z, Wang Y & Zhou H (2017) Oxidative Weathering and Microbial Diversity of an Inactive Seafloor Hydrothermal Sulfide Chimney. *Front Microbiol* **8**: 1378.
- Lilley MD, Feely RA & Trefry JH (1995) Chemical and biochemical transformations in hydrothermal plumes. *Seafloor hydrothermal systems: physical, chemical, biological, and geological interactions* **91**: 369-391.
- Lin T, Ver Eecke H, Breves E, Dyar M, Jamieson J, Hannington M, Dahle H, Bishop J, Lane M & Butterfield D (2016) Linkages between mineralogy, fluid chemistry, and microbial communities within hydrothermal chimneys from the Endeavour Segment, Juan de Fuca Ridge. *Geom Geophys Geosy* **17**: 300-323.
- Liu Y, Yu M & Zhang X-H (2018) *Bacillus alkalitolerans* sp. nov., isolated from marine sediment near a hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol*.
- López-García P, Duperron S, Philippot P, Foriel J, Susini J & Moreira D (2003) Bacterial diversity in hydrothermal sediment and epsilonproteobacterial dominance in experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *Environ Microbiol* **5**: 961-976.
- Love M, Anders S & Huber W (2014) Differential analysis of count data—the DESeq2 package. *Genome Biol* **15**: 10.1186.
- Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar, Buchner A, Lai T, Steppi S & Jobb G (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**: 1363-1371.
- Luef B, Frischkorn KR, Wrighton KC, Holman H-YN, Birarda G, Thomas BC, Singh A, Williams KH, Siegerist CE & Tringe SG (2015) Diverse uncultivated ultra-small bacterial cells in groundwater. *Nat Commun* **6**: 1-8.
- Luna GM, Dell'Anno A & Danovaro R (2006) DNA extraction procedure: a critical issue for bacterial diversity assessment in marine sediments. *Environ Microbiol* **8**: 308-320.
- Madigan MT, Clark DP, Stahl D & Martinko JM (2010) *Brock Biology of Microorganisms 13th edition*. Benjamin Cummings.
- Mahé F, Rognes T, Quince C, de Vargas C & Dunthorn M (2015) Swarm v2: highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ* **3**: e1420.
- Makita H, Tanaka E, Mitsunobu S, Miyazaki M, Nunoura T, Uematsu K, Takaki Y, Nishi S, Shimamura S & Takai K (2017) *Mariprofundus micogutta* sp. nov., a novel iron-oxidizing zetaproteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal field at the Bayonnaise knoll of

the Izu-Ogasawara arc, and a description of Mariprofundales ord. nov. and Zetaproteobacteria classis nov. *Arch Microbiol* **199**: 335-346.

Mangiapia M & Scott K (2016) From CO₂ to cell: energetic expense of creating biomass using the Calvin–Benson–Bassham and reductive citric acid cycles based on genome data. *FEMS Microbiol Lett* **363**: fnw054.

Marteinsson V, Birrien J-L, Jeanthon C & Prieur D (1996) Numerical taxonomic study of thermophilic *Bacillus* isolated from three geographically separated deep-sea hydrothermal vents. *FEMS Microbiol Ecol* **21**: 255-266.

Martin M (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal* **17**: 10-12.

Matabos M, Cuvelier D, Brouard J, Shillito B, Ravaux J, Zbinden M, Barthelemy D, Sarradin P-M & Sarrazin J (2015) Behavioural study of two hydrothermal crustacean decapods: *Mirocaris fortunata* and *Segonzacia mesatlantica*, from the Lucky Strike vent field (Mid-Atlantic Ridge). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **121**: 146-158.

McCliment EA, Voglesonger KM, O'Day PA, Dunn EE, Holloway JR & Cary SC (2006) Colonization of nascent, deep-sea hydrothermal vents by a novel Archaeal and Nanoarchaeal assemblage. *Environ Microbiol* **8**: 114-125.

McCollom TM (2000) Geochemical constraints on primary productivity in submarine hydrothermal vent plumes. *Deep Sea Res (I Oceanogr Res Pap)* **47**: 85-101.

McCollom TM (2007) Geochemical constraints on sources of metabolic energy for chemolithoautotrophy in ultramafic-hosted deep-sea hydrothermal systems. *Astrobiology* **7**: 933-950.

McCollom TM & Shock EL (1997) Geochemical constraints on chemolithoautotrophic metabolism by microorganisms in seafloor hydrothermal systems. *Geochim Cosmochim Acta* **61**: 4375-4391.

McKay LJ, MacGregor BJ, Biddle JF, Albert DB, Mendlovitz HP, Hoer DR, Lipp JS, Lloyd KG & Teske AP (2012) Spatial heterogeneity and underlying geochemistry of phylogenetically diverse orange and white Beggiatoa mats in Guaymas Basin hydrothermal sediments. *Deep Sea Res (I Oceanogr Res Pap)* **67**: 21-31.

McKnight DT, Huerlimann R, Bower DS, Schwarzkopf L, Alford RA & Zenger KR (2019) microDecon: A highly accurate read-subtraction tool for the post-sequencing removal of contamination in metabarcoding studies. *Environmental DNA* **1**: 14-25.

McMurdie PJ & Holmes S (2013) phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS one* **8**: e61217.

McMurdie PJ & Holmes S (2014) Waste not, want not: why rarefying microbiome data is inadmissible. *PLoS computational biology* **10**: e1003531.

Mehta MP & Baross JA (2006) Nitrogen fixation at 92 C by a hydrothermal vent archaeon. *Science* **314**: 1783-1786.

Mehta MP, Butterfield DA & Baross JA (2003) Phylogenetic diversity of nitrogenase (nifH) genes in deep-sea and hydrothermal vent environments of the Juan de Fuca Ridge. *Appl Environ Microbiol* **69**: 960-970.

Meier DV, Pjevac P, Bach W, Markert S, Schweder T, Jamieson J, Petersen S, Amann R & Meyerdierks A (2018) Microbial metal-sulfide oxidation in inactive hydrothermal vent chimneys suggested by metagenomic and metaproteomic analyses. *Environ Microbiol.*

Meng X, Li X, Chu F, Fu B, Lei J, Li Z, Wang H & Chen L (2018) Multi-stage growth and fluid evolution of a hydrothermal sulphide chimney in the East Pacific Ridge 1–2° S hydrothermal field: constraints from in situ sulphur isotopes. *Geological Magazine* 1-14.

Mino S, Maikita H, Toki T, Miyazaki J, Kato S, Watanabe H, Imachi H, Watsuji T-o, Nunoura T & Kojima S (2013) Biogeography of *Persephonella* in deep-sea hydrothermal vents of the Western Pacific. *Front Microbiol* **4**: 107.

- Miroshnichenko M, L'haridon S, Schumann P, Spring S, Bonch-Osmolovskaya E, Jeanthon C & Stackebrandt E (2004) *Caminibacter profundus* sp. nov., a novel thermophile of Nautiliales ord. nov. within the class 'Epsilonproteobacteria', isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 41-45.
- Miroshnichenko M, L'haridon S, Jeanthon C, Antipov A, Kostrikina N, Tindall B, Schumann P, Spring S, Stackebrandt E & Bonch-Osmolovskaya E (2003) *Oceanithermus profundus* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, microaerophilic, facultatively chemolithoheterotrophic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 747-752.
- Miroshnichenko M, L'haridon S, Necessian O, Antipov A, Kostrikina N, Tindall B, Schumann P, Spring S, Stackebrandt E & Bonch-Osmolovskaya E (2003) *Vulcanithermus mediatlanticus* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Thermaceae from a deep-sea hot vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1143-1148.
- Mohr PW & Krawiec S (1980) Temperature characteristics and Arrhenius plots for nominal psychrophiles, mesophiles and thermophiles. *Microbiology* **121**: 311-317.
- Mori JF, Scott JJ, Hager KW, Moyer CL, Küsel K & Emerson D (2017) Physiological and ecological implications of an iron-or hydrogen-oxidizing member of the Zetaproteobacteria, *Ghiorsea bivora*, gen. nov., sp. nov. *The ISME journal* **11**: 2624.
- Mori K, Maruyama A, Urabe T, Suzuki K-i & Hanada S (2008) *Archaeoglobus infectus* sp. nov., a novel thermophilic, chemolithoheterotrophic archaeon isolated from a deep-sea rock collected at Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, western Pacific Ocean. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 810-816.
- Mori K, Kakegawa T, Higashi Y, Nakamura K-i, Maruyama A & Hanada S (2004) *Oceanithermus desulfurans* sp. nov., a novel thermophilic, sulfur-reducing bacterium isolated from a sulfide chimney in Suiyo Seamount. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1561-1566.
- Mori K, Suzuki K-i, Urabe T, Sugihara M, Tanaka K, Hamada M & Hanada S (2011) *Thiopfundum hispidum* sp. nov., an obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing gammaproteobacterium isolated from the hydrothermal field on Suiyo Seamount, and proposal of Thioalkalspiraceae fam. nov. in the order Chromatiales. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 2412-2418.
- Nagata R, Takaki Y, Tame A, Nunoura T, Muto H, Mino S, Sawayama S, Takai K & Nakagawa S (2017) *Lebetimonas natsushimae* sp. nov., a novel strictly anaerobic, moderately thermophilic chemoautotroph isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete nest in the Mid-Okinawa Trough. *Syst Appl Microbiol* **40**: 352-356.
- Nakagawa S & Takai K (2008) Deep-sea vent chemoautotrophs: diversity, biochemistry and ecological significance. *FEMS Microbiol Ecol* **65**: 1-14.
- Nakagawa S, Takai K, Horikoshi K & Sako Y (2003) *Persephonella hydrogeniphila* sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 863-869.
- Nakagawa S, Takai K, Horikoshi K & Sako Y (2004) *Aeropyrum camini* sp. nov., a strictly aerobic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 329-335.
- Nakagawa S, Takai K, Inagaki F, Horikoshi K & Sako Y (2005) *Nitratiruptor tergarcus* gen. nov., sp. nov. and *Nitratifactor salsuginis* gen. nov., sp. nov., nitrate-reducing chemolithoautotrophs of the ϵ -Proteobacteria isolated from a deep-sea hydrothermal system in the Mid-Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 925-933.
- Nakagawa S, Takai K, Inagaki F, Hirayama H, Nunoura T, Horikoshi K & Sako Y (2005) Distribution, phylogenetic diversity and physiological characteristics of epsilon-Proteobacteria in a deep-sea hydrothermal field. *Environ Microbiol* **7**: 1619-1632.
- Nakagawa S, Takai K, Inagaki F, Chiba H, Ishibashi J-i, Kataoka S, Hirayama H, Nunoura T, Horikoshi K & Sako Y (2005) Variability in microbial community and venting chemistry in a

sediment-hosted backarc hydrothermal system: impacts of seafloor phase-separation. *FEMS Microbiol Ecol* **54**: 141-155.

Nelson WC & Stegen JC (2015) The reduced genomes of Parcubacteria (OD1) contain signatures of a symbiotic lifestyle. *Front Microbiol* **6**: 713.

Nercessian O, Reysenbach AL, Prieur D & Jeanthon C (2003) Archaeal diversity associated with in situ samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise (13 N). *Environ Microbiol* **5**: 492-502.

Nercessian O, Biennu N, Moreira D, Prieur D & Jeanthon C (2005) Diversity of functional genes of methanogens, methanotrophs and sulfate reducers in deep-sea hydrothermal environments. *Environ Microbiol* **7**: 118-132.

Nevot M, Deroncelle V, Montes MJ & Mercade E (2008) Effect of incubation temperature on growth parameters of *Pseudoalteromonas antarctica* NF3 and its production of extracellular polymeric substances. *J Appl Microbiol* **105**: 255-263.

Oger PM & Jebbar M (2010) The many ways of coping with pressure. *Research in microbiology* **161**: 799-809.

Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'hara R, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH & Wagner H (2013) Package 'vegan'. *Community ecology package, version 2*: 1-295.

Olins H, Rogers D, Frank K, Vidoudez C & Girguis P (2013) Assessing the influence of physical, geochemical and biological factors on anaerobic microbial primary productivity within hydrothermal vent chimneys. *Geobiology* **11**: 279-293.

Olins HC, Rogers DR, Preston C, Ussler III W, Pargett D, Jensen S, Roman B, Birch JM, Scholin CA & Haroon MF (2017) Co-registered geochemistry and metatranscriptomics reveal unexpected distributions of microbial activity within a hydrothermal vent field. *Front Microbiol* **8**: 1042.

Ondréas H, Cannat M, Fouquet Y, Normand A, Sarradin P-M & Sarrazin J (2009) Recent volcanic events and the distribution of hydrothermal venting at the Lucky Strike hydrothermal field, Mid-Atlantic Ridge. *Geom Geophys Geosy* **10**.

Ovreås L, Forney L, Daae FL & Torsvik V (1997) Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3367-3373.

Pagé A, Tivey MK, Stakes DS & Reysenbach AL (2008) Temporal and spatial archaeal colonization of hydrothermal vent deposits. *Environ Microbiol* **10**: 874-884.

Parada AE, Needham DM & Fuhrman JA (2016) Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ Microbiol* **18**: 1403-1414.

Parkes RJ, Cragg B, Roussel E, Webster G, Weightman A & Sass H (2014) A review of prokaryotic populations and processes in sub-seafloor sediments, including biosphere: geosphere interactions. *Marine Geology* **352**: 409-425.

Parkes RJ, Sass H, Webster G, Watkins AJ, Weightman AJ, O'Sullivan LA & Cragg BA (2010) Methods for studying methanogens and methanogenesis in marine sediments. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, p. 3799-3826. Springer.

Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P & Tyson GW (2015) CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res* **25**: 1043-1055.

Parks DH, Chuvochina M, Waite DW, Rinke C, Skarszewski A, Chaumeil P-A & Hugenholtz P (2018) A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nat Biotechnol* **36**: 996-1004.

- Perner M, Petersen JM, Zielinski F, Gennerich H-H & Seifert R (2010) Geochemical constraints on the diversity and activity of H₂-oxidizing microorganisms in diffuse hydrothermal fluids from a basalt-and an ultramafic-hosted vent. *FEMS Microbiol Ecol* **74**: 55-71.
- Perner M, Hentscher M, Rychlik N, Seifert R, Strauss H & Bach W (2011) Driving forces behind the biotope structures in two low-temperature hydrothermal venting sites on the southern Mid-Atlantic Ridge. *Environmental microbiology reports* **3**: 727-737.
- Perner M, Hansen M, Seifert R, Strauss H, Koschinsky A & Petersen S (2013) Linking geology, fluid chemistry, and microbial activity of basalt-and ultramafic-hosted deep-sea hydrothermal vent environments. *Geobiology* **11**: 340-355.
- Perner M, Kuever J, Seifert R, Pape T, Koschinsky A, Schmidt K, Strauss H & Imhoff JF (2007) The influence of ultramafic rocks on microbial communities at the Logatchev hydrothermal field, located 15 N on the Mid-Atlantic Ridge. *FEMS Microbiol Ecol* **61**: 97-109.
- Perner M, Seifert R, Weber S, Koschinsky A, Schmidt K, Strauss H, Peters M, Haase K & Imhoff JF (2007) Microbial CO₂ fixation and sulfur cycling associated with low-temperature emissions at the Lilliput hydrothermal field, southern Mid-Atlantic Ridge (9° S). *Environ Microbiol* **9**: 1186-1201.
- Peter JM & Scott SD (1988) Mineralogy, composition, and fluid-inclusion microthermometry of seafloor hydrothermal deposits in the southern trough of Guaymas Basin, Gulf of California. *Canadian Mineralogist* **26**: 567-587.
- Petersen JM, Ramette A, Lott C, Cambon-Bonavita MA, Zbinden M & Dutilleul N (2010) Dual symbiosis of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* with filamentous gamma-and epsilonproteobacteria at four Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Environ Microbiol* **12**: 2204-2218.
- Phipps BM, Typke D, Hegerl R, Volker S, Hoffmann A, Stetter KO & Baumeister W (1993) Structure of a molecular chaperone from a thermophilic archaeobacterium. *Nature* **361**: 475-477.
- Picard A & Daniel I (2013) Pressure as an environmental parameter for microbial life—a review. *Biophysical chemistry* **183**: 30-41.
- Pillot G, Frouin E, Pasero E, Godfroy A, Combet-Blanc Y, Davidson S & Liebgott P-P (2018) Specific enrichment of hyperthermophilic electroactive Archaea from deep-sea hydrothermal vent on electrically conductive support. *Bioresour Technol* **259**: 304-311.
- Pimenov N, Lein AY, Sagalevich A & Ivanov M (2000) Carbon dioxide assimilation and methane oxidation in various zones of the rainbow hydrothermal field. *Microbiology* **69**: 689-697.
- Pley U, Schipka J, Gambacorta A, Jannasch HW, Fricke H, Rachel R & Stetter KO (1991) *Pyrodictium abyssi* sp. nov. represents a novel heterotrophic marine archaeal hyperthermophile growing at 110 C. *Syst Appl Microbiol* **14**: 245-253.
- Pollock J, Glendinning L, Wisedchanwet T & Watson M (2018) The madness of microbiome: attempting to find consensus “best practice” for 16S microbiome studies. *Appl Environ Microbiol* **84**: e02627-02617.
- Postec A, Pignet P, Cuffe-Gauchard V, Schmitt A, Querellou J & Godfroy A (2005) Optimisation of growth conditions for continuous culture of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus hydrothermalis* and development of sulphur-free defined and minimal media. *Research in microbiology* **156**: 82-87.
- Postec A, Lesongeur F, Pignet P, Ollivier B, Querellou J & Godfroy A (2007) Continuous enrichment cultures: insights into prokaryotic diversity and metabolic interactions in deep-sea vent chimneys. *Extremophiles* **11**: 747-757.

- Qin W, Martens-Habbena W, Kobelt JN & Stahl DA (2015) Candidatus Nitrosopumilaceae. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* 1-2.
- Qin W, Heal KR, Ramdasi R, Kobelt JN, Martens-Habbena W, Bertagnolli AD, Amin SA, Walker CB, Urakawa H & Könneke M (2017) Nitrosopumilus maritimus gen. nov., sp. nov., Nitrosopumilus cobalaminigenes sp. nov., Nitrosopumilus oxyclinae sp. nov., and Nitrosopumilus ureiphilus sp. nov., four marine ammonia-oxidizing archaea of the phylum Thaumarchaeota. *Int J Syst Evol Microbiol* **67**: 5067-5079.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J & Glöckner FO (2012) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* gks1219.
- Ramírez GA, Graham D & D'Hondt S (2018) Influence of commercial DNA extraction kit choice on prokaryotic community metrics in marine sediment. *Limnology and Oceanography: Methods*.
- Ramírez GA, Jørgensen SL, Zhao R & D'Hondt S (2018) Minimal influence of extracellular DNA on molecular surveys of marine sedimentary communities.
- Raven N, Ladwa N, Cossar D & Sharp R (1992) Continuous culture of the hyperthermophilic archaeum Pyrococcus furiosus. *Applied microbiology and biotechnology* **38**: 263-267.
- Ray D, Banerjee R, Mazumder A, Paropkari AL, Mukhopadhyay S & Balakrishnan S (2018) Mineralogical and geochemical variation in hydrothermal sulfides from Vienna Woods field, Manus Basin, Papua New Guinea: constraints on their evolution. *Acta Oceanologica Sinica* **37**: 22-33.
- Reichert J, McNeight S & Rudel H (1939) Determination of hydrogen peroxide and some related peroxygen compounds. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition* **11**: 194-197.
- Reysenbach A-L & Shock E (2002) Merging genomes with geochemistry in hydrothermal ecosystems. *Science* **296**: 1077-1082.
- Reysenbach A-L, Longnecker K & Kirshtein J (2000) Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3798-3806.
- Reysenbach A-L, Gotz D, Banta A, Jeanthon C & Fouquet Y (2002) Expanding the distribution of the Aquificales to the deep-sea vents on Mid-Atlantic Ridge and Central Indian Ridge. *Cah Biol Mar* **43**: 425-428.
- Reysenbach A-L, Huber R, Stetter KO, Davey ME, MacGregor BJ & Stahl DA (2001) Phylum BII. Thermotogae ph. nov. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, p. 369-387. Springer.
- Reysenbach A-L, Huber R, Stetter KO, Ishii M, Kawasumi T, Igarashi Y, Eder W, L'Haridon S & Jeanthon C (2001) Phylum BI. Aquificae ph. nov. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, p. 359-367. Springer.
- Reysenbach A-L, Liu Y, Banta AB, Beveridge TJ, Kirshtein JD, Schouten S, Tivey MK, Von Damm KL & Voytek MA (2006) A ubiquitous thermoacidophilic archaeon from deep-sea hydrothermal vents. *Nature* **442**: 444-447.
- Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, Ivanova NN, Anderson IJ, Cheng J-F, Darling A, Malfatti S, Swan BK & Gies EA (2013) Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* **499**: 431.
- Rinke C, Rubino F, Messer LF, Youssef N, Parks DH, Chuvochina M, Brown M, Jeffries T, Tyson GW & Seymour JR (2019) A phylogenomic and ecological analysis of the globally abundant Marine Group II archaea (Ca. Poseidoniales ord. nov.). *The ISME journal* **13**: 663-675.

- Robador A, Brüchert V & Jørgensen BB (2009) The impact of temperature change on the activity and community composition of sulfate-reducing bacteria in arctic versus temperate marine sediments. *Environ Microbiol* **11**: 1692-1703.
- Robador A, Müller AL, Sawicka JE, Berry D, Hubert CR, Loy A, Jørgensen BB & Brüchert V (2016) Activity and community structures of sulfate-reducing microorganisms in polar, temperate and tropical marine sediments. *The ISME journal* **10**: 796.
- Romanenko LA, Tanaka N, Svetashev VI & Kalinovskaya NI (2013) *Paenibacillus profundus* sp. nov., a deep sediment bacterium that produces isocoumarin and peptide antibiotics. *Arch Microbiol* **195**: 247-254.
- Rommevaux C, Henri P, Degboe J, Chavagnac V, Lesongeur F, Godfroy A, Boulart C, Destrigneville C & Castillo A (2019) Prokaryote Communities at Active Chimney and In Situ Colonization Devices After a Magmatic Degassing Event (37 degrees N MAR, EMSO-Azores Deep-Sea Observatory). *Geochemistry Geophysics Geosystems* **20**: 3065-3089.
- Rommevaux C, Henri P, Degboe J, Chavagnac V, Lesongeur F, Godfroy A, Boulart C, Destrigneville C & Castillo A (2019) Prokaryote communities at active chimney and in situ colonization devices after a magmatic degassing event (37 N MAR, EMSO-Azores Deep-Sea Observatory). *Geom Geophy Geosy* **20**: 3065-3089.
- Rona P, Thompson G, Mottl M, Karson J, Jenkins W, Graham D, Mallette M, Von Damm K & Edmond J (1984) Hydrothermal activity at the Trans-Atlantic Geotraverse hydrothermal field, Mid-Atlantic Ridge crest at 26° N. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth* **89**: 11365-11377.
- Roussel E, Leroy EM, Aubé J, *et al.* (2018) First insights into continuous enrichment cultures of hyperthermophilic microorganisms potentially affiliated with the DPANN superphylum. p.^pp. Plouzané, France.
- Roussel EG, Konn C, Charlou J-L, Donval J-P, Fouquet Y, Querellou J, Prieur D & Bonavita M-AC (2011) Comparison of microbial communities associated with three Atlantic ultramafic hydrothermal systems. *FEMS Microbiol Ecol* **77**: 647-665.
- Roussel EG, Cragg BA, Webster G, Sass H, Tang X, Williams AS, Gorra R, Weightman AJ & Parkes RJ (2015) Complex coupled metabolic and prokaryotic community responses to increasing temperatures in anaerobic marine sediments: critical temperatures and substrate changes. *FEMS Microbiol Ecol* **91**: fiv084.
- Ruby E, Wirsén C & Jannasch H (1981) Chemolithotrophic sulfur-oxidizing bacteria from the Galapagos Rift hydrothermal vents. *Appl Environ Microbiol* **42**: 317-324.
- Russ L, Kartal B, Op Den Camp HJ, Sollai M, Le Bruchec J, Caprais J-C, Godfroy A, Sinninghe Damsté JS & Jetten MS (2013) Presence and diversity of anammox bacteria in cold hydrocarbon-rich seeps and hydrothermal vent sediments of the Guaymas Basin. *Front Microbiol* **4**: 219.
- Sako Y, Nomura N, Uchida A, Ishida Y, Morii H, Koga Y, Hoaki T & Maruyama T (1996) *Aeropyrum pernix* gen. nov., sp. nov., a novel aerobic hyperthermophilic archaeon growing at temperatures up to 100 C. *Int J Syst Evol Microbiol* **46**: 1070-1077.
- Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, Turner P, Parkhill J, Loman NJ & Walker AW (2014) Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC biology* **12**: 87.
- Santoro AE, Richter RA & Dupont CL (2019) Planktonic marine archaea. *Annu Rev Mar Sci* **11**: 131-158.
- Sarradin P-M & Cannat M (2015) MOMARSAT2015 cruise (Lucky Strike). Cruise Report. 8-29 Aug 2015. N/O Pourquoi pas?–Victor 6000. doi 10.17600/15000200.
- Sarradin P-M, Sarrazin J, Allais A, Almeida D, Brandou V, Boetius A, Buffier E, Coiras E, Colaço A & Cormack A (2007) EXtreme ecosystem studies in the deep OCEan: Technological Developments. p.^pp. 1-5. IEEE.

Sarradin PM & Cannat M (2014) MOMARSAT2014 (Lucky Strike). Cruise Report. 13 Aug - 31 July 2014. N/O Pourquoi pas ?–Victor 6000. doi 10.17600/14000300.

Sarradin PM & Cannat M (2017) MOMARSAT2017 cruise (Lucky Strike). Cruise Report. 8-28 July 2017. N/O Pourquoi pas ?–Victor 6000. doi 10.17600/17000500.

Sarradin PM & Legrand J (2019) MOMARSAT2019 cruise (Lucky Strike). Cruise Report. 11 June - 3 July 2019. N/O Pourquoi pas ? Nautil. doi 10.17600/18001110.

Sarradin PM, Blandin J & Escartin J (2010) MOMARSAT2010 cruise (Lucky Strike). Cruise Report. 2-16 Sept 2010. N/O Pourquoi pas ?–Victor 6000. doi 10.17600/10030100.

Sarrazin J, Sarradin P-M, Allais A-G & Participants MC (2006) MoMARETO: a cruise dedicated to the spatio-temporal dynamics and the adaptations of hydrothermal vent fauna on the Mid-Atlantic Ridge. *InterRidge News* **15**: 24-33.

Sarrazin J, Blandin J, Delauney L, Dentrecolas S, Dorval P, Dupont J, Legrand J, Leroux D, Leon P & Leveque J (2007) TEMPO: a new ecological module for studying deep-sea community dynamics at hydrothermal vents. p.^pp. 1-4. Ieee.

Schliep KP (2011) phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics* **27**: 592-593.

Schloss PD, Gevers D & Westcott SL (2011) Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PLoS one* **6**: e27310.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH & Robinson CJ (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **75**: 7537-7541.

Schrenk MO, Kelley DS, Delaney JR & Baross JA (2003) Incidence and diversity of microorganisms within the walls of an active deep-sea sulfide chimney. *Appl Environ Microbiol* **69**: 3580-3592.

Schulz F, Eloë-Fadrosh EA, Bowers RM, Jarett J, Nielsen T, Ivanova NN, Kyrpides NC & Woyke T (2017) Towards a balanced view of the bacterial tree of life. *Microbiome* **5**: 140.

Schut GJ, Lipscomb GL, Han Y, Notey JS, Kelly RM & Adams MM (2014) The order thermococcales and the family thermococcaceae. *The Prokaryotes*, p.^pp. 363-383. Springer.

Shannon CE (1997) The mathematical theory of communication. 1963. *MD computing: computers in medical practice* **14**: 306-317.

Sievert SM, Hügler M, Taylor CD & Wirsén CO (2008) Sulfur oxidation at deep-sea hydrothermal vents. *Microbial Sulfur Metabolism*, p.^pp. 238-258. Springer.

Simon M & Azam F (1989) Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Marine ecology progress series Oldendorf* **51**: 201-213.

Simonato F, Campanaro S, Lauro FM, Vezzi A, D'Angelo M, Vitulo N, Valle G & Bartlett DH (2006) Piezophilic adaptation: a genomic point of view. *J Biotechnol* **126**: 11-25.

Simpson EH (1949) Measurement of diversity. *nature* **163**: 688-688.

Singh SC, Crawford WC, Carton H, Seher T, Combier V, Cannat M, Canales JP, Düsünür D, Escartin J & Miranda JM (2006) Discovery of a magma chamber and faults beneath a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal field. *Nature* **442**: 1029-1032.

Sislač CD (2013) Novel Thermophilic Bacteria Isolated from Marine Hydrothermal Vents.

Slobodkin A, Campbell B, Cary SC, Bonch-Osmolovskaya E & Jeanthon C (2001) Evidence for the presence of thermophilic Fe (III)-reducing microorganisms in deep-sea hydrothermal vents at 13 N (East Pacific Rise). *FEMS Microbiol Ecol* **36**: 235-243.

Slobodkina G, Kolganova T, Querellou J, Bonch-Osmolovskaya E & Slobodkin AI (2009) *Geoglobus acetivorans* sp. nov., an iron (III)-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 2880-2883.

Sokolova T, Gonzalez J, Kostrikina N, Chernyh N, Tourova T, Kato C, Bonch-Osmolovskaya E & Robb F (2001) *Carboxydobrachium pacificum* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic,

thermophilic, CO-utilizing marine bacterium from Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 141-149.

Sokolova TG, Jeanthon C, Kostrikina NA, Chernyh NA, Lebedinsky AV, Stackebrandt E & Bonch-Osmolovskaya EA (2004) The first evidence of anaerobic CO oxidation coupled with H₂ production by a hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Extremophiles* **8**: 317-323.

Sorokin DY, Tourova TP, Spiridonova EM, Rainey FA & Muyzer G (2005) *Thioclava pacifica* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively autotrophic, marine, sulfur-oxidizing bacterium from a near-shore sulfidic hydrothermal area. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 1069-1075.

Sorokin DY, Tourova TP, Kolganova TV, Spiridonova EM, Berg IA & Muyzer G (2006) *Thiomicrospira halophila* sp. nov., a moderately halophilic, obligately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium from hypersaline lakes. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 2375-2380.

Spang A, Caceres EF & Ettema TJ (2017) Genomic exploration of the diversity, ecology, and evolution of the archaeal domain of life. *Science* **357**: eaaf3883.

Srinivasan V, Morowitz HJ & Huber H (2012) What is an autotroph? *Arch Microbiol* **194**: 135-140.

Stahl DA (1991) Development and application of nucleic acid probes. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*.

Steen IH, Dahle H, Stokke R, Roalkvam I, Daae F-L, Rapp HT, Pedersen RB & Thorseth IH (2016) Novel barite chimneys at the Loki's castle vent field shed light on key factors shaping microbial communities and functions in hydrothermal systems. *Front Microbiol* **6**: 1510.

Stein CA & Stein S (1994) Constraints on hydrothermal heat flux through the oceanic lithosphere from global heat flow. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth* **99**: 3081-3095.

Stetter KO (1988) *Archaeoglobus fulgidus* gen. nov., sp. nov.: a new taxon of extremely thermophilic archaebacteria. *Syst Appl Microbiol* **10**: 172-173.

Stetter KO (1999) Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS letters* **452**: 22-25.

Sylvan JB, Pyenson BC, Rouxel O, German CR & Edwards KJ (2012) Time-series analysis of two hydrothermal plumes at 9° 50' N East Pacific Rise reveals distinct, heterogeneous bacterial populations. *Geobiology* **10**: 178-192.

Takahashi S, Tomita J, Nishioka K, Hisada T & Nishijima M (2014) Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of bacteria and archaea using next-generation sequencing. *PloS one* **9**: e105592.

Takai K & Horikoshi K (1999) Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics* **152**: 1285-1297.

Takai K & Horikoshi K (2000) Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5066-5072.

Takai K & Nakamura K (2011) Archaeal diversity and community development in deep-sea hydrothermal vents. *Curr Opin Microbiol* **14**: 282-291.

Takai K, Inoue A & Horikoshi K (2002) *Methanothermococcus okinawensis* sp. nov., a thermophilic, methane-producing archaeon isolated from a Western Pacific deep-sea hydrothermal vent system. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1089-1095.

Takai K, Sugai A, Itoh T & Horikoshi K (2000) *Palaeococcus ferrophilus* gen. nov., sp. nov., a barophilic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 489-500.

Takai K, Komatsu T, Inagaki F & Horikoshi K (2001) Distribution of archaea in a black smoker chimney structure. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3618-3629.

Takai K, Hirayama H, Nakagawa T, Suzuki Y, Nealson KH & Horikoshi K (2004) *Thiomicrospira thermophila* sp. nov., a novel microaerobic, thermotolerant, sulfur-oxidizing chemolithomixotroph isolated from a deep-sea hydrothermal fumarole in the TOTO caldera, Mariana Arc, Western Pacific. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 2325-2333.

Takai K, Miyazaki M, Hirayama H, Nakagawa S, Querellou J & Godfroy A (2009) Isolation and physiological characterization of two novel, piezophilic, thermophilic chemolithoautotrophs from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Environ Microbiol* **11**: 1983-1997.

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

Takai K, Inagaki F, Nakagawa S, Hirayama H, Nunoura T, Sako Y, Nealson KH & Horikoshi K (2003) Isolation and phylogenetic diversity of members of previously uncultivated ϵ -Proteobacteria in deep-sea hydrothermal fields. *FEMS Microbiol Lett* **218**: 167-174.

Takai K, Oida H, Suzuki Y, Hirayama H, Nakagawa S, Nunoura T, Inagaki F, Nealson KH & Horikoshi K (2004) Spatial distribution of marine crenarchaeota group I in the vicinity of deep-sea hydrothermal systems. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2404-2413.

Takai K, Nunoura T, Ishibashi Ji, Lupton J, Suzuki R, Hamasaki H, Ueno Y, Kawagucci S, Gamo T & Suzuki Y (2008) Variability in the microbial communities and hydrothermal fluid chemistry at the newly discovered Mariner hydrothermal field, southern Lau Basin. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* **113**.

Tanner MA, Goebel BM, Dojka MA & Pace NR (1998) Specific ribosomal DNA sequences from diverse environmental settings correlate with experimental contaminants. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3110-3113.

Tarpgaard IH, Boetius A & Finster K (2006) *Desulfobacter psychrotolerans* sp. nov., a new psychrotolerant sulfate-reducing bacterium and descriptions of its physiological response to temperature changes. *Antonie Van Leeuwenhoek* **89**: 109-124.

Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Lomsadze A, Pruitt KD, Borodovsky M & Ostell J (2016) NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res* **44**: 6614-6624.

Team R (2013) R: A language and environment for statistical computing. p.^pp. Vienna, Austria.

Team R (2015) RStudio: integrated development for R. *RStudio, Inc, Boston, MA*.

Teske A & Sørensen KB (2008) Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? *The ISME journal* **2**: 3-18.

Teske A, Hinrichs K-U, Edgcomb V, de Vera Gomez A, Kysela D, Sylva SP, Sogin ML & Jannasch HW (2002) Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1994-2007.

Thauer RK, Jungermann K & Decker K (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev* **41**: 100.

Thompson G, Humphris SE, Schroeder B, Sulanowska M & Rona PA (1988) Active vents and massive sulfides at 26 degrees N (TAG) and 23 degrees N (Snakepit) on the Mid-Atlantic Ridge. *The Canadian Mineralogist* **26**: 697-711.

Thrash JC & Coates JD (2010) Phylum XVII. Acidobacteria phyl. nov. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, p.^pp. 725-735. Springer.

Tivey MK (2007) Generation of seafloor hydrothermal vent fluids and associated mineral deposits. *Oceanography*.

- Topçuoğlu BD, Stewart LC, Morrison HG, Butterfield DA, Huber JA & Holden JF (2016) Hydrogen limitation and syntrophic growth among natural assemblages of thermophilic methanogens at deep-sea hydrothermal vents. *Front Microbiol* **7**.
- Torti A, Jørgensen BB & Lever MA (2018) Preservation of microbial DNA in marine sediments: Insights from extracellular DNA pools. *Environ Microbiol*.
- Trembath-Reichert E, Butterfield DA & Huber JA (2019) Active seafloor microbial communities from Mariana back-arc venting fluids share metabolic strategies across different thermal niches and taxa. *The ISME journal* **1**.
- Turner JS & Campbell IH (1987) A laboratory and theoretical study of the growth of “black smoker” chimneys. *Earth and Planetary Science Letters* **82**: 36-48.
- Van Dover C, Fry B, Grassle J, Humphris S & Rona P (1988) Feeding biology of the shrimp *Rimicaris exoculata* at hydrothermal vents on the Mid-Atlantic Ridge. *Marine Biology* **98**: 209-216.
- Vigneron A, L'Haridon S, Godfroy A, Roussel EG, Cragg BA, Parkes RJ & Toffin L (2015) Evidence of active methanogen communities in shallow sediments of the sonora margin cold seeps. *Appl Environ Microbiol* AEM. 00147-00115.
- Von Damm K (1990) Seafloor hydrothermal activity: black smoker chemistry and chimneys. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* **18**: 173.
- Voordeckers JW, Do MH, Hügler M, Ko V, Sievert SM & Vetriani C (2008) Culture dependent and independent analyses of 16S rRNA and ATP citrate lyase genes: a comparison of microbial communities from different black smoker chimneys on the Mid-Atlantic Ridge. *Extremophiles* **12**: 627-640.
- Vuillemin R, Le Roux D, Dorval P, Bucas K, Sudreau J, Hamon M, Le Gall C & Sarradin P (2009) CHEMINI: A new in situ CHEMical MINIaturized analyzer. *Deep Sea Res (I Oceanogr Res Pap)* **56**: 1391-1399.
- Waite D, Vanwonterghem I, Rinke C, *et al.* (2017) Comparative genomic analysis of the class Epsilonproteobacteria and proposed reclassification to Epsilonbacteraeota (phyl. nov.). *Front Microbiol* **8**.
- Walters W, Hyde ER, Berg-Lyons D, Ackermann G, Humphrey G, Parada A, Gilbert JA, Jansson JK, Caporaso JG & Fuhrman JA (2016) Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. *Msystems* **1**: e00009-00015.
- Wang S, Xiao X, Jiang L, Peng X, Zhou H, Meng J & Wang F (2009) Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea in hydrothermal vent chimneys of the Juan de Fuca Ridge. *Appl Environ Microbiol* **75**: 4216-4220.
- Watsuji T-o, Hada E, Miyazaki M, Ichimura M & Takai K (2016) *Thiomicrospira hydrogeniphila* sp. nov., an aerobic, hydrogen-and sulfur-oxidizing chemolithoautotroph isolated from a seawater tank containing a block of beef tallow. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**: 3688-3693.
- Webster G, Newberry CJ, Fry JC & Weightman AJ (2003) Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale. *Journal of Microbiological Methods* **55**: 155-164.
- Wegener G, Krukenberg V, Riedel D, Tegetmeyer HE & Boetius A (2015) Intercellular wiring enables electron transfer between methanotrophic archaea and bacteria. *Nature* **526**: 587.
- Weisburg WG, Giovannoni SJ & Woese CR (1989) The Deinococcus-Thermus phylum and the effect of rRNA composition on phylogenetic tree construction. *Syst Appl Microbiol* **11**: 128-134.
- Weiss RF (1970) The solubility of nitrogen, oxygen and argon in water and seawater. Vol. 17 p. pp. 721-735. Elsevier.

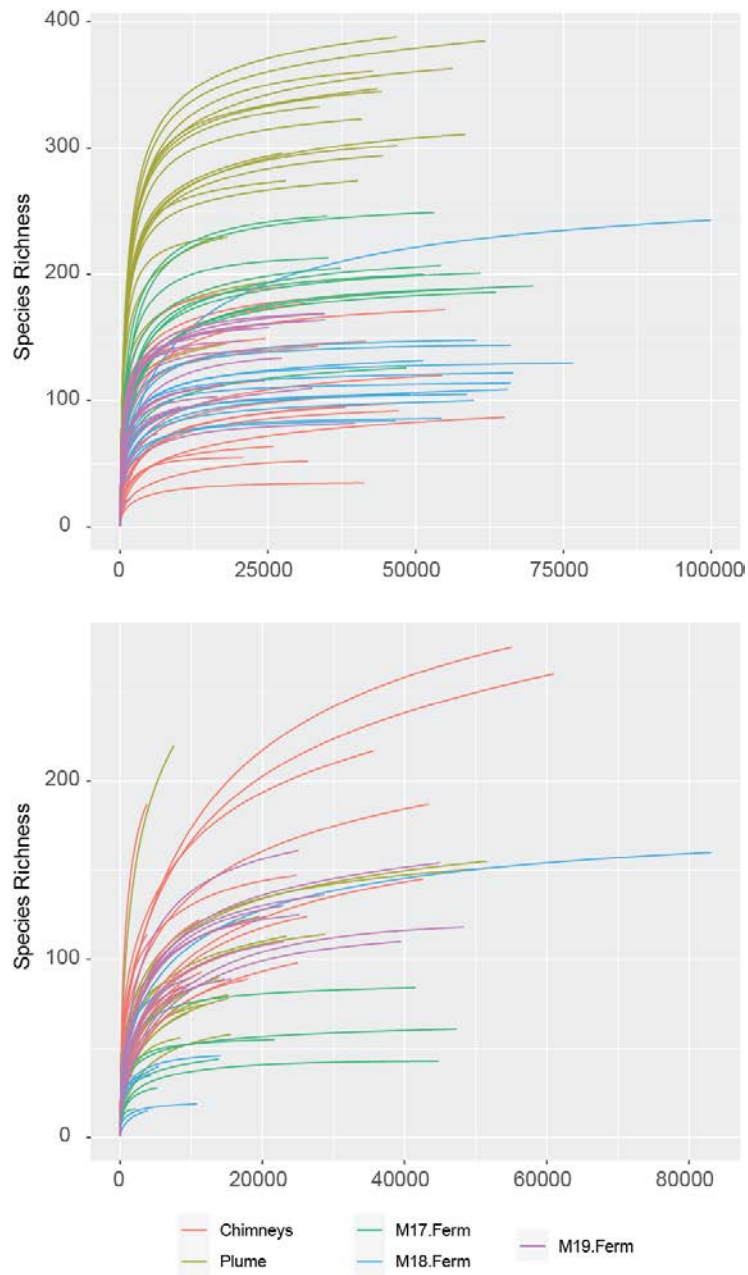
- Weiss SJ, Xu Z, Amir A, Peddada S, Bittinger K, Gonzalez A, Lozupone C, Zaneveld JR, Vazquez-Baeza Y & Birmingham A (2015) Effects of library size variance, sparsity, and compositionality on the analysis of microbiome data. *PeerJ PrePrints*.
- Wery N, Lesongeur F, Pignet P, Derennes V, Cambon-Bonavita M-A, Godfroy A & Barbier G (2001) *Marinitoga camini* gen. nov., sp. nov., a rod-shaped bacterium belonging to the order Thermotogales, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 495-504.
- Westcott SL & Schloss PD (2017) OptiClust, an improved method for assigning amplicon-based sequence data to operational taxonomic units. *mSphere* **2**: e00073-00017.
- Whitman WB, Oren A, Chuvochina M, da Costa MS, Garrity GM, Rainey FA, Rossello-Mora R, Schink B, Sutcliffe I & Trujillo ME (2018) Proposal of the suffix -ota to denote phyla. Addendum to 'Proposal to include the rank of phylum in the International Code of Nomenclature of Prokaryotes'. *Int J Syst Evol Microbiol* **68**: 967-969.
- Widdel F & Pfennig N (1982) Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov., sp. nov. *Arch Microbiol* **131**: 360-365.
- Widdel F & Bak F (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. *The prokaryotes*, p. 3352-3378. Springer.
- Wiegel J (1990) Temperature spans for growth: hypothesis and discussion. *FEMS Microbiol Rev* **6**: 155-169.
- Wiegel J & Michael AW (1998) *Thermophiles: The Keys to the Molecular Evolution and the Origin of Life?* CRC Press.
- Wiegel J, Ljungdahl L & Rawson J (1979) Isolation from soil and properties of the extreme thermophile *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *J Bacteriol* **139**: 800-810.
- Williams AB & Rona PA (1986) Two new caridean shrimps (Bresiliidae) from a hydrothermal field on the Mid-Atlantic Ridge. *Journal of Crustacean Biology* 446-462.
- Wirth R (2017) Colonization of black smokers by hyperthermophilic microorganisms. *Trends in microbiology* **25**: 92-99.
- Wirth R, Luckner M & Wanner G (2018) Validation of a Hypothesis: Colonization of Black Smokers by Hyperthermophilic Microorganisms. *Front Microbiol* **9**: 524.
- Woomer PL (1994) Most probable number counts. *Methods of Soil Analysis: Part 2—Microbiological and Biochemical Properties* 59-79.
- Wright ES (2016) Using DECIPHER v2. 0 to analyze big biological sequence data in R. *R Journal* **8**.
- Wrighton KC, Thomas BC, Sharon I, Miller CS, Castelle CJ, VerBerkmoes NC, Wilkins MJ, Hettich RL, Lipton MS & Williams KH (2012) Fermentation, hydrogen, and sulfur metabolism in multiple uncultivated bacterial phyla. *Science* **337**: 1661-1665.
- Wurch L, Giannone RJ, Belisle BS, Swift C, Utturkar S, Hettich RL, Reysenbach A-L & Podar M (2016) Genomics-informed isolation and characterization of a symbiotic Nanoarchaeota system from a terrestrial geothermal environment. *Nat Commun* **7**: 1-10.
- Xiao J, Zhang Y, Chen W, Xu Y, Zhao R, Tao L, Wu Y, Zhang Y, Xiao X & Zhu R (2020) Diversity and biogeography of Woesearchaeota: A comprehensive analysis of multi-environment data. *bioRxiv*.
- Xiaotong P & Huaiyang Z (2005) Growth history of hydrothermal chimneys at EPR 9-10° N: A structural and mineralogical study. *Science in China Series D: Earth Sciences* **48**: 1891.
- Xie W, Wang F, Guo L, Chen Z, Sievert SM, Meng J, Huang G, Li Y, Yan Q & Wu S (2011) Comparative metagenomics of microbial communities inhabiting deep-sea hydrothermal vent chimneys with contrasting chemistries. *The ISME journal* **5**: 414.

- Yang C-L, Chen X-K, Wang R, Lin J-Q, Liu X-M, Pang X, Zhang C-J, Lin J-Q & Chen L-X (2019) Essential role of σ factor RpoF in flagellar biosynthesis and flagella-mediated motility of *Acidithiobacillus caldus*. *Front Microbiol* **10**: 1130.
- Yayanos AA (1995) Microbiology to 10,500 meters in the deep sea. *Annual review of microbiology* **49**: 777-805.
- Yayanos AA, Dietz AS & Van Boxtel R (1979) Isolation of a deep-sea barophilic bacterium and some of its growth characteristics. *Science* **205**: 808-810.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S & Madden TL (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics* **13**: 134.
- Yoo Y, Lee DW, Lee H, Kwon B-O, Khim JS, Yim UH, Park H, Park B, Choi I-G & Kim BS (2019) *Gemmobacter lutimaris* sp. nov., a marine bacterium isolated from a tidal flat. *Int J Syst Evol Microbiol* **69**: 1676-1681.
- Yoon S-H, Ha S-m, Lim J, Kwon S & Chun J (2017) A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie van Leeuwenhoek* **110**: 1281-1286.
- Zaremba-Niedzwiedzka K, Caceres EF, Saw JH, Bäckström D, Juzokaite L, Vancaester E, Seitz KW, Anantharaman K, Starnawski P & Kjeldsen KU (2017) Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature* **541**: 353-358.
- Zbinden M, Le Bris N, Gaill F & Compère P (2004) Distribution of bacteria and associated minerals in the gill chamber of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* and related biogeochemical processes. *Marine Ecology Progress Series* **284**: 237-251.
- Zbinden M, Shillito B, Le Bris N, de Montlaur CdV, Roussel E, Guyot F, Gaill F & Cambon-Bonavita M-A (2008) New insights on the metabolic diversity among the epibiotic microbial community of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *J Exp Mar Biol Ecol* **359**: 131-140.
- Zhong Z-P, Solonenko NE, Gazitúa MC, Kenny DV, Mosley-Thompson E, Rich VI, Van Etten JL, Thompson LG & Sullivan MB (2018) Clean low-biomass procedures and their application to ancient ice core microorganisms. *Front Microbiol* **9**: 1094.
- Zhou H, Li J, Peng X, Meng J, Wang F & Ai Y (2009) Microbial diversity of a sulfide black smoker in main endeavour hydrothermal vent field, Juan de Fuca Ridge. *The Journal of Microbiology* **47**: 235-247.
- Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N & Haugland RP (1997) A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Analytical biochemistry* **253**: 162-168.
- Zillig W, Holz I, Janekovic D, Schäfer W & Reiter W (1983) The archaeobacterium *Thermococcus celer* represents, a novel genus within the thermophilic branch of the archaeobacteria. *Syst Appl Microbiol* **4**: 88-94.

Appendix

1) Appendix 1

Rarefaction curves of 16S rRNA genes libraries from the diversity study



Rarefaction curves of 16S rRNA genes libraries (Archaea at the top, Bacteria at the bottom) from the diversity study.

2) Appendix 2

Culturable cell concentration in hydrothermal chimney samples estimated by MPN enrichments

Incubation temperature (°C)	M2			M3			M5			M2			M3			M5			M1			M4			M6			Mean 1
	Inorganic carbon source									Organic carbon source																		
	Electron acceptor			Electron acceptor			Electron acceptor			Electron acceptor			Electron acceptor			Electron acceptor												
	Sulfur	Sulfate	Oxygen	Sulfur	Sulfate	Oxygen	Sulfur	Sulfate	Oxygen	Sulfur	Sulfate	Oxygen	Sulfur	Sulfate	Oxygen	Sulfur	Sulfate	Oxygen	Sulfur	Sulfate	Oxygen	Sulfur	Sulfate	Oxygen				
	MOM19 Aisics 1			MOM19 DEAFS			MOM19 Aisics 1			MOM19 DEAFS																		
30	5,33	5,71	5,71	3,68	3,28	2,68	5,04	5,71	5,33	3,68	5,36	1,68													4,43			
60	2,63	2,63	2,03	2,68	2,36	1,68	1,63	2,03	2,29	1,68	1,68	0,00													1,94			
80	2,03	3,63	0,00	2,28	3,95	1,68	0,00	2,03	0,00	2,28	1,68	0,00													1,63			
95	5,33	2,03	0,00	3,68	2,68	1,68	0,00	2,03	0,00	1,68	1,68	0,00													1,73			
Mean 2	3,83	3,50	1,93	3,08	3,07	1,93	1,67	2,95	1,90	2,33	2,60	0,42																
	MOM19 Aisics 2			MOM19 Cap 2			MOM19 Aisics 2			MOM19 Cap 2																		
30	6,16	6,16	6,16	5,98	5,98	5,98	6,16	6,16	6,16	5,98	5,98	5,61													6,04			
60	6,16	4,57	5,50	5,98	4,58	5,98	6,16	5,79	4,49	5,98	5,98	5,98													5,60			
80	3,09	3,49	3,09	4,12	3,91	5,98	4,49	5,09	4,49	5,98	5,98	4,31													4,50			
95	5,09	3,49	3,09	5,98	3,31	2,31	4,49	2,49	0,00	5,98	5,98	0,00													3,52			
Mean 2	5,13	4,43	4,46	5,52	4,45	5,06	5,33	4,88	3,78	5,98	5,98	3,98																

Heatmap representation of the culturable cell concentration estimated by MPN enrichments. The columns stand for the culture media. The rows stand for incubation temperature. The values in the heatmap correspond to the decimal logarithm of the estimated cell number in one gram of sample. Values in bold indicate that an enrichment was observed up to the last dilution, meaning that the value may be higher than the estimation. Pink backgrounds correspond to the lowest concentrations, and black backgrounds to the highest concentrations. Average values of the rows (incubation temperatures, mean 1) are presented on the right and average values of the columns (culture conditions and samples, mean 2) are presented on the bottom. The samples with a grey background were mainly composed of sulfates (upper part of chimneys) whereas samples with an orange background were mainly composed of sulfides (bottom of chimneys).

3) Appendix 3

Chapter of the book *Deep-sea microbiology*

Une partie de mon travail de synthèse bibliographique a été publiée dans le cadre d'un chapitre d'ouvrage auquel j'ai contribué. Ce chapitre est présenté en annexe dans les pages suivantes.

Physiology, metabolism and ecology of thermophiles from deep-sea vents

In Deep-sea microbiology book eds Costantino Vetriani and Donato Giovanelli

Springer en cours d'édition

Anne Godfroy, David François, Jordan Hartunians, Yann Moalic and Karine Alain

Deep-sea microbiology book

Physiology, metabolism, and ecology of thermophiles from deep-sea vents

Anne Godfroy, David François, Jordan Hartunians, Yann Moalic and Karine Alain

Abstract. Thermophiles from deep-sea hydrothermal vents are taxonomically and physiologically diverse. In those rich environments, they feed on a profusion of carbon sources and derive their energy from a wide variety of organic and mineral sources, through common and rare types of metabolic pathways, detailed in this chapter. Numerous thermophilic microorganism lineages possess cultured representatives and have been characterized in detail, but some taxa remain uncultured, for which functional hypotheses have been proposed from metagenomic data. Particularly, two prokaryotic lineages of (hyper)thermophilic bacteria and archaea, *Epsilonproteobacteria* and *Thermococcales*, are ubiquitous at deep-sea hydrothermal vents and key players of this ecosystem. We hypothesize that their physiological versatility might explain their ecological success. Generally speaking, (hyper)thermophiles also have to counteract the effect of high temperature on their cellular components, by involving cellular machineries, including, among others, membrane and protein adaptations, DNA stabilization proteins, compatible solutes or metabolism regulation, whose function is to maintain the integrity of the genome and proteome at their growth temperature. In recent years, important advances in the functioning and basic knowledge of thermophiles have been achieved through the development of genetic tools, which are also useful for the development of biotechnological applications from these unique organisms. Furthermore, the deep-sea and its associated high-pressure conditions also set advantages in some cases, which we are only beginning to explore and deserve broader attention.

1. Introduction

The microbial communities from deep-sea hydrothermal vents have been studied since the discovery of these singular ecosystems in the late seventies. During the first decades, microbiological investigation was mainly performed through traditional culture-dependent approaches. Then, with the advent of first and next generation molecular methods, and together with intensive culturing efforts, our knowledge of these chemosynthetic communities has advanced considerably despite limited access to this deep habitat and the inherent difficulties of obtaining samples. A wide diversity of *Bacteria* and *Archaea* characterize prokaryotic communities from deep-sea hydrothermal vents, including numerous thermophilic lineages, and high levels of endemic species. In the last 25 years, the development of deep-sea hydrothermal cabled observatories (Neptune in the Northeastern Pacific Ocean, EMSO-Azores on the Mid-Atlantic Ridge (www.emso-fr.org/fr/EMSO-Azores)) allowed a more detailed study of community dynamics and ecology as a function of environmental variations. This chapter presents the current state of knowledge of thermophiles from this singular ecosystem.

- *Hydrothermal vents chimneys: geochemistry and spatial-temporal physical-chemical gradients*

Deep sea hydrothermal chimneys are mineral structures resulting from contact between

superheated hydrothermal fluid springing from the seafloor and cold (2-6°C), oxygenated and slightly basic seawater. Hydrothermal fluid composition and temperature are highly dependent on the local geological setting. Indeed, depending on the nature of the seafloor (mafic, ultramafic or sedimentary, and on the subseafloor fluid circulation network (phase separation, mixing with seawater), fluid chemical composition may vary even at small local scales (hydrothermal field, or site). Broadly speaking, hydrothermal fluids are hot (up to 400°C), acidic, anoxic, and enriched in reduced compounds such as CH₄, H₂S, H₂, gases like CO₂ and CO, and metal species (Fe, Cu, Mn). Their concentration varies from one site to another depending on subseafloor fluid circulation processes.

Composition and porosity of mineral chimney structures are determined by fluid end member composition, emission temperature and speed, and they evolve over time. Small young spires are first composed of anhydrite or barite, resulting from the combination of calcium or barium with sulfates from seawater (Fouquet et al. 1988; Haymon 1983). The young chimneys thus formed are highly porous and brittle. Then the precipitation and deposition of sulfide metals such as pyrite, marcasite or sphalerite, and later chalcopyrite, allow the chimneys to grow in both width and height and to solidify. According to the succession of mineral precipitation and dissolution, hydrothermal chimney edifices have highly heterogeneous compositions.

In a simplified manner, the hydrothermal fluid provides electron donors and inorganic carbon while seawater provides electron acceptors and organic matter to the microbial communities. Thus, fluid chemistry represents an important driver for microbial community composition. Many lithotrophic microorganisms use H₂ and H₂S in vent fluids. In this way, energy availability has a significant influence on community composition, as shown by several approaches including numerical modelling, diversity studies, metagenomic/transcriptomic approaches, incubations, and activity measurements. Electron donors like hydrogen, methane and electron acceptors like nitrate and oxygen are important drivers for microbial diversity and activity (Fortunato et al. 2017; McCollom 2007; Perner et al. 2010; Reveillaud et al. 2016; Steen et al. 2016).

Otherwise, the steep temperature and chemical gradients (from hydrothermal fluid to seawater) within the chimney wall generate conditions that can change quickly at both temporally and spatially and result in a mosaic of microhabitats with contrasting physical and chemical conditions at the millimeter scale (Figure 1).

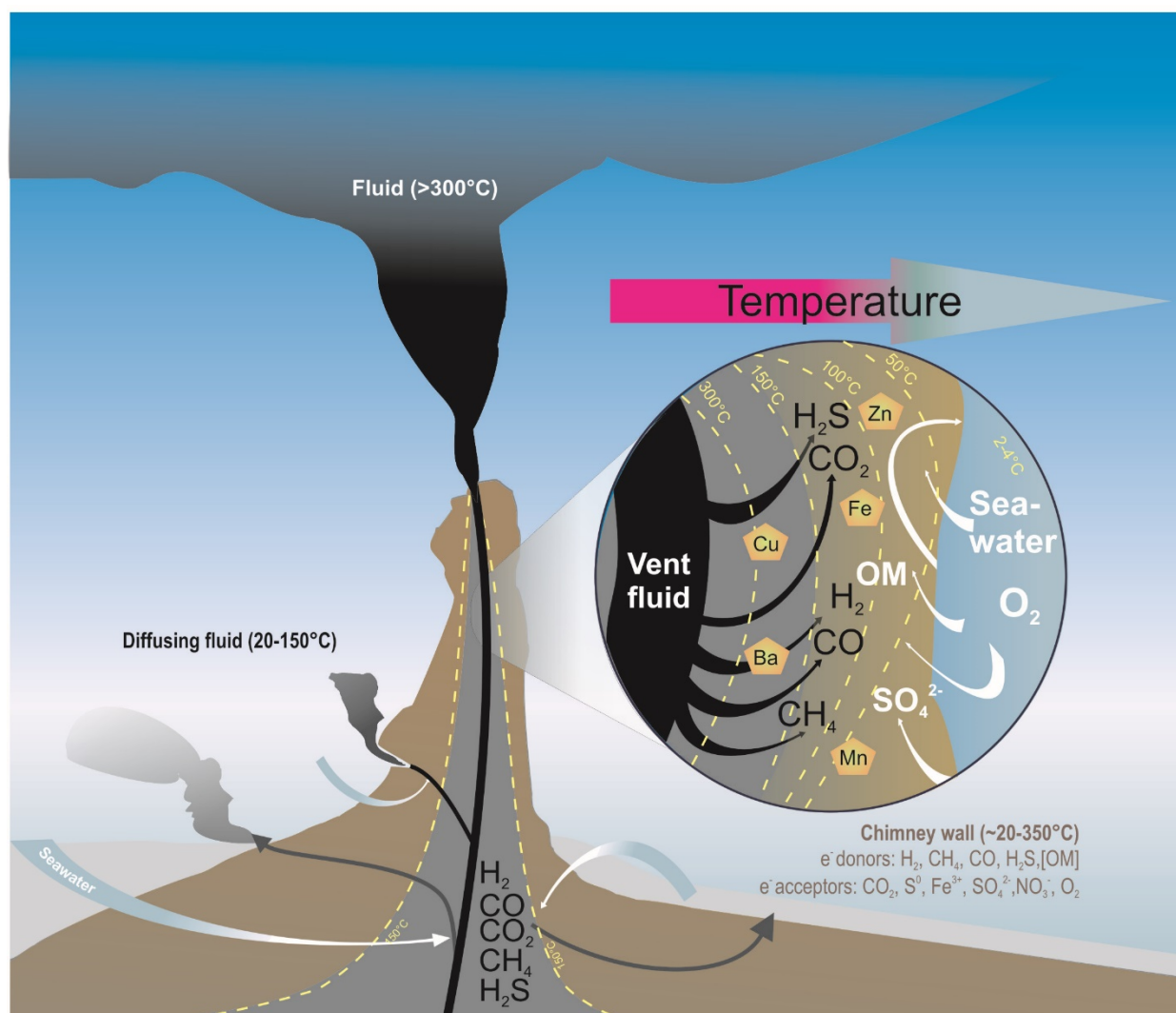


Figure 1: Cross-sectional diagram of an “ideal” hydrothermal chimney illustrating spatial and chemical gradients (modified from Roussel, et al 2011)

- *Definition of thermophily/hyperthermophily*

According to their temperature preference, microorganisms can be classified into three groups: psychrophiles, mesophiles, and thermophiles. Thermophiles are, literally, organisms that love high temperatures. Microorganisms growing at temperatures above 80°C were discovered in the seventies, a period when the notion of thermophily was redefined and extended to hyperthermophily. Today, the adjective “thermophilic” is applied to all microorganisms having an optimal temperature for growth above 45°C and “hyperthermophilic” refers to prokaryotes having their optimal temperature for growth above 80°C according to the definition given in the Brock Biology of Microorganisms 13rd edition (Madigan et al, 2010)

The discovery of deep-sea hydrothermal vents is contemporaneous with the emergence of thermophile microbiology, the discovery of *Archaea*, and life living at temperatures above 100°C where fluids remain liquid due to the high hydrostatic pressure. Consequently, hydrothermal ecosystems were rapidly recognized as a wonderful “playground” for studying life at high temperature.

In the chapter hereafter, we will focus on the diversity, ecology, and metabolism of thermophilic prokaryotes inhabiting hydrothermal ecosystems and having an optimum

temperature for growth above 45°C.

2. Taxonomic and metabolic diversity of microorganisms

- *Thermophilic and hyperthermophilic microbial species isolated from deep-sea hydrothermal vents*

Currently, 155 bacterial and 66 archaeal strains have been isolated and characterized from deep-sea hydrothermal vents, including 129 bacterial and 55 archaeal species recognized by the International Committee on Systematics of Prokaryotes. Within this collection, a substantial phylogenetic diversity is affiliated with *Bacteria*, divided into 12 phyla. Similarly, *Archaea* are also relatively diverse and affiliated with the phyla *Crenarchaeota* and *Nanoarchaeota* and with 5 classes of *Euryarchaeota*. All these *Archaea* have an optimal growth temperature above 60°C (Takai et al. 2002). Most of them are hyperthermophiles and grow optimally between 80 and 100°C or above, like *Pyrolobus fumarii* and *Pyrococcus kulkarnii* (Blöchl et al. 1997; Callac et al. 2016). Among bacterial strains, there are 81 thermophiles growing between 50 and 80°C. Several phyla like ‘*Aquificae*’ (class *Aquificae*), ‘*Thermotogae*’ (class *Thermotogae*), ‘*Deinococcus-Thermus*’ (class *Deinococci*), ‘*Deferribacteres*’ (class *Deferribacteres*) and ‘*Thermodesulfobacteria*’ (class *Thermodesulfobacteria*) only contain thermophilic isolates whereas the others also include mesophilic taxa. This diversity of microorganisms with different thermal preferences allows them to colonize various areas of hydrothermal vents (Nakagawa et al. 2005; Schrenk et al. 2003; Takai et al. 2001). Growth temperature of microorganisms thus represents a main driver of their distribution in deep-sea hydrothermal ecosystems.

- *Metabolic diversity of thermophilic taxa*

The mixing between the reduced hydrothermal fluid and the oxygenated seawater creates a chemical gradient that gathers potential electron donors and acceptors around the fluid emission zone. Hence, environmental conditions enable *Bacteria* and *Archaea* to perform a great diversity of biochemical reactions based on numerous redox couples. As shown in Table 1, three main types of electron donors can be used by (hyper)thermophilic microorganisms at deep-sea hydrothermal vents: hydrogen, reduced sulfur, and organic compounds. Electron acceptors include sulfur and nitrogen compounds, ferric iron, carbon dioxide, oxygen, and organic compounds. Many hyperthermophilic *Archaea* are chemolithoautotrophs, and thus use carbon dioxide as a carbon source and dihydrogen as an electron donor (Table 1). This is the case for some *Euryarchaeota*, like *Archaeoglobus* and *Geoglobus*, two *Archaeoglobales* genera that respectively reduce sulfur species or ferric iron. Methanogenic *Archaea* belonging to the classes *Methanococci* and *Methanopyri* also use hydrogen as an energy source to reduce CO₂ to methane. Several hydrogenotrophic genera constitute the phylum *Crenarchaeota*, like *Pyrodictium*, *Pyrolobus*, and *Ignicoccus*, the latter being a host of the symbiont *Nanoarchaeum equitans* (Blöchl et al. 1997; Huber et al. 2000; Huber et al. 2002; Pley et al. 1991). Some *Archaea* are chemoorganotrophs. Among them, the most commonly isolated archaeal genus in hydrothermal vents, *Thermococcus*, displays a fermentative metabolism and reduces elemental sulfur. *Pyrococcus* and *Palaeococcus* display similar features, and details about the order *Thermococcales* will be given later in the chapter. One heterotrophic species reduces ferric iron, *Aciduliprofundum boonei*, which is the sole thermoacidophilic *Thermoplasmata* isolated from hydrothermal vents. All those microorganisms require anaerobic conditions and their growth is inhibited by oxygen. Only

one archaeal genus, *Aeropyrum*, was shown to grow heterotrophically under strictly aerobic conditions (Nakagawa et al. 2004).

Besides *Archaea*, thermophilic *Bacteria* display a wider phylogenetic and metabolic diversity. For example, many autotrophic *Bacteria* use sulfur compounds as electron donors whereas hydrothermal *Archaea* do not. That is the case for *Dissulfuribacter* (Slobodkin et al. 2013) and some *Thermodesulfobacteria* (Slobodkin et al. 2012) that disproportionate elemental sulfur, thiosulfate, and sulfite. Sulfide oxidation is coupled to nitrate or oxygen reduction in a few *Proteobacteria* and *Aquificae*. Within the *Aquificae*, some genera like *Persephonella*, *Desulfurobacterium*, and *Thermovibrio* are also able to oxidize hydrogen giving them the ability to use a wide range of substrates under aerobic or anaerobic conditions (Götz et al. 2002; L'Haridon et al. 1998; Vetrani et al. 2004). Like for *Archaea*, hydrogen is a common electron donor for autotrophic *Bacteria*. Members of the phyla '*Aquificae*', '*Thermotogae*', '*Deferribacteres*', '*Thermodesulfobacteria*', '*Deinococcus-Thermus*', and *Proteobacteria* are hydrogen-oxidizers using different terminal electron acceptors. Those acceptors are also used for chemoorganotrophic metabolism in aerobic conditions (mainly by some *Deinococci* and *Firmicutes* like *Bacillus*) or in anaerobic conditions by sulfate reducers such as *Thermodesulfobacteria*, sulfur reducers such as *Thermotogae*, or nitrate-, nitrite-, and/or iron-reducers such as *Deferribacter*. A few genera in the phyla *Clostridia* and *Spirochaetia* grow only by fermentation (Alain et al. 2002a; Imachi et al. 2008). Table 1 summarizes the (hyper)thermophilic microbial taxa cultivated from deep-sea vents and the electron donors and acceptors they use.

Table 1 : Thermophilic and hyperthermophilic (underlined) species isolated from deep-sea hydrothermal vents according to the electron donor and acceptor they use for growth. (S) use sulfur as electron sink ;(sp) : only some species/strains of the genus perform the reaction ; (M) : some strains are mixotroph and also use organic matter for growth ; (H) : use inorganic electron donor but organic matter as carbon source ; (F) : perform fermentation but is also able to use inorganic electron acceptor ; (CO) : also able to oxidize carbon monoxide for autotrophic growth.

Electron Donor	Electron Acceptor	Genera
Organic matter (also used as carbon source)	S°	<u>Thermococcus</u> (S), <u>Palaeococcus</u> (F), <u>Pyrococcus</u> (S), <u>Pyrodicticum</u> (sp, F), <u>Aciduliprofundum</u> , <u>Marinitoga</u> (S), <u>Mesoaciditoga</u> , <u>Kosmotoga</u> , <u>Thermotomaculum</u> , <u>Oceanithermus</u> , <u>Anoxybacter</u> (F), <u>Tepidibacter</u> (F), <u>Deferrisoma</u> , <u>Hippea</u>
	SO ₄ ²⁻	<u>Palaeococcus</u> (sp, F), <u>Desulfothermus</u>
	NO ₃ ⁻	<u>Vulcanibacillus</u> , <u>Piezobacter</u> , <u>Geothermobacter</u> , <u>Alcanivorax</u> (F) <u>Oceanithermus</u>
	Fe ³⁺	<u>Aciduliprofundum</u> , <u>Anoxybacter</u> (F), <u>Caloranaerobacter</u> (F), <u>Deferrisoma</u> , <u>Geothermobacter</u>
	Fermentation	<u>Thermococcus</u> (S), <u>Pyrococcus</u> (S) <u>Caloranaerobacter</u> , <u>Caminicella</u> , <u>Carboxydobrachium</u> (CO), <u>Marinitoga</u> (S), <u>Clostridium</u> , <u>Exilispira</u>
H ₂	O ₂	<u>Aeropyrum</u> , <u>Marinithermus</u> , <u>Oceanithermus</u> , <u>Rhodothermus</u> , <u>Thermus</u> , <u>Vulcanithermus</u> , <u>Bacillus</u> , <u>Geobacillus</u> , <u>Rhodothermus</u> , <u>Piezobacter</u>
	S°	<u>Ignicoccus</u> , <u>Pyrodicticum</u> (sp, H), <u>Methanocaldococcus</u> , <u>Methanococcus</u> , <u>Persephonella</u> (sp), <u>Balnearium</u> , <u>Desulfurobacterium</u> (sp), <u>Phorcysia</u> , <u>Thermosulfidibacter</u> , <u>Thermovibrio</u> , <u>Thermosipho</u> , <u>Deferribacter</u> (M), <u>Hippea</u> , <u>Hydrogenimonas</u> , <u>Caminibacter</u> (M), <u>Cetia</u> , <u>Lebetimonas</u> , <u>Nautilia</u>
	S ₂ O ₃ ²⁻	<u>Pyrolobus</u> , <u>Archaeoglobus</u> (sp), <u>Desulfurobacterium</u> (sp), <u>Thermosipho</u> , <u>Nautilia</u> (sp)
	SO ₄ ²⁻	<u>Archaeoglobus</u> (M), <u>Desulfurobacterium</u> (sp), <u>Thermodesulfatator</u> (M), <u>Thermodesulfobacterium</u>
	SO ₃ ²⁻	<u>Archaeoglobus</u> (SD, M)
	NO ₃ ⁻	<u>Pyrodicticum</u> (sp), <u>Pyrolobus</u> , <u>Desulfurobacterium</u> (sp), <u>Persephonella</u> , <u>Phorcysia</u> , <u>Thermovibrio</u> , <u>Calditrix</u> (M), <u>Oceanithermus</u> (sp, M), <u>Vulcanithermus</u> (H), <u>Deferribacter</u> (M), <u>Piezobacter</u> , <u>Hydrogenimonas</u> , <u>Nitratiruptor</u> , <u>Caminibacter</u> (M), <u>Cetia</u> , <u>Lebetimonas</u> (sp), <u>Nautilia</u> (sp)
	Fe ³⁺	<u>Pyrodicticum</u> (sp), <u>Geoglobus</u> (M), <u>Thermosipho</u> (sp), <u>Deferribacter</u> (M)
	CO ₂	<u>Methanocaldococcus</u> , <u>Methanococcus</u> , <u>Methanopyrus</u> , <u>Methanothermococcus</u> , <u>Methanotorris</u>
	O ₂	<u>Pyrolobus</u> , <u>Persephonella</u> , <u>Vulcanithermus</u> (H), <u>Piezobacter</u> , <u>Hydrogenimonas</u> , <u>Nitratiruptor</u>
	Disproportionation	<u>Thermosulfurimonas</u> , <u>Thermosulfuriphilus</u> , <u>Dissulfuribacter</u>
S°	NO ₃ ⁻	<u>Hydrogenivirga</u> , <u>Thermosulfuriphilus</u> , <u>Piezobacter</u> , <u>Thioprofundum</u>
	O ₂	<u>Hydrogenivirga</u> , <u>Persephonella</u> , <u>Piezobacter</u> , <u>Thioprofundum</u>
	Disproportionation	<u>Thermosulfuriphilus</u> , <u>Dissulfuribacter</u>
S ₂ O ₃ ²⁻	NO ₃ ⁻	<u>Hydrogenivirga</u> , <u>Piezobacter</u> , <u>Thioprofundum</u>
	O ₂	<u>Hydrogenivirga</u> , <u>Persephonella</u> , <u>Piezobacter</u> , <u>Thioprofundum</u>
SO ₃ ²⁻	Disproportionation	<u>Thermosulfuriphilus</u> , <u>Dissulfuribacter</u>

Hydrothermal vents are places of highly intense interactions between the organic, biological world and the inorganic, metal-rich fluid emanating from the Earth's crust. Mixed with surrounding cold oxygenated seawater, it creates microhabitats harvesting an important biodiversity, as explained earlier herein. There, microorganisms are likely to induce mineral dissolution or precipitation for further biological use (Callac et al. 2015; Holden and Adams 2003; Pagé et al. 2008). However, mineralization can also originate from biological actions, such as, for example, the recently reported production of greigite (Fe_3S_4), a potential precursor to pyrite (FeS_2) (Gorlas et al. 2018).

- *Uncultured thermophilic lineages: recent contribution from metagenomic data*

In addition to the numerous microbial species isolated from hydrothermal vents, molecular studies have shown since the 1990s that many taxa living in hydrothermal ecosystems remain uncultured. In most cases, only their potential phylogenetic position was determined from 16S rRNA gene sequences and names were given to these candidate phyla depending on the sampling location like “Deep-sea Hydrothermal Vent *Euryarchaeota*” or “Pele’s Vents Bacteria” (Moyer et al. 1995; Takai and Horikoshi 1999). More recently, the development of metagenomic and proteomic studies provided phylogenetic information and functional hypotheses about these lineages. It allowed to more accurate resolution of their phylogenetic position by using concatenated genes obtained from metagenomes (Hug et al. 2016; Spang et al. 2017). Then, studying the coding sequences provided information about their genetic potential, putative metabolism, and ecological features of candidate phyla (Anantharaman et al. 2018; Castelle and Banfield 2018; Wrighton et al. 2012).

Some of those uncultured taxa present in hydrothermal samples are likely to be (hyper)thermophilic, based on the conditions of their natural habitat or their rRNA genes high G+C content (Galtier and Lobry 1997). That is the case for the *Archaea* like *Korarchaeota*, *Aigarchaeota*, *Aenigmarchaeota* (formerly named DHVE-3, DSEG or VAL III), *Hydrothermarchaeota* (MBG-E) or *Bacteria* like *Parcubacteria* (OD1), *Microgenomates* (OP11) and *Acetothermia* (OP1) (Auchtung et al. 2006; Hedlund et al. 2015; Jungbluth et al. 2017; Rinke et al. 2013; Zaitseva et al. 2017).

Recent studies also made assumptions about the biochemical pathways used by uncultured lineages, based on metagenome gene content. For example, *Hydrothermarchaeota* could be involved in the biogeochemical sulfur cycle because several *dsr* (dissimilatory sulfite reductase) genes are detected in the relevant metagenomes (Anantharaman et al. 2018). *Parcubacteria*, mostly detected into anaerobic niches, may ferment sugars and produce H_2 or reduce sulfur compounds (Wrighton et al. 2012). Besides, the reduced genome size and the potential absence of genes for biosynthesis of fatty acids, amino acids, nucleotides, or cofactors may be the evidence of a symbiotic lifestyle for the latter and explain the troubles encountered while cultivating such organisms (Nelson and Stegen 2015).

3. Main biogeochemical cycles at high temperature

Based on our knowledge of the taxa isolated from deep-sea hydrothermal vents, microorganisms living in the hottest part of the hydrothermal ecosystem are involved in the main biogeochemical cycles, namely the carbon, nitrogen, sulfur, and iron cycles.

Figure 2 shows the different reactions of those cycles and focuses on reactions that occur at

high temperature based on the cultivated prokaryotes presently available, molecular lines of evidence (identity or functional genes, and metagenomic data), and/or activity measurements.

It appears that nearly all the reactions of the carbon cycle operate in the hottest part of the hydrothermal ecosystem. All chemoorganotrophic reactions, including fermentation (Table 1, lines 1-6), aerobic respiration (Table 1, line 7), and anaerobic respirations coupled to the oxidation of organics (Table 1, lines 1 to 5); chemoautotrophic reactions (Table 1, lines 1 and 8 to 13); and methanogenesis (Table 1, line 14) occur at high temperatures. Carboxydrotrophy also was described at deep-sea hydrothermal vents, in reactions in which CO is used both as an energy and a carbon source (lithoautotrophic process), like in *Carboxydobrachium* (Sokolova et al. 2001), or in reactions where it is only used as an energy source (lithotrophic process), like in *Thermococcus* sp. (Sokolova et al. 2004). Based on molecular data, the anaerobic oxidation of methane (AOM) was predicted to be present at the Lost City off-axis hydrothermal site (Brazelton et al. 2006; Schrenk et al. 2004), in hydrothermal diffuse fluids from various hydrothermal sites from the Pacific ocean (Merkel et al. 2013), and at hydrothermal vents of Guaymas Basin where hydrothermal activity occurs in a sediment-hosted environment (Biddle et al. 2012; Cruaud et al. 2017; Holler et al. 2011; McKay et al. ; Wegener et al. 2015). There is no molecular or analytical (e.g., activity measurements) evidence for aerobic methanotrophy or acetogenesis at high temperatures.

With regard to the nitrogen cycle, denitrification and ammonification are widely distributed in this ecosystem as nitrate is a suitable electron acceptor (that can be reduced to dinitrogen or ammonia) used with a wide range of electron donors and carbon sources under anaerobic conditions. In addition, nitrate or nitrite can be used as inorganic nitrogen sources by numerous *Archaea* and *Bacteria* (Table 1, lines 4, 12, 17 and 20). Nitrogen fixation was demonstrated by a strain of *Methanocaldococcus* at 92°C (Mehta and Baross 2006). There is furthermore molecular evidence (*nifH* genes) that nitrogen fixation occurs in hydrothermal chimneys (Mehta et al. 2003).

The anaerobic ammonium oxidation (anammox) reaction occurs at deep-sea hydrothermal vents, as highlighted by molecular signatures, ladderane lipid detection (Rattray et al. 2008), and activity measurements at high temperature, as shown in various samples from the Mid-Atlantic Ridge (Byrne et al. 2009b) and in Guaymas hydrothermal vents sediments (Russ et al. 2013). In contrast, the aerobic oxidation of ammonia, namely nitrification and the recently discovered one-step aerobic oxidation of ammonia (so-called comammox, for COMplete AMMonia OXidizers) (van Kessel et al. 2015) have not been detected at high temperature in this particular ecosystem.

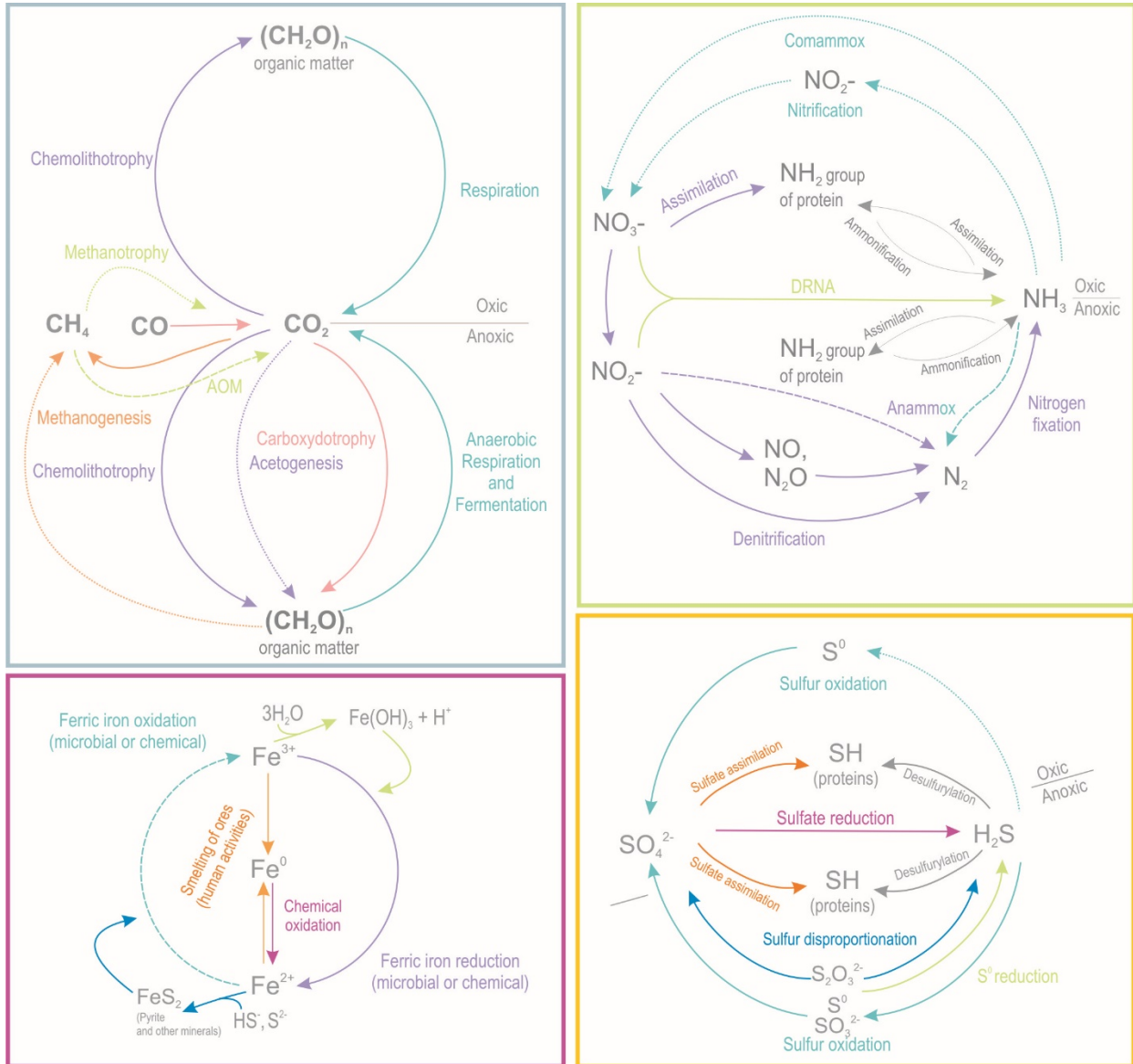
Sulfur and iron compounds are highly present at deep-sea hydrothermal vents.

The sulfur cycle is particularly important due to the abundance and diversity of sulfur species with various oxidation levels found in this ecosystem. All the reactions of the sulfur cycle are likely to occur in this ecosystem at high temperatures. The reduction of elemental sulfur to H₂S is a major process in chimneys and low-temperature (i.e., diffuse) fluids and is carried out by numerous microorganisms. S⁰ is used as a terminal electron acceptor for chemolithotrophic growth or by some chemoorganotrophs such as *Thermococcales* and *Thermotogales* to eliminate their excess of reducing equivalents in the form of H₂S, which is less toxic than H₂ for their growth (Table 1). Some bacterial species belonging to the *Aquificales* and the *Epsilonproteobacteria* can oxidize sulfur compounds (H₂S notably). These reactions occur aerobically and anaerobically (Table 1, lines 17, 18, 20 and 21).

Some thermophilic bacterial species also demonstrated sulfur disproportionation from elemental thiosulfate (or elemental sulfur) to hydrogen sulfide and sulfate (Table 1, lines 16, 19 and 22). Sulfate reduction is also an important process. Indeed, because it is present at a high concentration in seawater, sulfate is one of the major electron acceptors in marine ecosystems. Sulfate reduction is operated by *Archaeoglobus* at high temperature and by some bacteria of the *Thermodesulfobacteriaceae* (Table 1 line 10) at lower temperatures.

With regard to the iron cycle, ferric iron reduction is performed at high temperature by the archaea *Geoglobus* (Kashefi et al. 2002; Slobodkina et al. 2009) and *Pyrodictium* (Lin et al. 2014) and by some bacteria such as *Deferribacter* (Greene et al. 1997; Miroshnichenko et al. 2003) for chemolithotrophic growth using hydrogen as an electron donor. Iron reduction is also used for chemoorganotrophic growth in species such as *Pyrodictium* (Pley et al. 1991), *Geothermobacter*, or *Aciduliprofundum* (Flores et al. 2012a) (Table 1 ; line 5). Some *Thermococcus* species were also reported to reduce ferric iron (Slobodkin et al. 2001). Ferrous iron oxidation was suggested by a molecular signature for *Ferroglobus* sp. (Reysenbach et al. 2000) but *Ferroglobus placidus* (Hafenbradl et al. 1996) was shown to perform iron reduction (Tor et al. 2001; Tor and Lovley 2001). In conclusion, effective iron oxidation in the hot areas of deep-sea hydrothermal vents is not certain. However, it is important to mention that *Ferroglobus* sp. have been enriched from a Guaymas Basin chimney sample, in a bioreactor continuous culture, and based on the culture conditions, it has been hypothesized that it was performing iron oxidation (Callac et al. 2015). For the reactions of the element cycles, which are not present at high temperatures or have not been detected so far, we must keep in mind that the functions might be present in the coldest oxygenated parts of the hydrothermal ecosystem. For example, iron oxidation mediated by microorganisms has not been clearly demonstrated to occur at high temperature, but was demonstrated to occur under mesophilic conditions, mediated by *Zetaproteobacteria* such as *Mariprofundus ferrooxydans* (Callac et al. 2015; Singer et al. 2011) that produces iron microbial mats (Emerson et al. 2017; Scott et al. 2015; Vander Roost et al. 2017). Sulfur oxidation is known to be a very active energy yielding process operated at low temperatures by free-living microorganisms, notably within large bacterial mats of filamentous *Gammaproteobacteria* such as *Beggiatoa* like sp. and *Thioploca* (Crépeau et al. 2011). In deep-sea hydrothermal ecosystems around the world, many high energy yielding processes based on the oxidation of sulfur, hydrogen, and methane are operated in the frame of epibiotic or symbiotic associations with metazoans such as tube worms, shrimps, or mussels (Duperron et al. 2006; Jan et al. 2014; Petersen et al. 2011).

Figure 2: Metabolic reactions of the C, N, S and Fe cycles occurring at high temperatures in hydrothermal vents chimneys (adapted from the Brock Biology of Microorganisms 13rd edition, (Madigan et al, 2010) —> cultivated prokaryotes presently available, - -> molecular lines of evidence (identity or functional genes, and metagenomic data), and/or activity measurements> not demonstrated yet.



An extraordinary metabolic diversity occurs in the contrasting hydrothermal environment. In parallel with common and well-documented energy-yielding processes, rare types of metabolism occur, such as dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) coupled to anaerobic oxidation of elemental sulfur (Slobodkina et al. 2017) performed by only two known species from deep-sea vents, *Thermosulfurimonas dismutans* and *Dissulfuribacter thermophilus* (Slobodkin et al. 2012; Slobodkin et al. 2013), but is likely not limited to these isolates in such a sulfur-rich ecosystem. The ability of microorganisms to obtain energy for

growth by disproportionation of sulfur compounds (thiosulfate and sulfite notably) is also quite unusual at high temperatures and restricted to four thermophilic bacterial species of hydrothermal origin (Slobodkin et al. 2012; Slobodkin et al. 2013; Slobodkin et al. 2016; Slobodkina et al. 2016). Microbial growth coupled to electroactivity is also an uncommon metabolism occurring at deep-sea vents. Hyperthermophilic electroactive enrichment cultures of *Archaea* (*Thermococcales*, *Archaeoglobales*) have been recently obtained (Pillot et al. 2018). Some (hyper)thermophilic taxa also couple microbial growth to carbon monoxide oxidation, namely carboxydrotrophy (Miroshnichenko et al. 2002; Sokolova et al. 2004). In view of the diversity of chemical and mineral species present in this ecosystem, the list of rare metabolisms is expected to increase further in the coming years.

Interestingly, several taxa living in warm and hot areas of deep-sea hydrothermal vents display a degree of metabolic plasticity. They can grow *via* various energy-yielding reactions and use multiple carbon sources. This physiological versatility may allow organisms to cope with their highly changing physicochemical conditions and may reflect a specific adaptation to their ever-changing habitat. Two main lineages found at deep-sea hydrothermal vents, namely *Epsilonproteobacteria* and *Thermococcales*, are characterized by such a metabolic versatility.

4. *Epsilonproteobacteria* and *Thermococcales*, two important lineages

Bacteria of the class *Epsilonproteobacteria* and *Archaea* of the order *Thermococcales* belong to the most ubiquitous lineages found at deep-sea vents. The first inhabits the warm area of the hydrothermal ecosystem while the second lives in the hotter parts.

Many surveys have reported the occurrence of *Epsilonproteobacteria* at deep-sea hydrothermal vents, among the free-living bacteria in vent plumes, within mats covering deposits, on chimneys, within sediments, associated with animals, or acting as episymbionts of animals (Alain et al. 2004; Campbell 2006). Several studies also demonstrated their predominance in plumes, chimney walls, or microbial mats (i.e. Flores et al. 2011; Nakagawa et al. 2006; Opatkiewicz et al. 2009). All the *Epsilonproteobacteria* isolated from deep-sea vents are chemolithotrophs able to use H₂ as an energy source (Campbell 2006; Takai et al. 2005; Vetriani et al. 2014). For this reason, but also because most of them are autotrophs fixing CO₂ and because several mesophilic taxa perform sulfide oxidation, *Epsilonproteobacteria* belong to the early colonizers of deep-sea vent ecosystems (Akerman et al. 2013; Alain et al. 2004; Gulmann et al. 2015; Waite et al. 2017). There are 11 genera of *Epsilonproteobacteria* subdivided into 21 species, which have been exclusively isolated from deep-sea hydrothermal habitats: among them, 6 genera (*Cetia*, *Caminibacter*, *Hydrogenimonas*, *Lebetimonas*, *Nautilia*, *Nitratiruptor*; 12 species in total) encompass thermophilic species growing in between 40–60°C, and 5 genera (*Sulfurovum*, *Sulfurimonas*, *Thioreductor*, *Thiofractor*, *Nitratifactor*; 9 species in total) contain mesophilic strains (25–37°C) (Parte 2018). Two other genera of *Epsilonproteobacteria* (*Sulfurospirillum*, *Sulfurimonas*) include taxa isolated from hydrothermal vents (3 species) and strains isolated from other ecosystems (10 species).

The *Epsilonproteobacteria* from deep hydrothermal habitats are involved in carbon, nitrogen, and sulfur cycling. They include strict anaerobic and microaerophilic species. Regarding the carbon cycle, all the hydrothermal isolates described so far grow autotrophically

on CO₂ via the reductive tricarboxylic acid (rTCA) cycle (Campbell et al. 2006; Takai et al. 2005; Waite et al. 2017). A few isolates also possess the complete Wood-Ljungdahl pathway, although its operation has not been demonstrated. This pathway is more energetically favorable than the rTCA but more sensitive to oxygen, which means that it may not work in these taxa, especially those that are microaerophilic (Waite et al. 2017). Some of these strains of hydrothermal origin growing autotrophically are also able to grow weakly from organic carbon sources such as yeast extract, tryptone, peptone, brain-heart infusion, or formate (Alain et al. 2002b; Campbell 2006). These are notably the strains that were associated to hydrothermal fauna. As described above, H₂ is used as an electron donor by all hydrothermal isolates, but a few of them are also oxidize formate, which is present in hydrothermal fluids, acetate, or complex organic substrates (Grosche et al. 2015; Grote et al. 2012). It is likely that autotrophy is an ancestral trait of the *Epsilonproteobacteria* and that heterotrophic capabilities were more recently acquired through gene gain and gene loss (Waite et al. 2017).

Regarding nitrogen metabolism, anaerobic respiration of nitrate is widespread throughout the *Epsilonproteobacteria* and all the thermophilic genera contain at least one species that respire nitrate. Most of the hydrothermal *Epsilonproteobacteria* possess the soluble periplasmic reductase (NapA) that has a high affinity for nitrate, perhaps as an adaptive response to their nitrate-poor environment (Waite et al. 2017). Mesophilic strains perform denitrification and reduce nitrate to dinitrogen, while thermophilic species perform ammonification and reduce nitrate to ammonia. Most of them assimilate nitrogen from ammonium extracted directly from the environment or generated from nitrogenous species collected from the environment.

Although H₂ remains the main electron donor used (because it is the most powerful, available source of reducing power), anaerobic oxidation of sulfide, sulfur, sulfite, and/or thiosulfate occurs within a couple of genera (*Sulfurovum*, *Sulfurimonas*) (Takai et al. 2005; Waite et al. 2017). Furthermore, several genera respire sulfur species. Sulfur reduction is common, while thiosulfate reduction is rare in the taxa isolated so far. Regarding the enzymatic machinery related to the sulfur cycle, most *Epsilonproteobacteria* possess the bidirectional sulfide-oxidizing sulfide: quinone oxidoreductase (SQR) (to detoxify H₂S and/or use it as an electron donor) and numerous taxa have the polysulfide reductase (PsrA). In the *Epsilonproteobacteria*, these enzymes have polyphyletic origins suggesting an acquisition through lateral gene transfers to adapt to their environmental conditions (Waite et al. 2017). Only *Sulfurimonas* possess the complete sulfur oxidation (*sox*) pathway.

Phylogenetic analyses were recently done on concatenated ribosomal proteins and on 120 single-copy markers genes, with more than 4,000 bacterial genomes, including about a hundred of *Epsilonproteobacteria* (Waite et al. 2017). These analyses were performed using a variety of tree-building methods and demonstrated that the phylogenetic placement of *Proteobacteria* as a class should be revised and that this lineage should be reassigned to a novel phylum for which the name 'Epsilonbacteraeota' has been proposed (Waite et al. 2017). They also concluded that the ancestor of this phylum was probably an autotrophic, motile, thermophilic chemolithotroph related to *Aquificae*.

In summary, *Epsilonproteobacteria* from hydrothermal vents can grow at low or warm temperatures, under microaerophilic or anaerobic conditions, using various electron donors (including hydrogen, sulfide, sulfur, sulfite, thiosulfate, formate, acetate, and/or complex organic substrates), reducing diverse electron acceptors (such as oxygen, nitrate, nitrite,

sulfur, thiosulfate and selenite), and using different carbon sources (such as carbon dioxide, formate or complex organic substrates). Most of them are highly motile. One may hypothesize that their ecological success is linked to their physiological and metabolic versatility that may allow them to respond to the changing environmental conditions. One can also hypothesize that their strong motility and thus their ability to move quickly to a niche where conditions are appropriate for their growth can partially explain their ubiquitous presence in hydrothermal environments.

Thermococcales represents an order of *Euryarchaeota* divided into three genera (*Thermococcus*, *Pyrococcus* and *Palaeococcus*) and remain, since the description of the first species more than thirty years ago (Zillig et al. 1987), one of the most studied hyperthermophilic hydrothermal taxa. These anaerobic, sulfur-reducing chemoorganotrophs are ubiquitously found around the world in various hot areas: deep and coastal hydrothermal vents (Flores et al. 2012b; Prieur et al. 1995); freshwater geothermal pools (Klages and Morgan 1994; Ronimus et al. 1997); hydrothermal and non-hydrothermal sub seafloor sediments (Ciobanu et al. 2014; Roussel et al. 2009), and even hot, continental and offshore oil reservoirs (Miroshnichenko et al. 2001; Stetter et al. 1993).

Fourty-two species have been characterized and published (33 *Thermococcus*, 6 *Pyrococcus* and 3 *Palaeococcus* species) (Parte 2018), among which 31 complete genomes have been sequenced and published (24 *Thermococcus*, 5 *Pyrococcus*, 2 *Palaeococcus*). Some of them are strict or facultative piezophiles (Birrien et al. 2011; Marteinson et al. 1999). Strains with the deepest origins are *T. piezophilus*, isolated from the Cayman Trough, at a depth of 4,964 m (Dalmasso et al. 2016) and *P. yayanosii* isolated from the Ashadze site at a depth of 4,100 m (Birrien et al. 2011). All isolated strains are motile, anaerobic, and neutrophilic chemoorganotrophs (Bertoldo and Antranikian 2006), with a coccoid morphology (except for *T. coalescens* (Kuwabara et al., 2005) showing irregular cells). *Thermococcales* are commonly grown on rich media, although often being isolated from oligotrophic environments. Interestingly, some of them have been enriched on culture media targeting methanogens (*T. piezophilus*) (Dalmasso et al. 2016), or under oligotrophic conditions (Byrne et al. 2009a). Various works explored their broad ability to grow by fermenting different substrates, including simple and complex carbohydrates (e.g. maltose (Xavier et al. 1999), glucose (Schäfer et al. 1994), galactose (Rinker and Kelly 1996), cellobiose (Oslowski et al. 2011), glycogen (Callac et al. 2016), starch (Lee et al. 2006), chitin (Horiuchi et al. 2016), cellulose (Gavrilov et al. 2016), xylan (Gavrilov et al. 2016), xyloglucan (Gavrilov et al. 2016), organic acids (e.g. pyruvate (Kanai et al. 2005)), formate (Kim et al. 2010)), polyols (e.g. glycerol (Mardanov et al. 2009)), peptides, amino acids, or other nitrogen sources (casein (Marteinson et al. 1999), casaminoacids (Marteinson et al. 1999), peptone (Marteinson et al. 1999), tryptone (Gonzales et al. 1995), urea (Callac et al. 2016), and even more complex matrices (e.g. milk and brewery wastes (Hensley et al. 2016), beef or yeast extracts (Marteinson et al. 1999). Growth on carbon monoxide as sole carbon source has also been reported in several species, such as '*T. onnurineus*' (Bae et al. 2012) and *T. barophilus* (Kozhevnikova et al. 2016). Some *Thermococcales* have also been suggested to convey exoelectrogenic abilities, i.e. to practice extracellular electron transfer in order to exchange with insoluble minerals as hydrothermal sulfides (Pillot et al. 2018). Catabolic derivatives from uptaken environmental organic electron donors can be directed towards glycolysis by a modified version of the Embden-Meyerhof pathway, in which the the classical glycolytic enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and phosphoglycerate kinase (PGK) are replaced by one Fd-linked enzyme, glyceraldehyde-3-phosphate Fd oxidoreductase

(GAPOR) (Mukund and Adams 1995; van der Oost et al. 1998 ; Verhees et al. 2003) The major fermentation products are acetate, H₂, and CO₂. Importantly, those steps lead to the reduction of ferredoxin, a protein that will transport the electrons to different types of cytosolic or membrane hydrogenases (from two (e.g. *P. horikoshii*) to seven (e.g. '*T. onnurineus*' NA1) enzymes (Lee et al. 2017)), inducing the concomitant regeneration of reducing equivalents (NADP⁺/NADPH) and formation of H₂ or H₂S, depending respectively on the absence or presence of available elemental sulfur (Schut et al. 2013, Schut et al , 2014). It is noteworthy that this potential H₂ synthesis has attracted a large interest for overproduction oriented towards industrial exploitation, either in simple culture or in consortia (Bálint et al. 2005; Pawar and Niel 2013).

Fourty years after the discovery of deep-sea hydrothermal vents, it has become clear that *Thermococcales* are key actors of deep-sea hydrothermal vents, being hypothesized as possible first hydrothermal chimneys colonizers (Byrne et al. 2009a), most likely thanks to the wide environmental conditions they cope with, their ability to survive in cold oxygenated seawater (Lesongeur et al. 2014), and their metabolic plasticity.

In brief, these two widespread lineages, *Epsilonproteobacteria* and *Thermococcales*, display a wide physiological diversity around deep-sea hydrothermal vent habitats. This versatility allows them to thrive in a variety of physicochemical conditions, and not surprisingly, some members belong to early colonizers of uninhabited vent ecosystems. Thus, they can be defined as generalist lineages, *i.e.* lineages able to adapt to diverse habitats. Generalist lineages were demonstrated to possess higher speciation rates and significant persistence advantage over specialists (*i.e.* those that are adapted to specific niches) (Sriswasdi et al. 2017). This might be the key of the ecological success of *Epsilonproteobacteria* and *Thermococcales* in an environment as unstable and changing as the hydrothermal ecosystem.

5. Adaptations to high temperature

Since the discovery of life at very high temperatures, the research community has tried to decipher how such adaptations were possible. Many works have shown diverse variations regarding their mesophilic counterparts, induced by fundamental changes in thermodynamic behavior. Investigations concerned several levels, such as cell membrane, protein structures, protein folding systems, cytoplasmic solutes, nucleic acid stabilization and metabolic regulation.

The directions of biochemical reactions are determined by Gibbs energies changes (ΔG , defined according to temperature as $\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln K$, with ΔG° : standard Gibbs energy; R: ideal gas constant (J/mol K); T : temperature (Kelvin); K: equilibrium constant). Consequently, assessing ΔG is crucial to understanding metabolism. As temperature increases, this value varies, and reactions that would not be spontaneous under standard conditions (reactions which would be endergonic) become exergonic (releasing energy) at high growth temperatures (Verhaart et al. 2010). Comprehensive works have allowed the kinetic evaluation of principal metabolic reactions under mesophilic conditions and higher temperatures, based on the Helgeson-Kirkham- Flowers equations of state parameters for ions and electrolytes and combined with experimental data and other literature analyses (Amend and Plyasunov 2001; Thauer et al. 1977).

Practically, many biological features ensue from these fundamental variations. Cell membranes must adapt for thermostability. Membranes in *Archaea* are principally composed

of lipids with glycerol ether linked to isoprenoid hydrocarbon chains, leading to a different stereochemistry than the one directing glycerophospholipids of *Bacteria* (and *Eukarya*). If evolutionarily relevant, this fact is however not significant for adaptations to high temperature (both having the same thermal stability). Indeed, rigidity can be conferred by tetraether lipids creating covalent bonds between each side of the lipid bilayer, but those have also been found in mesophilic species (*e.g.* in the thermophilic *Methanobacter thermoautotrophicus* and the mesophilic genus *Methanobacterium*) (Imanaka 2011; Koga 2012). Studies have outlined that just one type of lipid alone cannot explain this adaptation, but rather a complex mix of different properties. At high temperatures, maintaining a permeable barrier can be allowed by so-called thermophilic lipids (*e.g.* ether lipids as the monobranched fatty alcohol-containing diether lipids of *Thermodesulfobacterium commune* (Langworthy et al. 1983)). On another hand, heat tolerant lipids possess a liquid crystalline phase, thus remaining highly permeable and being possibly used at both low and high temperatures (*e.g.* unsaturated, geranylgeranyl group-containing archaeol present in both *Methanococcoides burtonii* (psychrophile) and *Methanopyrus kandleri* (hyperthermophile)) (Koga 2012).

Proteins of hyperthermophiles have been broadly investigated as fundamental adaptive questions but also because many have unique features not found in mesophilic organisms, making them interesting for biotechnological purposes (as the famous practical example of the use of the polymerase from *Thermus aquaticus* for polymerase chain reactions (Saiki et al. 1988)). Among the common investigated parameters, increases in hydrogen bonds, as well as hydrophobic interactions, are reported to enhance thermal resistance (Imanaka et al. 1986; Macedo-Ribeiro et al. 1996). The tertiary structure internal packing of a protein can be stabilized thanks to the generation of aromatic clusters or a shift of hydrophobic residues to the interior of the molecule (Hashimoto et al. 1999). Sequence termini can be buried into hydrophobic pocket and disordered loop can be replaced by alpha-helix, thus avoiding nucleation melting (Hennig et al. 1997). Ion interactions, quite insensitive to alterations of water structure occurring in thermophilic conditions, allow the pairing of protein subunits in a sturdy fashion, and more of such networks are observed in thermophiles than in mesophiles (Rahman et al. 1998a; Robb and Clark 1999). Presence of disulfide bonds, such as in the family-B DNA polymerase of *Thermococcales*, also plays in strengthening of the protein (Killelea and Connolly 2011). Some enzymes that are monomeric in mesophilic environments are found as oligomers at high temperatures, such as the thermophilic rhodopsin of in *Thermus thermophilus* JL-18 (MacBeath et al. 1998; Shionoya et al. 2018). As long supposed and then shown in *Thermococcus celer* protein L30e, stabilizing salt-bridges (*ie.* electrostatic bonds between closed, oppositely charged residues) increase thermostability of the molecule, by reducing the heat capacity change of unfolding (Chan et al. 2011; Folch et al. 2008). This aspect, along with the compactness of the molecule, has also been shown to influence protein thermostability in *Thermotoga maritima* and several other models (Panja et al. 2015; Robinson-Rechavi et al. 2006). However, protein aggregation remains a threat to their activity, and tends to happen at high temperatures. In response, thermophilic proteins keep their aggregation prone regions (APRs) away from solvent exposure into hydrophobic cores, or by using close charged residues (Thangakani et al. 2012). But the protein itself is generally not the unique responsible for its extreme adaptation: its maturation process seems to be sometimes crucial (Rahman et al. 1998b).

On another hand, a cell must also be able to quickly adapt in response to punctual temperature augmentation. Heat shock proteins (HSPs) are part of such folding system (De Maio et al. 2012; Ritossa 1962). They include chaperones, ATPases, proteases and DNA-repair proteins. In *Archaea*, AAA+ proteins (a kind of ATPases), small heat shock proteins (sHSPs),

and the β 1 subunit of the proteasome constitute the response to a heat shock (Keese et al. 2010). Mesophilic *bacteria* and *archaea* share a common, so-called, chaperone machine, from which many HSPs are not found in hyperthermophiles (such as, for example, Hsp90, DnaK, DnaJ, GrpE, Hsp33 and Hsp10 homologues), though some of the absent proteins can be functionally replaced (Laksanalamai et al. 2004). However, other molecules can be involved in acquired thermotolerance, *i.e.* the mechanism of direct acclimation to supra-optimal temperatures, even in hyperthermophiles (*e.g.* Hsp60 synthesized in *Sulfolobus shibatae*) (Trent et al. 1994). Overall, in hyperthermophiles, the chaperone system seems minimal compare to mesophilic species.

In cytoplasm, cells accumulate small, highly soluble, organic compounds, to balance the osmotic pressure and preserve cell viability under stress conditions (including high temperatures). Usually uncharged, they can be negatively charged in thermophiles, which would help to better stabilize proteins against structural disruption caused by high thermal energy (Santos et al. 2011). Two categories of thermolytes (solutes involved in thermophily) can be mainly described: polyol-phosphodiester (e.g. di-myo-inositol phosphate (DIP), not found in organisms growing below 60°C optimum) and alpha-hexose derivatives (*e.g.* mannosylglycerate). Other solutes which are not categorized as such are also specific to hyperthermophiles, such as beta-glutamate, aspartate, cyclic-2,3-biphosphoglycerate (cBPG) (Neves et al. 2005; Santos et al. 2011). However, if those have been found in thermophiles, it also appeared that they are not essential to life at high temperatures. For example, certain thermophiles living in non-saline environments, such as *Thermotoga thermarum* or *Thermococcus zilligii* do not accumulate organic solutes. Moreover, mutational works in *Thermococcales* have confirmed that the lack of DIP synthesis as a thermolytic response to heat does not impair growth and that other mechanisms are used (*e.g.* aspartate synthesis) (Borges et al. 2010; Cario et al. 2015). It is noteworthy that, though solutes are usually rather uptaken than synthesized, transport systems for thermolytes have not been reported yet.

At high temperatures, double-stranded DNA faces many risks of denaturation and chemical cleavages of the N-glycosidic links between sugars and bases (Grogan 1998; Lindahl and Andersson 1972; Lindahl and Karlstrom 1973). Stabilizing nucleic acids, thanks to different strategies, is thus very important for thermophiles. Many tend to harbor multiple copies of the chromosomes, coded in smaller genomes, in order to counteract their degradation (Bernander 2000). Also, the fraction of G and C bases of ribosomal and transfer RNAs is positively correlated with the optimum growth temperature. However, this may not apply to mRNAs and genomic DNA (Lambros et al. 2003). Some bases can be covalently modified in much varied fashion to harbor better conformational rigidity (often thanks to extensive hydrogen bonding (Kowalak et al. 1994)), and compact tertiary structures induce stability (Grosjean and Oshima 2007). External factors can help maintain the molecules at high temperatures as well. Histones can enhance the melting temperature by allowing DNA compaction and nucleosome formation (*e.g.* HpkA and HpkB from *T. kodakarensis* (Higashibata et al. 1999)). High concentrations of potassium and magnesium ions and polyamine also stabilize nucleic acids, which are better bound by small ligands (Imanaka 2011). Importantly, the reverse gyrase is a topoisomerase found in every hyperthermophile (and not in any mesophile), and leads to a positive superhelix structure of DNA, which is linked to better resistance to high temperatures (Atomi et al. 2004).

Finally, regarding hyperthermophily, posttranscriptional modifications shown of great importance in the thermal RNA stabilization of *P. furiosus* (Kowalak et al. 1994), and some heat-shock inducible promoters have also been identified in this genus (Keese et al. 2010; Usui

et al. 2001). Despite those works, few regulative strategies have been specifically attributed to those extremophiles.

6. Genetic models

In the sections above, information about the diversity and molecular function of thermophiles observed at deep-sea hydrothermal vents was provided using molecular and culture-based approaches. However, to obtain a finer understanding of the molecular machinery of (hyper)thermophiles, *in vivo* genetic manipulations are required. Indeed, physiological impact resulting from a gene deletion/modification can help resolving its function (Soppa 2006). Moreover, the development of genetic systems can lead to biotechnological applications (Counts et al. 2017).

There are fundamental requirements for the development of genetic tools (Atomi et al. 2012; Farkas et al. 2013): first, the availability of a DNA delivery method, in order to allow the entrance of exogenic DNA inside the cell, and second some selection/counterselection markers to ensure its maintenance and expression thereafter. These two steps allow the creation of genetic constructs harboring genome modifications. For example, a gene deletion can be achieved after a double-crossover recombination between a plasmid carrying the two flanked homologous regions of target gene. It is achieved through a non-autonomous plasmid, while autonomous plasmids, if available, can serve for complementation and to the development of expression systems.

Genetic systems exist for several thermophiles such as *Thermus* (Cava et al. 2009), *Geobacillus* (Hussein et al. 2015), and *Thermotoga* (Connors et al. 2006) for *Bacteria* and *Thermococcus*, *Pyrococcus*, and *Sulfolobus* for *Archaea* (Farkas et al. 2013). However, only *Thermococcus barophilus* MP (Birien et al. 2018; Thiel et al. 2014), *Pyrococcus yayanosi* A1 (Li et al. 2015) and *Methanocaldococcus jannashii* (Susanti et al. 2019) are genetic models among deep-sea hydrothermal vent species. They benefited from previous genetic tools developed for other *Thermococcales*, *Thermococcus kodakarensis* (Hileman and Santangelo 2012) and *Pyrococcus furiosus* (Lipscomb et al. 2011). Transformation of *Pyrococcus abyssi* could be achieved but at a level of efficiency too low to conduct genetic modifications (Lucas et al. 2002). The strong specificity of these deep-sea hydrothermal models is their adaptation to high hydrostatic pressure. Thus, these genetic systems could help to better understand the molecular functions that drive piezophily at very high temperature (Li et al. 2018).

In the field of biotechnological applications, biocatalysis and metabolic engineering remain to be developed for these models. Nevertheless, some previous works have been done with thermophilic models (Counts et al. 2017) and even with taxa from the same order, such as *Pyrococcus furiosus*. For instance, novel enzymes such as DNA polymerases, hydrogenases, or hydrolases have some great potential in industry, bioenergy, or environmental remediation. More specifically, various high-pressure processes such as high-pressure food pasteurization could derive benefits from piezo-tolerant enzymes. For instance, cheese ripening could be achieved by a protease (Zhang et al. 2015). Engineering of pressure-inducible osmolytes, also call piezolytes, could potentially play a role in osmoadaptation and thermoadaptation for molecules of interest (Neves et al. 2005). Thus, this technological field would deserve broader investigations, though early applications may have been hampered by their inherent technical challenges.

7. Perspectives

After forty years of studies of thermophilic bacteria and archaea from deep-sea hydrothermal vents, through physiological, (meta)-genomic, genetic, and biochemical approaches, major advances have been made in understanding these communities, particularly on species abundant *in situ* and adaptations to high temperature. Microbial ecology and ecological strategies at deep-sea vents remain much less documented. In the future, we believe that technical and conceptual developments should drive innovative data and improve our knowledge and understanding of the hydrothermal thermophilic microbial world. We believe that culturomics and culture-directed from metagenomic data should drive innovative results and allow to isolate taxa of yet- uncultivated lineages, with poorly-documented metabolisms, or with metabolisms filling gaps in biogeochemical cycles. We are also convinced that the implementation of reactors simulating the complex microenvironments found at deep-sea vents onto reconstituted synthetic communities or natural communities should bring interesting results regarding to the ecology of microbial communities. Indeed, in their natural habitat, microorganisms are not isolated from each other. On the contrary, they communicate and interact with each other and with their environment. Such experimental systems materialize the reproduction of both *in situ* conditions/gradients and *in situ* communities, and the analysis of their interaction in greater details. The interfacing of biological and geological sciences is also promising for new discoveries. This may be new ways to extract energy from the hydrothermal environment that have not been discovered yet. To better address the ecology from deep-sea vents, it would be also very interesting to have more reports about precise microbial members at different taxonomic levels, and from multiple sites, and to perform activity measurements (if possible at the *in situ* pressure), because these data are crucial for the understanding of an ecosystem functioning and dynamics. Finally, the development of new genetic models for some abundant or key ecosystem players will be helpful to understand the adaptations of thermophiles to physicochemical parameters, to find functions for the considerable number of genes in genomes with no known function, and to describe new metabolic pathways.

References

- Akerman NH, Butterfield DA, Huber JA (2013) Phylogenetic diversity and functional gene patterns of sulfur-oxidizing seafloor Epsilonproteobacteria in diffuse hydrothermal vent fluids *Front Microbiol* 4:185 doi:10.3389/fmicb.2013.00185
- Alain K et al. (2002a) *Caminicella sporogenes* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic spore-forming bacterium isolated from an East-Pacific Rise hydrothermal vent *International J. System. and Evol. Microbiol.* 52:1621-1628 doi:10.1099/00207713-52-5-1621
- Alain K et al. (2002b) *Caminibacter hydrogeniphilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an East Pacific Rise hydrothermal vent *International J. System. and Evol. Microbiol* 52:1317-1323 doi:10.1099/00207713-52-4-1317
- Alain K, Zbinden M, Le Bris N, Lesongeur F, Querellou J, Gaill F, Cambon-Bonavita MA (2004) Early steps in microbial colonization processes at deep-sea hydrothermal vents *Environ. Microbiol.* 6:227-241
- Amend JP, Plyasunov AV (2001) Carbohydrates in thermophile metabolism: calculation of the standard molal thermodynamic properties of aqueous pentoses and hexoses at elevated temperatures and pressures *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65:3901-3917 doi:10.1016/S0016-7037(01)00707-4
- Anantharaman K et al. (2018) Expanded diversity of microbial groups that shape the dissimilatory sulfur cycle *Isme Journal*:1
- Atomi H, Imanaka T, Fukui T (2012) Overview of the genetic tools in the Archaea *Front Microbiol* 3:337 doi:10.3389/fmicb.2012.00337
- Atomi H, Matsumi R, Imanaka T (2004) Reverse Gyrase Is Not a Prerequisite for Hyperthermophilic Life *Journal of Bacteriology* 186:4829-4833 doi:10.1128/JB.186.14.4829-4833.2004
- Auchtung TA, Takacs-Vesbach CD, Cavanaugh CM (2006) 16S rRNA phylogenetic investigation of the candidate division "Korarchaeota" *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5077-5082
- Bae SS et al. (2012) H₂ production from CO, formate or starch using the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus onnurineus* *Biotechnol. Letters* 34:75-79 doi:10.1007/s10529-011-0732-3
- Bálint B, Bagi Z, Tóth A, Rákhely G, Perei K, Kovács KL (2005) Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen *Applied Microbiology and Biotechnology* 69:404-410 doi:10.1007/s00253-005-1993-3
- Bernander R (2000) Chromosome replication, nucleoid segregation and cell division in archaea *Trends in Microbiology* 8:278-283
- Bertoldo C, Antranikian G (2006) The Order Thermococcales. In: *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY, pp 69-81
- Biddle J, Cardman Z, Mendlovitz H, Albert D, Lloyd K, Boetius A, Teske A (2012) Anaerobic oxidation of methane at different temperature regimes in Guaymas Basin hydrothermal sediments *ISME Journal* 6:1018-1031 doi:10.1038/ismej.2011.164
- Birien T, Thiel A, Henneke G, Flament D, Moalic Y, Jebbar M (2018) Development of an Effective 6-Methylpurine Counterselection Marker for Genetic Manipulation in *Thermococcus barophilus* *Genes (Basel)* 9 doi:10.3390/genes9020077
- Birrien JL et al. (2011) *Pyrococcus yayanosii* sp. nov., an obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61:2827-2831 doi:10.1099/ij.s.0.024653-0
- Blöchl E, Rachel R, Burggraf S, Hafenbradl D, Jannasch HW, Stetter KO (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
- Borges N, Matsumi R, Imanaka T, Atomi H, Santos H (2010) *Thermococcus kodakarensis* Mutants Deficient in Di-myo-Inositol Phosphate Use Aspartate To Cope with Heat Stress. *Journal of Bacteriology* 192:191-197 doi:10.1128/JB.01115-09
- Brazelton WJ, Schrenk MO, Kelley DS, Baross JA (2006) Methane- and Sulfur-Metabolizing Microbial Communities Dominate the Lost City Hydrothermal Field Ecosystem *Applied and Environmental Microbiology* 72:6257-6270
- Byrne N, Lesongeur F, Bienvenu N, Geslin C, Alain K, Prieur D, Godfroy A (2009a) Effect of variation of environmental conditions on the microbial communities of deep-sea vent chimneys, cultured in a bioreactor *Extremophiles* 13:595-608 doi:10.1007/s00792-009-0242-6
- Byrne N et al. (2009b) Presence and activity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria at deep-sea hydrothermal vents *ISME Journal* 3:117-123 doi:10.1038/ismej.2008.72
- Callac N et al. (2016) *Pyrococcus kukulkanii* sp. nov., a hyperthermophilic, piezophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66:3142-3149 doi:10.1099/ijsem.0.001160
- Callac N et al. (2015) Biogeochemical insights into microbe–mineral–fluid interactions in hydrothermal chimneys using enrichment culture *Extremophiles* 19:597-617 doi:10.1007/s00792-015-0742-5
- Campbell BJ, Engel AS, Porter ML, Takai K (2006) The versatile epsilon-proteobacteria: key players in sulphidic habitats *Nat Rev Microbiol* 4:458-468 doi:10.1038/nrmicro1414
- Campbell KA (2006) Hydrocarbon seep and hydrothermal vent paleoenvironments and paleontology: Past developments and future research directions *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* In Press, Corrected Proof:362-407
- Cario A, Mizgier A, Thiel A, Jebbar M, Oger PM (2015) Restoration of the di-myo-inositol-phosphate pathway in the piezo-hyperthermophilic archaeon *Thermococcus barophilus* *Biochimie* 118:286-293 doi:10.1016/j.biochi.2015.05.011
- Castelle CJ, Banfield JF (2018) Major New Microbial Groups Expand Diversity and Alter our Understanding of the Tree of Life *Cell* 172:1181-1197
- Cava F, Hidalgo A, Berenguer J (2009) *Thermus thermophilus* as biological model *Extremophiles* 13:213-231 doi:10.1007/s00792-009-0226-6
- Chan C-H, Yu T-H, Wong K-B (2011) Stabilizing Salt-Bridge Enhances Protein Thermostability by Reducing the Heat Capacity Change of Unfolding *PLOS ONE* 6:e21624 doi:10.1371/journal.pone.0021624
- Ciobanu M-C et al. (2014) Microorganisms persist at record depths in the seafloor of the Canterbury Basin *The ISME Journal* 8:1370-1380 doi:10.1038/ismej.2013.250
- Connors SB, Mongodin EF, Johnson MR, Montero CI, Nelson KE, Kelly RM (2006) Microbial biochemistry, physiology, and biotechnology of hyperthermophilic *Thermotoga* species *FEMS microbiology reviews* 30:872-905 doi:10.1111/j.1574-6976.2006.00039.x
- Counts JA, Zeldes BM, Lee LL, Straub CT, Adams MWW, Kelly RM (2017) Physiological, metabolic and biotechnological features of extremely thermophilic microorganisms *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 9 doi:10.1002/wsbm.1377
- Crépeau V, Cambon Bonavita M-A, Lesongeur F, Randrianalivelo H, Sarradin P-M, Sarrazin J, Godfroy A (2011) Diversity and function in microbial mats from the Lucky Strike hydrothermal vent field *FEMS Microbiology Ecology* 76:524-540
- Cruaud P et al. (2017) Comparative Study of Guaymas Basin Microbiomes: Cold Seeps vs.

- Dalmaso C et al. (2016) *Thermococcus piezophilus* sp. nov., a novel hyperthermophilic and piezophilic archaeon with a broad pressure range for growth, isolated from a deepest hydrothermal vent at the Mid-Cayman Rise Syst Appl Microbiol 39:440-444 doi:10.1016/j.syapm.2016.08.003
- De Maio A, Santoro MG, Tanguay RM, Hightower LE (2012) Ferruccio Ritossa's scientific legacy 50 years after his discovery of the heat shock response: a new view of biology, a new society, and a new journal Cell Stress & Chaperones 17:139-143 doi:10.1007/s12192-012-0320-z
- Duperron S et al. (2006) A dual symbiosis shared by two mussel species, *Bathymodiolus azoricus* and *Bathymodiolus puteoserpentis* (Bivalvia: Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge Environmental microbiology
- Emerson D, Scott JJ, Leavitt A, Fleming E, Moyer C (2017) In situ estimates of iron-oxidation and accretion rates for iron-oxidizing bacterial mats at Loihi Seamount Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers 126:31-39 doi:10.1016/j.dsr.2017.05.011
- Farkas JA, Picking JW, Santangelo TJ (2013) Genetic techniques for the archaea Annu Rev Genet 47:539-561 doi:10.1146/annurev-genet-111212-133225
- Flores GE et al. (2011) Microbial community structure of hydrothermal deposits from geochemically different vent fields along the Mid-Atlantic Ridge Environmental microbiology 13:2158-2171 doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02463.x
- Flores GE, Wagner I, Liu Y, Reysenbach A-L (2012) Distribution, Abundance, and Diversity Patterns of the Thermoacidophilic "Deep-Sea Hydrothermal Vent Euryarchaeota 2" Frontiers in Microbiology 3 doi:10.3389/fmicb.2012.00047
- Folch B, Rooman M, Dehouck Y (2008) Thermostability of Salt Bridges versus Hydrophobic Interactions in Proteins Probed by Statistical Potentials Journal of Chemical Information and Modeling 48:119-127 doi:10.1021/ci700237g
- Fortunato CS, Larson B, Butterfield DA, Huber JA (2017) Spatially distinct, temporally stable microbial populations mediate biogeochemical cycling at and below the seafloor in hydrothermal vent fluids Environmental microbiology
- Fouquet, Auclair G, Cambon P, Etoubleau J (1988) Geological setting and mineralogical and geochemical investigations on sulfide deposits near 13°N on the East Pacific Rise Marine Geology 84:145-178 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0025-3227\(88\)90098-9](http://dx.doi.org/10.1016/0025-3227(88)90098-9)
- Galtier N, Lobry J (1997) Relationships between genomic G+ C content, RNA secondary structures, and optimal growth temperature in prokaryotes Journal of molecular evolution 44:632-636
- Gavrilov SN et al. (2016) Isolation and Characterization of the First Xylanolytic Hyperthermophilic Euryarchaeon *Thermococcus* sp. Strain 2319x1 and Its Unusual Multidomain Glycosidase Frontiers in Microbiology 7 doi:10.3389/fmicb.2016.00552

- Gonzales JM, Kato C, Horikoshi K (1995) *Thermococcus peptonophilus* sp. nov., a fast-growing, extremely thermophilic archaebacterium isolated from deep-sea hydrothermal vents *Archives of Microbiology*:1-6
- Gorlas A, Jacquemot P, Guigner J-M, Gill S, Forterre P, Guyot F (2018) Greigite nanocrystals produced by hyperthermophilic archaea of Thermococcales order *PLOS ONE* 13:e0201549 doi:10.1371/journal.pone.0201549
- Götz D, Banta A, Beveridge TJ, Rushdi AI, Simoneit BRT, Reysenbach AL (2002) *Persephonella marina* gen. nov., sp. nov. and *Persephonella guaymasensis* sp. nov., two novel, thermophilic, hydrogen-oxidizing microaerophiles from deep-sea hydrothermal vents *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 52:1349-1359 doi:10.1099/00207713-52-4-1349
- Greene A, Patel B, Sheehy A (1997) *Deferribacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic manganese- and iron-reducing bacterium isolated from a petroleum reservoir *Int J Syst Bacteriol* 47:505-509
- Grogan DW (1998) Hyperthermophiles and the problem of DNA instability *Molecular Microbiology* 28:1043-1049 doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00853.x
- Grosche A, Sekaran H, Perez-Rodriguez I, Starovoytov V, Vetriani C (2015) *Cetia pacifica* gen. nov., sp. nov., a chemolithoautotrophic, thermophilic, nitrate-ammonifying bacterium from a deep-sea hydrothermal vent *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 65:1144-1150 doi:10.1099/ijs.0.000070
- Grosjean H, Oshima T (2007) How Nucleic Acids Cope with High Temperature Physiology and Biochemistry of Extremophiles:39-56 doi:10.1128/9781555815813.ch4
- Grote J et al. (2012) Genome and physiology of a model Epsilonproteobacterium responsible for sulfide detoxification in marine oxygen depletion zones *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:506-510 doi:10.1073/pnas.1111262109
- Gulmann LK, Beaulieu SE, Shank TM, Ding K, Seyfried WE, Sievert SM (2015) Bacterial diversity and successional patterns during biofilm formation on freshly exposed basalt surfaces at diffuse-flow deep-sea vents *Front Microbiol* 6:901 doi:10.3389/fmicb.2015.00901
- Hafenbradl D et al. (1996) *Ferroglobus placidus* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeum that oxidizes Fe²⁺ at neutral pH under anoxic conditions *Arch Microbiol* 166:308-314
- Hashimoto H, Inoue T, Nishioka M, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T, Kai Y (1999) Hyperthermostable protein structure maintained by intra and inter-helix ion-pairs in archaeal O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase *Journal of molecular biology* 292:707-716 doi:10.1006/jmbi.1999.3100
- Haymon RM (1983) Growth history of hydrothermal black smoker chimneys *Nature* 301:695-698
- Hedlund BP et al. (2015) Uncultivated thermophiles: current status and spotlight on 'Aigarchaeota' *Current opinion in microbiology* 25:136-145
- Hennig M, Sterner R, Kirschner K, Jansonius JN (1997) Crystal structure at 2.0 Å resolution of phosphoribosyl anthranilate isomerase from the hyperthermophile *Thermotoga maritima*: possible determinants of protein stability *Biochemistry* 36:6009-6016 doi:10.1021/bi962718q
- Hensley SA, Moreira E, Holden JF (2016) Hydrogen Production and Enzyme Activities in the Hyperthermophile *Thermococcus paralvinellae* Grown on Maltose, Tryptone, and Agricultural Waste *Front Microbiol* 7:167 doi:10.3389/fmicb.2016.00167
- Higashibata H, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T (1999) Analysis of DNA compaction profile and intracellular contents of archaeal histones from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1

- Biochemical and Biophysical Research Communications 258:416-424
doi:10.1006/bbrc.1999.0533
- Hileman TH, Santangelo TJ (2012) Genetics Techniques for *Thermococcus kodakarensis* Front Microbiol 3:195 doi:10.3389/fmicb.2012.00195
- Holden JF, Adams MW (2003) Microbe–metal interactions in marine hydrothermal environments Current Opinion in Chemical Biology 7:160-165 doi:10.1016/S1367-5931(03)00026-7
- Holler T et al. (2011) Thermophilic anaerobic oxidation of methane by marine microbial consortia The ISME journal 5:1946-1956 doi:10.1038/ismej.2011.77
- Horiuchi A, Aslam M, Kanai T, Atomi H (2016) A Structurally Novel Chitinase from the Chitin-Degrading Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus chitonophagus* Appl Environ Microbiol 82:3554-3562 doi:10.1128/AEM.00319-16
- Huber H, Burggraf S, Mayer T, Wyschkony I, Rachel R, Stetter KO (2000) *Ignicoccus* gen. nov., a novel genus of hyperthermophilic, chemolithoautotrophic Archaea, represented by two new species, *Ignicoccus islandicus* sp nov and *Ignicoccus pacificus* sp nov. and *Ignicoccus pacificus* sp. nov International journal of systematic and evolutionary microbiology 50:2093-2100
- Huber H, Hohn MJ, Rachel R, Fuchs T, Wimmer VC, Stetter KO (2002) A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont Nature 417:63
- Hug LA et al. (2016) A new view of the tree of life Nature Microbiology 1:16048
- Hussein AH, Lisowska BK, Leak DJ (2015) The genus *Geobacillus* and their biotechnological potential Adv Appl Microbiol 92:1-48 doi:10.1016/bs.aambs.2015.03.001
- Imachi H, Sakai S, Hirayama H, Nakagawa S, Nunoura T, Takai K, Horikoshi K (2008) *Exilispira thermophila* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic spirochaete isolated from a deep-sea hydrothermal vent chimney International journal of systematic and evolutionary microbiology 58:2258-2265 doi:10.1099/ijs.0.65727-0
- Imanaka T (2011) Molecular bases of thermophily in hyperthermophiles Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and Biological Sciences 87:587-602 doi:10.2183/pjab.87.587
- Imanaka T, Shibasaki M, Takagi M (1986) A new way of enhancing the thermostability of proteases Nature 324:695-697 doi:10.1038/324695a0
- Jan C et al. (2014) The gill chamber epibiosis of deep-sea shrimp *Rimicaris exoculata*: an in-depth metagenomic investigation and discovery of Zetaproteobacteria. Environmental Microbiology 16:2723-2738 doi:10.1111/1462-2920.12406
- Jungbluth SP, Amend JP, Rappé MS (2017) Data Descriptor: Metagenome sequencing and 98 microbial genomes from Juan de Fuca Ridge Scientific Data
- Kanai T et al. (2005) Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 Journal of Biotechnology 116:271-282 doi:10.1016/j.jbiotec.2004.11.002
- Kashefi K, Tor JM, Holmes DE, Gaw Van Praagh CV, Reysenbach AL, Lovley DR (2002) *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon capable

- of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe(III) serving as the sole electron acceptor *Int J Syst Evol Microbiol* 52:719-728
- Keese AM, Schut GJ, Ouhammouch M, Adams MWW, Thomm M (2010) Genome-Wide Identification of Targets for the Archaeal Heat Shock Regulator Phr by Cell-Free Transcription of Genomic DNA *Journal of Bacteriology* 192:1292-1298 doi:10.1128/JB.00924-09
- Killelea T, Connolly BA (2011) Role of disulfide bridges in archaeal family-B DNA polymerases *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 12:1330-1336 doi:10.1002/cbic.201100145
- Kim YJ et al. (2010) Formate-driven growth coupled with H₂ production *Nature* 467:352-355 doi:10.1038/nature09375
- Klages KU, Morgan HW (1994) Characterization of an extremely thermophilic sulphur-metabolizing archaeobacterium belonging to the Thermococcales *Archives of Microbiology* 162:261-266 doi:10.1007/BF00301848
- Koga Y (2012) Thermal Adaptation of the Archaeal and Bacterial Lipid Membranes.
- Kowalak JA, Dalluge JJ, McCloskey JA, Stetter KO (1994) The Role of Posttranscriptional Modification in Stabilization of Transfer RNA from Hyperthermophiles *Biochemistry* 33:7869-7876 doi:10.1021/bi00191a014
- Kozhevnikova DA, Taranov EA, Lebedinsky AV, Bonch-Osmolovskaya EA, Sokolova TG (2016) Hydrogenogenic and sulfidogenic growth of *Thermococcus* archaea on carbon monoxide and formate *Microbiology* 85:400-410 doi:10.1134/S0026261716040135
- L'Haridon S et al. (1998) *Desulfurobacterium thermolithotrophum* gen. nov., sp. nov., a novel autotrophic, sulphur-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent *Int J Syst Bacteriol* 48 Pt 3:701-711 doi:10.1099/00207713-48-3-701
- Laksanalamai P, Whitehead TA, Robb FT (2004) Minimal protein-folding systems in hyperthermophilic archaea *Nature Reviews Microbiology* 2:315-324 doi:10.1038/nrmicro866
- Lambros RJ, Mortimer JR, Forsdyke DR (2003) Optimum growth temperature and the base composition of open reading frames in prokaryotes *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions* 7:443-450 doi:10.1007/s00792-003-0353-4
- Langworthy TA, Holzer G, Zeikus JG, Tornabene TG (1983) Iso- and Anteiso-Branched Glycerol Diethers of the Thermophilic Anaerobe *Thermodesulfotobacterium commune* *Systematic and Applied Microbiology* 4:1-17 doi:10.1016/S0723-2020(83)80029-0
- Lee H-S et al. (2006) Transcriptional and biochemical analysis of starch metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* *Journal of Bacteriology* 188:2115-2125 doi:10.1128/JB.188.6.2115-2125.2006
- Lee SH, Kim M-S, Kim YJ, Kim TW, Kang SG, Lee HS (2017) Transcriptomic profiling and its implications for the H₂ production of a non-methanogen deficient in the frhAGB-encoding hydrogenase *Applied Microbiology and Biotechnology* 101:5081-5088 doi:10.1007/s00253-017-8234-4
- Lesongeur F, Briand P, Godfroy A, Crassous P, Byrne N, Khripounoff A (2014) Export of deep-sea hydrothermal particles, indigenous thermophilic microorganisms and larvae to the surrounding Ocean *Cahiers De Biologie Marine* 55:409-420
- Li X, Fu L, Li Z, Ma X, Xiao X, Xu J (2015) Genetic tools for the piezophilic hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus yayanosii* *Extremophiles* 19:59-67 doi:10.1007/s00792-014-0705-2
- Li Z, Song Q, Wang Y, Xiao X, Xu J (2018) Identification of a functional toxin-antitoxin system

- located in the genomic island PYG1 of piezophilic hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus yayanosii* *Extremophiles* 22:347-357 doi:10.1007/s00792-018-1002-2
- Lin TJ, Breves EA, Dyar MD, Ver Eecke HC, Jamieson JW, Holden JF (2014) Magnetite formation from ferrihydrite by hyperthermophilic archaea from Endeavour Segment, Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent chimneys *Geobiology* 12:200-211 doi:10.1111/gbi.12083
- Lindahl T, Andersson A (1972) Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid *Biochemistry* 11:3618-3623
- Lindahl T, Karlstrom O (1973) Heat-induced depyrimidination of deoxyribonucleic acid in neutral solution *Biochemistry* 12:5151-5154 doi:10.1021/bi00749a020
- Lipscomb GL et al. (2011) Natural competence in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* facilitates genetic manipulation: construction of markerless deletions of genes encoding the two cytoplasmic hydrogenases *Appl Environ Microbiol* 77:2232-2238 doi:10.1128/AEM.02624-10
- Lucas S et al. (2002) Construction of a shuttle vector for, and spheroplast transformation of, the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi* *Appl Environ Microbiol* 68:5528-5536
- MacBeath G, Kast P, Hilvert D (1998) Redesigning enzyme topology by directed evolution *Science* (New York, NY) 279:1958-1961
- Macedo-Ribeiro S, Darimont B, Sterner R, Huber R (1996) Small structural changes account for the high thermostability of 1[4Fe-4S] ferredoxin from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* *Structure* (London, England: 1993) 4:1291-1301
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D.A. and Clark, D.P (Brock Biology of Microorganisms, Vol. 13 (Pearson, Essex, England, 2010).
- Mardanov AV, Ravin NV, Svetlitchnyi VA, Beletsky AV, Miroshnichenko ML, Bonch-Osmolovskaya EA, Skryabin KG (2009) Metabolic Versatility and Indigenous Origin of the Archaeon *Thermococcus sibiricus*, Isolated from a Siberian Oil Reservoir, as Revealed by Genome Analysis *Applied and Environmental Microbiology* 75:4580- 4588 doi:10.1128/AEM.00718-09
- Marteinsson VT et al. (1999) *Thermococcus barophilus* sp. nov., a new barophilic and hyperthermophilic archaeon isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 49:351-359 doi:10.1099/00207713-49-2-351
- McCollom TM (2007) Geochemical constraints on sources of metabolic energy for chemolithoautotrophy in ultramafic-hosted deep-sea hydrothermal systems *Astrobiology* 7:933-950
- McKay LJ et al. 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
- Mehta MP, Baross JA (2006) Nitrogen Fixation at 92{degrees}C by a Hydrothermal Vent Archaeon *Science* 314:1783-1786 doi:10.1126/science.1134772
- Mehta MP, Butterfield DA, Baross JA (2003) Phylogenetic Diversity of Nitrogenase (nifH) Genes in Deep-Sea and Hydrothermal Vent Environments of the Juan de Fuca Ridge *Appl Environ Microbiol* 69:960-970
- Merkel AY, Huber JA, Chernyh NA, Bonch-Osmolovskaya EA, Lebedinsky AV (2013) Detection of Putatively Thermophilic Anaerobic Methanotrophs in Diffuse Hydrothermal Vent Fluids *Applied and Environmental Microbiology* 79:915-923 doi:10.1128/aem.03034-12

- Miroshnichenko ML et al. (2001) Isolation and characterization of *Thermococcus sibiricus* sp. nov. from a Western Siberia high-temperature oil reservoir *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions* 5:85-91
- Miroshnichenko ML, Kostrikina NA, L'Haridon S, Jeanthon C, Hippe H, Stackebrandt E, Bonch-Osmolovskaya EA (2002) *Nautilia lithotrophica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfur-reducing epsilon-proteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 52:1299-1304 doi:10.1099/00207713-52-4-1299
- Miroshnichenko ML et al. (2003) *Deferribacter abyssi* sp. nov., an anaerobic thermophile from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:1637-1641
- Moyer CL, Dobbs FC, Karl DM (1995) Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii *Applied and environmental microbiology* 61:1555-1562
- Mukund S & Adams MWW (1995) Glyceraldehyde-3-phosphate ferredoxin oxidoreductase, a novel tungsten-containing enzyme with a potential glycolytic role in the hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. *The Journal of Biological Chemistry*. 270: 8389-8392.
- Nakagawa S, Takai K, Horikoshi K, Sako Y (2004) *Aeropyrum camini* sp. nov., a strictly aerobic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 54:329-335
- Nakagawa S et al. (2005) Variability in microbial community and venting chemistry in a sediment-hosted backarc hydrothermal system: Impacts of subseafloor phase-separation *FEMS Microbiology Ecology* 54:141-155
- Nakagawa T, Takai K, Suzuki Y, Hirayama H, Konno U, Tsunogai U, Horikoshi K (2006) Geomicrobiological exploration and characterization of a novel deep-sea hydrothermal system at the TOTO caldera in the Mariana Volcanic Arc *Environmental microbiology* 8:37-49 doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00884.x
- Nelson WC, Stegen JC (2015) The reduced genomes of Parcubacteria (OD1) contain signatures of a symbiotic lifestyle *Frontiers in microbiology* 6:713
- Neves C, da Costa MS, Santos H (2005) Compatible solutes of the hyperthermophile *Palaeococcus ferrophilus*: osmoadaptation and thermoadaptation in the order thermococcales *Appl Environ Microbiol* 71:8091-8098 doi:10.1128/AEM.71.12.8091-8098.2005
- Opatkiewicz AD, Butterfield DA, Baross JA (2009) Individual hydrothermal vents at Axial Seamount harbor distinct subseafloor microbial communities *FEMS microbiology ecology* 70:413-424 doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00747.x
- Osowski DM, Jung J-H, Seo D-H, Park C-S, Holden JF (2011) Production of Hydrogen from α -1,4- and β -1,4-Linked Saccharides by Marine Hyperthermophilic Archaea *Applied and Environmental Microbiology* 77:3169-3173 doi:10.1128/AEM.01366-10
- Pagé A, Tivey MK, Stakes DS, Reysenbach A-L (2008) Temporal and spatial archaeal colonization of hydrothermal vent deposits *Environmental microbiology* 10:874-884 doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01505.x
- Panja AS, Bandopadhyay B, Maiti S (2015) Protein Thermostability Is Owing to Their Preferences to Non-Polar Smaller Volume Amino Acids, Variations in Residual Physico-Chemical Properties and More Salt-Bridges *PLOS ONE* 10:e0131495 doi:10.1371/journal.pone.0131495
- Parte AC (2018) LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net),

- 20 years on International journal of systematic and evolutionary microbiology 68:1825-1829 doi:10.1099/ijsem.0.002786
- Pawar SS, Niel EWJv (2013) Thermophilic biohydrogen production: how far are we? Applied Microbiology and Biotechnology 97:7999-8009 doi:10.1007/s00253-013-5141-1
- Perner M, Petersen JM, Zielinski F, Gennerich H-H, Seifert R (2010) Geochemical constraints on the diversity and activity of H₂-oxidizing microorganisms in diffuse hydrothermal fluids from a basalt-and an ultramafic-hosted vent FEMS microbiology ecology 74:55-71
- Petersen JM et al. (2011) Hydrogen is an energy source for hydrothermal vent symbioses Nature 476:176-180 doi:nature10325 [pii] 10.1038/nature10325
- Pillot G, Frouin E, Pasero E, Godfroy A, Combet-Blanc Y, Davidson S, Liebgott P-P (2018) Specific enrichment of hyperthermophilic electroactive Archaea from deep-sea hydrothermal vent on electrically conductive support Bioresource Technology 259:304-311 doi:10.1016/j.biortech.2018.03.053
- Pley U, Schipka J, Gambacorta A, Jannasch HW, Fricke H, Rachel R, Stetter KO (1991) *Pyrodictium abyssi* sp. nov. represents a novel heterotrophic marine archaeal hyperthermophile growing at 110 C Systematic and applied microbiology 14:245-253
- Prieur D, Erauso G, Jeanthon C (1995) Hyperthermophilic life at deep-sea hydrothermal vents Planetary and Space Sciences 43:115-122
- Rahman RN, Fujiwara S, Nakamura H, Takagi M, Imanaka T (1998a) Ion pairs involved in maintaining a thermostable structure of glutamate dehydrogenase from a hyperthermophilic archaeon Biochemical and Biophysical Research Communications 248:920-926 doi:10.1006/bbrc.1998.8933
- Rahman RN, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T (1998b) Sequence analysis of glutamate dehydrogenase (GDH) from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. KOD1 and comparison of the enzymatic characteristics of native and recombinant GDHs Molecular & general genetics: MGG 257:338-347
- Rattray JE et al. (2008) Ladderane lipid distribution in four genera of anammox bacteria Archives of Microbiology 190:51-66 doi:10.1007/s00203-008-0364-8
- Reveillaud J et al. (2016) Subseafloor microbial communities in hydrogen-rich vent fluids from hydrothermal systems along the Mid-Cayman Rise Environmental microbiology 18:1970-1987
- Reysenbach AL, Longnecker K, Kirshtein J (2000) Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent Appl Environ Microbiol 66:3798-3806
- Rinke C et al. (2013) Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter Nature 499:431
- Rinker KD, Kelly RM (1996) Growth Physiology of the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis*: Development of a Sulfur-Free Defined Medium, Characterization of an Exopolysaccharide, and Evidence of Biofilm Formation Applied and Environmental Microbiology 62:4478-4485
- Ritossa F (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila Experientia 18:571-573 doi:10.1007/BF02172188
- Robb FT, Clark DS (1999) Adaptation of proteins from hyperthermophiles to high pressure and high temperature Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 1:101- 105
- Robinson-Rechavi M, Alibés A, Godzik A (2006) Contribution of electrostatic interactions, compactness and quaternary structure to protein thermostability: lessons from

- structural genomics of *Thermotoga maritima* *Journal of molecular biology* 356:547-557 doi:10.1016/j.jmb.2005.11.065
- Ronimus RS, Reysenbach A, Musgrave DR, Morgan HW (1997) The phylogenetic position of the *Thermococcus* isolate AN1 based on 16S rRNA gene sequence analysis: a proposal that AN1 represents a new species, *Thermococcus zilligii* sp. nov *Archives of Microbiology* 168:245-248
- Roussel EG, Sauvadet A-L, Chaduteau C, Fouquet Y, Charlou J-L, Prieur D, Cambon Bonavita M-A (2009) Archaeal communities associated with shallow to deep seafloor sediments of the New Caledonia Basin *Environmental microbiology* 11:2446-2462 doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01976.x
- Roussel, E. G., C. Konn, J. L. Charlou, J. P. Donval, Y. Fouquet, J. Querellou, D. Prieur, and M.-A. Cambon-Bonavita. (2011). Comparison of microbial communities associated with three Atlantic ultramafic hydrothermal systems. *FEMS Microbiology Ecology* 77:647-655.
- Russ L 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. doi: 210.3389/fmicb.2013.00219 doi:10.3389/fmicb.2013.00219
- Saiki RK et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase *Science (New York, NY)* 239:487-491
- Santos H, Lamosa P, Borges N, Gonçalves LG, Pais T, Rodrigues MV (2011) Organic Compatible Solutes of Prokaryotes that Thrive in Hot Environments: The Importance of Ionic Compounds for Thermostabilization. In: *Extremophiles Handbook*. Springer, Tokyo, pp 497-520
- Schäfer T, Xavier KB, Santos H, Schönheit P (1994) Glucose fermentation to acetate and alanine in resting cell suspensions of *Pyrococcus furiosus*: Proposal of a novel glycolytic pathway based on ¹³C labelling data and enzyme activities *FEMS Microbiology Letters* 121:107-114
- Schrenk MO, Kelley DS, Bolton SA, Baross JA (2004) Low archaeal diversity linked to seafloor geochemical processes at the Lost City Hydrothermal Field, Mid-Atlantic Ridge *Environmental Microbiology* 6:1086-1095
- Schrenk MO, Kelley DS, Delaney JR, Baross JA (2003) Incidence and diversity of microorganisms within the walls of an active deep-sea sulfide chimney *Applied and Environmental Microbiology* 69:3580-3592
- Schut GJ, Boyd ES, Peters JW, Adams MWW (2013) The modular respiratory complexes involved in hydrogen and sulfur metabolism by heterotrophic hyperthermophilic archaea and their evolutionary implications *FEMS microbiology reviews* 37:182-203 doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00346
- Schut GJ, Lipscomb GL, Han Y, Notey JS, Kelly RM & Adams MMW (2014) The Order Thermococcales and the Family Thermococcaceae. *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*, (Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E & Thompson F, eds.), pp. 363-383. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Scott J, Breier J, Luther G, Emerson D (2015) Microbial Iron Mats at the Mid-Atlantic Ridge and Evidence that Zetaproteobacteria May Be Restricted to Iron-Oxidizing Marine Systems *Plos One* 10 doi:10.1371/journal.pone.0119284
- Shionoya T et al. (2018) High Thermal Stability of Oligomeric Assemblies of Thermophilic Rhodopsin in a Lipid Environment *The Journal of Physical Chemistry B* 122:6945-6953 doi:10.1021/acs.jpcc.8b04894
- Singer E et al. (2011) *Mariprofundus ferrooxydans* PV-1 the First Genome of a Marine Fe(II)

- Slobodkin A, Campbell B, Cary SC, Bonch-Osmolovskaya EA, Jeanthon C (2001) Evidence for the presence of thermophilic Fe(III)-reducing microorganisms in deep-sea hydrothermal vents at 13°N (East Pacific Rise) *FEMS Microbiology Ecology* 36:235- 243
- Slobodkin AI, Reysenbach AL, Slobodkina GB, Baslerov RV, Kostrikina NA, Wagner ID, Bonch-Osmolovskaya EA (2012) *Thermosulfurimonas dismutans* gen. nov., sp. nov., an extremely thermophilic sulfur-disproportionating bacterium from a deep-sea hydrothermal vent *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 62:2565-2571 doi:10.1099/ijs.0.034397-0.
- Slobodkin AI, Reysenbach AL, Slobodkina GB, Kolganova TV, Kostrikina NA, Bonch-Osmolovskaya EA (2013) *Dissulfuribacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, autotrophic, sulfur-disproportionating, deeply branching deltaproteobacterium from a deep-sea hydrothermal vent *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 63:1967-1971 doi:10.1099/ijs.0.046938-0
- Slobodkin AI, Slobodkina GB, Panteleeva AN, Chernyh NA, Novikov AA, Bonch-Osmolovskaya EA (2016) *Dissulfurimicrobium hydrothermale* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, autotrophic, sulfur-disproportionating deltaproteobacterium isolated from a hydrothermal pond *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 66:1022-1026 doi:10.1099/ijsem.0.000828
- Slobodkina GB, Baslerov RV, Novikov AA, Viryasov MB, Bonch-Osmolovskaya EA, Slobodkin AI (2016) *Inmirania thermothiophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, facultatively autotrophic, sulfur-oxidizing gammaproteobacterium isolated from a shallow-sea hydrothermal vent *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 66:701-706 doi:10.1099/ijsem.0.000773
- Slobodkina GB, Kolganova TV, Querellou J, Bonch-Osmolovskaya EA, Slobodkin AI (2009) *Geoglobus acetivorans* sp. nov., an iron(III)-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2880-2883 doi:10.1099/ijs.0.011080-0
- Slobodkina GB, Mardanov AV, Ravin NV, Frolova AA, Chernyh NA, Bonch-Osmolovskaya EA, Slobodkin AI (2017) Respiratory Ammonification of Nitrate Coupled to Anaerobic Oxidation of Elemental Sulfur in Deep-Sea Autotrophic Thermophilic Bacteria *Front Microbiol* 8:87 doi:10.3389/fmicb.2017.00087
- Sokolova T et al. (2001) *Carboxydobrachium pacificum* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, CO-utilizing marine bacterium from Okinawa Trough *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 51:141-149
- Sokolova TG, Jeanthon C, Kostrikina NA, Chernyh NA, Lebedinsky AV, Stackebrandt E, Bonch-Osmolovskaya EA (2004) The first evidence of anaerobic CO oxidation coupled with H₂ production by a hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent *Extremophiles* 8:317-323 doi:10.1007/s00792-004-0389-0
- Soppa J (2006) From genomes to function: haloarchaea as model organisms *Microbiology* 152:585-590 doi:10.1099/mic.0.28504-0
- Spang A, Caceres EF, Ettema TJ (2017) Genomic exploration of the diversity, ecology, and evolution of the archaeal domain of life *Science* 357:eaaf3883
- Sriswasdi S, Yang CC, Iwasaki W (2017) Generalist species drive microbial dispersion and evolution *Nat Commun* 8:1162 doi:10.1038/s41467-017-01265-1
- Steen IH et al. (2016) Novel barite chimneys at the Loki's castle vent field shed light on key factors shaping microbial communities and functions in hydrothermal systems *Frontiers in microbiology* 6:1510

- Stetter KO et al. (1993) Hyperthermophilic archaea are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs *Nature* 365:743-745 doi:10.1038/365743a0
- Susanti D, Frazier MC & Mukhopadhyay B (2019) A Genetic System for Methanocaldococcus jannaschii: An Evolutionary Deeply Rooted Hyperthermophilic Methanarchaeon. *Frontiers in Microbiology* 10. doi.org/10.3389/fmicb.2019.01256
- Takai K et al. (2005) Enzymatic and Genetic Characterization of Carbon and Energy Metabolisms by Deep-Sea Hydrothermal Chemolithoautotrophic Isolates of Epsilonproteobacteria *Applied and Environmental Microbiology* 71:7310-7320 doi:10.1128/AEM.71.11.7310-7320.2005
- Takai K, Horikoshi K (1999) Genetic Diversity of Archaea in Deep-Sea Hydrothermal Vent Environments *Genetics* 152:1285-1297
- Takai K, Inoue A, Horikoshi K (2002) Methanothermococcus okinawensis sp. nov., a thermophilic, methane-producing archaeon isolated from a Western Pacific deep-sea hydrothermal vent system *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 52:1089-1095
- Takai K, Komatsu T, Inagaki F, Horikoshi K (2001) Distribution of archaea in a black smoker chimney structure *Applied and Environmental Microbiology* 67:3618-3629
- Thangakani AM, Kumar S, Velmurugan D, Gromiha MSM (2012) How do thermophilic proteins resist aggregation? *Proteins* 80:1003-1015 doi:10.1002/prot.24002
- Thauer RK, Jungermann K, Decker K (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria *Bacteriological Reviews* 41:100-180
- Thiel A, Michoud G, Moalic Y, Flament D, Jebbar M (2014) Genetic Manipulations of the Hyperthermophilic Piezophilic Archaeon *Thermococcus barophilus* *Appl Environ Microbiol* 80:2299-2306 doi:10.1128/AEM.00084-14AEM.00084-14 [pii]
- Tor JM, Kashefi K, Lovley DR (2001) Acetate oxidation coupled to Fe(III) reduction in hyperthermophilic microorganisms *Applied and Environmental Microbiology* 67:1363-1365
- Tor JM, Lovley DR (2001) Anaerobic degradation of aromatic compounds coupled to Fe(III) reduction by *Ferroglobus placidus* *Environmental Microbiology* 3:281-287
- Trent JD, Gabrielsen M, Jensen B, Neuhard J, Olsen J (1994) Acquired thermotolerance and heat shock proteins in thermophiles from the three phylogenetic domains *Journal of Bacteriology* 176:6148-6152
- Usui K, Yoshida T, Maruyama T, Yohda M (2001) Small heat shock protein of a hyperthermophilic archaeum, *Thermococcus* sp. strain KS-1, exists as a spherical 24 mer and its expression is highly induced under heat-stress conditions *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92:161-166
- Van Kessel MAHJ et al. (2015) Complete nitrification by a single microorganism *Nature* 528:555 doi:10.1038/nature16459
<https://www.nature.com/articles/nature16459-supplementary-information>
- Vander Roost J, Thorseth IH, Dahle H (2017) Microbial analysis of Zetaproteobacteria and co-colonizers of iron mats in the Troll Wall Vent Field, Arctic Mid-Ocean Ridge *Plos One* 12 doi:ARTN e018500810.1371/journal.pone.0185008
- Van Der Oost J, Schut G, Kengen SW, Hagen WR, Thomm M et al (1998) The ferredoxin-dependent conversion of glyceraldehyde-3-phosphate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* represents a novel site of glycolytic regulation. *The Journal of Biological Chemistry* 273:28149-28154
- Verhaart MR, Bielen AA, van der Oost J, Stams AJ, Kengen SW (2010) Hydrogen production by hyperthermophilic and extremely thermophilic bacteria and archaea: mechanisms for

- reductant disposal Environ Technol 31:993-1003
doi:10.1080/09593331003710244
- Verhees CH, Kengen SW, Tuininga JE, Schut GJ, Adams MW, De Vos WM, Van Der Oost J (2003) The unique features of glycolytic pathways in Archaea Biochem J 375:231-246
doi:10.1042/BJ20021472
- Vetriani C, Speck MD, Ellor SV, Lutz RA, Starovoytov V (2004) *Thermovibrio ammonificans* sp. nov., a thermophilic, chemolithotrophic, nitrate-ammonifying bacterium from deep-sea hydrothermal vents International journal of systematic and evolutionary microbiology 54:175-181 doi:10.1099/ijs.0.02781-0
- Vetriani C, Voordeckers JW, Crespo-Medina M, O'Brien CE, Giovannelli D, Lutz RA (2014) Deep-sea hydrothermal vent Epsilonproteobacteria encode a conserved and widespread nitrate reduction pathway (Nap) ISME J 8:1510-1521 doi:10.1038/ismej.2013.246
- Waite DW et al. (2017) Comparative Genomic Analysis of the Class Epsilonproteobacteria and Proposed Reclassification to Epsilonbacteraeota (phyl. nov.) Front Microbiol 8:682
doi:10.3389/fmicb.2017.00682
- Wegener G, Krukenberg V, Riedel D, Tegetmeyer HE, Boetius A (2015) Intercellular wiring enables electron transfer between methanotrophic archaea and bacteria Nature 526:587 doi:10.1038/nature15733
<https://www.nature.com/articles/nature15733-supplementary-information>
- Wrighton KC et al. (2012) Fermentation, hydrogen, and sulfur metabolism in multiple uncultivated bacterial phyla Science 337:1661-1665
- Xavier KB, Peist R, Kossmann M, Boos W, Santos H (1999) Maltose Metabolism in the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis*: Purification and Characterization of Key Enzymes Journal of Bacteriology 181:3358-3367
- Zaitseva SV, Lavrentieva EV, Radnagurueva AA, Baturina OA, Kabilov MR, Barkhutova DD (2017) Distribution of Acetothermia-dominated microbial communities in alkaline hot springs of Baikal Rift Zone PeerJ Preprints 5:e3492v3491
- Zhang Y, Li X, Bartlett DH, Xiao X (2015) Current developments in marine microbiology: high-pressure biotechnology and the genetic engineering of piezophiles Curr Opin Biotechnol 33:157-164 doi:10.1016/j.copbio.2015.02.013
- Zillig W et al. (1987) *Pyrococcus woesei*, sp. nov., an ultra-thermophilic marine archaeobacterium, representing a novel order, Thermococcales Systematic and Ap

Titre : Dynamique spatiale et temporelle des communautés microbiennes dans les édifices hydrothermaux actifs

Mots clés : Sources hydrothermales, communautés microbiennes, *Persephonella*

Résumé : Dans les sources hydrothermales océaniques profondes, le mélange du fluide hydrothermal chaud, acide et anoxique avec l'eau de mer froide et oxygénée provoque la formation de cheminées hydrothermales. Il s'agit de structures poreuses dont la composition minéralogique évolue au cours du temps. Les gradients thermiques et chimiques sont propices à la croissance de communautés microbiennes, qui présentent une forte diversité taxonomique, physiologique et métabolique. Malgré les nombreuses études portant sur la microbiologie de ces environnements, la dynamique spatiale et temporelle des communautés microbiennes des cheminées hydrothermales reste encore peu connue. Notre étude a été basée sur un échantillonnage rigoureux de cheminées hydrothermales de six sites du champ hydrothermal Lucky Strike, et du panache proximal associé

La composition minéralogique des cheminées hydrothermales, déterminée par diffraction aux rayons X, a permis d'estimer le stade de maturation des cheminées. Des approches complémentaires ont été mises en place pour étudier et comparer les communautés microbiennes des cheminées et du panache proximal. La diversité phylogénétique et la structure de ces communautés a été étudiée par une approche de metabarcoding, et des informations fonctionnelles ont été obtenues en réalisant des cultures en continu en bioréacteur, des enrichissements MPN ainsi que des mesures d'activité métabolique. Une souche appartenant au genre *Persephonella* a également été isolée et décrite et son adaptation à l'environnement hydrothermal a été montrée.

Title : Spatial and temporal dynamics of microbial communities in active hydrothermal vents

Keywords : Hydrothermal vents, microbial communities, *Persephonella*

Abstract : In deep-sea hydrothermal vents, the mixing between hot, acidic and anoxic hydrothermal fluid with seawater leads to the formation of hydrothermal chimneys. These are porous structures whose mineralogical composition changes over time. Thermal and chemical gradients are favourable to the growth of microbial communities, that present a high taxonomic, physiologic and metabolic diversity. Despite numerous studies about the microbiology of hydrothermal environments, the spatial and temporal dynamics of microbial communities in hydrothermal vents remain relatively unknown. Our study was based on a rigorous sampling of hydrothermal chimneys from six sites in the Lucky Strike hydrothermal vent field, and the associated proximal plume.

The mineralogical composition of hydrothermal chimneys, determined by X-ray diffraction, was used to estimate the growth stage of the chimneys. Complementary approaches were implemented to study and compare the microbial communities in chimneys and proximal plume. The phylogenetic diversity and the structure of these communities was studied by a metabarcoding approach, and functional information were obtained by realizing continuous cultures in bioreactor, MPN enrichments and metabolic activities measurements. A strain of the genus *Persephonella* was isolated and described. The investigation of its physiological and metabolic capacities has highlighted its adaptation to the hydrothermal environment