



HAL
open science

Aspects physiologiques et écologiques des Methanomassiliicoccales dans des environnements terrestres et aquatiques

Marc Cozannet

► **To cite this version:**

Marc Cozannet. Aspects physiologiques et écologiques des Methanomassiliicoccales dans des environnements terrestres et aquatiques. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2021. Français. NNT : 2021BRES0023 . tel-03610539

HAL Id: tel-03610539

<https://theses.hal.science/tel-03610539v1>

Submitted on 16 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

Marc COZANNET

**Aspects physiologiques et écologiques des *Methanomassiliicoccales*
dans des environnements terrestres et aquatiques**

Thèse présentée et soutenue à Plouzané, le 30 Mars 2021

Unité de recherche : Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (UMR 6197)

Rapporteurs avant soutenance :

Patricia BONIN
Directrice de recherche CNRS, MEB, MIO Marseille

Jean-François BRUGERE
Maître de conférences, LMGE, Université Clermont Auvergne

Composition du Jury :

Gwenaëlle LE BLAY (Présidente du jury)
Professeure, LEMAR, Université de Bretagne Occidentale

Patricia BONIN (Rapporteuse)
Directrice de recherche CNRS, MEB, MIO Marseille

Jean-François BRUGERE (Rapporteur)
Maître de conférences, LMGE, Université Clermont Auvergne

Robert DURAN (Examinateur)
Professeur, IPREM, Université de Pau et des Pays de l'Adour

Karine ALAIN (Directrice de thèse)
Chargée de Recherche, LM2E, CNRS Brest

Laurent TOFFIN (Co-directeur de thèse)
Chargé de Recherche, LM2E, Ifremer Plouzané

Invité

Guillaume BORREL
Chercheur, MIM, Institut Pasteur Paris

Remerciements

Je remercie la Région Bretagne et l'École Doctorale des Sciences de la Mer et du Littoral pour avoir contribué au financement de cette thèse. Ce travail de recherche a été mené au sein du Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (Technopôle Brest-Iroise, Plouzané) dont je tiens à remercier Mohamed Jebbar, directeur, pour son accueil et ses conseils tout au long de ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux rapporteurs et aux examinateurs qui ont accepté de participer à l'évaluation de ce travail de thèse.

Ce travail a été encadré par Karine Alain et Laurent Toffin. Karine, merci de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail sous ta direction. Ces dernières années ont été un réel plaisir tant professionnel que personnel. Je te remercie encore pour ton écoute, la confiance que tu m'as accordée, tes conseils et tes encouragements, tout au long de ce travail. Laurent, merci pour ton regard critique et constructif tout au long de mon travail.

J'exprime également ma reconnaissance aux membres de mon Comité de Suivi Individuel pour avoir accepté d'évaluer ces travaux au fil des ans, pour leurs regards critiques, leur bienveillance et leur disponibilité.

Je tiens également à remercier Marc Le Romancer (Maître de conférences à l'UBO) pour m'avoir initié à l'enseignement, et, plus généralement, de m'avoir fait découvrir la mycologie.

Un grand merci à Yann Moalic, pour son aide cruciale dans la mise en place des analyses en réseaux. Mais également pour ses conseils et les diverses discussions enrichissantes tant professionnelles que personnelles que nous avons eues. Pour son humour acidulé aussi. Bon courage à toi pour la suite.

Je tiens également à exprimer toute ma gratitude à Erwan Roussel, pour son soutien technique au niveau des chromatographies (gazeuses et ioniques), mais aussi pour son regard critique et sa bienveillance tout au long de ce travail de thèse.

Merci à Sophie Mieszkin (que je n'oublie pas) pour sa bienveillance, ses conseils et les nombreuses discussions enrichissantes que nous avons eues. Au plaisir de te revoir et de partager un repas à l'occasion !

Un grand merci tout particulier à Amandine, ma stagiaire, pour son travail de qualité... et ses excellentes tartes au citron meringuées ! Bon courage à toi pour la suite.

Merci également à Xavier Philippon et Ludovic Stéphan (UMR CNRS 6521 Chimie, électrochimie moléculaires et chimie analytique, UBO) pour leurs aides techniques et leur curiosité à l'égard de mon sujet de thèse. Merci également à Guillaume Lannuzel pour son soutien technique en biologie moléculaire.

Un grand merci à Erwann (avec deux « n ») Vince pour sa bonne humeur communicative et inoxydable, et son soutien logistique au laboratoire... Mais également pour ses petites manies parfois très drôles, parfois moins (le chauffage sacrebleu !).

Je remercie Stéphanie Renard (et son flamant rose), pour son soutien administratif et logistique, sa disponibilité, et sa grande gentillesse.

Je tiens également à remercier Isabelle Bozec, Myriam Georges, Nadège Quintin, Raphaël Brizard, Stéphane L'Haridon et Valérie Cueff-Gauchard pour leur soutien logistique et technique, et tout simplement pour leur sympathie et bienveillance.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des chercheurs du laboratoire pour leur sympathie, leur disponibilité ainsi que pour leur regard critique lors des différentes journées des Doc'.

Je remercie bien évidemment l'ensemble des doctorants, post-doctorants et anciens du laboratoire, qui m'ont accompagné tout au long de mon stage de Master II et de ma thèse.

Un remerciement sincère à Ashley (French citizen within 3 years ?), Blandine (de la maison Gryffondor, porteuse de l'anneau unique), Clarisse (et sa boisson douteuse à base de pommes normandes), Coraline (et ses conseils avisés), Damien (et ses tuto), David (et son efficacité à toute épreuve), Élodie (et sa détermination), Florian (et ses blagues à tomber par terre, à mourir de rire), Gaëlle (et sa newsletter), Jie (et son hot pot), Jordan (et sa pizza au caviar), Kévin (et Robin), Marion (et ses symbiontes), Marion (et ses PHAs), Maurane (et sa newsletter), Maxime (Четырехлистный

клевер), Morgane (et son excellent regard critique), Pierre (et ses crevettes), Sabrina (et ses échantillons), Sarah (encore une fois : bien le bonjour !), Sébastien (doctorant émérite *ad vitam æternam*), Simon (un pokémon sauvage furtif), Steven (et ses « petits » plats), Thiphaine (et ses Thermoc'), Yang (et sa bonne humeur communicative !). Merci également à Francis et Johan. J'adresse un bon vent aux petits nouveaux.

Mes remerciements vont également aux nombreuses autres personnes que j'ai pu côtoyer au cours de toutes ces années passées au laboratoire.

J'adresse également mes remerciements à mes proches, hors du laboratoire, pour leur soutien et leur présence à mes côtés depuis tant d'années.

A mes parents tout d'abord. Vous m'avez toujours soutenu. Je ne vous remercierai jamais assez pour tous les sacrifices auxquels vous avez consenti pour me voir arriver là où j'en suis. Merci.

A ma sœur également. Merci d'être là. J'espère que tu feras toujours ce qui t'épanouiras et que tu voyageras autant que tu le souhaites. Je suis fier de toi.

A mes grands-parents, merci pour tous les moments de joie que vous m'avez offert durant ma prime jeunesse. J'aurais voulu être plus présent à vos côtés ces dernières années.

A mes cousins et cousines, à mes oncles et tantes. A Éric.

A mes amis de longue date également. Ne souhaitant pas écrire une trentaine de pages à votre propos, je me contenterai de vous citer. Sachez toutefois que le cœur y était : Anaëlle, Anna, Arthur, Clément, Colin, Maele, Matthieu et Sarah. A tous ceux que je ne peux citer, faute de place.

Enfin, à Christophe Destombe et Myriam Valéro pour m'avoir accompagné dans mon parcours scientifique depuis mes débuts. Pour leur incroyable gentillesse et générosité.

La seule révolution possible, c'est d'essayer de s'améliorer soi-même,
en espérant que les autres fassent la même démarche.

Le monde ira mieux alors.

– Georges Brassens

Table des matières

Introduction bibliographique	1
1. Le méthane	2
a) Généralités	2
b) Impacts du méthane à l'échelle globale	3
c) Sources de méthane atmosphérique	5
d) Dégradation et séquestration de méthane.....	7
2. Evolution des connaissances sur la diversité des archées	13
3. Diagenèse précoce et dégradation de la matière organique	20
a) Diagenèse abiotique de la matière organique.....	20
b) Dépolymérisation de la MO et zonations.....	22
c) Etapes de dégradation biotique et anaérobie de la matière organique	23
d) Origines des différents substrats de la méthanogenèse	29
4. Interactions entre les archées méthanogènes et d'autres microorganismes	32
a) Compétition pour l'accès aux substrats	32
b) Interactions avec des bactéries oxydant l'acétate.....	35
c) Interactions avec des bactéries anaérobies productrices obligatoires d'hydrogène	35
d) Exemples de transferts d'électrons entre microorganismes	36
e) Interactions entre des <i>Protozoa</i> et des archées méthanogènes en milieu digestif.....	37
5. Les archées méthanogènes	38
a) Distribution environnementale des archées méthanogènes et paramètres structurant cette distribution	38
b) Biochimie et énergétique de la méthanogenèse	39
c) Diversité phylogénétique chez les archées méthanogènes.....	50
6. Hypothèses sur les origines de la méthanogenèse.....	61
7. Les <i>Methanomassiliicoccales</i>	64
a) Aspects historiques	64
b) Phylogénie, taxonomie et écologie des <i>Methanomassiliicoccales</i>	65
c) Métabolisme des <i>Methanomassiliicoccales</i>	72
d) Ultrastructure et lipides membranaires	79
e) Vers de potentielles applications médicales ?.....	84
Objectifs de l'étude	89
Chapitre I : Étude intégrée des <i>Methanomassiliicoccales</i> en contexte non digestif : Aspects physiologiques et écologiques des <i>Methanomassiliicoccales</i> dans des environnements terrestres et aquatiques.....	95
Chapitre II : Travaux supplémentaires	157
1. Quantification des bactéries et archées totales dans les échantillons environnementaux et les mésocosmes.....	158

2. Tentatives d'isolement d'une souche de <i>Methanomassiliicoccales</i> par une approche d'étalement sur milieu gélosé	161
a) Procédure expérimentale.....	161
b) Résultats des tentatives d'isolement.....	164
3. Criblage moléculaire ciblant les <i>Methanomassiliicoccales</i> à partir de matrices digestives où leur présence n'est pas documentée	168
Discussion générale, perspectives et conclusion	172
Activités annexes aux travaux de thèse	184
Bibliographie	189

Liste des figures

Introduction bibliographique

FIGURE 1 : REPRESENTATION TRIDIMENSIONNELLE D'UNE MOLECULE DE METHANE (CH ₄)	2
FIGURE 2 : GRAVURE DU XVII ^{EME} SIECLE REPRISE PAR WOLFE (1993) ET DECRIVANT LA CELEBRE EXPERIENCE DE VOLTA.	2
FIGURE 3 : ESTIMATIONS DU FR DU CLIMAT POUR LA PERIODE ALLANT DE 1750 A 2011.	4
FIGURE 4 : CONCENTRATION MOYENNE DU CH ₄ ATMOSPHERIQUE ET SON RATIO ANNUEL.	55
FIGURE 5 : ESTIMATIONS DU BUDGET EN METHANE ATMOSPHERIQUE A L'ECHELLE GLOBALE.	6
FIGURE 6 : MICROPHOTOGRAPHIES D'UN TAPIS (A) ET D'AGREGATS (B & C) MICROBIENS.	9
FIGURE 7 : DISTRIBUTION ET SOURCES DE METHANE AU NIVEAU DES PERGELISOLS.	11
FIGURE 8 : REPARTITION ET SOURCES DES DIFFERENTS RESERVOIRS DE METHANE.	12
FIGURE 9 : EVOLUTION DES RECONSTRUCTIONS PHYLOGENETIQUES DANS LE TEMPS.	16
FIGURE 10 : EVOLUTION DU NOMBRE DE SEQUENCES GENOMIQUES ET D'ESPECES ARCHEENNES FORMELLEMENT DECRITES.	17
FIGURE 11 : ARBRE PHYLOGENOMIQUE DES <i>ARCHAEA</i>	18
FIGURE 12 : ARBRE PHYLOGENOMIQUE DES <i>ARCHAEA</i>	19
FIGURE 13 : EXEMPLE D'EVOLUTION DES CONCENTRATIONS DE METABOLITES MICROBIENS DANS UN CONTEXTE SEDIMENTAIRE PROFOND EN FONCTION DE LA PROFONDEUR ET DE LA TEMPERATURE [...].	22
FIGURE 14 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE ET IDEALISEE DES DIFFERENTES ZONATIONS BIOGEOCHIMIQUES DANS LEQUEL LA METHANOGENESE PEUT SE PRODUIRE, DANS UN CONTEXTE DE SEDIMENTS MARINS.	23
FIGURE 15 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES ETAPES DE DEGRADATION DE LA MO DANS UN CADRE IDEALISE.	24
FIGURE 16 : SCHEMA ILLUSTRANT L'ORIGINE ET L'UTILISATION DE COMPOSES AROMATIQUES METHOXYLES.	32
FIGURE 17 : EFFET DE LA PRESSION PARTIELLE EN H ₂ (P _{H₂}) SUR LES ENERGIES LIBRES DE LA METHANOGENESE, DE LA SULFATO-REDUCTION ET DE L'HOMOACETOGENESE.	34
FIGURE 18 : PRINCIPALES VOIES DE TRANSFERT D'ELECTRONS ENTRE CELLULES.	37
FIGURE 19 : REPARTITION ENVIRONNEMENTALE DES ARCHEES METHANOGENES.	38
FIGURE 20 : FORMULES DES PRINCIPAUX COENZYMES IMPLIQUES DANS LA METHANOGENESE.	40
FIGURE 21 : SCHEMA REPRESENTANT LES DIFFERENTES VOIES DE METHANOGENESE.	41
FIGURE 22 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PROCESSUS DE REDUCTION DU CoM-S-S-CoB EN PRESENCE D'H ₂ PAR LE COMPLEXE MVHADG-HDRABC.	43
FIGURE 23 : VOIES DE CONSERVATION DE L'ENERGIE CHEZ <i>METHANOSARCINA BARKERI</i> ET <i>METHANOSARCINA ACETIVORANS</i>	44
FIGURE 24 : SCHEMAS DECRIVANT LES DIFFERENTES ETAPES DE L'INCORPORATION DES COMPOSES METHYLES DANS LA VOIE DE METHANOGENESE METHYLOTROPHE CHEZ LES <i>METHANOSARCINA SPP</i>	46
FIGURE 25 : BIOSYNTHESE DE LA PYRROLYSINE ET METHYLTRANSFERASE MtMBC.	47
FIGURE 26 : ARBRE PHYLOGENOMIQUE METTANT EN LUMIERE LES LIGNEES RENFERMANT LES GENES FONCTIONNELS MCR ET MCR-« LIKE ».	51
FIGURE 27 : STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE LA METHYLE-COENZYME M (DE TYPE III) DE <i>METHANOTHERMOCOCCUS THERMOLITHOTROPHICUS</i> (<i>METHANOCOCCALES</i>).	52

FIGURE 28 : MICROPHOTOGRAPHIES ILLUSTRANT UN OU PLUSIEURS REPRESENTANTS DE CHAQUE LIGNEE D'ARCHEES METHANOGENES POSSEDANT AU MOINS UN REPRESENTANT ISOLE EN CULTURE CLONALE.....	53
FIGURE 29 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'EVOLUTION DE LA METHANOGENESE.	64
FIGURE 30 : DETAIL DE LA POSITION PHYLOGENETIQUE DES <i>METHANOMASSILIICOCALES</i> AU SEIN DES <i>DIAFORARCHAEA</i> , UNE SUPER-CLASSE DES <i>EURYARCHAEOTA</i>	66
FIGURE 31 : ARBRES PHYLOGENETIQUES MONTRANT LA RELATION ENTRE LES SEQUENCES DES GENES CODANT LES ARNr 16S (A GAUCHE) ET CELLES CODANT LES MCRA (<i>MCRA</i>) (A DROITE) CHEZ LES <i>METHANOMASSILIICOCALES</i>	67
FIGURE 32 : VOIE DE METHANOGENESE ET CONSERVATION DE L'ENERGIE CHEZ LES <i>METHANOMASSILIICOCALES</i> (A GAUCHE).	74
FIGURE 33 : ARBRE PHYLOGENETIQUE DES SEQUENCES DES GENES CODANT LES MTAA ET MTBA CHEZ PLUSIEURS ARCHEES METHANOGENES..	77
FIGURE 34 : STRUCTURES SECONDAIRES DES P ^{YL} ARNt CHEZ <i>MMC. LUMINYENSIS</i> , <i>METHANOSARCINA BARKERI</i> , <i>D. HAFRIENSE</i> , <i>Ca. 'MM. ALVUS'</i> , ET <i>Ca. 'MMC. INTESTINALIS'</i>	79
FIGURE 35 : MICROPHOTOGRAPHIES DE QUELQUES <i>METHANOMASSILIICOCALES</i> PRISES AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (MET).	81
FIGURE 36 : STRUCTURES MOLECULAIRES DES PRINCIPAUX LIPIDES RETROUVES DANS LES MEMBRANES DE <i>MMC. LUMINYENSIS</i>	83
FIGURE 37 : ORIGINES DE LA TMA INTESTINALE, DEVENIR ET CONCEPT D'ARCHEBIOTIQUE.....	85
FIGURE 38 : APPROCHES BIOTECHNOLOGIQUES VISANT A METTRE AU POINT DES ARCHEBIOTIQUES ET DES SUBSTITUTS BASES SUR DES APPROCHES MOLECULAIRES.....	87

Chapitre I

FIGURE 1 : DISTRIBUTION OF ENVIRONMENTAL SAMPLES SCREENED FOR <i>METHANOMASSILIICOCALES</i>	105
FIGURE 2 : DENDROGRAM SHOWING THE RELATIONSHIPS BETWEEN 16S rRNA GENE SEQUENCES (253 BP) DETECTED IN ENVIRONMENTAL SAMPLES, IN SUBSTRATE-AMENDED SLURRY (PENF SLURRY) [...].	106
FIGURE 3 : (A) CONSUMPTION KINETICS OF METHANOGENESIS SUBSTRATES DURING THE WEEK OF INCUBATION OF THE SUBSTRATE-AMENDED SLURRY PERFORMED WITH PENF SAMPLE [...].	108
FIGURE 4 : MAXIMUM LIKELIHOOD PHYLOGENOMIC TREE (LG + F + G4) SHOWING THE POSITION OF THE TWO <i>METHANOMASSILIICOCALES</i> MAGs OBTAINED IN THIS STUDY (IN GREEN) [...].	110
FIGURE 5 : PREDICTED METABOLIC PATHWAYS FOR METHANOGENESIS, CARBON ASSIMILATION, AND ENERGY CONSERVATION IN <i>Ca. 'METHANO-MASSILIICOCCUS ARMORICUS MXMAG1'</i> [...].	112
FIGURE 6 : CO-OCCURRENCE NETWORK RECONSTRUCTED BASED ON 16S rRNA GENE-SEQUENCING DATA FROM SUBSTRATE-AMENDED SLURRIES (DOUR, PENF, AND MOUG2, RESPECTIVELY) [...].	115
FIGURE 7 : SCHEMATIC DIAGRAM REPRESENTING THE SUBSTRATES AMENDED TO THE ORIGINAL SLURRY IN THE CULTURE-BASED INCUBATION EXPERIMENT PENF [...].	118
FIGURE S1 : TRENDS IN MICROBIAL DIVERSITY REVEALED BY METABARCODING IN DOUR (TOP) AND MOUG2 (BOTTOM) SUBSTRATE-AMENDED SLURRIES, OVER TIME.	147
FIGURE S2 : EVOLUTION OF THE PROKARYOTIC ALPHA-DIVERSITY DURING THE INCUBATION OF THE PENF SAMPLE, IN THE CULTURE-BASED INCUBATION EXPERIMENT.....	148
FIGURE S3 : MICROBIAL DIVERSITY PATTERNS REVEALED BY METABARCODING (16S rRNA GENE COPY NUMBERS) IN THE PENF SUBSTRATE-AMENDED SLURRY OVER TIME.	149
FIGURE S4 : PHYLOGENETIC TREE SHOWING THE RELATIONSHIPS BETWEEN THE TRIMETHYLAMINE METHYLTRANSFERASES (<i>MTTB</i>) SEQUENCES EXTRACTED FROM THE METAGENOME (IN BOLD) [...].	150

FIGURE S5 : CO-OCCURRENCE NETWORK RECONSTRUCTED BASED ON 16S rRNA GENE SEQUENCING DATA FROM BULK ENVIRONMENTAL SAMPLES [...]. 153

Chapitre II

FIGURE 1 : ÉVOLUTION DU NOMBRE DE COPIES DES GENES CODANT LES ARNr 16S DES *METHANOMASSILIICOCCALES* ET DES BACTERIES TOTALES AU COURS DU TEMPS DANS LE SLURRY PENF..... 160

FIGURE 2 : PHOTOGRAPHIES DES AGREGATS MACROSCOPIQUES BLEUTES QUI SE SONT DEVELOPPES A LA SURFACE DE LA GELOSE D'UNE FIOLE DE WOLFE. 164

FIGURE 3 : DENDROGRAMME REPRESENTANT LA RELATION ENTRE LA SEQUENCE DU GENE DE L'ARNr16S REPRESENTATIVE DES *METHANOMASSILIICOCCALES* DETECTEE DANS LES AGREGATS MACROSCOPIQUES [...]. 165

FIGURE 4 : DENDROGRAMME COMPORTANT LES SEQUENCES DE GENES CODANT DES ARNr 16S BACTERIENS PRESENTS DANS LES AGREGATS MACROSCOPIQUES BLEUTES QUI SE SONT DEVELOPPES SUR MILIEUX GELOSES. 167

Liste des tableaux

Introduction bibliographique

TABLEAU 1 : REACTIONS EN CHAÎNE MENANT À LA DÉGRADATION DU MÉTHANE TROPOSPHÉRIQUE.....	8
TABLEAU 2 : ESTIMATIONS DES QUANTITÉS EN CARBONE ET MÉTHANE PIÉGÉES DANS LES HYDRATES DE MÉTHANE, EN GT.....	12
TABLEAU 3 : SUBSTRATS ET REACTIONS DE DÉGRADATION DE LA MÉTHANOGENÈSE.....	27
TABLEAU 4 : EXEMPLES DE CONCENTRATIONS EN DIHYDROGÈNE DANS DIFFÉRENTS HABITATS ANOXIQUES.....	33
TABLEAU 5 : REACTIONS IMPLIQUÉES DANS L'OXYDATION DE L'ACÉTATE (CH ₃ COO ⁻) ET DU MÉTHANE.....	35
TABLEAU 6 : EXEMPLE DE REACTIONS SYNTROPHIQUES ENTRE UNE BACTÉRIE APOH ET UNE ARCHÉE MÉTHANOGENE HYDROGÉNOTROPHE.....	36
TABLEAU 7 : EXEMPLES DE SOUCHES ISOLÉES (EN GRAS) OU DE MAG DE <i>METHANOMASSILIICOCALES</i> AFFILIÉS AUX CLADES FREE-LIVING (EN VERT) OU HOST-ASSOCIATED (EN ROUGE) ACCOMPAGNÉ DE DONNÉES GÉNOMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES.....	69

Chapitre I

TABLEAU 1 : ORIGIN AND MAIN CHARACTERISTICS OF THE ENVIRONMENTAL SAMPLES SELECTED AFTER A PRE-SCREENING MOLECULAR STAGE TARGETING <i>METHANOMASSILIICOCALES</i>	98
TABLEAU S1 : ORIGIN AND LOCATION OF THE 86 ENVIRONMENTAL SAMPLES SCREENED AS A FIRST APPROACH FOR THE RESEARCH OF <i>METHANOMASSILIICOCALES</i>	134
TABLEAU S2 : NUMBER OF 16S rRNA GENE SEQUENCE READS OF THE VARIOUS <i>METHANOMASSILIICOCALES</i> ' OTUs, OTHER METHANOGENS OTUs AND TOTAL PROKARYOTIC OTUs GENERATED BY METABARCODING [...].	137
TABLEAU S3 : LIST OF THE <i>METHANOMASSILIICOCALES</i> 16S rRNA GENE SEQUENCES IDENTIFIED IN THE METAGENOME OF THE CULTURE-BASED EXPERIMENT PENF T8 (8TH WEEK OF INCUBATION) [...].	141
TABLEAU S4 : RESULTS OF THE QUANTIFICATION OF <i>METHANOMASSILIICOCALES</i> BY QPCR IN THE DIFFERENT SAMPLES.....	146
TABLEAU S5 : TAXONOMIC ASSIGNATION OF THE TAXA NON-RANDOMLY ASSOCIATED WITH <i>METHANOMASSILIICOCALES</i> OTUs AND THEIR REPORTED METABOLIC FEATURES, WITHIN THE PENF SUBSTRATE-AMENDED SLURRY.....	151

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique	MMPA : Méthylmercaptopropionate
Acs : Acétyl-CoA synthase	MO : Matière organique
AGAGE : Advanced Global Atmospheric Gases Experiment	MP : Méthanophénazine
AGMLCs : Acides gras à moyennes et longues chaînes	MT1 : Méthyltransférase 1
AGVs : Acides gras volatils	MT2 : Méthyltransférase 2
ANI : Average Nucleotide Identity	Mtd : <i>N5,N10</i> -méthylène- H_4 MPT déshydrogénase
ANME : Archées anaérobies méthanotrophes	Mtr : <i>N5</i> -méthyl- H_4 MPT:CoM-SH méthyltransférase
AOM : Anaerobic Oxidation of Methane	Mvh : Hydrogénase-hétérodisulfure réductase
APOH : Acétogènes productrices obligatoires de dihydrogène	NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
ATP : Adénosine triphosphate	NOAA : National Oceanic and Atmospheric Administration
ARMAN : Archaeal Richmond Mine acidophilic nanoorganisms	PCR : Polymerase chain reaction
ARN : Acide ribonucléique	PDGT : Pentanétriol dibiphytanyle glycérol tétraéther
ARNr 16S : Sous-unité 16S de l'acide ribonucléique ribosomal	P_{H_2} : Pression partielle de dihydrogène (H_2)
ARNt : Acide ribonucléique de transfert	Ppb : Partie par milliard (part per billion, en anglais)
AVG : Acide gras volatil	PRG : Potentiel de réchauffement global
BDGT : Glycérol dibiphytanyle glycérol tétraéther	Pyl : Pyrrolysine
BSR Bactéries sulfato-réductrices	qPCR : PCR quantitative
CI : Composés à un carbone	RC-III : Rice Cluster III
CH_3 -S-S-CoM : Méthyl-coenzyme M	RCC : Rumen Cluster C
CH_3CO -S-CoA : Acétyl-CoA	Rnf : Ferrédoxine-NAD ⁺ oxydoréductase
CISP : Comité international sur la systématique des procaryotes	SAG : Single-amplified genome
Codh : Monoxyde de carbone déshydrogénase	TACK : <i>Thaumarchaeota</i> , <i>Aigarchaeota</i> , <i>Crenarchaeota</i> et <i>Korarchaeota</i>
CoM-SH : Coenzyme M	TMEG : <i>Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotic Group</i>
CoM-S-S-CoB : Hétérodisulfure	TMA : Triméthylamine
CSIRO : Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation	TMAO : Oxyde de TMA
Ct : Threshold cycle	UCI : University of California Irvine
DMA : Diméthylamine	Vho : Hydrogénase méthanophénazine-dépendante (Vht)
DMS : Diméthylsulfure	WL : Voie de Wood-Ljungdahl
DPANN : <i>Diapherotrites</i> , <i>Parvarchaeota</i> , <i>Aenigmarchaeota</i> , <i>Nanohaloarchaeota</i> et <i>Nanoarchaeota</i>	
Ech : Hydrogénase ferrédoxine-dépendante	
Eha/Ehb : Energy-converting hydrogenase	
FAD : Flavine adénine dinucléotide	
Fd : Ferrédoxine	
FISH Fluorescence In Situ Hybridation	
FMO3 : Flavine monooxygénase	
Fpo : $F_{420}H_2$ -déshydrogénase	
FR : Forçage radiatif	
Frh : Hydrogénase F_{420} -réductase	
Frt : Formyle-MFR: H_4 MPT formyletransférase	
Fwd : Formyle-MFR déshydrogénase	
GHSZ : gas hydrate stability zone	
GIEC : Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat	
GIT : Gastro-intestinal tract	
H_4 MPT : Tétrahydrométhanoptérine	
H_4 SPT : Tétrahydrosarcinaptérine	
Hdr : Hétérodisulfure réductase	
HS-HTP : 7-mercaptoheptanoylthréonine phosphate (= HS-CoB, coenzyme B)	
ICNP : International Code of Nomenclature of Prokaryotes	
ICSP International Committee on Systematics of Prokaryotes	
LUCA : Last Universal Common Ancestor	
m-WL : Branche méthyle de la voie de Wood-Ljungdahl	
MAG : Metagenome assembled genome	
Mch : <i>N5,N10</i> -méthényl- H_4 MPT cyclohydrolase	
Mcr : Méthyl-CoM réductase	
MEB : Microscope électronique à balayage	
MeOH : Méthanol	
MET : Microscope électronique à transmission	
Mer : <i>N5,N10</i> -méthylène- H_4 MPT réductase	
MFR : Méthanofurane	
MMA : Monométhylamine	
MMO : Méthane mono-oxygénase	

Introduction bibliographique

1. Le méthane

a) Généralités

Le méthane est la plus simple des molécules organiques et fait partie de la famille des alcanes. C'est un hydrocarbure non-polaire composé d'un carbone lié à quatre hydrogènes par des liaisons covalentes (Figure 1). Dans les conditions standards de pression et de température, c'est une molécule inodore et incolore qui se présente sous forme gazeuse. Ses températures de fusion et d'ébullition sont, respectivement de -183 °C et $-167,5\text{ °C}$.

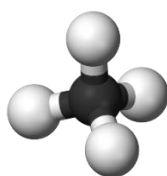


Figure 1 : Représentation tridimensionnelle d'une molécule de méthane (CH₄).

S'il est aujourd'hui couramment admis que c'est le chimiste et physicien Alessandro Volta (1745 – 1827) qui a été à l'origine de l'isolement et de la caractérisation du méthane, il est important de noter que ce gaz suscitait un grand intérêt chez les scientifiques du XVIII^{ème} siècle. Parmi eux, il est possible de citer Benjamin Franklin, Antoine de Lavoisier, John Pringle ou encore Joseph Priestley Priestley (Volta, 1778; Wolfe, 1993). C'est au cours des années 1776 à 1778 et après plusieurs expériences que Volta a démontré que la nature de son « air inflammable » emprisonné dans les sédiments vaseux du Lac Majeur (Italie) différait de celle de l'air (Figure 2) (Volta, 1778; Wolfe, 1993).



Figure 2 : Gravure du XVIII^{ème} siècle reprise par Wolfe (1993) et décrivant la célèbre expérience de Volta. A gauche, le protocole utilisé par l'auteur pour isoler le méthane piégé dans la vase du Lac Majeur. La partie de droite illustre l'inflammabilité du gaz ainsi collecté.

b) Impacts du méthane à l'échelle globale

Les gaz à effet de serre sont des constituants de l'atmosphère qui absorbent et émettent un rayonnement à des longueurs d'onde données du spectre du rayonnement terrestre émis par la surface de la Terre, l'atmosphère et les nuages (GIEC, 2013). Les 2 principaux gaz responsables de l'effet de serre de la Terre depuis que notre planète a une atmosphère sont : la vapeur d'eau (H₂O) et le gaz carbonique (CO₂). Il en existe beaucoup d'autres naturels dont le méthane (CH₄), le protoxyde d'azote (N₂O) ou l'ozone (O₃). Il existe également des gaz industriels à effet de serre (halocarbures, *etc.*) (GIEC, 2013).

La durée de vie du méthane est estimée à environ 9,1 [\pm 0,9] années avant qu'une large fraction de celui-ci (~ 90 %) ne soit réduite par les radicaux hydroxyles (HO^{*}) de la troposphère (strate atmosphérique située entre 5 et 15 kilomètres d'altitude) ou par le sol (~ 5 %) (Ehhalt, 1974; Conrad, 2009; Prather *et al.*, 2012; Kirschke *et al.*, 2013).

Deux notions physiques clés sont à prendre en compte dans l'évaluation de l'impact du méthane sur le climat : (i) le forçage radiatif (FR) et (ii) le potentiel de réchauffement global (PRG). Le forçage radiatif est un indice (exprimé en W m⁻²) permettant de mesurer la différence entre l'énergie radiative reçue puis émise par un système, ici l'atmosphère (Hansen *et al.*, 1997; Solomon, 2009; GIEC, 2013). Concrètement, cet indice permet d'évaluer le potentiel de chaque gaz et d'autres agents (albédo, radiations solaires, *etc.*) à modifier l'équilibre énergétique du globe et donc à participer aux changements climatiques. De 1750 (date fixée comme étant le début de la première révolution industrielle) à 2011, le FR du méthane était de 0,48 W m⁻² [0,43 ; 0,53], faisant de ce composé le gaz à effet de serre ayant la deuxième valeur la plus élevée de FR, juste derrière le CO₂ (1,82 W m⁻² [1,63 ; 2,01]) (Figure 3) (Forster *et al.*, 2007; GIEC, 2013). Le potentiel de réchauffement global (PRG) est utilisé pour comparer l'impact relatif de chaque gaz sur le changement climatique sur une période d'un siècle. Il se base sur leurs propriétés radiatives (mesurées par le FR) et leur temps de résidence dans l'atmosphère. Le gaz de référence utilisé pour calculer ce potentiel est le CO₂, dont le PRG est conventionnellement de 1. Le PRG estimé du méthane est compris entre 25 et 28 pour une même période, ce qui signifie que le méthane est un gaz à effet de serre 25 à 28 fois plus puissant que le dioxyde de carbone (Solomon, 2009; Myhre *et al.*, 2014).

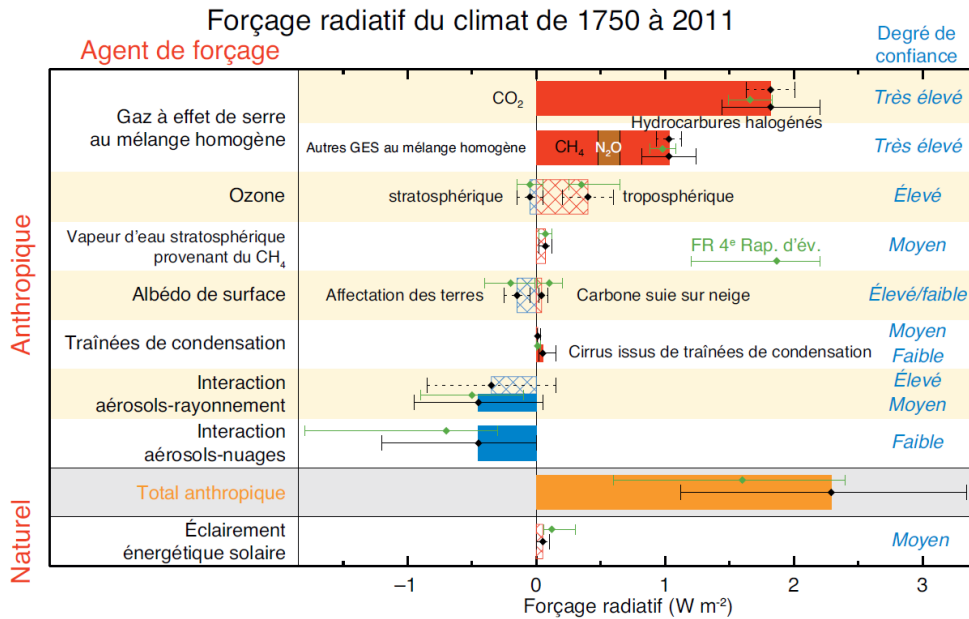


Figure 3 : Estimations du FR du climat pour la période allant de 1750 à 2011. Ces estimations ont été extraites du cinquième rapport d'évaluation du GIEC (2013). Les lignes et noires indiquent les intervalles de confiance des FR du 5^{ème} rapport d'évaluation du GIEC ; ils sont à comparer avec les intervalles de confiance en vert calculés dans le quatrième rapport d'évaluation.

Depuis le début de la première révolution industrielle et le développement des activités humaines, la concentration en méthane atmosphérique n'a eu de cesse de croître, pour atteindre environ 1810 parties par milliard (ppb, part per billion en anglais) en 2012 (Figure 4) (Dlugokencky *et al.*, 2009; Kirschke *et al.*, 2013). Depuis quelques années, la régulation et la limitation des rejets de gaz à effet de serre – dont le CH₄ – dans l'atmosphère fait l'objet de politiques publiques à l'échelle locale et internationale (ex. : Accord de Paris sur le climat de 2016, https://unfccc.int/sites/default/files/french_paris_agreement.pdf).

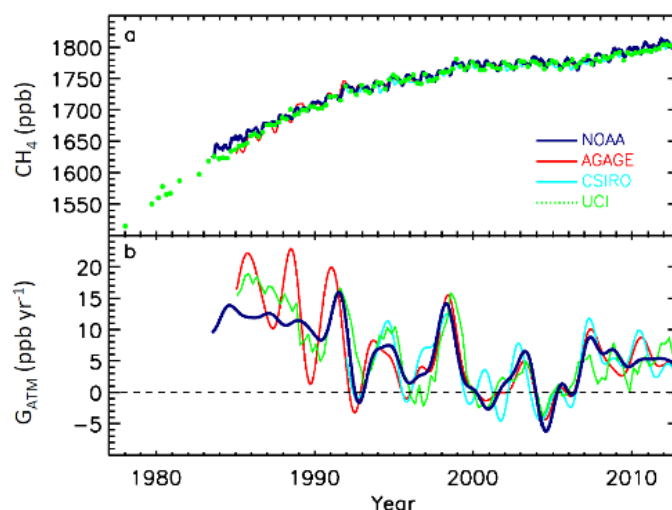


Figure 4 : Concentration moyenne du CH₄ atmosphérique et son ratio annuel. Données issues de quatre instituts de recherche. NOAA : National Oceanic and Atmospheric Administration ; AGAGE : Advanced Global Atmospheric Gases Experiment ; CSIRO : Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation ; UCI : University of California Irvine. Figure extraite de Saunois *et al.*, 2016, adaptée de Kirschke *et al.* (2013).

c) Sources de méthane atmosphérique

A l'échelle décennale, il s'avère difficile d'estimer les contributions respectives des différents écosystèmes et activités anthropiques dans le bilan global du méthane, en raison de la fluctuation des émissions annuelles de ce gaz, et compte-tenu des biais et de la diversité des méthodes de quantification et de calculs (Conrad, 2009). Il est aujourd'hui estimé que, depuis 2000, 500 à 750 Tg (1 Téra = 10¹² g) de CH₄ sont émis chaque année dans l'atmosphère (Conrad, 2009; Lyu *et al.*, 2018; Saunois *et al.*, 2020) (Figure 5).

Le méthane émis dans l'atmosphère provient à la fois de processus naturels (30 – 50 %) et de sources anthropiques (50 – 70 %) (Le Mer & Roger, 2001; Saunois *et al.*, 2016). Parmi les sources naturelles de méthane atmosphérique, il est possible de citer : les zones humides (150 – 220 Tg CH₄ an⁻¹), les eaux douces (lacs, étangs, réservoirs, ruisseaux et rivières) (130 – 160 Tg CH₄ an⁻¹), les océans (15 – 30 Tg CH₄ an⁻¹), des sources géologiques (~ 40 Tg CH₄ an⁻¹) ou encore les termites et les animaux sauvages (10 – 25 Tg CH₄ an⁻¹). Les sources anthropiques de méthane atmosphérique recouvrent les activités agricoles (dont la riziculture) et les déchets (200 Tg CH₄ an⁻¹), la combustion des énergies fossiles (95 – 110 Tg CH₄ an⁻¹) et la combustion de la biomasse et des bio-fiouls (30 – 80 Tg CH₄ an⁻¹) (Le Mer & Roger, 2001; Knittel & Boetius, 2009; Kirschke *et al.*, 2013; Saunois *et al.*, 2020).

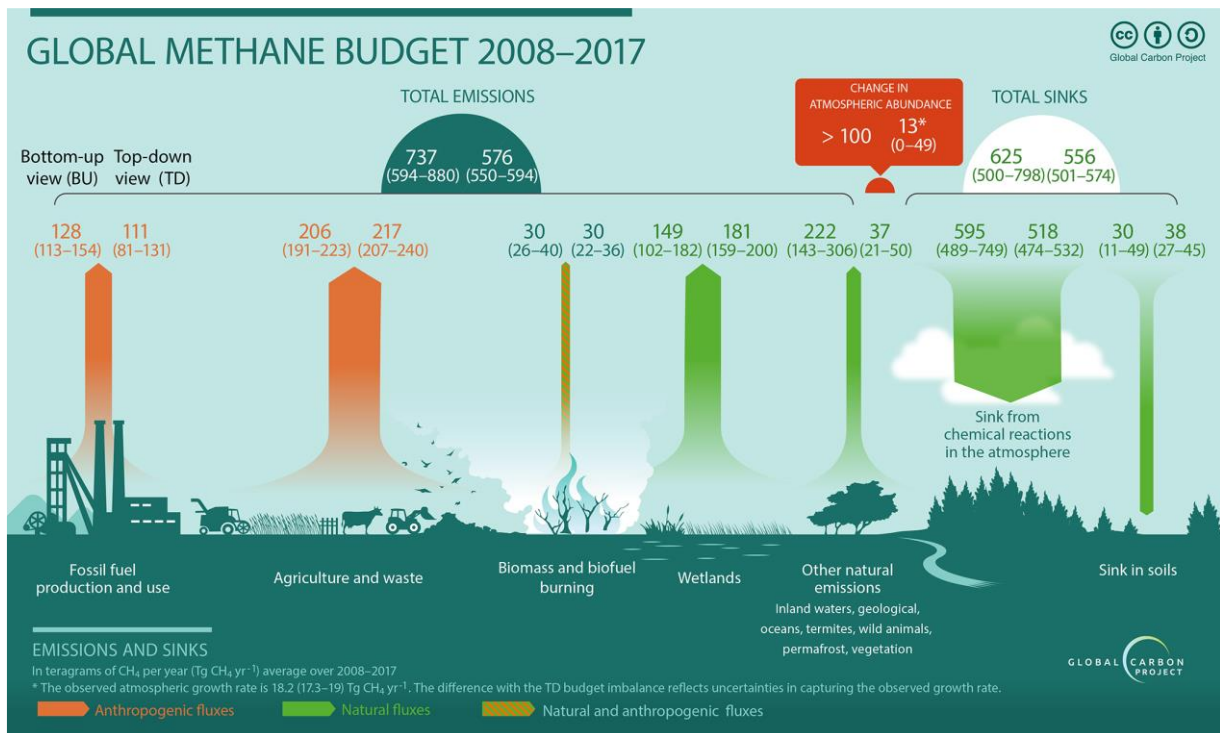


Figure 5 : Estimations du budget en méthane atmosphérique à l'échelle globale. Période prise en compte : 2008 à 2017. En orange, les principales sources d'émission de méthane d'origine anthropique : la production et l'utilisation d'énergies fossiles, l'agriculture et les déchets. En vert et orange : les émissions naturelles et anthropiques résultant de la combustion de biomasse et de biofuels. En vert, flèches vers le haut : les zones humides et les autres sources naturelles d'émission de méthane. En vert, flèches vers le bas : l'abaissement en méthane par réactions chimiques (à gauche) et absorption dans le sol (à droite). Les demi-cercles vert et blanc indiquent respectivement les émissions et absorptions totales en méthane (figure extraite de Sauniois *et al.*, 2020).

L'origine du méthane peut être classé sur la base du calcul du rapport isotopique du carbone du méthane ($\delta^{13}\text{CH}_4 = \left[\frac{(^{13}\text{CH}_4/^{12}\text{CH}_4)_{\text{échantillon}}}{(^{13}\text{CH}_4/^{12}\text{CH}_4)_{\text{standard}}} - 1 \right] \times 1000$) propre à chacun des processus menant à la synthèse de ce composé (Ferretti *et al.*, 2005; Kirschke *et al.*, 2013). Il est ainsi possible de distinguer les sources pyrogéniques, les sources thermogéniques (ou fossiles) et les sources biogéniques de méthane.

Une fraction du méthane est produite par thermogénèse. La thermogénèse est un processus lent se déroulant sur une période de l'ordre de l'ère géologique. Ce processus a lieu lors de l'enfouissement de la matière organique sédimentaire dans la croûte terrestre. Lors de son enfouissement, celle-ci va progressivement se réchauffer et se comprimer, aboutissant à son craquage et à la production de méthane. Ce méthane, principalement caractérisé par un faible rapport en ¹²C, va ensuite pouvoir être émis dans l'atmosphère *via* des migrations du fluides sous-marins et terrestres ou par l'exploitation et la distribution de ressources minières (charbon) et pétrolières (production, distribution, raffinement) (Cicerone & Oremland, 1988; Sauniois *et al.*, 2016). Selon les estimations, le méthane issu de la thermogénèse représenterait entre 25 et 55 % des émissions globales de méthane (Ferretti *et al.*, 2005; Kirschke *et al.*, 2013).

La pyrogenèse du méthane est le résultat d'une combustion imparfaite de la matière organique lors de déforestations, de combustions de tourbe ou durant l'utilisation de biofiouls. Elle conduirait à environ 37 % des émissions de méthane selon certains auteurs (Ferretti *et al.*, 2005) ou entre 13 à 25 % selon d'autres estimations (Kirschke *et al.*, 2013).

La biogenèse du méthane constitue la principale source de méthane atmosphérique, représentant à elle-seule entre 55 et 70 % des émissions globales de méthane, selon les estimations (Le Mer & Roger, 2001; Ferretti *et al.*, 2005; Conrad, 2009; Kirschke *et al.*, 2013; Lyu *et al.*, 2018). Le méthane biogénique est produit par diverses lignées phylogénétiques d'archées méthanogènes qui interviennent dans la dernière étape de reminéralisation de la matière organique et le recyclage du carbone (King, 1984; Chaban *et al.*, 2006). Ces archées méthanogènes se développent dans des niches écologiques anoxiques (Chaban *et al.*, 2006). Les places et fonctions de ces archées méthanogènes dans les écosystèmes naturels, leurs traits physiologiques et leurs interactions avec leur habitat et avec les autres microorganismes seront abordés dans les parties suivantes de la synthèse bibliographique (§ 4. et 5.).

d) Dégradation et séquestration de méthane

Suite à sa synthèse par des processus thermogéniques, pyrogéniques ou biogéniques, le méthane peut être soit (i) rejeté dans l'atmosphère et y être dégradé, soit (ii) consommé par des microorganismes méthanotrophes se développant à proximité des sources de méthane avant d'atteindre l'atmosphère, soit (iii) être stocké ou piégé dans des hydrates de gaz, des pergélisols ou des lacs de thermokarst.

a. Dégradation photochimique du méthane dans l'atmosphère

Comme évoqué précédemment, 90 % du méthane émis dans l'atmosphère est dégradé dans la troposphère par réaction avec des radicaux hydroxyle (HO[•]). Ces radicaux se forment par photolyse ($\lambda_{\text{photon}} \leq 310 \text{ nm}$) de l'ozone (O₃) en présence de vapeur d'eau (H₂O) (O'Connor *et al.*, 2010; Kirschke *et al.*, 2013). La dégradation du méthane est la dernière étape d'une série de 11 réactions en chaîne impliquant plusieurs intermédiaires dont le monoxyde et le dioxyde d'azote (NO et NO₂), l'acide nitrique (HNO₃), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ainsi que des radicaux hydroperoxyde (HO₂) (Tableau 1).

Tableau 1 : Réactions en chaîne menant à la dégradation du méthane troposphérique. Le methylperoxyde issu de la dégradation du méthane (étape 11) peut être réutilisé lors de la première réaction. $h\nu$, photon ($\lambda \leq 310$ nm) ; M = O₂ ou N₂ ; O(¹D) : état singulet de l'oxygène, instable et excité; O(³P) : état triplet de l'oxygène ; R = C₂H₅ ou un autre groupe organique supérieur. Données extraites de O'Connor *et al.*, 2010.

1	HO ₂ (RO ₂) + NO → OH + NO ₂	4'	O(¹ D) + H ₂ O → 2OH	8	2HO ₂ + M → H ₂ O ₂ + M
2	NO ₂ + $h\nu$ → NO + O(³ P)	5	O ₃ + 2OH → OH + 2O ₂	9	OH + HO ₂ → H ₂ O + O ₂
3	O(³ P) + O ₂ + M → O ₃ + M	6	O ₃ + OH → H ₂ O + O ₂	10	OH + CO → (O ₂ , M) → HO ₂ + M
4	O ₃ + $h\nu$ → O(¹ D) + O ₂	7	NO ₂ + OH + M → HNO ₃ + M	11	OH + CH₄ → (O₂, M) → H₂O + CH₃O₂

Concrètement, les étapes 1 à 3 permettent la formation d'ozone tandis que les étapes 4 à 6 conduisent à sa destruction. La dégradation du méthane avec un radical hydroxyle mène à la production d'eau et de radicaux peroxydes qui sont par la suite recyclés lors de la première étape des réactions en chaîne menant à la dégradation du méthane troposphérique.

b. Les microorganismes méthanotrophes

Dans de nombreux écosystèmes où la méthanogenèse prend place (océans, lacs, pergélisols, sols, tourbières), des microorganismes méthanotrophes oxydent le méthane d'origine biotique et abiotique, afin d'en retirer du carbone et de l'énergie (Le Mer & Roger, 2001). L'oxydation biotique du méthane peut être réalisée par des bactéries aérobies (*Proteobacteria*) se développant en collaboration avec des hôtes invertébrés (bivalves, vers, *etc.*), ou par des archées anaérobies se développant, pour certaines, en collaboration avec des bactéries (Thauer *et al.*, 2008; Ettwig *et al.*, 2010). Ces microorganismes méthanotrophes se développent le long du gradient rédox vertical de leur habitat (sédiments marins et d'eaux douces, colonnes d'eaux, sols, tourbières, *etc.*), en couplant l'oxydation du méthane à la réduction du dioxygène (O₂) dans le cas des méthanotrophes vivant de manière libre ou en symbiose avec des invertébrés marins par exemple, ou en couplant l'oxydation du méthane à la réduction du nitrate (NO₃⁻), de fer ferrique (Fe³⁺), de manganèse (Mn⁴⁺) ou de sulfate (SO₄²⁻) dans le cas des associations syntrophiques (Serrano-silva *et al.*, 2014; Ettwig *et al.*, 2016).

L'oxydation aérobie du méthane est un processus de consommation du méthane réalisé dans des niches écologiques oxygénées par des bactéries aérobies strictes. Ces bactéries utilisent le dioxygène comme accepteur terminal d'électrons pour oxyder le méthane et l'utiliser comme source d'électrons et de carbone. La plupart des bactéries méthanotrophes sont également méthylotrophes. Succinctement, la réaction d'oxydation aérobie du méthane est la suivante :



Ce métabolisme se décompose en trois principales étapes, faisant intervenir une méthane mono-oxygénase (MMO), un cytochrome C et une quinone. La méthane mono-oxygénase est une

enzyme membranaire ou soluble pouvant également oxyder l'ammonium (NH_4^+), rendant ce composé toxique pour les méthanotrophes. La méthane monoxygénase est constituée de trois sous-unités A, B et C codées respectivement par les gènes *pmoA*, *pmoB* et *pmoC*. Il est intéressant de noter que le gène *pmoA* est utilisé comme marqueur phylogénétique chez les bactéries méthanotrophes aérobies (McDonald & Murrell, 1997).

Depuis une trentaine d'années, les indices témoignant de l'existence d'un processus anaérobie d'oxydation du méthane (en anglais, Anaerobic Oxidation of Methane, AOM) ont été mis en évidence. Il s'agit d'un processus principalement retrouvé au niveau de la zone de transition méthane-sulfate (SO_4^{2-}) dans des sédiments marins diffusifs soumis à des migrations de fluides au travers des couches sédimentaires. C'est dans ces horizons que se réalise la réduction dissimilatrice des sulfates par oxydation du méthane. D'autres accepteurs d'électrons comme le nitrate (NO_3^-), le fer ferrique (Fe^{3+}) ou le manganèse (Mn^{4+}) sont utilisables (Knittel & Boetius, 2009). Cette réaction est le résultat d'une syntrophie entre des archées anaérobies méthanotrophes (ANMEs) et des bactéries sulfato-réductrices (BSRs) affiliées aux genres *Desulfosarcina*, *Desulfococcus* et *Desulfobulbus* (Figure 6). Les ANMEs ont été classées en trois grands groupes sur la base de leur position phylogénétique : les ANME-1, les ANME-2 et les ANME-3. Les ANME-1 forment leur propre ordre tandis que les ANME-2 et les ANME-3 sont principalement affiliées aux *Methanosarcinales*. D'un point de vue organisationnel, les ANMEs sont souvent arrangées en consortia structurés où les ANMEs forment un corpuscule semi-sphérique enrobé par les BSRs (Figure 6). Elles peuvent aussi se présenter sous forme d'agrégats monospécifiques, de tapis, de cellules libres, ou en chaînettes sans partenaires bactérien (ex. : ANME-1) (Orphan *et al.*, 2001). Le bilan de la réaction de méthanotrophie anaérobie sulfato-dépendante est le suivant (Knittel & Boetius, 2009) :

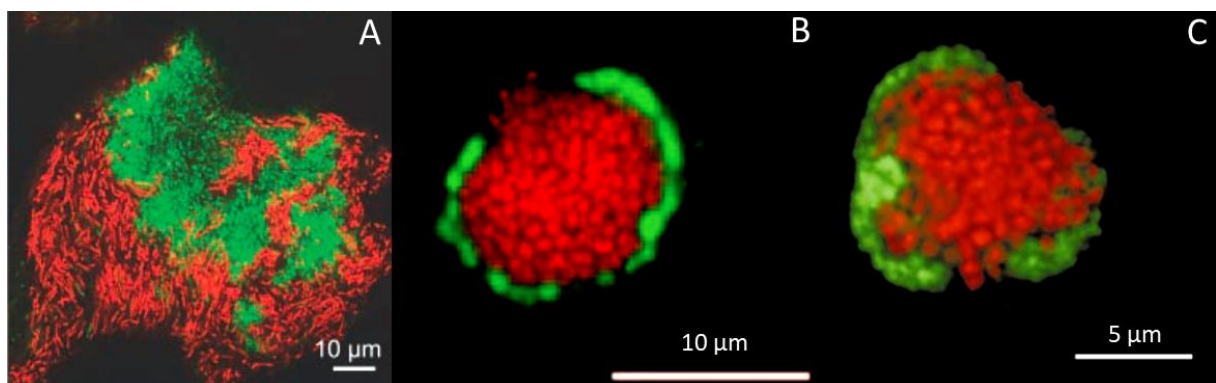


Figure 6 : Microphotographies d'un tapis (A) et d'agrégats (B & C) microbiens. Les agrégats ont été visualisés par technique d'hybridation in situ en fluorescence (en anglais, Fluorescence In Situ Hybridation, FISH) afin d'illustrer

l'étroite association spatiale entre les ANMEs et les BSRs. En vert : les BSRs ; en rouge : les ANMEs. (A) Les cellules d'ANME-1 ont une forme de bâtonnets tandis les BSRs sont les petites cellules coccoïdes (Michaelis *et al.*, 2002), (B) ANME-2 associées avec des *Desulfosarcina/Desulfococcus sp.* (Boetius *et al.*, 2000), (C) ANME-3 associées avec *Desulfolobus sp.* (Losekann *et al.*, 2007).

Les mécanismes mis en jeu pour l'AOM ne sont à ce jour pas totalement élucidés. Deux principales hypothèses sont cependant avancées pour expliquer ce métabolisme particulier. La première serait la consommation du méthane par les ANMEs *via* une méthanogenèse inversée, libérant alors du dihydrogène (H₂) utilisé par les BSRs comme source d'électrons. La seconde hypothèse serait une oxydo-réduction du couple méthane/soufre élémentaire (CH₄/S⁰) par les ANMEs ; il s'agit d'un phénomène encore jamais observé mais métaboliquement possible.

Par leurs activités métaboliques, les microorganismes méthanotrophes constituent un filtre très efficace limitant le rejet d'importantes quantités de méthane lors de son transport vers l'atmosphère (Knittel & Boetius, 2009). A titre d'exemple, il est estimé que plus de 90 % du méthane se trouvant dans les sédiments marins y est directement oxydé en CO₂ (Reeburgh, 1996; Knittel & Boetius, 2009), contre 70 à 90 % dans les rizières (Neue & Scharpenseel, 1987; Le Mer & Roger, 2001), environ 50 % dans le sol (Lyu *et al.*, 2018) et jusqu'à 80 % dans les pergélisols (Anisimov, 2007).

c. Les principaux puits de méthane

i. Les pergélisols

Les pergélisols (en anglais : permafrosts) sont des espaces terreux ou rocheux dont la température reste inférieure ou égale à 0 °C au moins deux années consécutives. Ils sont principalement retrouvés au niveau de l'hémisphère Nord (~ 20 % des surfaces émergées) et sud, en altitude (plateau tibétain, Alpes) et dans les fonds de l'Océan Arctique (Figure 7) (O'Connor *et al.*, 2010; van Huissteden, 2020). Sur les continents, les pergélisols sont constitués de deux principales strates distinctes recouvertes par une fine couche de sol actif de quelques décimètres (van Huissteden, 2020). La première strate de pergélisol est une couche de sol de 10 à 20 m d'épaisseur impactée par les variations de températures saisonnières. La seconde strate de pergélisol a une épaisseur allant de quelques dizaines de mètres à parfois plus d'un km suivant les sites (ex. : plateau de l'Anabar, Russie). Cette seconde strate est insensible aux variations climatiques et est imperméable aux gaz. Le méthane associé aux pergélisols peut avoir diverses sources, et parfois se retrouver piégé dans des cages d'eau gelée (Figure 7) (van Huissteden, 2020). Le permafrost peut parfois s'étendre jusqu'aux marges océaniques. Les estimations font état d'un total de 1035 ± 150 Pg (1 Péta = 10¹⁵) de carbone dans les

3 premiers mètres du pergélisol et environ 1300 (1100 à 1500) Pg de carbone pour l'ensemble du pergélisol (Saunois *et al.*, 2020).

Comme indiqué ci-dessus, environ 80 % du méthane provenant des pergélisols est filtré par les microorganismes méthanotrophes lors du transport vers l'atmosphère (Anisimov, 2007). Toutefois, le réchauffement climatique pourrait bouleverser cet équilibre et entraîner une fonte des pergélisols et donc un relargage massif de méthane dans l'atmosphère.

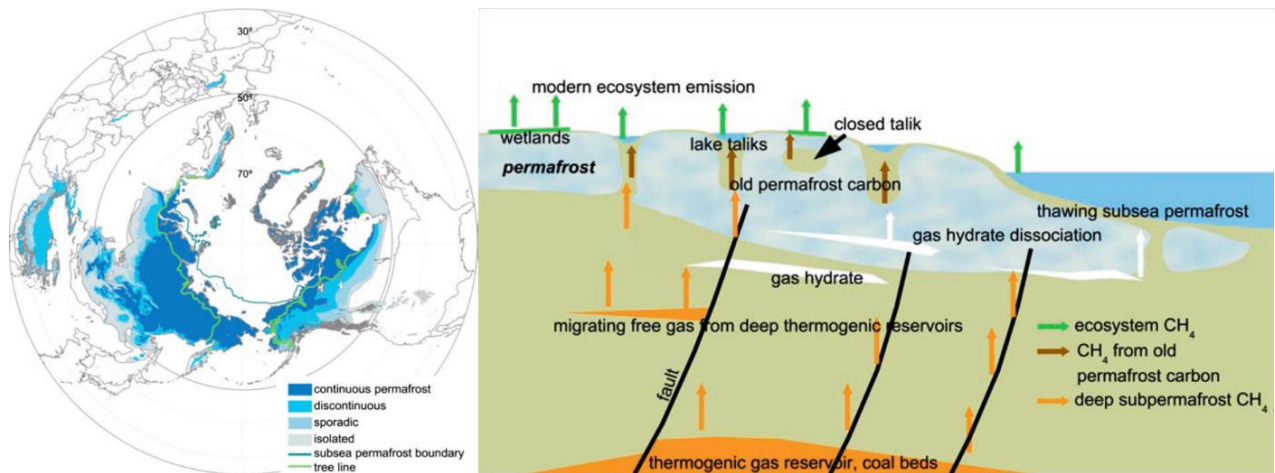


Figure 7 : Distribution et sources de méthane au niveau des pergélisols. A gauche : répartition des pergélisols à la surface du globe. Les pergélisols sont plus stables et épais aux hautes latitudes alors qu'ils sont discontinus ou sporadiques à des latitudes plus méridionales. A droite : Les différentes sources de méthane dans un contexte de pergélisol : les sources de méthane modernes et d'origine microbienne (flèches vertes), les sources de méthane anciennes (flèches marrons) et les sources de méthane profondes et issues de la thermogénèse (flèches oranges). Les lignes de failles sont indiquées comme de potentiels conduits d'infiltration de gaz issus du sous-sol profond. Figures extraites de van Huisteden, 2020, données de 2019 reprises du National Snow and Ice Data Center, <https://nsidc.org/data/ggd318>.

ii. Les hydrates de méthane

Les hydrates de gaz (ou clathrates) sont des nappes de gaz, majoritairement composées de méthane, encapsulées dans des cages d'eau gelée, et formées sous de fortes pressions et à basse température (Figure 6A). Ces structures se forment et restent stables dans des conditions très précises de pressions, de températures et salinité (Hester & Brewer, 2009; Ruppel & Kessler, 2017). Les hydrates de méthane sont séquestrés dans de vastes réservoirs que l'on peut rencontrer sous les glaciers, dans le pergélisol profond ainsi qu'au niveau des sédiments des marges océaniques et des sédiments marins profonds (Figure 8 B, C, D) (O'Connor *et al.*, 2010; Walter Anthony *et al.*, 2012; James *et al.*, 2016; Ruppel & Kessler, 2017). Ces réservoirs sont alimentés en méthane par les processus de thermogénèse et/ou de méthanogénèse (Figure 8 B).

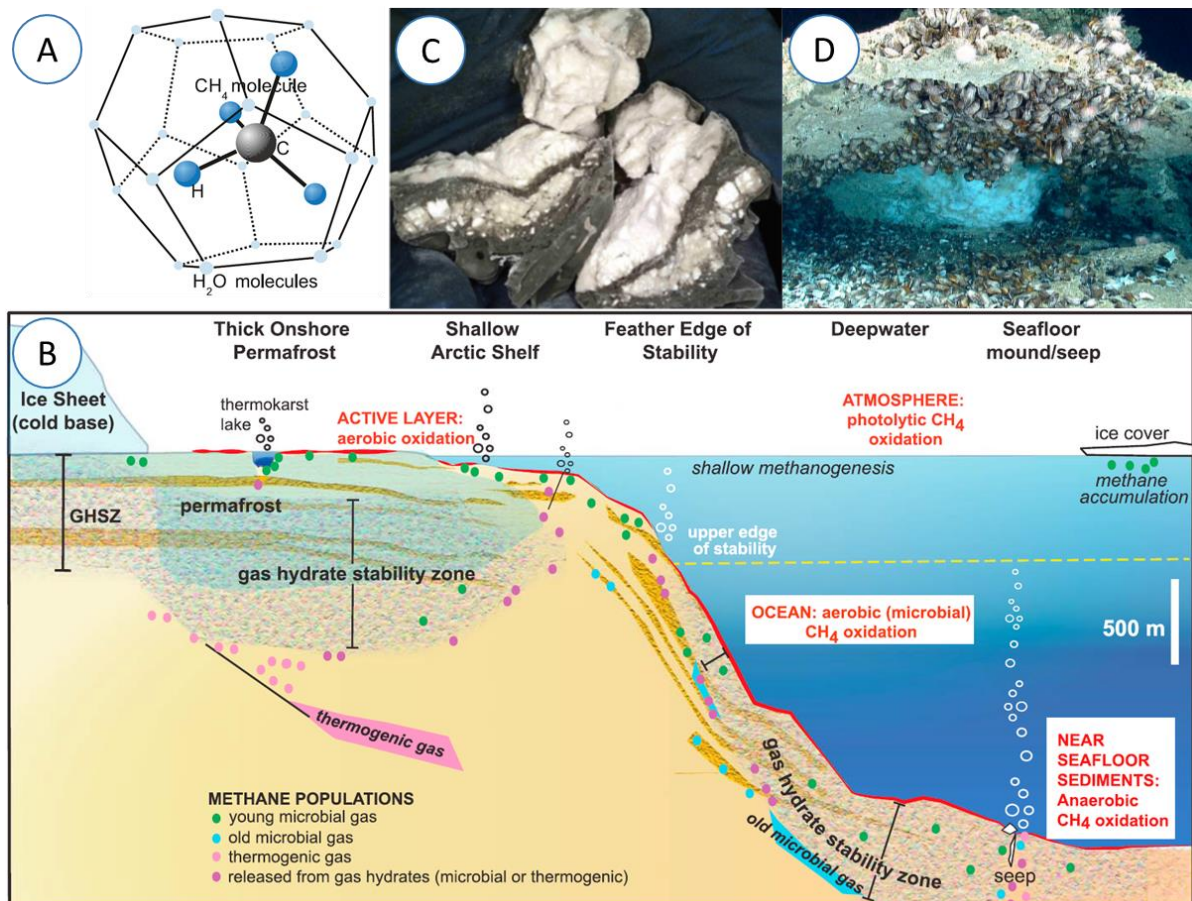


Figure 8 : Répartition et sources des différents réservoirs de méthane. (A) Représentation tridimensionnelle d'un hydrate de méthane. Le méthane est piégée dans un cristal de glace (van Huissteden, 2020) (B) Photographie d'hydrates de méthane sédimentaires collectés sur le site Hydrate Ridge, au large de l'Oregon (États-Unis) (Torres *et al.*, 2004). (C) Photographie d'hydrates de méthane (structure bleue claire) formés à l'interface entre l'eau de mer et la surface du plancher océanique dans le golfe du Mexique (Ruppel & Kessler 2017). Des moules et des cnidaires se sont développés autour de la structure rocheuse abritant les hydrates. (D) Représentation schématique des principaux réservoirs de méthane au niveau de la zone Arctique (Ruppel & Kessler 2017). GHSZ : gas hydrate stability zone (zone de stabilité des hydrates de gaz, dont ceux de méthane). Les principaux réservoirs de méthane sont localisés dans le pergélisol, les plateaux océaniques, les talus continentaux et le plancher océanique.

Nos connaissances sur la répartition des réservoirs d'hydrates de méthane marins et des quantités de méthane séquestrées demeurent parcellaires en raison des difficultés d'accès à certains sites d'études (ex. : le plancher océanique de l'océan Arctique, climat sibérien) (O'Connor *et al.*, 2010; Ruppel & Kessler, 2017). Suivant les modèles utilisés pour réaliser des estimations globales de stocks de méthane planétaire, les quantités estimées peuvent varier entre 35 et 16500 Gt (1 Gt = 1 Pg = 10^{15} g) de méthane séquestré dans l'ensemble des réservoirs (Tableau 2) (GIEC, 2013; James *et al.*, 2016; Ruppel & Kessler, 2017).

Tableau 2 : Estimations des quantités en carbone et méthane piégées dans les hydrates de méthane, en Gt. Ces données ont été estimées pour les fonds océaniques et pergélisols. Les valeurs sont extraites de Ruppel & Kessler (2017) et du cinquième rapport d'évaluation du GIEC (2013). Les * indiquent des valeurs citées dans l'étude de Ruppel & Kessler (2017) ; ^b = estimation basse ; ^h = estimation haute.

Source	Estimation en C (Gt)	Estimation en CH ₄ (Gt)
--------	----------------------	------------------------------------

Dickens 2001*	12 400	16 500
Kvenvolden <i>et al.</i> , 1988b*	11 000	14 600
Ruppell & Kessler, 2017	1800	2400
Boswell & Collett, 2011*	1500	2 000
GIEC, 2013	–	350 ^h
	–	35 ^b

Comme précisé ci-avant, les hydrates de gaz sont très sensibles aux changements de température et de pression (O'Connor *et al.*, 2010; James *et al.*, 2016). Dans un contexte de changement global, l'augmentation des températures affectera probablement la stabilité des hydrates de méthane, tel que cela a été rapporté pour la perturbation climatique du Paléocène-Éocène (– 55 Ma) (O'Connor *et al.*, 2010). Lors de cet évènement climatique, 1500 à 2000 Gt de carbone ont été libérés en quelques milliers d'années. Dans ses travaux, (Dickens, 2001) a calculé que le volume des réservoirs d'hydrates de méthane avait diminué de moitié, ce qui s'est traduit par une augmentation de 5°C de la température globale durant cette période.

2. Evolution des connaissances sur la diversité des archées

A ce jour, la totalité des microorganismes connus pour produire du méthane *via* leur métabolisme énergétique sont classées au sein des *Archaea*, le troisième Domaine du vivant (Woese & Fox, 1977). Ce paragraphe retrace l'évolution temporelle de nos connaissances sur la diversité des *Archaea*, conjointement à l'évolution des stratégies de classification taxonomique et à celle des méthodes de séquençage.

Entre le milieu du XIX^{ème} siècle et durant la première moitié du XX^{ème} siècle, les microorganismes unicellulaires dépourvus de noyaux et d'organites étaient classés au sein du Domaine des Procaryotes (*Prokaryota*). A cette époque, la classification de ces microorganismes se basait principalement sur un faible nombre de critères phénotypiques et physiologiques (morphologie, caractères biochimiques, pouvoir pathogène). Historiquement, c'est en 1958 que la première archée méthanogène (*Methanobacterium ruminantium*, une *Methanobacteriales*) a été purifiée et caractérisée à partir du rumen d'un bovin (Smith & Hungate, 1978). Dès sa découverte, cette archée méthanogène a été classée au sein des *Bacteria*. De la fin des années 70 au début des années 90, les archées ont majoritairement été isolées à partir d'environnements qualifiés d'« extrêmes », car

caractérisés par des gammes de pH, de température, de radioactivité, d'anaérobiose, de pression ou de salinité jugées comme très difficiles, voire hostiles, d'un point de vue anthropocentrique. A titre d'exemple, de nombreuses archées thermophiles et/ou halophiles ont été isolées de sources hydrothermales océaniques profondes et terrestres (*Pyrococcus* spp.), de lacs de soude hypersalés (*Natronomonas pharaonis*) ou encore de solfatares (*Picrophilus* spp.) (Chaban *et al.*, 2006; Grant & Jones, 2016). La profusion d'isolats enrichis à partir d'écosystèmes extrêmes a longtemps laissé penser que les archées étaient des microorganismes primitifs majoritairement inféodés à des conditions de croissance stringentes (Chaban *et al.*, 2006). Durant cette période, les archées étaient regroupées en trois grands clades définis sur la base de caractéristiques physiologiques : (i) les archées halophiles (*Haloarchaea*) principalement retrouvées dans les milieux hypersalés (ex. : marais salants, Mer Morte, *etc.*), (ii) les archées thermoacidophiles se développant au niveau des sources hydrothermales sous-marines ou des zones d'activités volcaniques, et (iii) les méthanogènes peuplant les environnements aquatiques anoxiques marins et dulçaquicoles, ou les tractus digestifs des animaux (Cavicchioli, 2011).

A la fin des années 70, Woese et ses collaborateurs ont posé les bases de la classification moderne des procaryotes en s'appuyant sur la comparaison des gènes codant la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ARNr 16S). L'utilisation de ce gène pour étudier la phylogénie des archées et des autres domaines du vivant s'est justifiée en raison de son universalité et de la présence de régions ultra-conservées au cours de l'évolution permettant de calculer des relations évolutives entre différentes espèces (Woese & Fox, 1977). Ces études ont ainsi permis, en 1990, de discriminer les deux domaines du monde vivant que sont les *Archaea* et les *Bacteria* (Woese *et al.*, 1990).

Les premières classifications phylogénétiques établies sur la base des séquences des gènes codant pour les ARNr 16S avaient regroupé les *Archaea* au sein de deux phyla : les *Euryarchaeota* et les *Crenarchaeota*. Ces deux phyla comportaient alors respectivement 5 ordres (les *Thermococcales*, les *Methanococcales*, les *Methanobacteriales*, les *Methanomicrobiales* et une lignée comportant divers représentants d'archées halophiles extrêmes) et 2 genres (*Pyrodictium* et *Thermoproteus*) (Pace, 1997; Woese *et al.*, 1990) (Figure 9a). Il est intéressant de noter que trois des cinq ordres d'*Euryarchaeota* connus à cette époque étaient composés d'archées méthanogènes.

Puis, tout au long des années 90, les techniques de séquençage (*i.e.* : technologie Sanger), de traitement et de stockage des données informatiques ont évolué et se sont peu à peu démocratisées, permettant ainsi de s'émanciper des approches culturelles pour décrire la diversité microbienne (Robertson *et al.*, 2005). Suite à ces avancées technologiques, de très nombreux criblages

moléculaires visant à décrire la diversité microbienne d'un grand nombre d'écosystèmes ont été réalisés, engendrant le dépôt d'un très grand nombre de séquences génétiques dans les banques de données (Figure 9b). Sur une échelle globale, ces criblages moléculaires ont révélé que les archées ne sont pas uniquement inféodées aux environnements extrêmes, mais au contraire plutôt ubiquites. Ces dernières sont présentes, entre autres, dans l'eau de mer, les lacs et rivières, la tourbe, le sédiment ou le sol. Elles sont également associées à de nombreux organes animaux (tractus digestif, voies respiratoires, peau, muqueuses) et végétaux (systèmes racinaire et foliaire, graines, tiges) (Chaban *et al.*, 2006; Gopal & Gupta, 2016; Koskinen *et al.*, 2017).

A partir du début des années 2000, le développement des technologies de séquençage de « seconde génération » (*Next-Generation Sequencing* ou NGS, en anglais) (*i.e.* : Roche/454, Illumina, AB SOLiD, Ion Torrent) a permis d'accroître considérablement le nombre de séquences du gène de l'ARNr 16S dans les bases de données en ligne (passant d'environ 1000 séquences environnementales en 2000 à plus de 10000 en 2005) (Robertson *et al.*, 2005; Schleper *et al.*, 2005). Concrètement, cette accumulation exponentielle de séquences s'est traduite par la découverte de nouvelles lignées archéennes telles que les *Korarchaeota* et les *Nanoarchaeota* (Figure 9c) (Schleper *et al.*, 2005).

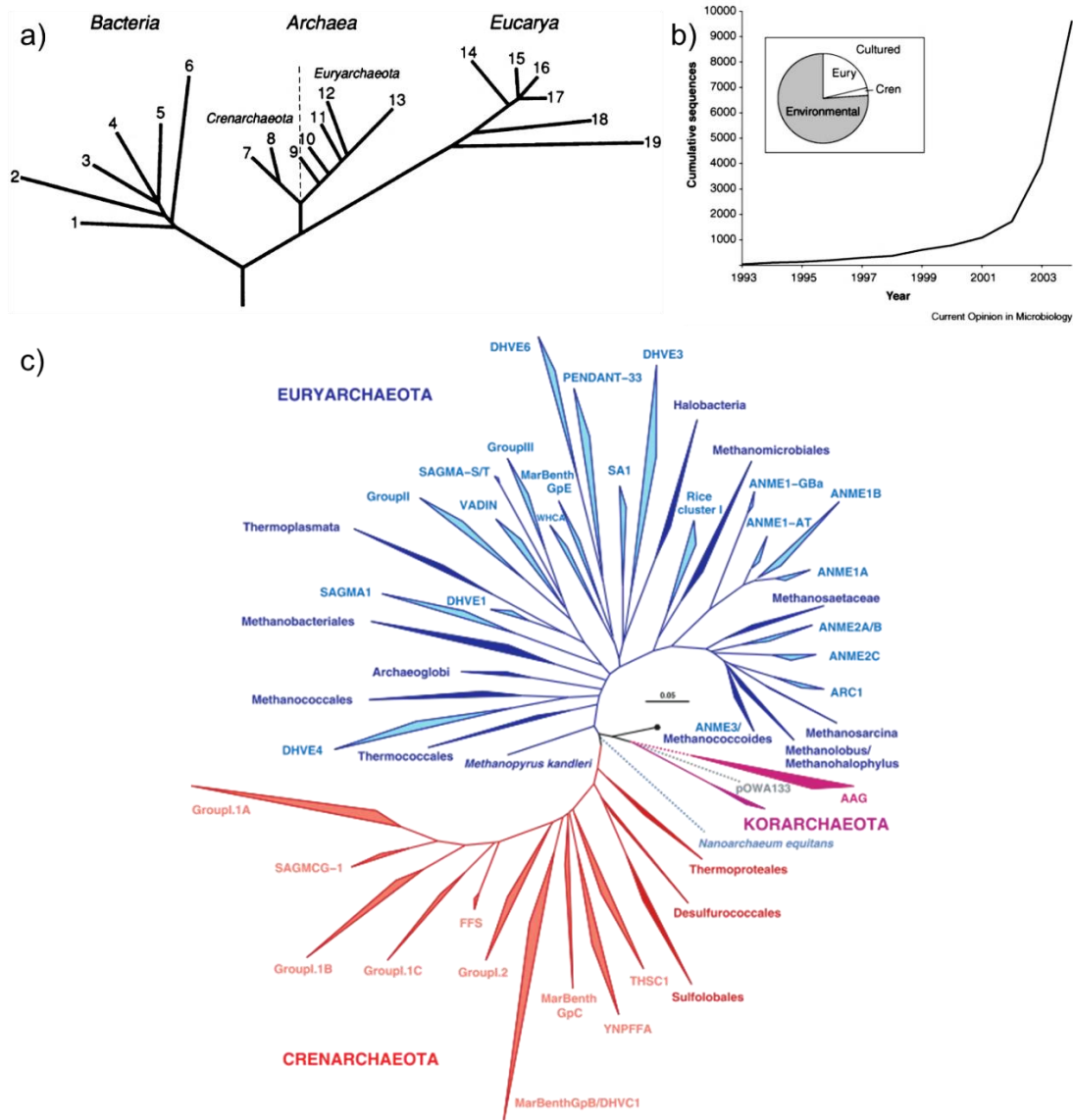


Figure 9 : Evolution des reconstructions phylogénétiques dans le temps. a) Premier arbre phylogénétique construit par Woese *et al.* (1990), présentant les trois domaines du vivant : *Archaea*, *Bacteria* et *Eucarya* (figure extraite de Woese *et al.* (1990). Cet arbre a été construit en comparant des séquences codant les sous-unités 16S et 18S de l'ARNr. La dénomination de certains clades a évolué depuis 1990. Parmi les *Bacteria* : 1, *Thermotogales* ; 2, *Flavobacteria* et apparentés ; 3, *Cyanobacteria* ; 4, bactéries pourpres ; 5, bactéries à Gram-positif ; et 6, bactéries vertes non sulfureuses. Parmi les *Archaea* : phylum *Crenarchaeota* : 7, *Pyrodictium* ; et 8, *Thermoproteus* ; phylum *Euryarchaeota* : 9, *Thermococcales* ; 10 *Methanococcales* ; 11, *Methanobacteriales* ; 12, *Methanomicrobiales* ; 13, diverses halophiles extrêmes. *Eucarya*: 14, animaux ; 15, ciliés ; 16, plantes vertes ; 17, champignons ; 18, flagellés ; et 19, microsporidies. b) Nombre cumulé de séquences du gène codant la sous-unité 16S de l'ARNr disponibles dans la base de données en ligne GenBank, entre 1993 et 2003 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Robertson *et al.*, 2005). Médaille : proportion de séquences détectées uniquement dans l'environnement (« *Environmental* », en gris) par rapport aux séquences de représentants cultivés (« *Cultured* », en blanc). Abréviations : Cren, *Crenarchaeota* ; Eury, *Euryarchaeota*. c) Arbre phylogénétique des *Archaea* identifiées en 2005. Cette reconstruction se base sur la comparaison de 1344 séquences de gènes codant l'ARNr 16S. Les triangles foncés représentent des lignées dont des représentants cultivés sont disponibles dans les collections internationales. A noter : la discrimination des *Korarchaeota* et du premier *Nanoarchaeota* (*Nanoarchaeum equitans*) (Schleper *et al.*, 2005).

Au cours de ces vingt dernières années, les technologies de séquençage à haut-débit se sont démocratisées, leurs coûts ont considérablement baissé et les outils permettant leur traitement ont progressé. Des méthodes permettant d'avoir accès à des génomes microbiens entiers à partir de

cellules uniques isolées (*single amplified genome*, SAG en anglais) ont été développées, ainsi que des approches de séquençage direct de génomes de communautés à partir d'un échantillon brut (= métagénomes), et de reconstruction de génomes à partir de ces métagénomes (*Metagenome Assembled Genomes*, MAGs en anglais) (Rinke *et al.*, 2013). Depuis, le nombre de génomes archéens disponibles dans les bases de données en ligne n'a eu de cesse de croître, passant d'une vingtaine de séquences en 2004 à 1062 entre 2004 et 2016 (Figure 10) (Hug *et al.*, 2016; Adam *et al.*, 2017).

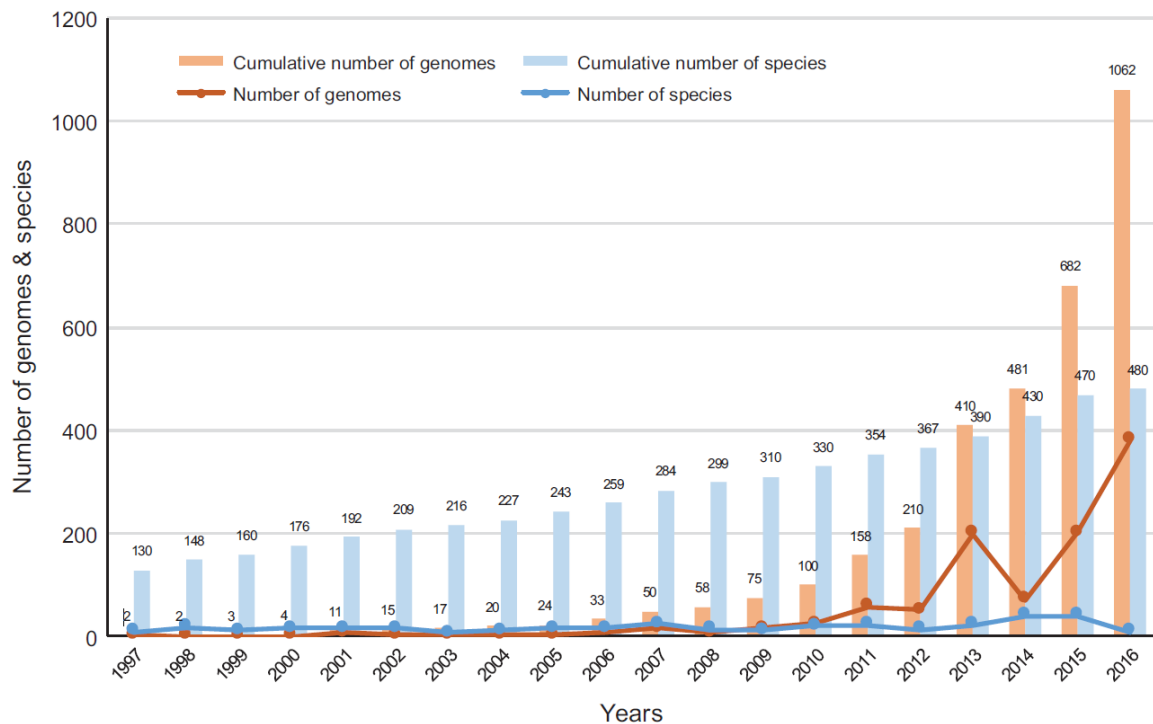


Figure 10 : Evolution du nombre de séquences génomiques et d'espèces archéennes formellement décrites. Valeurs données pour la période allant de 1997 à 2016. La ligne et les histogrammes oranges représentent respectivement le nombre annuel et l'accumulation de nouvelles séquences génomiques archéennes déposée dans les banques de données en ligne au cours du temps. La ligne et les histogrammes bleus représentent respectivement le nombre annuel et l'accumulation de nouvelles espèces archéennes formellement décrites au cours du temps. (Source : <http://www.bacterio.net/>). Figure extraite de Adam *et al.* (2017).

Le fait de disposer de génomes complets ou de MAGs de bonne qualité (*i.e.* : bonne complétude et faible pourcentage de contamination) permet de construire des arbres phylogénomiques sur la base de plusieurs marqueurs génétiques (par exemple les *single-copy core genes*), qui sont plus robustes et résolutifs que les arbres phylogénétiques basés sur la comparaison des gènes codant l'ARNr 16S (Baker *et al.*, 2020). Encore une fois, la conséquence de ce progrès technologique s'est concrétisée par la découverte de nouveaux phyla archéens. Ainsi, alors qu'en 2005 il n'y avait que 4 phyla archéens d'identifiés, il y en avait 27 en 2020 (Baker *et al.*, 2020). La découverte d'une multitude de lignées archéennes au cours des dix dernières années a mené à leur regroupement sous un rang taxinomique supérieur appelé « super-phyla » (Figures 11,12). Trois super-phyla sont aujourd'hui décrits dans la littérature : les « DPANN » (*Diapherotrites*,

Parvarchaeota, *Aenigmarchaeota*, *Nanohaloarchaeota* et *Nanoarchaeota*), les « TACK » (*Thaumarchaeota*, *Aigarchaeota*, *Crenarchaeota* et *Korarchaeota*) et les « Asgard » (*Odinarchaeota*, *Helarchaeota*, *Lokiarchaeota*, *Thorarchaeota* et *Heimdallarchaeota*). Il est important de noter que d'autres phyla sont régulièrement intégrés au sein des différents super-phyla (sans en altérer la dénomination), au fil des découvertes, notamment suite à l'exploration d'environnements jusque-là peu étudiés (sources hydrothermales profondes, sédiments de subsurface, *etc.*) et en fonction des progrès des méthodes de traitement des données génomiques (ex. : augmentations des capacités de traitement de données et des données disponibles dans les bases de données ouvertes, développement de nouveaux outils, *etc.*) (Hug *et al.*, 2016; Adam *et al.*, 2017; Baker *et al.*, 2020; Rinke *et al.*, 2020).

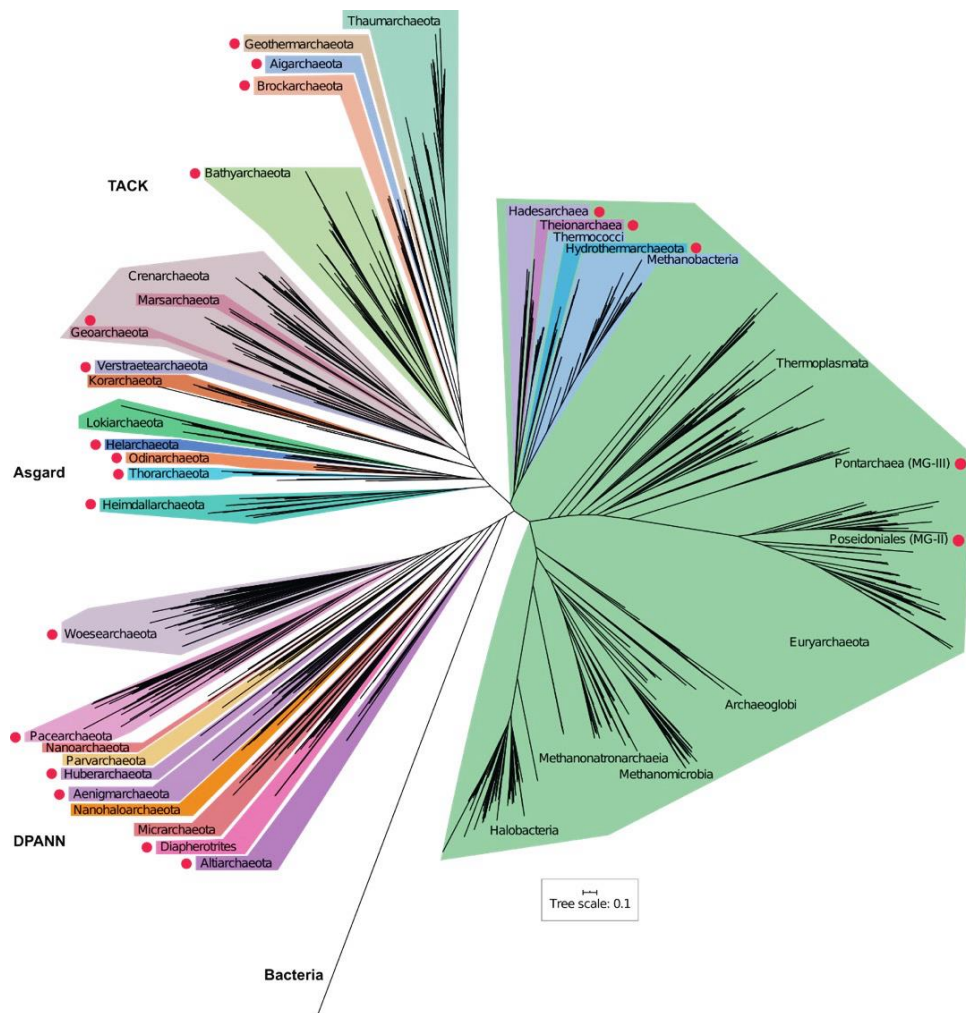


Figure 11 : Arbre phylogénomique des *Archaea*. Cette reconstitution est basée sur la comparaison de 36 marqueurs protéiques (principalement des gènes conservés codant des protéines ribosomales) issus de 3549 génomes archéens (contenant au moins 50 % des marqueurs d'intérêts). Quarante génomes bactériens ont été utilisés comme groupe externe (outgroup en anglais). Des noms de nouveaux phyla et de nouvelles classes euryarchéennes y sont proposés. Les points rouges indiquent des lignées pour lesquelles il n'existe à ce jour aucun représentant cultivé. Figure extraite de Baker *et al.* (2020).

En plus de permettre la reconstruction d'arbres phylogénomiques, l'annotation des séquences génomiques permet de prédire le potentiel métabolique et physiologique reclus dans chaque génome. Mais il ne s'agit que de prédictions physiologiques qui nécessitent d'être validées par des approches moléculaires fonctionnelles et culturelles. Cette approche ne permet pas de connaître en détails le fonctionnement et la tolérance de la cellule dans des conditions *in situ*. Par ailleurs, les données génomiques ne fournissent aucune indication sur l'expression fonctionnelle des gènes, et donc aucune indication sur l'adaptation du protéome actif suivant les conditions de l'environnement (Lewis *et al.*, 2020). Cette déconnexion entre les approches moléculaires et culturelles se ressent particulièrement chez les archées dont le nombre de nouveaux représentants formellement décrits n'a que rarement excédé plus de 15 par ans (entre 2004 et 2016) (Adam *et al.*, 2017). Ainsi, seuls 7 des 27 phyla proposés possèdent des représentants cultivés : les *Euryarchaeota*, les *Lokiarchaeota*, les *Marsarchaeota*, les *Micrarchaeota*, les *Nanoarchaeota*, les *Thaumarchaeota* et des représentants de l'ordre des *Sulfolobales*, auparavant classés au sein de l'ancien phylum des *Crenarchaeota* et dont la classification contemporaine est indéterminée (Figure 12) (Hug *et al.*, 2016; Baker *et al.*, 2020; Lewis *et al.*, 2020).

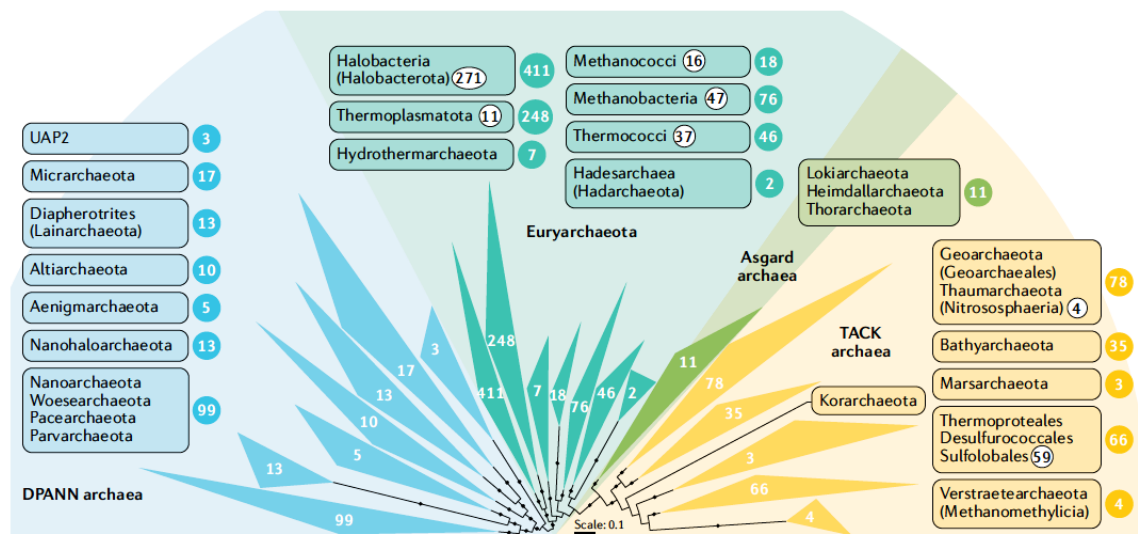


Figure 12 : Arbre phylogénomique des *Archaea*. Cette reconstruction est basée sur la comparaison d'au moins 5 gènes conservés codant des protéines ribosomales et issus de 1166 génomes archéens (extraits de la base de données en ligne Genome Taxonomy Database (<https://gtdb.ecogenomic.org/>)). Les nombres dans les bulles colorées indiquent le nombre de taxa identifiés pour chaque clade apparaissant sur l'arbre. Les nombres dans les bulles blanches indiquent le nombre total d'isolats cultivés et décrits comme des espèces types, pour chaque clade, en employant comme référence la base de données en ligne BacDive (<https://bacdive.dsmz.de/>). Figure extraite de Lewis *et al.* (2020).

Un des enjeux majeurs dans les prochaines années sera probablement de compléter les connaissances acquises *via* des méthodes (méta-)génomiques par des approches culturelles afin d'obtenir un panorama complet de la phylogénie, du métabolisme, de la physiologie des archées, mais

également élucider leurs interactions avec leur biotope et biocénose (Sun *et al.*, 2020). Compte-tenu de l'ampleur de la tâche à venir, certains auteurs recommandent de cibler les taxa d'archées sur lesquels les efforts de mise en culture devraient être mis. Ainsi, ils proposent de cibler préférentiellement (i) les taxa apparemment abondants dans certains environnements naturels (ex. : *Bathyarchaeota*, *Marine Group*), (ii) les lignées ayant peu ou pas de représentants cultivés (ex. : DPANN), et (iii) les lignées phylogénétiquement très basales (*i.e.* : proches de la racine de l'arbre du vivant) et importantes pour la compréhension de l'évolution des archées (Lewis *et al.*, 2020).

Enfin, des débats sont actuellement en cours en vue de tenter de mieux concilier la taxonomie des taxa candidats avec celle des procaryotes cultivés, ou *a minima* de mettre en place une nomenclature pour les taxa candidats. En effet, actuellement, il n'existe aucune règle de nomenclature claire et officielle dédiée aux microorganismes incultivés connus simplement par leur « génome » (MAGs et SAGs). Ainsi, pour l'instant, les noms de taxa candidats des organismes incultivés (MAG *metagenome-assembled genomes* et SAG *single-amplified genomes*) ne sont pas reconnus par le code international en nomenclature (ICNP *International Code of Nomenclature of Prokaryotes* ou parfois, le Code, publié par l'ICSP *International Committee on Systematics of Prokaryotes*), ce qui fait qu'un taxon candidat change de nom une fois qu'il est cultivé. Dans l'état actuel des discussions et des débats, la mise en place d'une nomenclature propre aux taxa candidats semble se profiler, car l'ICNP ne souhaite pas modifier le Code pour utiliser le génome comme unité de référence de l'espèce (ce qui aurait permis d'avoir une nomenclature unique pour les taxa cultivés et les taxa candidats) (Murray *et al.*, 2020).

3. Diagenèse précoce et dégradation de la matière organique

Au cours de son enfouissement dans les sédiments ou le sol, la MO subit une série de transformations biochimiques impliquant différentes cohortes microbiennes, et abiotiques par des processus physico-chimiques aboutissant à la formation de roches sédimentaires. Cet ensemble de réactions de minéralisation de la MO est appelé diagenèse. Les diverses molécules organiques issues de la MO enfouie représentent des sources de carbone et d'énergie potentielles pour les communautés souterraines, dont les archées méthanogènes.

a) Diagenèse abiotique de la matière organique

Lors de leur enfouissement, les monomères (ex. : sucres et acides aminés) issus de la dégradation enzymatique de macromolécules (ex. : polysaccharides, protéines) sont soit utilisés pour synthétiser des constituants cellulaires et dans ce cas réintroduits dans le cycle biologique, soit minéralisés lors de leur utilisation par les microorganismes comme source d'énergie. Sous l'effet de la température et de la pression, une partie de la MO enfouie subit une série de transformations au travers desquelles elle devient progressivement insoluble et réfractaire aux dégradations enzymatiques aboutissant à la formation de roches sédimentaires (lithification). A titre d'exemple, dans un contexte de sédiments marins profonds, cette suite continue de transformations physico-chimiques (hydrolyses et oxydations) aboutit à la formation de géopolymères comme le kérogène. Sous l'effet d'une pyrolyse intense (100 – 150 °C), les kérogènes séquestrés dans les sédiments profonds (~ 3,5 km sous la surface du sédiment) sont par la suite transformés en hydrocarbures fossiles (gaz ou pétrole) et en produits de faible poids moléculaires (ex. : alcools, cétones, nitriles et thiols) (Rovere *et al.*, 1983; Wilson *et al.*, 1983; Parkes *et al.*, 2007).

Dans ce contexte, de nombreux auteurs ont émis l'hypothèse que l'acétate pourrait constituer un carrefour métabolique important pour les communautés microbiennes souterraines (Wellsbury *et al.*, 1997). En effet, l'acétate est un produit courant du métabolisme microbien (acétogénèse) communément utilisé par des procaryotes aux métabolismes variés (sulfato-réduction, méthanogénèse acétoclastique (voir § 4. et 5.b)), *etc.*). Sa production peut également être le résultat de processus abiotiques, notamment par craquage thermique (> 80 °C) dans les sédiments. Les travaux de Wellsbury *et al.* (1997) ont permis de démontrer que la formation thermogénique d'acétate à partir de MO sédimentaire pouvait intervenir lors des phases précoces de la diagenèse et à des températures compatibles avec les activités bactériennes (10 – 60 °C). Dans un contexte de sédiments très profonds, la pyrolyse hydratée des kérogènes produit également des quantités conséquentes d'acétate et de dihydrogène propice au développement de prokaryotes dont des archées méthanogènes (Figure 13) (Parkes *et al.*, 2014).

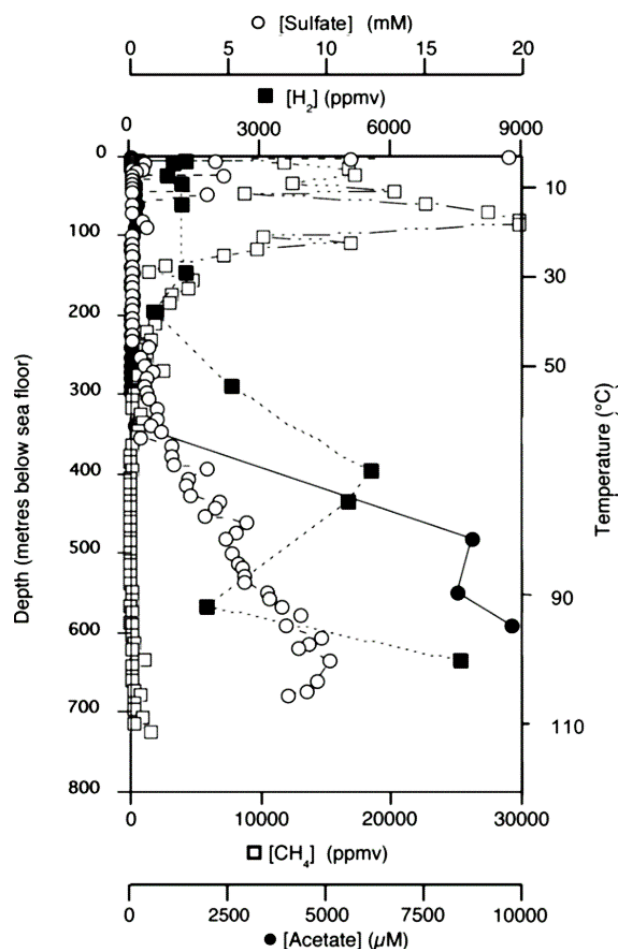


Figure 13 : Exemple d'évolution des concentrations de métabolites microbiens dans un contexte sédimentaire profond en fonction de la profondeur et de la température (fosse de Nankai, Japon). Figure extraite de Parkes *et al.*, 2014.

b) Dépolymérisation de la MO et zonations

De nombreux environnements (ex. : lacs, rizières, sédiments marins, tourbières) sont des habitats stratifiés (zonations) au sein desquels il existe d'importantes variations de potentiels redox et de gradients géochimiques comportant différents donneurs et/ou accepteurs d'électrons, et par conséquent une grande diversité de niches pour des procaryotes aux métabolismes variés (Canfield *et al.*, 1993; Le Mer & Roger, 2001; Conrad, 2007; Avramescu *et al.*, 2011; Bridgham *et al.*, 2013). Le cycle du carbone y est couplé à la réduction, par une microflore détritique, d'une large gamme d'accepteurs d'électrons qui sont, globalement, consommés selon une série de réactions métaboliques prédictibles. Les réactions métaboliques produisant le plus d'énergie libre ($\Delta G_0'$) interviennent les premières. Les archées méthanogènes se développent dans les microniches anoxiques qui correspondent souvent à des horizons non superficiels. Les archées méthanogènes se développant à partir d'hydrogène et d'acétate peuplent les zones dépourvues d'oxydants inorganiques forts tels que le nitrate (NO_3^-), le fer ferrique (Fe^{3+}), le manganèse (Mn^{4+}) ou le sulfate (SO_4^{2-}) (Schink, 1989; Worm *et al.*, 2010). Les méthanogènes méthylotrophes peuvent cohabiter avec des microorganismes

sulfato-réducteurs vu qu'ils n'entrent pas en compétition pour les mêmes substrats (*i.e.* : des composés méthylés). Les procaryotes sulfato-réducteurs et méthanogènes interviennent donc dans la dégradation terminale de la MO, minéralisant celle-ci ou les produits de sa transformation par d'autres procaryotes, en CO₂ ou en CO₂ et CH₄, respectivement dans les strates riches et moins riches en sulfates. Les acides humiques présents dans de nombreux écosystèmes (tourbières, sédiments, lacs, *etc.*) semblent inhiber la méthanogénèse (Khadem *et al.*, 2017) (Figure 14). D'un point de vue énergétique, la production de méthane n'est possible que lorsque le potentiel redox du milieu est compris entre -200 et -400 mV (Fetzer & Conrad, 1993; Le Mer & Roger, 2001). Certaines espèces affiliées à l'ordre des *Methanosarcinales* (versatile d'un point de vue métabolique) sont néanmoins capables de mettre en œuvre ce processus sous un potentiel redox de -50 mV (Fetzer & Conrad, 1993; Wagner, 2020).

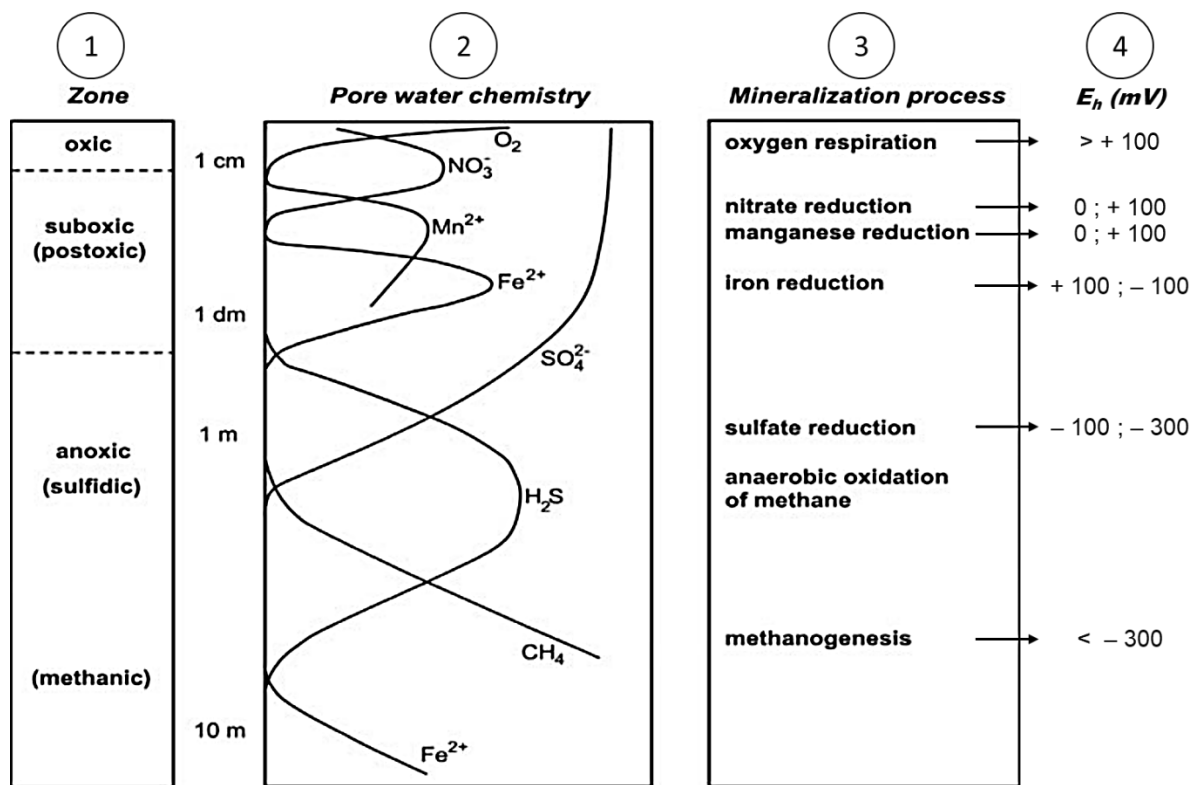


Figure 14 : Représentation schématique et idéalisée des différentes zonation biogéochimiques dans lesquelles la méthanogénèse peut se produire, dans un contexte de sédiments marins. (1) Les différents degrés d'oxydation du sédiment. L'échelle de la profondeur est quasi logarithmique la profondeur réelle peut cependant varier suivant le contexte géologique. (2) Evolution de la concentration des composés dissous dans l'eau (O_2 , NO_3^- , Mn^{2+} , Fe^{2+} , SO_4^{2-} , H_2S et CH_4) en fonction de la profondeur ; la hauteur des pics et l'échelle des concentrations sont arbitraires. (3) Processus métaboliques successifs de reminéralisation de la matière organique dominants. (4) Potentiels d'oxydo-réduction de ces différents processus. Figures extraites et adaptées de Jørgensen & Kasten, (2006), d'après des travaux de Froelich *et al.* (1979) et de Berner (1981).

c) Etapes de dégradation biotique et anaérobie de la matière organique

Les substrats de la méthanogénèse proviennent en partie de la dégradation de la matière organique (MO) par une succession de dégradations microbiennes, le long d'un gradient rédox vertical. Dans la plupart des environnements dépourvus de lumière ou de sulfate, différents consortia successifs de microorganismes procaryotes et parfois eucaryotes (protistes, microchampignons) dégradent la MO en cinq grandes étapes : (i) l'hydrolyse, (ii) l'acidogénèse, (iii) l'acétogénèse, (iv) l'oxydation syntrophique de l'acétate et (v) la méthanogénèse (Bryant, 1979; Schink, 1997; Garcia *et al.*, 2000) (Figure 15). Les produits du métabolisme générés à une étape donnée sont généralement utilisés comme substrats à l'étape suivante. La composition taxonomique de ces cohortes microbiennes ainsi que le nombre d'étapes de dégradation de la MO peuvent varier suivant les conditions physico-chimiques du milieu (présence d'oxydants forts, pH, température, salinité, pression osmotique, qualité des substrats disponibles, *etc.*).

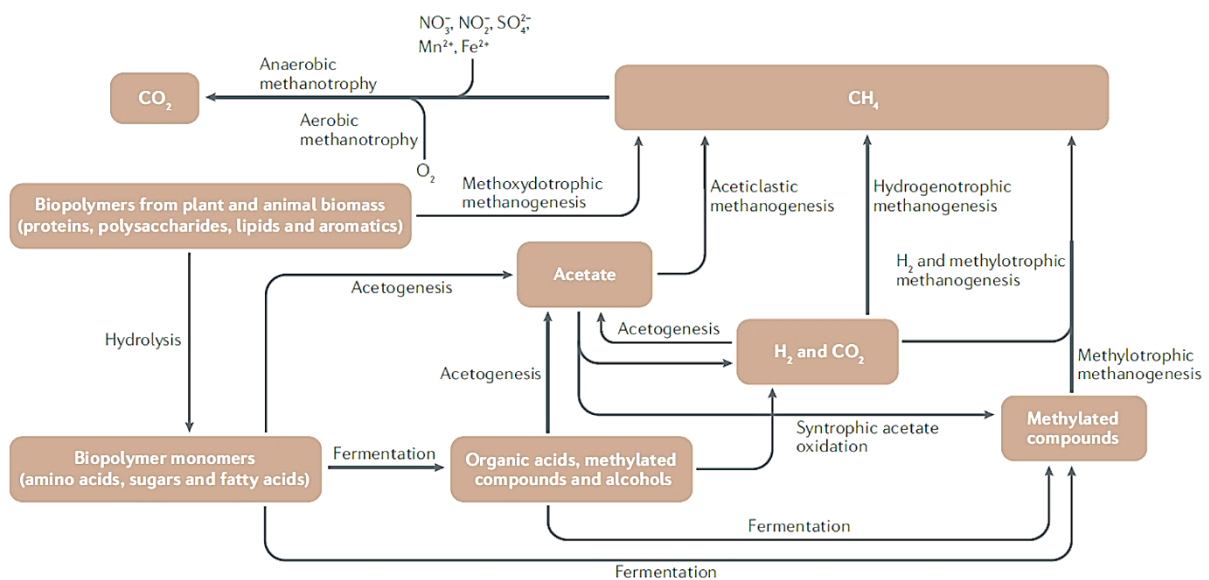


Figure 15 : Représentation schématique des différentes étapes de dégradation de la MO dans un cadre idéalisé. Ces étapes vont de la production des substrats de la méthanogénèse à la production du méthane, et à son recyclage par les microorganismes. La MO complexe est dégradée successivement par les étapes d'hydrolyse, de fermentation, d'(homo-)acétogénèse, d'oxydation syntrophique de l'acétate et enfin par la méthanogénèse. Le méthane est ensuite oxydé par des bactéries méthylotrophes anaérobies ou aérobies. Figure extraite de Evans *et al.* (2019).

a. L'hydrolyse et l'acidogénèse

L'hydrolyse et l'acidogénèse sont réalisées par les bactéries fermentaires dites primaires anaérobies strictes ou anaérobies facultatives (ex. : *Bacteroidetes*, *Clostridiales*, *Streptococcales*) ainsi que par des champignons saprophytes (ex. : *Fusarium commune*) (Le Mer & Roger, 2001; Huang *et al.*, 2015; Nozhevnikova *et al.*, 2020). Ces organismes excrètent dans le milieu des enzymes hydrolytiques (ex. : cellulases, protéases) clivant des macromolécules complexes et des polymères

(acides nucléiques, lipides, polysaccharides, protéines) en oligomères et monomères (acides aminés, acides gras, sucres, glycérol, purines, pyrimidines) (Zinder, 1993; Liu & Whitman, 2008; McInerney *et al.*, 2008). Les bactéries fermentaires impliquées dans l'hydrolyse de la MO sont généralement peu sensibles aux variations de température et de pH du milieu et ont un temps de génération relativement court (Nozhevnikova *et al.*, 2020). Une partie des produits de l'hydrolyse est directement consommée par les bactéries hydrolytiques tandis que le reste est consommé par les bactéries acidogènes (Nozhevnikova *et al.*, 2020). En théorie, les archées réalisant la méthanogenèse hydrogénotrophe et méthoxydotrophe peuvent aussi se développer à ce stade, parallèlement aux réactions de fermentation, en réduisant du CO₂ et en oxydant de l'H₂ dans le premier cas, ou des composés aromatiques méthoxylés (R-O-CH₃, issus de la lignine par exemple) dans le second cas (Mayumi *et al.*, 2016).

L'acidogenèse est réalisée par des bactéries anaérobies strictes ou anaérobies facultatives (ex. : *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*) qui fermentent les oligomères et monomères en acétate et en d'autres acides gras volatils (AGVs) (butyrate, formate, isovalérate, propionate, valérate, *etc.*), en alcools (méthanol, éthanol, butanol), en lactate, en succinate, ainsi qu'en composés méthylés (diméthylsulfure, méthanethiol, méthylamines), en CO₂ et dihydrogène (H₂) (King, 1984; Schink, 1997; Le Mer & Roger, 2001; Lomans *et al.*, 2001; Venkiteshwaran *et al.*, 2016). A cette étape, l'ensemble des principaux substrats de la méthanogenèse sont disponibles (composés méthylés, H₂/CO₂, formate, acétate) et peuvent être consommés par les archées méthanogènes.

b. L'acétogenèse

La troisième étape de la dégradation de la MO est l'acétogenèse. Cette étape est réalisée par des bactéries dites secondaires parmi lesquelles il est possible de distinguer les bactéries acétogènes majoritairement autotrophes et les bactéries acétogènes (hétérotrophes) productrices obligatoires de dihydrogène (APOH) qui forment une relation syntrophique avec des microorganismes hydrogénotrophes comme certaines archées méthanogènes (Garcia *et al.*, 2000). Les relations avec les archées méthanogènes seront évoquées dans le paragraphe § 4..

Parmi les bactéries acétogènes autotrophes, il est possible de distinguer les bactéries homoacétogènes produisant de l'acétate par réduction de CO₂ et oxydation d'H₂, et les autres bactéries acétogènes produisant de l'acétate, du CO₂ et de l'H₂ par oxydation d'AGVs (ex. : butyrate, propionate) ou d'éthanol. Phylogénétiquement proches (*Firmicutes*) des autres bactéries acétogènes,

les bactéries homoacétogènes sont capables de croître par autotrophie ou par hétérotrophie, en consommant alors des substrats organiques plus complexes (ex. : bétaine) (Saady, 2013). Leur particularité réside dans leur capacité à réorienter rapidement leur métabolisme vers la consommation d' H_2/CO_2 (et de CO) lorsque les conditions du milieu deviennent défavorables (stress, épuisement de substrats réduits) (Saady, 2013). Par leur compétitivité métabolique et leur capacité à fixer l' H_2 et de CO_2 , les bactéries homoacétogènes peuvent entrer en compétition trophique directe avec les bactéries sulfato-réductrices et les archées méthanogènes hydrogénotrophes présentes dans leur milieu (Lovley, 1985).

c. L'oxydation syntrophique de l'acétate

L'oxydation de l'acétate est une étape supplémentaire de la dégradation de la MO. Celle-ci est réalisée par certaines bactéries dites homoacétogènes qui produisent de l' H_2/CO_2 à partir d'acétate lors d'une réaction endergonique. Cette réaction n'étant thermodynamiquement pas favorable, l'interaction avec des microorganismes hydrogénotrophes est nécessaire afin de contrebalancer ce déséquilibre énergétique. Les interactions métaboliques entre ces bactéries et les microorganismes méthanogènes sont détaillées dans le paragraphe § 4.

d. La méthanogenèse

La méthanogenèse constitue l'ultime étape de la dégradation de la matière organique. Les archées méthanogènes réduisent un nombre relativement restreint de substrats pour en retirer de l'énergie. Traditionnellement, ces archées sont réparties dans 4 catégories sur la base des substrats cataboliques utilisés pour la méthanogenèse. Sur cette base, les principaux types de méthanogenèse sont : (i) la méthanogenèse acétotrophe (acétoclaste) basée sur la consommation d'acétate, (ii) la méthanogenèse hydrogénotrophe (H_2/CO_2 et/ou des composés en C1), (iii) la méthanogenèse méthylotrophe (R- CH_3) et (iv) la méthanogenèse hydrogénotrophe méthyle-dépendante ($H_2 + R-CH_3$) (Garcia *et al.*, 2000; Liu & Whitman, 2008) (Tableau 3). Certaines archées méthanogènes sont également capables de dégrader des substrats plus complexes comme des composés aromatiques méthoxylés (R-O- CH_3) (méthanogenèse méthoxydrotrophe) (Tableau 3) (Mayumi *et al.*, 2016). Les différentes voies métaboliques impliquées ce métabolisme sont détaillées dans le paragraphe § 5.b).

Tableau 3 : Substrats et réactions de dégradation de la méthanogénèse. Les variations standard des énergies libres ($\Delta G_0'$ en $\text{kJ mol}^{-1} \text{CH}_4$) ont été calculées à pH 7 à partir de l'énergie libre de formation des espèces ioniques les plus abondantes : ex., le CO_2 correspond à $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ et l' HCOOH à $\text{HCOO}^- + \text{H}^+$. *Mbacter* : *Methanothermobacter*, *Mcoccoides* : *Methanococcoides*, *Mcococcus* : *Methanomicrococcus*, *Mgenium* : *Methanogenium*, *Mmicrobium* : *Methanomicrobium*, *Mmicoccus* : *Methermicoccus*, *Msarcina* : *Methanosarcina*, *Msphaera* : *Methanosphaera*, *Mspirillum* : *Methanospirillum*, *Mthrix* : *Methanothrix*, *Mx* : *Methanomassiliicoccales*. AM : Archées méthanogènes. Ar : composé méthoxydé. * : genre incertain. ** : putatif. NR : Non renseigné.

Réaction de méthanogénèse	Substrat	$\Delta G_0'$	Exemple d'organisme	Référence
Acétoclastique				
$\text{CH}_3\text{COCO}^-\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2$	Pyruvate	- 88,0	<i>Msarcina barkeri</i> Fusaro	(Bock <i>et al.</i> , 1994)
$\text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	Acétate	- 31,0	<i>Mthrix</i> sp., <i>Msarcina</i> sp.	(Zinder, 1993)
Hydrogéntrophe, avec des composés de type CO_2				
$4 \text{CO} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	Monoxyde de carbone	- 196	<i>Mbacter</i> sp., <i>Ms</i>	(Liu & Whitman, 2008)
$4 \text{HCOOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{CO}_2$	Formate	- 130,1	Plupart des AM	(Zinder, 1993)
$\text{CO}_2 + 4 \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$	$\text{CO}_2 + \text{H}_2$	- 135,6	Plupart des AM	(Zinder, 1993)
Hydrogéntrophe, avec des alcools (parfois référé à méthanogénèse alcoolotrophe)				
$\text{CO}_2 + 2 \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}_2\text{O}$	$\text{CO}_2 + \text{Ethanol}$	- 116,3	<i>Mgenium organophilum</i>	(Frimmer & Widdel, 1989)
$\text{CO}_2 + 4 \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \rightarrow \text{CH}_4 + 4 \text{CH}_3\text{COCH}_3 + 2 \text{H}_2\text{O}$	$\text{CO}_2 + (\text{Iso-})\text{propanol}$	- 36,7	<i>Mspirillum</i> sp. SK	(Widdel, 1986)
$\text{CO}_2 + 4 \text{C}_5\text{H}_9\text{OH} \rightarrow \text{CH}_4 + 4 \text{C}_5\text{H}_8\text{O} + 2 \text{H}_2\text{O}$	$\text{CO}_2 + \text{Cyclopentanol}$	NR	<i>Mmicrobium paynteri</i>	(Bleicher <i>et al.</i> , 1989)
NR	$\text{CO}_2 + (\text{Iso-})\text{butanol}$	NR	<i>Mspirillum</i> sp. SK	(Widdel, 1986)
NR	$\text{CO}_2 + 2,3\text{-butanediol}$	NR	<i>Mspirillum</i> sp. SK	(Widdel, 1986)
Méthylotrophe (R-CH_3)				
$4 \text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	Méthanol	- 104,9	<i>Msarcina</i> spp.	(Liu & Whitman, 2008)
Méthylotrophe, avec des composés soufrés (R-S-CH_3)				
$2 (\text{CH}_3)_2\text{S} + 3 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{S}$	Diméthylsulfure	- 52,2	<i>Msarcina barkeri</i> , <i>Mx</i>	(Bok <i>et al.</i> , 2006)
$4 \text{CH}_3\text{SH} + 3 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{HS}^- + 4\text{H}^+$	Méthanethiol	- 51,0	<i>Msarcina barkeri</i> , <i>Mx</i>	(Bok <i>et al.</i> , 2006)
$4 \text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$	3-S-méthylmercaptopropionate	NR	<i>Msarcina</i> sp. MTP4	(van der Maarel & Hansen, 1997)
Méthylotrophe, avec des composés aminés (R-N-CH_3)				
$2 (\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	<i>N,N</i> -diméthyléthanolamine	- 88,6	<i>Mcoccoides methylutens</i>	(Watkins <i>et al.</i> , 2012)
$4 \text{CH}_3\text{NH}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{NH}_3$	Monométhylamine	- 75,0	<i>Msarcina</i> spp.	(Zinder, 1993; Liu & Whitman, 2008)
$4 (\text{CH}_3)_3\text{NH} + 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 9 \text{CH}_4 + 3 \text{CO}_2 + 4 \text{NH}_3$	Triméthylamine	- 74,3	<i>Msarcina</i> spp.	(Zinder, 1993; Liu & Whitman, 2008)
$4 \text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{NH}_4\text{Cl}$	Chlorure de méthylammonium	- 74	<i>Marcina</i> spp.	(Liu & Whitman, 2008)

$2 (\text{CH}_3)_2\text{NH} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{NH}_3$	Diméthylamine	- 73,2	<i>Msarcina</i> spp.	(Zinder, 1993; Liu & Whitman, 2008)
Méthylotrophe, avec des amines quaternaires (NR₄⁺ où R sont identiques ou différents groupes alkyle ou aryle)				
$4 (\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^- + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 (\text{CH}_3)_2\text{N} + \text{CH}_2\text{COO}^-$	Glycine-bétaïne	- 129,8	<i>McCocoides vulcani</i>	(Watkins <i>et al.</i> , 2014)
$4 (\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} + 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 9 \text{CH}_4 + 3 \text{CO}_2 + 4 \text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH} + 4 \text{H}^+$	Choline	51,0	<i>McCocoides burtonii</i>	(Watkins <i>et al.</i> , 2012)
$(\text{CH}_3)_4\text{N}^+ + 3 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + \text{NH}_4^+$	Tétraméthylammonium	NR	<i>McCocoides</i> sp. NaT1	(Tanaka, 1994; Ticak <i>et al.</i> , 2015)
Hydrogénotrophe méthyle-dépendante (H₂ + R-CH₃)				
$2 \text{CH}_3\text{OH} + \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} \rightarrow 2 \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O} + \text{CH}_3\text{COOH}$	Méthanol + Ethanol	- 199,9	<i>Msphaera</i> sp. WGK6	(Hoedt <i>et al.</i> , 2016)
$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	Méthanol + H ₂	- 113	<i>McCoccus blatticola</i> , <i>Mx</i>	(Liu & Whitman, 2008)
$(\text{CH}_3)_3\text{NH} + 3 \text{H}_2 \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{NH}_3$ NR	Triméthylamine + H ₂	NR	<i>Msarcina barkeri</i> , <i>Mx</i>	(Müller <i>et al.</i> , 1987; Kröninger <i>et al.</i> , 2017)
$2 (\text{CH}_3)_2\text{NH} + 5 \text{H}_2 \rightarrow 4 \text{CH}_4 + 2 \text{NH}_3$ NR	Diméthylamine + H ₂	NR	<i>Mx</i>	(Kröninger <i>et al.</i> , 2017)
$\text{CH}_3\text{NH} + 4 \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{NH}_3$ NR	Monométhylamine + H ₂	NR	<i>McCoccus</i> sp., <i>Mx</i>	(Kröninger <i>et al.</i> , 2017)
Méthoxydotrophe				
$4 \text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})(\text{OCH}_3) + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + 4 \text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2 + \text{CO}_2$	2-méthoxyphénol	- 90	<i>Mmicoccus shengliensis</i>	(Mayumi <i>et al.</i> , 2016; Kurth <i>et al.</i> , 2020)
$4 \text{Ar-OCH}_3 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + 4 \text{Ar-OH} + \text{CO}_2$ – formule générale	Ar : composé méthoxylé	-	-	(Kallistova <i>et al.</i> , 2017)
Alcanotrophe				
$4 \text{C}_{16}\text{H}_{34} + 30 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 49 \text{CH}_4 + 15 \text{CO}_2$	Hexadécane **	- 339,2	<i>Ca.</i> ‘Methanoliparia’	(Laso-Pérez <i>et al.</i> , 2019)

d) Origines des différents substrats de la méthanogenèse

Les différents substrats de la méthanogenèse sont le résultat de la dégradation de la MO et/ou de processus géologiques. Bien qu'ubiquistes dans les environnements anoxiques, les archées méthanogènes ne peuvent consommer qu'une certaine gamme de substrats suivant leurs capacités métaboliques (Tableau 3).

a. H₂/CO₂, CO et formate

Comme évoqué ci-dessus, le dihydrogène et le CO₂ sont des produits majeurs des étapes d'hydrolyse et de fermentation de la MO. Ces étapes sont réalisées par différentes cohortes de microorganismes dont les microchampignons, les protozoaires et les bactéries anaérobies (Zinder, 1993). Le H₂ et le CO₂ formés lors de processus géologiques sont également des sources d'énergie pour les archées méthanogènes hydrogénotrophes (Garcia *et al.*, 2000; Parkes *et al.*, 2014). Ces deux composés sont les plus couramment utilisés par les archées méthanogènes : près des deux-tiers (~ 100/140) des archées méthanogènes décrites à ce jour sont capables de consommer ces composés pour leur métabolisme (Sowers, 2019). Il est intéressant de noter que les différentes étapes de fermentations génèrent de grandes quantités de CO₂, ce qu'il le rend rarement limitant dans les milieux anaérobies (Liu & Whitman, 2008). Le dihydrogène est un composé rapidement produit et consommé par les diverses communautés microbiennes faisant l'objet d'une compétition entre les différentes cohortes microbiennes (voir § 4.).

Le formate (HCOO⁻) est également un produit commun de la fermentation microbienne, notamment chez les espèces qui font intervenir une pyruvate-formate lyase. Ce composé peut également être un sous-produit de la fermentation de l'acide oxalique (HOOC-COOH) synthétisé par les végétaux (Zinder, 1993).

Bien que le monoxyde de carbone (CO) soit un substrat de la méthanogenèse, sa consommation ne mène qu'à une faible croissance cellulaire et ne semble qu'être un substrat mineur pour ce métabolisme (Zinder, 1993; Garcia *et al.*, 2000).

b. L'acétate

L'acétate (CH₃COO⁻) est considéré comme l'un des plus importants intermédiaires carbonés dans les systèmes anaérobies. Dans ces écosystèmes, l'acétate est produit lors de la l'acétogenèse à partir d'H₂ et de CO₂, ou de matière organique (acides organiques, alcools, CO,

composés méthylés, sucres) avant d'être rapidement consommé par les bactéries réductrices d'oxydants forts et les archées méthanogènes acétoclastiques (Zinder, 1993; Hines *et al.*, 2008; Liu & Whitman, 2008). Comme évoqué ci-dessus, l'acétate est également généré par des processus géologiques à partir de matières organiques enfouies dans des conditions de pression et de températures précises (Parkes *et al.*, 2014). A ce titre, l'acétate est virtuellement présent dans l'ensemble des écosystèmes anoxiques en petites quantités car rapidement consommé (ex. : de $< 0,1$ à $1000 \mu\text{M}$ dans certaines tourbières (Ansbaek & Blackburn, 1980; Hines *et al.*, 2001)).

c. Les alcools

Les alcools sont des sous-produits de la fermentation anaérobie consommés par certaines archées méthanogènes hydrogénotrophes. Bien que l'éthanol, le propanol, l'isopropanol et le butanol soient des produits de fermentation courants, leurs rôles dans le cycle du carbone restent peu étudiés, notamment dans les sédiments. A titre d'exemple, des concentrations de 3 à $62 \mu\text{M}$ d'éthanol dans les sédiments marins contre 11 à $2,5 \text{ nM}$ dans des sédiments d'eaux douces (Martins *et al.*, 2019). Des concentrations de 4 à 5 mM d'éthanol et de propanol ont également été mesurés dans certaines zones humides (ex. : région des cuvettes des prairies, Amérique du Nord) (Martins *et al.*, 2019)).

d. Les composés méthylés

Les composés méthylés (R-CH_3) sont des sous-produits de la dégradation anaérobie de matières organiques aminés présents dans de nombreux écosystèmes (océans, saumures, sédiments, tourbières, tubes digestifs). Ces substrats – particulièrement les méthylamines – sont qualifiés de « non compétitifs » car non consommés par les bactéries sulfato-réductrices (Liu & Whitman, 2008).

A titre d'exemple, la TMA est produite à partir de la choline, de la bétaine, de la carnitine, de certains lipides (diacylglycérol-hydroxyméthyl-triméthyl- β -alanine) ou encore de l'oxyde de triméthylamine (TMAO) et de la méthionine (Zinder, 1993; Whitman *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2019). La TMAO et la bétaine sont deux solutés compatibles (osmolytes) abondamment produits par le phytoplancton ou les poissons. La choline est un des produits de dégradation de la lécithine (un lipide) (Zinder, 1993; Sun *et al.*, 2019). Dans un contexte digestif, la TMA est issue de la dégradation de divers aliments (voir § 7.b) pour plus de détails).

Il est également intéressant de noter que la choline et la bétaine sont des substrats directs de certains méthanogènes (Watkins *et al.*, 2014, 2012; L'Haridon *et al.*, 2014;).

Bien que marginalement consommé par les archées méthanogènes, le méthanol (MeOH) est un des substrats de la méthanogenèse méthylotrophe. A titre d'exemple, le méthanol est un des sous-produits de la dégradation de la pectine, des acides aromatiques méthoxylés et plus marginalement de la lignine et du xylane (Schink & Zeikus, 1980; Whitman *et al.*, 2006; Conrad, 2020).

Le méthane-thiol et le diméthylsulfure (DMS) sont les composés organiques volatils soufrés majoritaires dans les sédiments d'eaux douces (Kurth *et al.*, 2020). Ceux-ci sont également présents dans d'autres écosystèmes tels que les tourbières, les océans, les marais salants ou encore dans les réservoirs pétroliers et les fluides hydrothermaux océaniques (Bok *et al.*, 2006; Curson *et al.*, 2011; Reeves *et al.*, 2014; Carrión *et al.*, 2017, 2019; Schäfer & Eyice, 2019). Le DMS résulte de la dégradation anaérobie du diméthylsulfoniopropionate (dérivé du phytoplaston en décomposition), du diméthylsulfonium, de la S-méthylméthionine, du diméthylsulfoxyde ou de composés aromatiques méthoxylés (Iverson *et al.*, 1989; Carrión *et al.*, 2017). Le DMS est également un précurseur du méthane-thiol.

e. Les composés aromatiques méthoxylés et les hydrocarbures

La méthanogenèse méthoxydotrophe est l'une des dernières voies de méthanogenèse décrites à ce jour, demeurant encore peu explorée (voir § 5.b) (Mayumi *et al.*, 2016). Dans cette voie de méthanogenèse, des composés aromatiques méthoxylés sont utilisés comme substrats. Les composés aromatiques méthoxylés du charbon sont issus de la dégradation et de la transformation de la lignine (un des principaux constituant du bois), dont les produits directs de la diagenèse peuvent également servir de substrat à *Methermicoccus shengliensis* (*Methanosarcinales*) (Figure 16). La découverte récente de cette voie de méthanogenèse fait que son impact sur le cycle biogéochimique du carbone demeure méconnu (Mayumi *et al.*, 2016; Adam *et al.*, 2017).

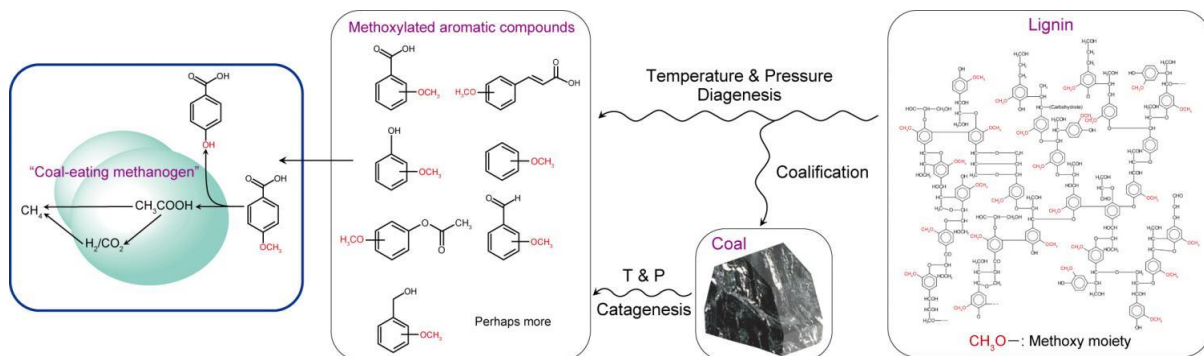


Figure 16 : Schéma illustrant l'origine et l'utilisation de composés aromatiques méthoxylés. Figure extraite de : <https://phys.org/news/2016-10-microbes-compounds-coal-methane.html>.

La décomposition thermogénique (*i.e.* : abiotique) de la matière organique mène également à la production de différents gaz naturels dont de grandes quantités de méthane et d'alcane à court chaîne (*i.e.* : éthane, propane, butane et/ou isobutane) (Laso-Pérez *et al.*, 2016). Ces composés ont récemment été proposés comme de potentiels substrats susceptibles d'être utilisés par de nouvelles lignées candidates d'archées méthanotrophes et/ou méthanogènes comme les *Ca.* 'Methanoliparia' et *Ca.* 'Bathyarchaeota' (Laso-Pérez *et al.*, 2016; Borrel *et al.*, 2019). A l'instar de la voie de méthanogénèse méthoxydotrophe, la voie de méthanogénèse utilisant ces composés (*i.e.* : la méthanogénèse alcanotrophe ; voir § 5.b)) n'est à ce jour connue qu'à travers des analyses génomiques.

4. Interactions entre les archées méthanogènes et d'autres microorganismes

a) Compétition pour l'accès aux substrats

Le dihydrogène est un composé rapidement produit et consommé par les divers taxa microbiens tout au long des différents processus de dégradation de la matière organique, notamment dans les écosystèmes avec de faibles apports en matière organique (ex. : sédiments lacustres, sédiments marins) (Zinder, 1993). Sa concentration dans l'environnement est donc généralement relativement faible (Tableau 4), ce qui peut mener à une compétition entre d'une part les bactéries sulfato-réductrices et les archées méthanogènes hydrogénotrophes, et d'autre part entre ces dernières et les bactéries homoacétogènes (Zinder, 1993).

Tableau 4 : Exemples de concentrations en dihydrogène dans différents habitats anoxiques. Données extraites de Zinder, 1993.

Habitat	H ₂ (Pa)	H ₂ (atm)	H ₂ (nM)
Sédiments (Lac Mendota, États-Unis)	4,8	~ 4,86 × 10 ⁻⁷	36
Sédiments (Lac Knaak, États-Unis)	3,7	~ 3,75 × 10 ⁻⁷	28
Rizières	2,7	~ 2,74 × 10 ⁻⁷	28
Boues d'épuration	27,0	~ 2,74 × 10 ⁻⁶	203
Fluides du rumen (niveau basal)	187	~ 1,89 × 10 ⁻⁵	1400
Fluides du rumen (après subsistance)	2000	~ 2,02 × 10 ⁻⁴	15000

Bien qu'en règle générale, la méthanogenèse prévaut dans les horizons anoxiques dépourvus d'oxydants forts, et donc de sulfates, il existe des zones où certaines archées méthanogènes sont susceptibles d'entrer en compétition avec les bactéries sulfato-réductrices pour l'utilisation du dihydrogène. En plus d'avoir un métabolisme énergétique plus favorable, les bactéries sulfato-réductrices hydrogénotrophes peuvent se développer à des pressions partielles de dihydrogène (P_{H_2}) bien inférieures à celles requises par les archées méthanogènes hydrogénotrophes CO₂-dépendantes (*i.e.* : qui consomment de l'H₂/CO₂ pour leur méthanogenèse) et vont donc surpasser les méthanogènes hydrogénotrophes dans les habitats où la pression partielle en H₂ est très basse (Figure 1). En effet, typiquement, la grande majorité des archées méthanogènes hydrogénotrophes CO₂-dépendantes sont incapables d'utiliser l'H₂ lorsqu'un seuil de $P_{H_2} < 6 \text{ Pa}$ ($\approx 6 \times 10^{-5} \text{ atm}$) est atteint dans le milieu (N.B. : la température peut toutefois influencer la thermodynamique de la réaction) alors que ce seuil descend à moins de 1 Pa pour les bactéries compétitrices (Lovley, 1985; Zinder, 1993; Feldewert *et al.*, 2020).

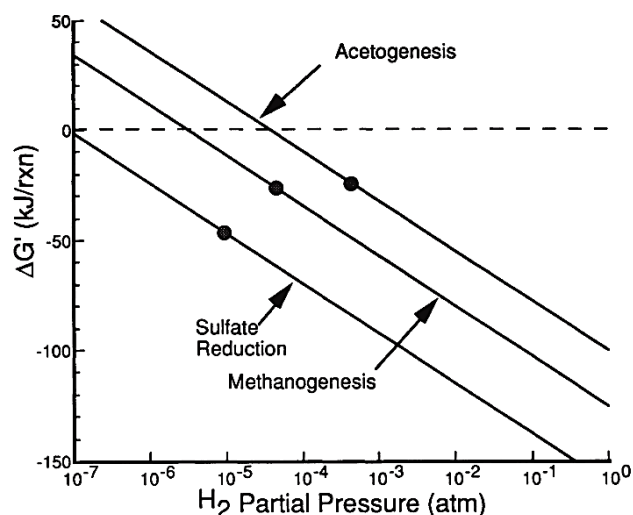


Figure 17 : Effet de la pression partielle en H_2 (P_{H_2}) sur les énergies libres de la méthanogénèse, de la sulfato-réduction et de l'homoacétogénèse. Les points indiquent les seuils d' H_2 typiques pour les trois différents groupes microbiens (homoacétogène : *Actobacterium woodii* ; sulfato-réductrice : *Desulfovibrio desulfuricans* ; méthanogènes hydrogénotrophes CO_2 -dépendantes : *Methanospirillum hungatei* & *Methanobrevibacter smithii*). Les concentrations pour les autres produits et réactifs que l' H_2 sont : HCO_3^- et SO_4^{2-} , 20 mM ; CH_4 , 0,5 atm ($\approx 5,1 \times 10^4$ Pa) ; HS^- = 1 mM ; acétate, 10 mM. Figure extraite de Zinder (1993).

Les archées méthanogènes méthylotrophes n'ont pas besoin d'oxyder du dihydrogène pour réaliser leur méthanogénèse. A ce titre, ces microorganismes n'entrent pas en compétition avec les bactéries sulfato-réductrices pour l' H_2 (Oremland *et al.*, 1982; Liu & Whitman, 2008). Dans leurs récents travaux Feldewert *et al.* (2020) ont montré que la P_{H_2} requise par les archées méthanogènes hydrogénotrophes méthyle-dépendantes *Methanomassiliicoccus luminyensis* (*Mmc. luminyensis*, *Methanomassiliicoccales*), *Methanosphaera stadtmanae* (*Methanobacteriales*) et *Methanimicrococcus blatticola* (*Methanosarcinales*), pour leur métabolisme, était inférieure à 0,1 Pa ($P_{H_2} < 0,1$; 0,1 Pa $\approx 10^{-6}$ atm), ce qui semble indiquer que ces archées ont une forte affinité pour le dihydrogène qui leur permettrait de cohabiter ou de ne pas entrer en compétition avec les bactéries sulfato-réductrices. Dans ce cadre, il est intéressant de noter qu'à l'exception de *Mmc. luminyensis*, toutes ces espèces ayant une forte affinité pour l'hydrogène sont inféodées aux écosystèmes digestifs, où les P_{H_2} sont généralement élevées. Dans un cadre non-digestif, les *Methanomassiliicoccales* ainsi que d'autres lignées hydrogénotrophes méthyle-dépendantes pourraient coloniser les mêmes niches écologiques que les bactéries sulfato-réductrices (Oremland *et al.*, 1982; Feldewert *et al.*, 2020).

Suivant les concentrations en sulfates dans le milieu, les archées méthanogènes acétoclastiques peuvent entrer en compétition avec des bactéries sulfato-réductrices (Oremland *et al.*, 1982; Whitman *et al.*, 2006).

Les archées méthanogènes n'entrent pas nécessairement en compétition avec les microorganismes de leur niche écologique. En effet, il a été démontré que de nombreuses archées méthanogènes hydrogénotrophes peuvent entretenir des relations syntrophiques avec d'autres microorganismes.

b) Interactions avec des bactéries oxydant l'acétate

L'oxydation syntrophique de l'acétate peut être réalisée en faisant intervenir certaines bactéries (ex. : *Clostridia*, *Geobacter* et *Thermotoga*) productrices d'hydrogène et des archées méthanogènes hydrogénotrophes (Hattori, 2008). La réaction syntrophique peut se résumer en deux étapes : l'oxydation déséquilibrée des groupements méthyle (R-CH₃) et carboxyle (R-COO⁻) de l'acétate en CO₂ et H₂ ($\Delta G_0' = 104,6 \text{ kJ mol}^{-1}$), suivie du rétablissement de l'équilibre énergétique par l'élimination de l'hydrogène excédentaire par une archée méthanogène hydrogénotrophe ($\Delta G_0' = - 135,6 \text{ kJ mol}^{-1}$) (Tableau 5) (Hattori, 2008). Bien que thermodynamiquement favorable, cette coopération syntrophique ne génère que très peu d'énergie pour chacun des partenaires (Bilan de la réaction : $- 31,0 \text{ kJ mol}^{-1}$). L'association de bactéries oxydant l'acétate avec d'autres microorganismes hydrogénotrophes non-méthanogènes est également possible (ex. : avec *Geobacter sulfurreducens*, bactérie réductrice de fer ferrique) (Caccavo *et al.*, 1994).

Tableau 5 : Réactions impliquées dans l'oxydation de l'acétate (CH₃COO⁻) et du méthane. La variation d'énergie libre a été calculée en conditions standard (25 °C, pH = 7, 10⁵ Pa et concentrations initiales à 1 M). En culture pure, l'oxydation de l'acétate par la bactérie syntrophe est théoriquement endergonique. La réaction de méthanogenèse seule est exergonique. En coculture avec une archée méthanogène hydrogénotrophe, la réaction d'oxydation de l'acétate devient exergonique, permettant le développement de la bactérie syntrophe. Données extraites de Hattori (2008).

Réaction	$\Delta G_0'$ (kJ mol ⁻¹)	Microorganisme impliqué
$\text{CH}_3\text{COO}^- + 4 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{HCO}_3^- + 4 \text{H}_2 + \text{H}^+$	+ 104,6	Bactérie syntrophe oxydant l'acétate
$4 \text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	- 135,6	Méthanogène hydrogénotrophe
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CH}_3\text{COO}^-$	- 31,0	Bactérie syntrophe + méthanogène hydrogénotrophe

c) Interactions avec des bactéries anaérobies productrices obligatoires d'hydrogène

Les bactéries acétogènes productrices obligatoires de dihydrogène (APOHs) produisent de l'acétate par l'oxydation des produits issus de l'acidogenèse (les acides gras volatiles dont l'acétate lui-même, l'éthanol, le glycérol, et le lactate) (Garcia *et al.*, 2000; Nozhevnikova *et al.*, 2020). Chez ces microorganismes, la production d'acétate mène à une coproduction d'H₂ qui s'accumule dans le milieu, déplaçant l'équilibre de la réaction (enthalpie libre $\Delta G_0' > 0 \text{ kJ mol}^{-1}$) (Tableau 6). Lorsque la pression partielle d'H₂ atteint ou dépasse 10

Pa ($P_{H_2} \geq 10$ Pa ; soit $\sim 10^{-4}$ atm), l'acétogenèse et la croissance cellulaire sont inhibées (Garcia *et al.*, 2000; McInerney *et al.*, 2008). Afin de palier à ce phénomène, les bactéries APOHs développent des associations syntrophiques avec des archées méthanogènes hydrogénotropes qui par leur métabolisme maintiennent une P_{H_2} constamment inférieure à 10 Pa (Conrad, 2007). Cette relation entre microorganismes est qualifiée de syntrophie puisque la régulation de la P_{H_2} par les méthanogènes hydrogénotropes est nécessaire au développement des bactéries APOHs. Plusieurs substrats, incluant l'éthanol, le butyrate, le propionate et le benzoate, sont ainsi convertis en méthane et en acétate (Zinder, 1993).

Tableau 6 : Exemple de réactions syntrophiques entre une bactérie APOH et une archée méthanogène hydrogénotrophe. Les variations d'énergie libre de Gibbs ont été calculées en conditions standards (25 °C, pH = 7, 10^5 Pa et concentrations initiales à 1 M). En culture pure, la production d'acétate par la bactérie APOH est endergonique ($\Delta G_0' > 0$). La réaction de méthanogenèse est exergonique ($\Delta G_0' < 0$). En coculture avec une archée méthanogène hydrogénotrophe, la réaction d'acétogenèse devient exergonique, permettant le développement de la bactérie APOH. Données extraites de McInerney *et al.* (2008).

Réaction	$\Delta G_0'$ (kJ mol ⁻¹)	Microorganismes impliqués
$CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3COOH + 2 H_2$	+ 9,65	Bactérie APOH
$4 H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2 H_2O$	- 131	<i>Methanobacterium bryantii</i>
$2 CH_3CH_2OH + CO_2 \rightarrow 2 CH_3COOH + CH_4$	- 112	Bactérie APOH + <i>M. bryantii</i>

d) Exemples de transferts d'électrons entre microorganismes

Très souvent, les microorganismes impliqués dans la dégradation de la MO se développent en agrégats (parfois englués dans une matrice polysaccharidique) à l'intérieur desquels se développent des bactéries primaires et secondaires, des archées méthanogènes et des bactéries sulfato-réductrices (Shen *et al.*, 2016). Dans le cadre de la syntrophie microbienne, le transfert d' H_2 entre les deux cellules se fait soit par une incorporation directe de ce dernier, soit *via* un transfert d'électrons. Quatre principales voies de transfert d'électrons entre cellules sont à ce jour décrites avec (Figure 18) : (a) un transfert d'électrons *via* des *pili* conducteurs d'électrons ou d'autres structures analogues (e^-), (b) par l'intermédiaire de matériaux conducteurs d'électrons (ex. : magnétite, Fe_3O_4), (c) *via* des protéines de transport d'électrons (cytochromes) à la surface des membranes extérieures, ou (d) par la simple diffusion entre cellules (Lovley, 2017; Park *et al.*, 2018; Nozhevnikova *et al.*, 2020). Les mécanismes décrits ci-dessus ont été mis en évidence à partir de cultures plus ou moins complexes.

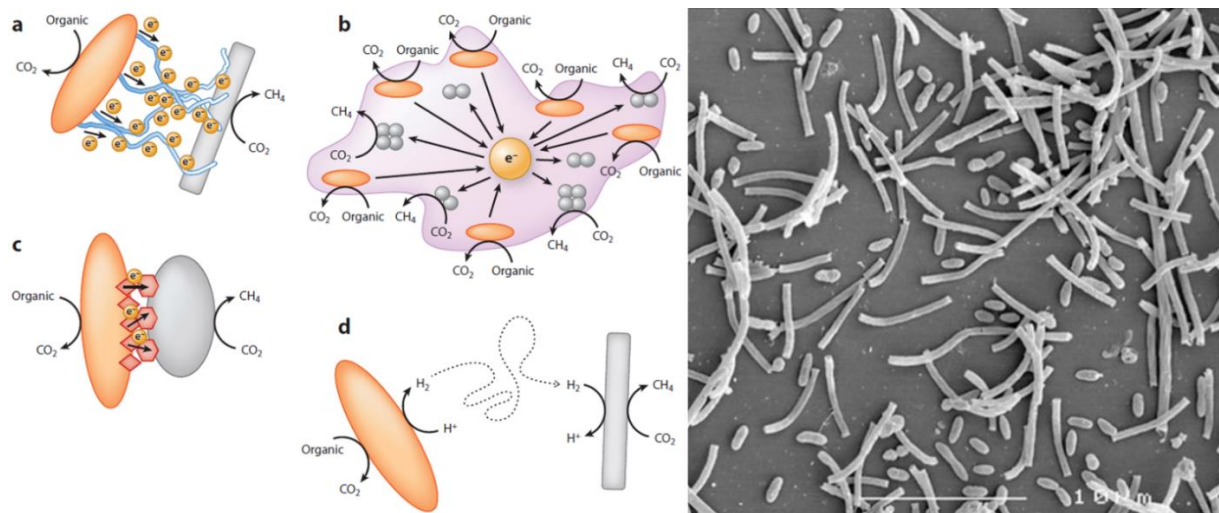


Figure 18 : Principales voies de transfert d'électrons entre cellules. A gauche, mécanismes impliqués dans le transfert d'électrons ou d' H_2 entre une bactérie fermentaire (orange) et un microorganisme hydrogénéotrophe (ici une archée méthanogène, en gris). Le transfert se fait soit (a) par un transfert d'électron à l'aide d'un *pilus* conducteur d'électricité, (b) par l'intermédiaire de matériaux conducteurs d'électricité et donc d'électrons, (c) *via* des protéines de transport d'électrons (cytochromes) à la surface des membranes extérieures, ou (d) par la simple diffusion d' H_2 entre cellules (figure extraite de Lovley *et al.*, 2017). A droite, microphotographie au microscope électronique à balayage (MEB) d'une coculture syntrophique comportant la bactérie *Syntrophobacter fumaroxidans* (cellules ovoïdes ou en forme de citron) capable de dégrader le propionate, et l'archée méthanogène hydrogénéotrophe *Methanospirillum hungatei* (en forme de bâtonnets) (figure extraite de Worm *et al.* (2010). Barre : 10 μ m.

e) Interactions entre des *Protozoa* et des archées méthanogènes en milieu digestif

Les tractus digestifs de nombreux animaux (arthropodes, oiseaux, reptiles, mammifères) hébergent des archées méthanogènes. Les termites et les ruminants sont parmi les principaux animaux émetteurs de méthane connus. Le rumen des ruminants et l'intestin postérieur des termites xylophages hébergent des symbiontes protozoaires (ex. : des *Ciliophora*) (Lange *et al.*, 2005; Brune, 2014; Moissl-Eichinger *et al.*, 2018). Ces ciliés développent eux-mêmes des interactions mutualistes avec des archées méthanogènes sous forme d'ecto- ou endosymbioses. Dans le cadre de la digestion les ciliés dégradent la cellulose des plantes ingérées par l'animal pour produire du CO_2 , de l'acétate, du lactate et de l' H_2 . L' H_2 ainsi produit est directement consommé par des bactéries homoacétogènes et des archées méthanogènes hydrogénéotrophes (*i.e.* : *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* et *Methanomassiliicoccales*) (Brune, 2014; Söllinger *et al.*, 2016; Moissl-Eichinger *et al.*, 2018). A l'instar d'autres écosystèmes, les archées méthanogènes hydrogénéotrophes permettent ainsi de limiter le surplus d' H_2 issu de la fermentation microbienne (Conrad, 2009).

Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'acétate produit par les bactéries du microbiote intestinal dans la cadre de la digestion, peut traverser la paroi intestinale et être consommé par l'hôte (Garcia *et al.*, 2000; Conrad, 2009). Ce phénomène limite ainsi le

développement d'archées méthanogènes acétoclastiques dans les tractus digestifs (Garcia *et al.*, 2000; Conrad, 2009).

5. Les archées méthanogènes

a) Distribution environnementale des archées méthanogènes et paramètres structurant cette distribution

a. Généralités

Comme évoqué ci-dessus, les archées méthanogènes sont ubiquistes dans les écosystèmes anoxiques (Figure 19) (Evans *et al.*, 2019). Certains ordres d'archées méthanogènes (*Methanobacteriales*, *Methanosarcinales*, *Methanomassiliicoccales*) semblent versatiles et pouvoir se développer dans la majorité des environnements anoxiques, tandis que d'autres comme les *Methanopyrales* semblent inféodés à des environnements bien particuliers tels que des sources géothermales et hydrothermales (Evans *et al.*, 2019). Parmi les écosystèmes colonisés par les archées méthanogènes, il est possible de citer : les sédiments (marins, dulçaquicoles), le sol, les zones humides (tourbières, marais, *etc.*), les rizières, les décharges ou encore les mines et les tubes digestifs de nombreux animaux (insectes, vertébrés). Chacun de ces écosystèmes est caractérisé par un panel de paramètres physico-chimiques comme le pH, la salinité, la température, l'exposition au dioxygène ou encore la nature et la disponibilité des substrats.

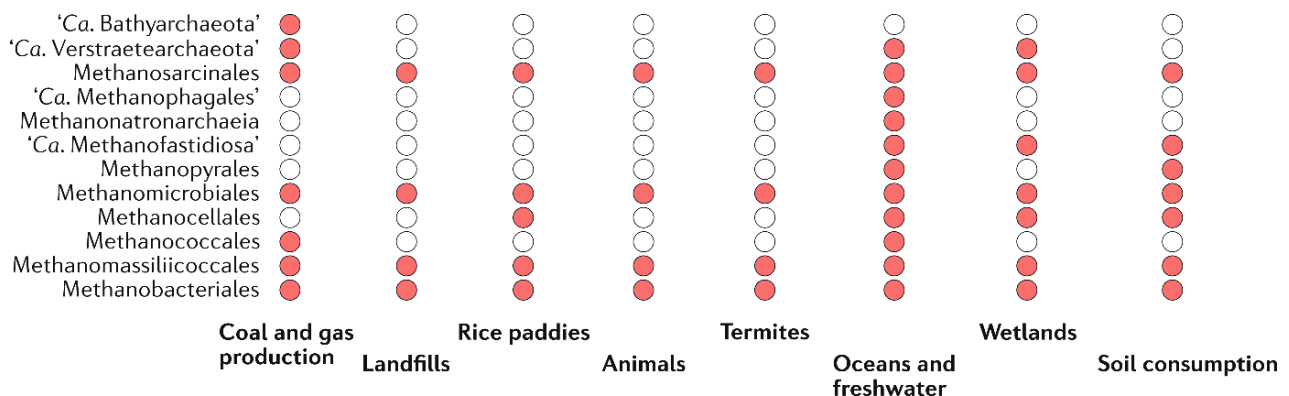


Figure 19 : Répartition environnementale des archées méthanogènes. Les cercles indiquent la présence (rouges) ou l'absence (blancs) de différentes lignées d'archées méthanogènes détectées dans différents écosystèmes sur la base d'inventaires moléculaires de diversité se basant sur le séquençage des gènes codant les ARNr 16S. Figure extraite et adaptée de Evans *et al.* (2019).

b. Paramètres structurant les populations d'archées méthanogènes

i. Généralités sur les gammes de tolérance physiologique chez les archées méthanogènes

Bien que la plupart des archées méthanogènes soient mésophiles, certaines espèces comme *Methanogenium frigidum* (*Methanomicrobiales*) sont psychrophiles, se développant à des températures proches de 0 °C, tandis que *Methanopyrus kandleri* supporte des températures allant jusqu'à 120 °C (Kurr *et al.*, 1991; Zinder, 1993; Franzmann *et al.*, 1997). La plupart des archées méthanogènes ont un pH optimal de croissance proche de la neutralité (Zinder, 1993). Néanmoins, certaines espèces comme *Methanoregula boonei* (*Methanomicrobiales*; pH optimal de 5,1) peuvent se développer dans des environnements acides comme les tourbières par exemple (Bräuer *et al.*, 2011). La plupart des archées méthanogènes alcalophiles sont méthylophiles et sont affiliées aux genres *Methanobacterium* (*Methanobacteriales*), *Methanocalculus* (*Methanomicrobiales*) et *Methanosalsum* (*Methanosarcinales*) (Jones *et al.*, 1998). Ces microorganismes peuvent se développer dans des lacs de soude ou des sédiments alcalins ayant un pH proche de 10 (Sowers, 2019). La plupart des archées méthanogènes peuvent se développer à des salinités inférieures à 0,1 M de NaCl et sont couramment retrouvées dans les sédiments d'eaux douces. Les représentants du genre méthylophile *Methanohalophilus* (*Methanosarcinales*) sont halophiles et se développent dans des milieux hypersalés (thalassiques comme athalassiques) à plus de 2,5 M de NaCl (Boone, 2015).

ii. Sensibilité à l'oxygène

Comme indiqué précédemment, les microorganismes méthanogènes se développent dans des environnements anoxiques dépourvus d'oxydants forts. A ce titre, le dioxygène (O₂) est un composé toxique pour les archées méthanogènes (Zinder, 1993). En effet, l'O₂ cause une dissociation irréversible de l'hydrogénase F₄₂₀-réductase (Frh), un complexe enzymatique clef de la méthanogenèse (voir §5.a) (Garcia *et al.*, 2000). Certaines espèces affiliées aux *Methanocellales*, *Methanosarcinales* et *Methanobacteriales* seraient néanmoins susceptibles de tolérer de faibles concentrations de ce gaz pendant quelques heures (< 24 heures) (Zinder, 1993). D'autres paramètres comme la concentration en ammonium (NH₄⁺), en phosphates (PO₄³⁻) ou la présence d'acides humiques peuvent également limiter voire inhiber l'activité des archées méthanogènes (Khadem *et al.*, 2017; Conrad, 2020).

b) Biochimie et énergétique de la méthanogenèse

a. Coenzymes de la méthanogénèse

Les principaux coenzymes utilisés comme transporteurs de molécules en C1 ou comme donneurs d'électrons dans les voies de la méthanogénèse sont les suivants (Figure 20) : (A) le méthano furane (MFR), (B) la tétrahydrométhanoptérine (H₄MPT), (C) le coenzyme M (CoM-SH), (E) le coenzyme B (7-mercaptoheptanoylthréonine phosphate) (HS-HTP ou HS-CoB), (F) le coenzyme F₄₃₀ (contenant un ion nickel Ni⁺), (G) le coenzyme F₄₂₀, (H) le 5-hydroxybenzimidazolylcobamide (facteur III) et (I) la méthano phénazine (MP) (Beifuss *et al.*, 2000; Whitman *et al.*, 2006; Ferry, 2010).

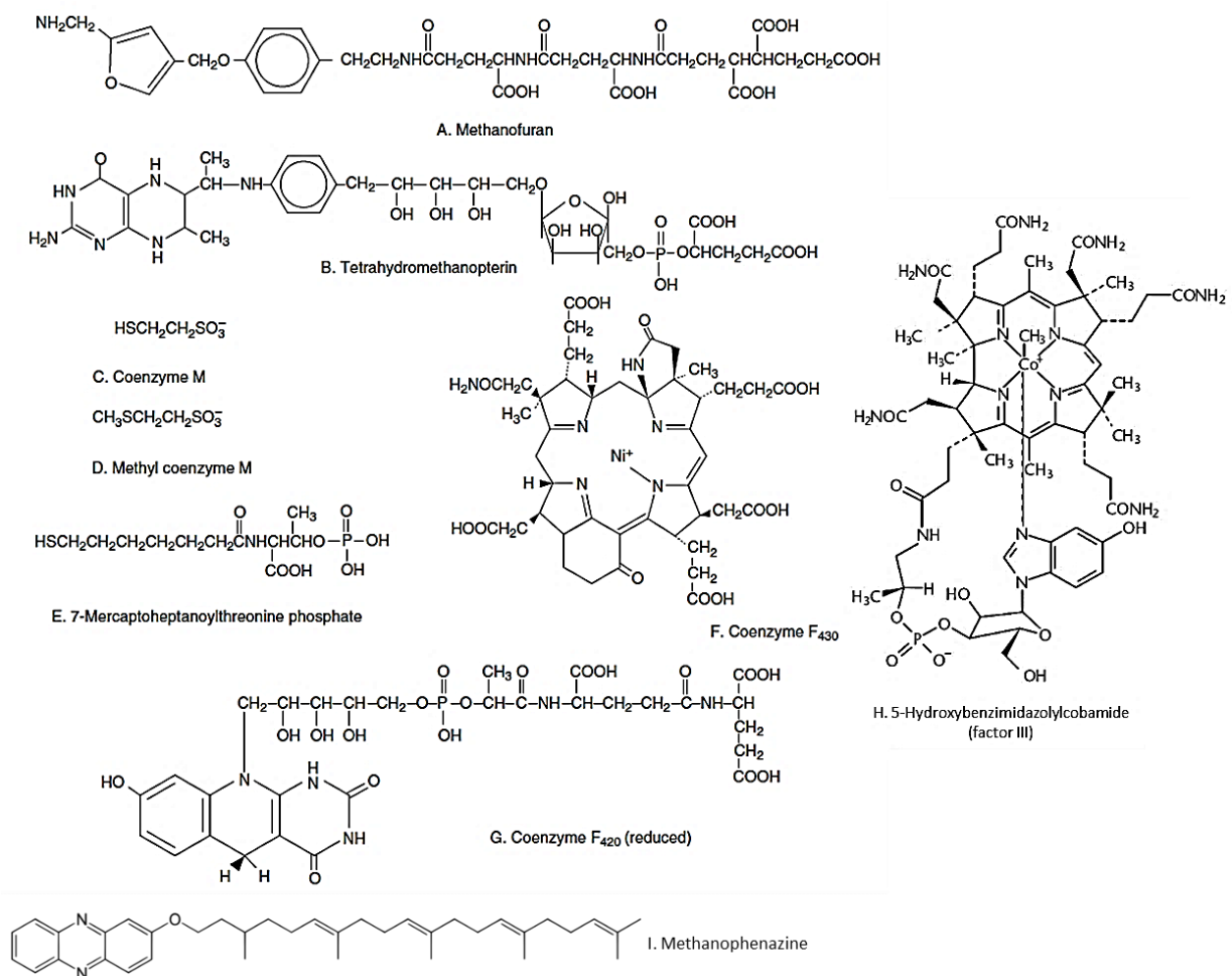


Figure 20 : Formules des principaux coenzymes impliqués dans la méthanogénèse. Figures extraites et adaptées de Beifuss *et al.* (2000), Ferry (2010) et Whitman *et al.* (2014).

b. Métabolismes méthanogènes

La méthanogénèse peut schématiquement se résumer à une combinaison de réactions d'oxydo-réduction et de transport de molécules en C1 de plus en plus réduites (Tableau 3, §

3.c). Les voies synthétiques et bioénergétiques de ce métabolisme ont des intermédiaires communs ($-\text{CH}_3$). A l'heure actuelle, cinq voies métaboliques de méthanogénèse sont identifiées : (i) la voie hydrogénotrophe, (ii) la voie acétotrophe (ou acétoclaste), (iii) la voie méthylotrophe, (iv) la voie hydrogénotrophe méthyle-dépendante, et (v) la voie méthoxydotrophe (Figure 21). Une potentielle nouvelle voie méthanogène basée sur l'oxydation d'alcane et/ou d'acides gras a récemment été proposée (Borrel *et al.*, 2019).

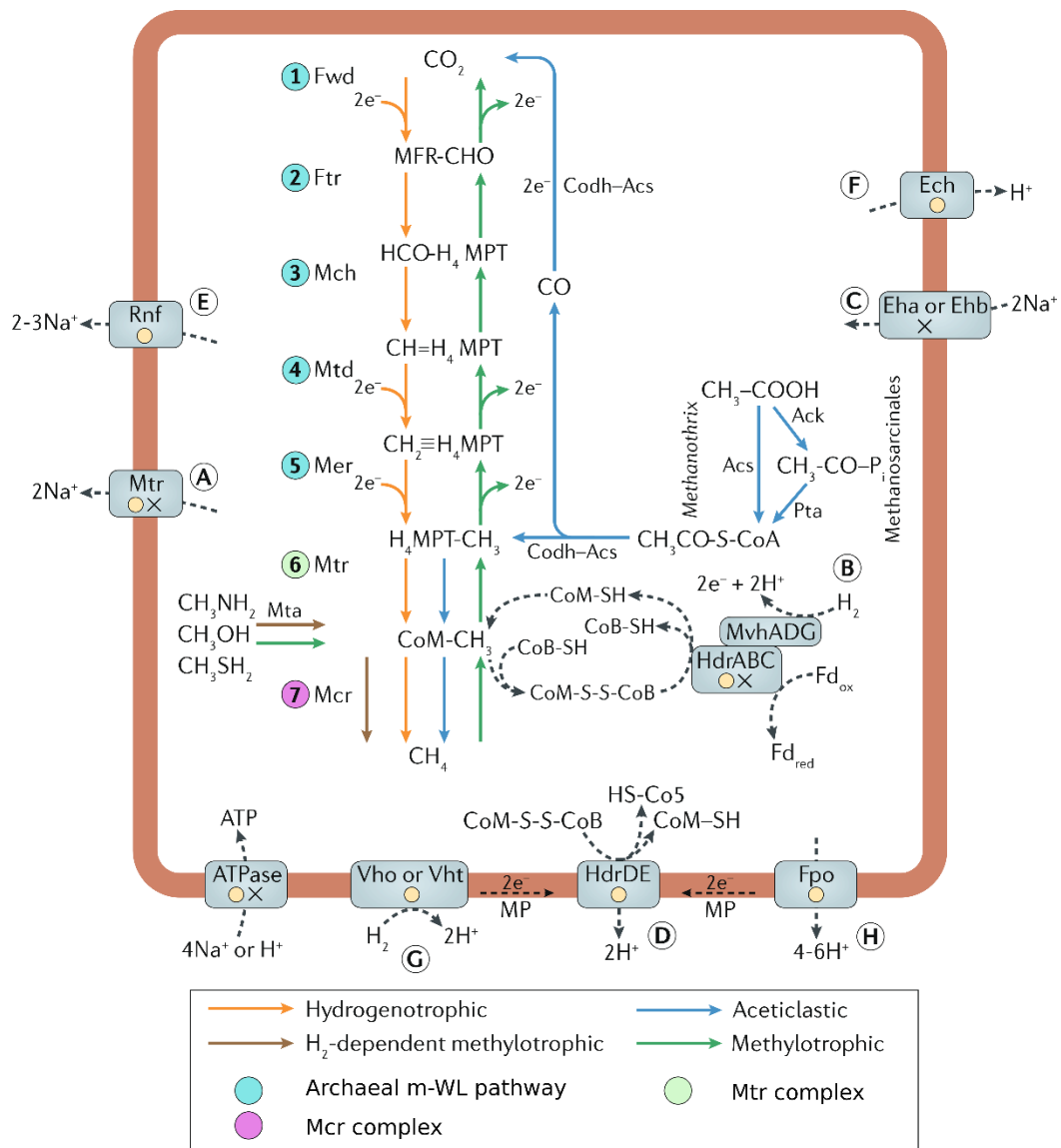


Figure 21 : Schéma représentant les différentes voies de méthanogénèse. Les cercles bleus numérotés indiquent les enzymes intervenant dans la branche méthyle de la voie de Wood-Ljungdahl, le cercle vert indique le complexe Mtr et le cercle violet le complexe Mcr. Les cercles jaunes indiquent les complexes enzymatiques présents uniquement chez les archées méthanogènes possédant des cytochromes ; les croix signalent les enzymes présentes uniquement chez les archées méthanogènes dépourvues de cytochromes. m-WL : branche méthyle de la voie de Wood-Ljungdahl. Les voies de méthanogénèse méthoxydotrophe et alcanotrophe ne sont pas décrites dans cette figure. Figure extraite et adaptée de Evans *et al.* (2019).

i. Voie de la méthanogénèse hydrogénotrophe

La méthanogenèse hydrogénotrophe est réalisée par une large fraction des archées méthanogènes décrites à ce jour (Thauer *et al.*, 2008; Sowers, 2019). Cette réaction se base sur l'oxydation de l' H_2 et la réduction de CO_2 en sept étapes séquentielles, allant de l'activation du CO_2 à la libération de méthane ; des étapes additionnelles sont nécessaires lors de l'utilisation d'un autre accepteur d'électrons (non développées ici) (Liu & Whitman, 2008; Evans *et al.*, 2019; Sowers, 2019; Kurth *et al.*, 2020). L'énergie libre nécessaire à chaque étape a été calculée par Thauer *et al.* (2008). Les cinq premières étapes (Figure 21, 1 à 5) font intervenir la branche méthyle de la voie archéenne de Wood-Ljungdahl (m-WL).

La méthanogenèse débute (1) par l'activation du CO_2 en formyle-MFR à partir du coenzyme MFR par la formyle-MFR déshydrogénase (Fwd). La source d'électrons nécessaire à cette réaction est une ferrédoxine réduite (Fd_{red}). S'ensuit (2) le transfert du groupement formyle au coenzyme H_4MPT par la formyle-MFR: H_4MPT formyletransférase (Ftr) pour former le formyle- H_4MPT . Le groupement formyle du formyle- H_4MPT est ensuite condensé (3) en méthényle- H_4MPT sous l'action de la N^5,N^{10} -méthényle- H_4MPT cyclohydrolase (Mch). Le méthényle- H_4MPT est séquentiellement (4, 5) réduit en méthylène- H_4MPT puis en méthyl- H_4MPT sous les actions respectives de la N^5,N^{10} -méthylène- H_4MPT déshydrogénase (Mtd) et de la N^5,N^{10} -méthylène- H_4MPT réductase (Mer). Lors de ces deux étapes, deux coenzymes F_{420} réduits ($F_{420}H_2$) servent de donneurs d'électrons ($2 \times 2 e^-$) avant d'être réduits par de l' H_2 via une hydrogénase F_{420} -réductase (Frh, FrhABG) (Liu & Whitman, 2008). Il est intéressant de noter que les espèces du genre *Methanosarcina* utilisent un homologue du coenzyme H_4MPT , à savoir la tétrahydrosarcinaptérine (H_4SPT) (Grahame, 1991).

La sixième étape (6) consiste en la formation du méthyl-S-CoM ($CH_3-S-CoM$) par le transfert du groupement méthyle du méthyl- H_4MPT au coenzyme CoM-SH par le complexe enzymatique transmembranaire N^5 -méthyl- H_4MPT :CoM-SH méthyltransférase (Mtr, MtrA-H). Lors de cette étape, l'atome de carbone du groupement méthyle se lie à l'atome de cobalt au centre du facteur III (Figure 20, H), un cofacteur inclus dans la sous-unité méthyltransférase MtrA (Ferry, 2010). Cette étape est aussi directement liée à la conservation de l'énergie : lors du transfert du groupement méthyle, le complexe Mtr génère un gradient chimiosmotique sodique (Na^+) dont la force protonmotrice est exploitée par une ATP synthase (Figure 21, (A)).

Enfin, la dernière étape (7) permet la réduction terminale du $CH_3-S-CoM$ à partir du coenzyme HS-CoB par la méthyl-CoM réductase (Mcr, McrBDGAC). Cette enzyme commune à l'ensemble des voies de méthanogenèse possède un groupement prosthétique (coenzyme F_{430})

catalysant la production d'un hétérodisulfure (CoM-S-S-CoB) et conduisant à la libération d'une molécule de méthane (Reeve *et al.*, 1997) (voir § 5.c).

La cellule régénère les CoM-SH et HS-CoB par un complexe enzymatique hydrogénase-hétérodisulfure réductase (MvhADG-HdrABC) cytoplasmique dont la sous-unité HdrA arbore une flavine adénine dinucléotide (cofacteur FAD) (Figures 21, 22) (Thauer *et al.*, 2008 ; Kaster *et al.*, 2011). Ce complexe induit la réduction endergonique de la ferrédoxine et la réduction exergonique de l'hétérodisulfure et l'oxydation de dihydrogène par la bifurcation d'électrons dans le cofacteur FAD, soit (Kaster *et al.*, 2011) :



L'énergie nécessaire à cette étape est extraite d'un gradient chimiosmotique (Na^+) entrant par une hydrogénase membranaire (Eha/Ehb) liée à une ATP synthase (Figure 21, (C)). La Fd_{red} est ensuite recyclée pour favoriser la réduction d'une nouvelle molécule de CO_2 en formyle-MFR (retour à l'étape 1) (Evans *et al.*, 2019).

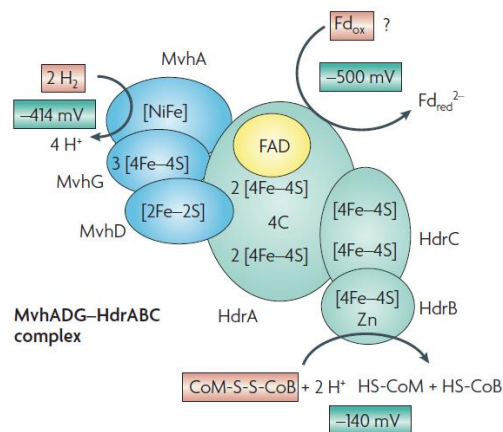


Figure 22 : Représentation schématique du processus de réduction du CoM-S-S-CoB en présence d' H_2 par le complexe MvhADG-HdrABC. Figure extraite de Thauer *et al.* (2008).

Pour conserver leur énergie, les *Methanosarcina* hydrogénéotrophes facultatives possédant des cytochromes (ex. : *Methanosarcina barkeri*) réduisent leur ferrédoxine par une hydrogénase ferrédoxine-dépendante transmembranaire (Ech, EchA-F) (Figure 21, (F)). Cette réduction s'accompagne de la régénération du coenzyme F_{420} réduit (F_{420}H_2) par une F_{420}H_2 -déshydrogénase (Fpo, FpoA-O) en présence d' H_2 (Figure 21, (H)) (Liu & Whitman, 2008).

ii. Voie de la méthanogenèse acétoclaste

Il semble que la voie de méthanogenèse acétotrophe soit responsable d'environ 65 à 75 % des émissions du méthane d'origine biologique (Ferry, 1992; McInerney *et al.*, 2008; Conrad, 2020). Ce métabolisme est retrouvé chez les *Methanothrix* (synonyme de *Methanosaeta*) et les *Methanosarcina* (Sowers, 2019). La méthanogenèse débute par la formation d'acétyl-CoA ($\text{CH}_3\text{CO-S-CoA}$) à partir d'acétate et d'un coenzyme-A, en une ou deux étapes suivant les genres (Figure 21). Dans les deux cas, la production d'acétyl-CoA induit la consommation d'ATP et donc un coût énergétique se traduisant par une faible croissance cellulaire (Zinder, 1993). Les liaisons C-C et C-S de l'acétyl-CoA sont ensuite clivées par le complexe enzymatique CO:déshydrogénase/acétyl-CoA synthase (Cdh-Acs), ce qui mène à la régénération du coenzyme A et à la séparation des groupements méthyle et carboxyle (Maupin-Furlow & Ferry, 1996; Kurth *et al.*, 2020). Le groupement méthyle est alors transféré au H_4SPT avant de suivre les étapes 6 et 7 précédemment décrites, tandis que le groupement carboxyle est successivement converti en CO puis CO_2 .

La conservation de l'énergie repose sur une hétérodisulfure réductase HdrDE transmembranaire (Figure 21, (D)). Ce complexe réduit le CoM-S-S-CoB en utilisant un gradient chimiosmotique (H^+) et des électrons fournis par un cofacteur, la méthanophénazine (Figure 20, I) (Ferry, 2010; Evans *et al.*, 2019).

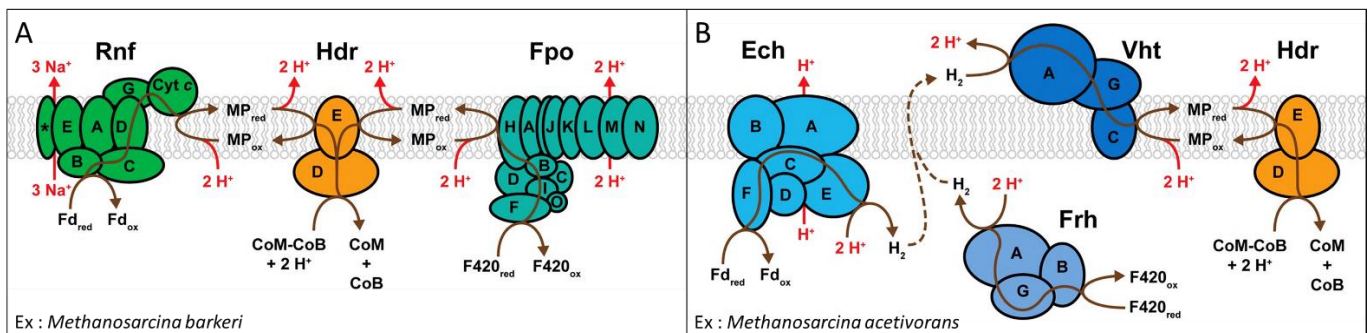


Figure 23 : Voies de conservation de l'énergie chez *Methanosarcina barkeri* et *Methanosarcina acetivorans*. Représentation des différents systèmes hypothétiques de transports des électrons chez (A) *Methanosarcina barkeri* et la plupart des méthanogènes méthylotrophes et (B) *Methanosarcina acetivorans*. L'hydrogénase F_{420} -réductase (Frh) n'est pas impliquée dans la voie de méthanogenèse acétoclaste, mais dans les voies hydrogénéotrophe et méthylotrophe. Les sous-unités des différents complexes sont indiquées par leur lettre correspondante. Les réactions colorées en marron restent putatives. * : sous-unité de la Rnf dont la fonction reste inconnue. Figures extraites et adaptées de Mand & Metcalf (2019).

Les représentants du genre *Methanosarcina* dépourvus de cytochromes (ex. : *Methanosarcina acetivorans*) oxydent leur ferrédoxine à partir d'un gradient chimiosmotique (Na^+) engendré par une ferrédoxine- NAD^+ oxydoréductase transmembranaire (Rnf) (Figure 21,

(E)). Les 2 électrons libérés par cette réaction sont transférés à la méthano-phénazine pour activer le complexe HdrED. La MP réduite est ensuite régénérée par l'oxydation du cofacteur F₄₂₀ par le complexe Fpo (Figure 23, A) (Mand & Metcalf, 2019; Kurth *et al.*, 2020). Les *Methanosarcina* possédant des cytochromes (ex. : *Methanosarcina barkeri*) utilisent l'hydrogénase ferrédoxine-dépendante transmembranaire (Ech) pour induire l'oxydation de ferrédoxine, la génération d'H₂ et la création un gradient chimioosmotique (H⁺) (Figure 21, (F)). L'H₂ produit est réoxydé par une hydrogénase méthano-phénazine-dépendante transmembranaire (Vho, ou Vht) (G) pour fournir deux électrons à la MP et activer le complexe HdrED (Figure 23, B) (Mand & Metcalf, 2019; Stams *et al.*, 2019). Dans les deux cas, la cellule exploite un gradient chimioosmotique (H⁺ ou Na⁺) pour entraîner une ATP synthase et générer de l'ATP (Figure 21).

Les mécanismes de conservation de l'énergie chez les *Methanotrix* restent encore peu connus : les gènes codant les complexes Ech ou Rnf ne semblent pas être présents dans leurs génomes (Stams *et al.*, 2019). A la place, la cellule couplerait l'oxydation de la ferrédoxine à la réduction de la MP en utilisant une Fpo homologue (ou « Fpo-like ») (Figure 21, (H)) dépourvue de la sous-unité oxydante F (FpoF) (Evans *et al.*, 2019).

iii. Voie de la méthanogénèse méthylotrophe

La méthanogénèse méthylotrophe est une réaction de dismutation retrouvée chez toutes les *Methanosarcinales*, à l'exception notable des *Methanotrix* (Keltjens & Vogels, 1993; Evans *et al.*, 2019; Mand & Metcalf, 2019; Sowers, 2019). Ces archées utilisent une gamme relativement limitée de substrats méthylés pour leur métabolisme (voir Tableau 3, § 3.d)). L'incorporation des substrats implique l'intervention de méthyltransférases substrat-spécifiques et d'une protéine corrinoïde afin de transférer le groupement méthyle vers le coenzyme HS-CoM (Fu & Metcalf, 2015).

L'incorporation de MeOH, MMA, DMA et TMA repose sur la mise en oeuvre successive (i) d'une substrat:méthyltransférase (MT1) liée à (ii) une protéine corrinoïde, et (iii) d'une méthylcobamide:CoM méthyltransférase (MT2) (Rother & Krzycki, 2010; Sowers, 2019). Les deux méthyltransférases ont une spécificité de substrat (Figure 24, A) (Asakawa *et al.*, 1998; Fu & Metcalf, 2015). Au cours de la méthanogénèse, le groupement méthyle du substrat se lie au résidu pyrrolysine de la sous-unité B de la MT1 avant d'être transféré à l'atome de cobalt Co^{III} de la protéine corrinoïde (sous-unité C) précédemment activée (réduction) par la

protéine fer-soufre RamA (Figure 25, a, b, d) (Ferguson *et al.*, 2009; Rother & Krzycki, 2010). Le groupement méthyle est successivement transféré à la méthyltransférase MT2 puis au coenzyme HS-CoM pour former un CH₃-S-CoM (Figure 25, d) (Asakawa *et al.*, 1998; Fu & Metcalf, 2015).

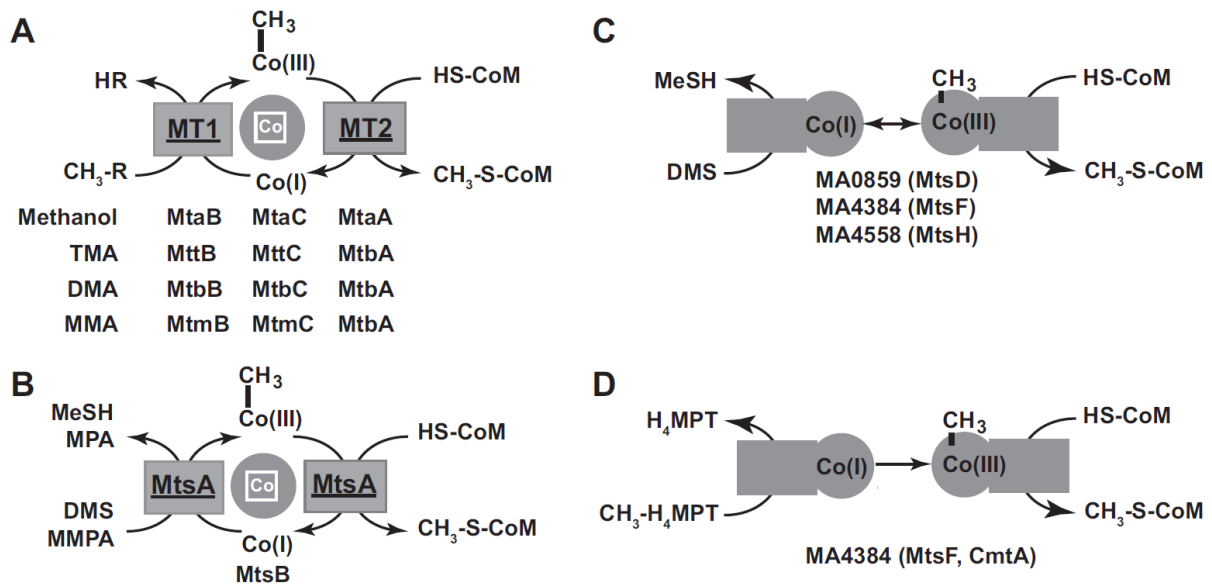


Figure 24 : Schémas décrivant les différentes étapes de l'incorporation des composés méthylés dans la voie de méthanogenèse méthylo-trophe chez les *Methanosarcina* spp.. (A) Système MT1/MT2 à trois polypeptides substrats-spécifiques et nom de leurs substrats. (B) Incorporation des DMS et MMPA chez *Methanosarcina barkeri*. (C) Mécanisme putatif d'incorporation du DMS chez *Methanosarcina acetivorans* basé sur l'analyse respective des gènes *mtsD*, *mtsF* et *mtsH*. (D) Fonctionnement putatif de la H₄MPT:CoM méthyltransférase codée par les gènes *mtsD*, *mtsF* et *mtsH* chez *Methanosarcina acetivorans* en se basant sur l'analyse biochimique de la protéine MtsF (= CmtA). Figure extraite de Fu & Metcalf (2015).

Il est important de mentionner que les sous-unités B des MT1 interagissant avec des méthylamines ont la particularité de posséder un résidu pyrrolysine (Pyl, O) dans leur site actif (Figure 25, c.). La pyrrolysine est le 22^{ème} acide-aminé protéinogène à avoir été découvert et caractérisé (Srinivasan *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2005). Cet acide aminé rare est codé par un codon non-sens *ambre* (UAG) et est synthétisé par un opéron Pyl (*pylBCD*) à partir de deux *L*-lysines (Figure 25, c) (Krzycki, 2004, 2013; Gaston *et al.*, 2011). L'opéron Pyl est complété par les gènes *pylT* et *pylS* codant respectivement l'^{Pyl}ARNt et l'aminocyl-ARNt synthétase (Figure 25, c) (Borrel *et al.*, 2014a).

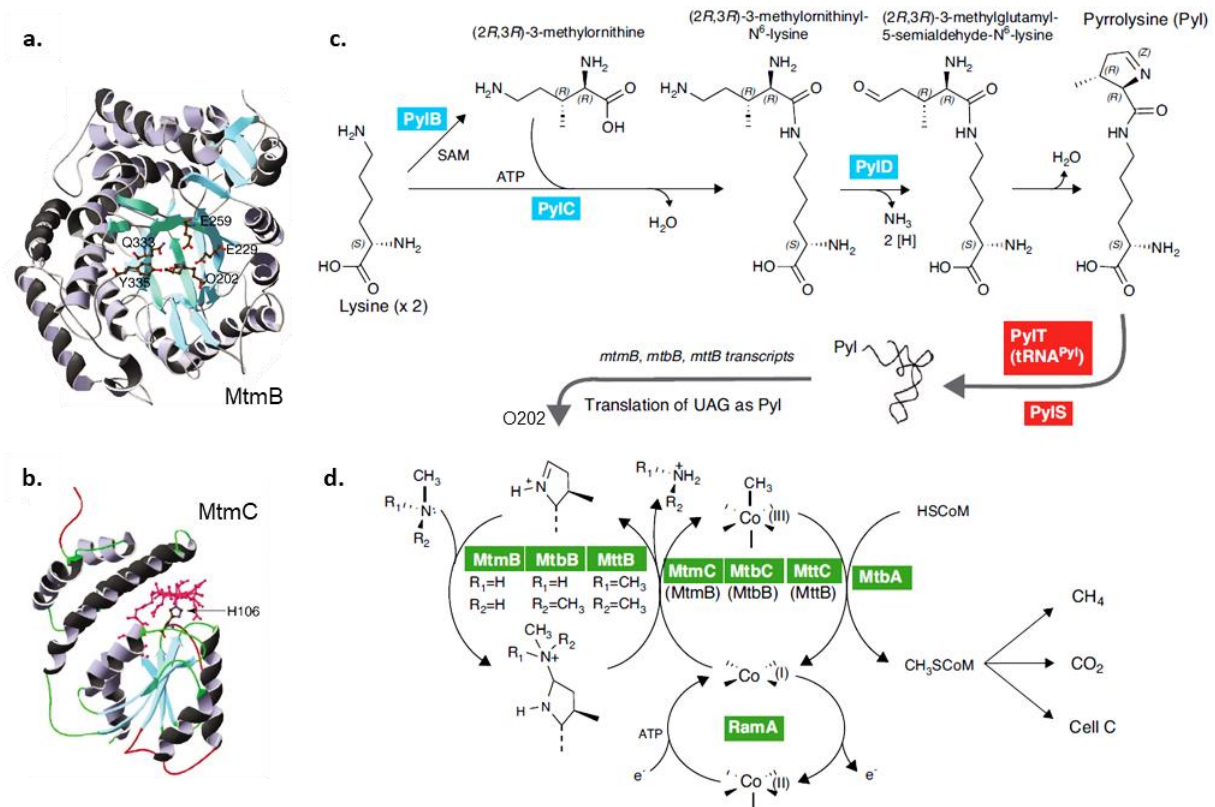


Figure 25 : Biosynthèse de la pyrrolysine et méthyltransférase MtmBC. a. et b. : représentations des structures tertiaires des sous-unités B (a.) et C (b.) de la MtmBC impliquée dans l'incorporation de la monométhylamine. c. et d. : métabolismes respectifs de la pyrrolysine et des méthylamines chez les *Methanosarcina* spp.. Le groupement corrinnoïde (Co^{III}) liant le résidu méthyle du substrat est figuré en rouge dans la sous-unité MtmC. Emplacement des acides aminés dans la MtmB : E229 & E259, acide glutamique ; O202, pyrrolysine ; Q333, glutamine ; Y335, tyrosine. Emplacement des acides aminés dans la MtmC : H106, histidine. Figure composée à partir des travaux de Krzycki (2004) et Gaston *et al.* (2011).

Les composés aminés tertiaires et quaternaires (ex. : bétaïne, choline, tétraméthylammonium) semblent être déméthylés de façon similaire (Asakawa *et al.*, 1998). Il est cependant intéressant de noter que la bétaïne:méthyltransférase MtbG de *Methanobrevibacterium smithii* ne possède pas de résidu pyrrolysine dans son site actif (Ticak *et al.*, 2015).

Certaines archées méthanogènes métylotrophes utilisent une voie différente pour transférer le groupement méthyle de substrats soufrés vers le HS-CoM (Figure 24) (Fu & Metcalf, 2015; Sowers, 2019; Kurth *et al.*, 2020). Les mécanismes impliqués dans l'incorporation de ces substrats restent encore relativement méconnus et semblent varier suivant les espèces. *Methanosarcina barkeri* utiliserait un complexe enzymatique composé d'une sous-unité méthyltransférase MtsA et d'une protéine corrinnoïde MtsB pour métyler le coenzyme M à partir de DMS ou de MMP (Figure 24, B) (Tallant & Krzycki, 1997; Kurth *et al.*, 2020). La méthyltransférase MtsA transférerait séquentiellement le groupement méthyle du substrat à la protéine MtsB qui le transférerait au coenzyme M. Le système d'incorporation des substrats

soufrés chez *Methanosarcina acetivorans* reste relativement méconnu (Figure 24, C) (Fu & Metcalf, 2015). Dans leurs travaux, Vepachedu & Ferry (2012) ont proposé que l'enzyme MtsF de *Methanosarcina acetivorans* serait potentiellement capable de catalyser le transfert du groupement méthyle de la CH₃-H₄MPT au coenzyme M (Figure 24, D). Enfin, cette espèce cataboliserait le méthylmercaptopropionate (MMPA) à l'aide à l'aide d'une protéine corrinoïde (MtpC), d'une CoM:méthyltransférase (MtpA) et d'un transporteur (MtpP). Le tout serait potentiellement sous le contrôle d'un régulateur transcriptionnel (*msrH*) (Fu & Metcalf, 2015).

Comme évoqué ci-dessus, La méthanogenèse méthylotrophe est en fait une dismutation : les composés méthylés jouent à la fois le rôle d'oxydant et de réducteur. Pour conserver leur énergie, les archées méthanogènes méthylotrophes oxydent en CO₂ environ un quart du CH₃-S-CoM produit en remontant la m-WL (Figure 21, 6 à 1), tandis que le reste est réduit en CH₄ suivant les mécanismes décrits précédemment (Figure 21, 7) (Kurr *et al.*, 1991; Welander & Metcalf, 2005; Whitman *et al.*, 2014; Sowers, 2019). L'oxydation du CH₃-S-CoM en CO₂ mène à la production de Fd_{red} et de F₄₂₀H₂.

Les mécanismes de conservation de l'énergie de cette voie ne sont pas encore tout à fait élucidés mais semblent présenter des similitudes avec ceux de la voie acétoclaste (Figure 23 A et B) (Timmers *et al.*, 2017; Mand & Metcalf, 2019; Sowers, 2019). Une différence notable serait l'implication de l'hydrogénase F₄₂₀-réductase (Frh) dans la production de dihydrogène à partir de F₄₂₀H₂ chez les archées hydrogénotrophes méthyle-dépendantes facultatives comme *Methanosarcina barkeri* (Figure 23, B) (Evans *et al.*, 2019; Mand & Metcalf, 2019).

iv. Voie de la méthanogenèse hydrogénotrophe basée sur la réduction de composés méthylés

La voie de méthanogenèse hydrogénotrophe méthyle-dépendante est couramment désignée sous le terme de « méthanogenèse méthylotrophe hydrogénéodépendante ». Néanmoins, cette voie de méthanogenèse n'est pas une dismutation : les électrons nécessaires à l'équilibre de la réaction sont fournis par l'oxydation de dihydrogène (voire d'éthanol) exogène et non par l'oxydation partielle d'un groupement méthyle (Hoedt *et al.*, 2016; Evans *et al.*, 2019).

La méthanogenèse hydrogénotrophe méthyle-dépendante est mise en œuvre par des archées affiliées aux *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales*, *Methanonatronarchaeales* et

Methanomassiliicoccales (Liu & Whitman, 2008; Dridi *et al.*, 2012a; Vanwonterghem *et al.*, 2016; Sorokin *et al.*, 2017). Les lignées candidates *Ca.* ‘Methanofastidiosa’ et *Ca.* ‘Methanomethyliales’ possèdent le potentiel génétique pour réaliser la méthanogenèse hydrogénotrophe méthyle-dépendante (Nobu *et al.*, 2016; Vanwonterghem *et al.*, 2016).

Malgré le nombre relativement restreint de microorganismes hydrogénotrophes méthyle-dépendants, de nombreuses variantes de cette voie ont été décrites, notamment au niveau des mécanismes de conservation de l'énergie (Liu & Whitman, 2008; Kurth *et al.*, 2020). Hormis de très rares exceptions, les archées hydrogénotrophes méthyles-dépendantes ne codent pas les enzymes associés à la branche m-WL et au complexe Mtr : le substrat méthylé est directement lié à un coenzyme-M par la MT2 pour former du CH₃-S-CoM. La réduction du CH₃-S-CoM à partir de coenzyme HS-CoB est ensuite catalysée par la Mcr pour libérer du méthane (Figure 21, étape 7). L'oxydation d'H₂ exogène fournit les électrons nécessaires à la régénération du CoM-S-S-CoB. Cette oxydation est catalysée par diverses hydrogénases suivant les microorganismes. A titre d'exemple, *Methanimicrococcus blatticola* utilise le complexe Vht impliquant la méthanophénazine, tandis que *Methanosphaera stadtmanae* utilise le complexe MvhADG-HdrABC (Kurth *et al.*, 2020).

v. Voies de méthanogenèse méthoxydotrophe et alcanotrophe

La voie de méthanogenèse méthoxydotrophe a été mise en évidence chez deux souches d'une espèce de *Methanosarcinales* appelée *Methermicoccus shengliensis* (Mayumi *et al.*, 2016). Bien que les données disponibles à ce sujet demeurent très parcellaires, la voie de méthanogenèse méthoxydotrophe semble être similaire à la voie de méthanogenèse méthylotrophe. Il est néanmoins intéressant de noter que ces souches de *Methermicoccus shengliensis* sont également capables de réaliser la méthanogenèse méthylotrophe (MeOH, méthylamines) (Kurth *et al.*, 2020).

Deux MAGs affiliés à la classe candidate des *Ca.* ‘Methanoliparia’ seraient susceptibles de produire du méthane par oxydation d'alcane à courtes chaînes et d'acides gras à moyennes et longues chaînes (Borrel *et al.*, 2019; Laso-Pérez *et al.*, 2019). En effet, ces deux MAGs codent les enzymes de la m-WL et les complexes Mtr et Mcr canoniques indispensables à la production de méthane. Pour conserver leur énergie, ces archées pourraient employer un complexe MvhD-HdrABC incomplet lié à un homologue de la glutamate synthase NADH (GltD-like). Curieusement, ces MAGs possèdent également le potentiel génétique pour

synthétiser le complexe Mcr-like associé à la méthanotrophie anaérobie et à l'activation d'alcane à courtes chaînes (éthane et butane, *etc.*) (Borrel *et al.*, 2019).

c) Diversité phylogénétique chez les archées méthanogènes

a. Généralités

Jusqu'en 2012, six ordres euryarchéens d'archées méthanogènes étaient décrits et répartis en deux classes. La classe I des archées méthanogènes regroupe les *Methanobacteriales*, les *Methanococcales* et les *Methanopyrales*. La classe II renferme les *Methanocellales*, les *Methanomicrobiales*, et les *Methanosarcinales*. Ces dix dernières années, les efforts de culture conjugués à l'essor des approches de métagénomique et de génomique sur cellules individuelles isolées ont révélé que la diversité des archées méthanogènes était bien plus vaste qu'on ne le pensait et ne se limitait pas au seul phylum des *Euryarchaeota* (Evans *et al.*, 2019) (Figure 26).

Ces archées méthanogènes ont pour point commun de toutes posséder la méthyl-coenzyme M réductase (complexe Mcr). Les lignées d'archées méthanogènes apparaissent dans des ellipses bleues et vertes sur l'arbre ci-dessous (Figure 27).

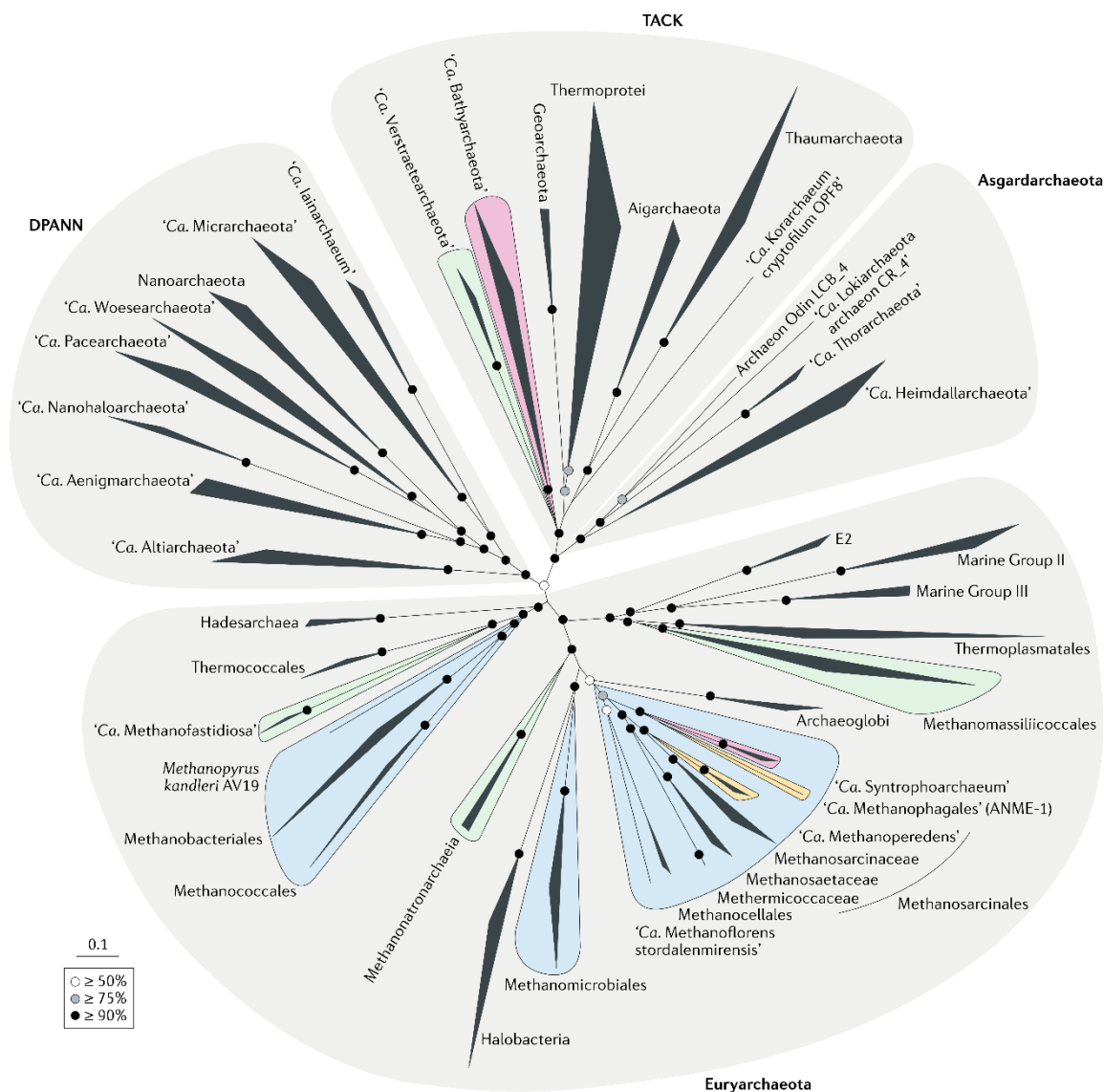


Figure 26 : Arbre phylogénomique mettant en lumière les lignées renfermant les gènes fonctionnels *mcr* et *mcr*-« like ». Cet arbre est construit sur la base de 122 marqueurs protéiques concaténés. Les *Ca.* 'Methanoliparia' et *Ca.* 'Nezhaarchaeota' ne sont pas représentées sur l'arbre. En vert : archées méthanogènes hydrogénéotrophes méthyle-dépendantes ; en bleu : archées méthanogènes hydrogénéotrophes CO₂-dépendantes ; en jaune : archées méthanotrophes ; en rouge : archées alcanotrophes. Figure extraite de Evans *et al.* (2019).

La méthyl-coenzyme M réductase (complexe Mcr) catalyse la dernière étape de la méthanogenèse permettant la libération d'une molécule de méthane. Ce complexe est une enzyme dimérique composée d'hétérotrimères ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$), qui est codée par les gènes *mcrABG* (Figure 27) (Ermler *et al.*, 1997). Trois isoenzymes ayant les mêmes fonctions sont à ce jour décrites (types I, II et III). La méthyl-coenzyme M réductase se trouve être la seule enzyme commune à l'ensemble des voies de méthanogenèse. A ce titre, le gène *mcrA* (codant les sous-unités catalytiques α) est utilisé comme marqueur phylogénétique des archées méthanogènes, car les arbres phylogénétiques construits sur la base de ce marqueur ont une topologie similaire

et congruente avec ceux construits à partir des gènes codant les ARNr 16S (Reeve *et al.*, 1997; Luton *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 2017).

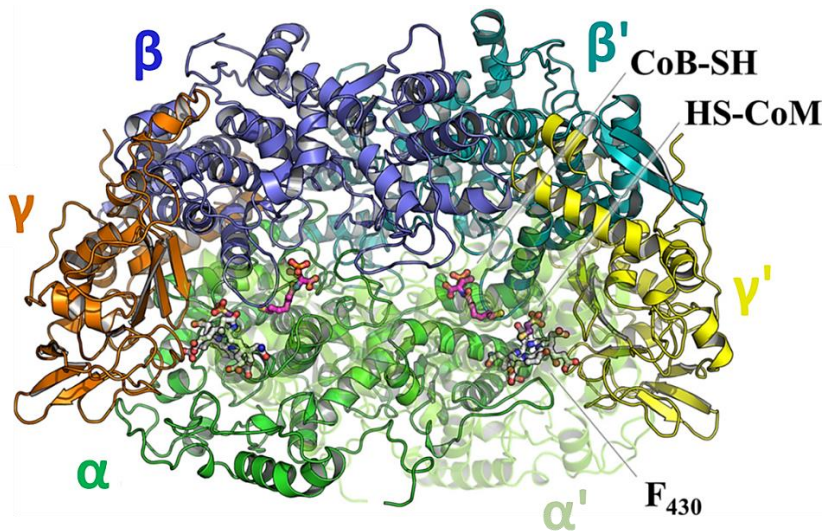


Figure 27 : Structure tridimensionnelle de la méthyle-coenzyme M (de type III) de *Methanothermococcus thermolithotrophicus* (*Methanococcales*). Le facteur F₄₃₀ (blanc), le CoB-SH en (rose), le HS-CoM en (mauve) sont modelisés sous la forme de boules et de bâtons. Figure extraite et adaptée de Wagner *et al.* (2017).

Bien que catalysant la dernière étape de la méthanogénèse, le complexe Mcr catalyse également la première étape de la méthanotrophie anaérobie (Thauer *et al.*, 2008). De récents travaux ont également démontrés l'existence de gènes codant un complexe Mcr divergent dit Mcr-« like » (Mcr-like) du gène codant pour le complexe enzymatique Mcr (dit canonique) qui pourrait activer des sources de carbones plus complexes telles que des alcanes à courtes et moyenne chaînes (éthane, butane, propane et probablement hexadécane) (Meng *et al.*, 2014; Evans *et al.*, 2015; Borrel *et al.*, 2019; Laso-Pérez *et al.*, 2019). Tout cela est à démontrer *in vitro*, notamment chez les *Ca.* 'Bathyarchaeota' et chez les *Ca.* 'Methanoliparia' où les deux complexes semblent être présents (voir ci-dessous) (Borrel *et al.*, 2019).

Les archées méthanogènes cultivées ont des morphologies de type coques ou de type bacilles (courts ou longs, et recouverts ou non d'une gaine) (Figure 28). Le mode d'organisation des cellules de certaines archées méthanogènes peut varier suivant les conditions environnementales. A titre d'exemple, *Methanosarcina barkeri* (*Methanosarcinales*) se présente sous forme d'agrégats dans des milieux modérément salés, et sous forme libre dans des milieux ayant une salinité proche de celle de l'eau de mer (Maeder *et al.*, 2006).

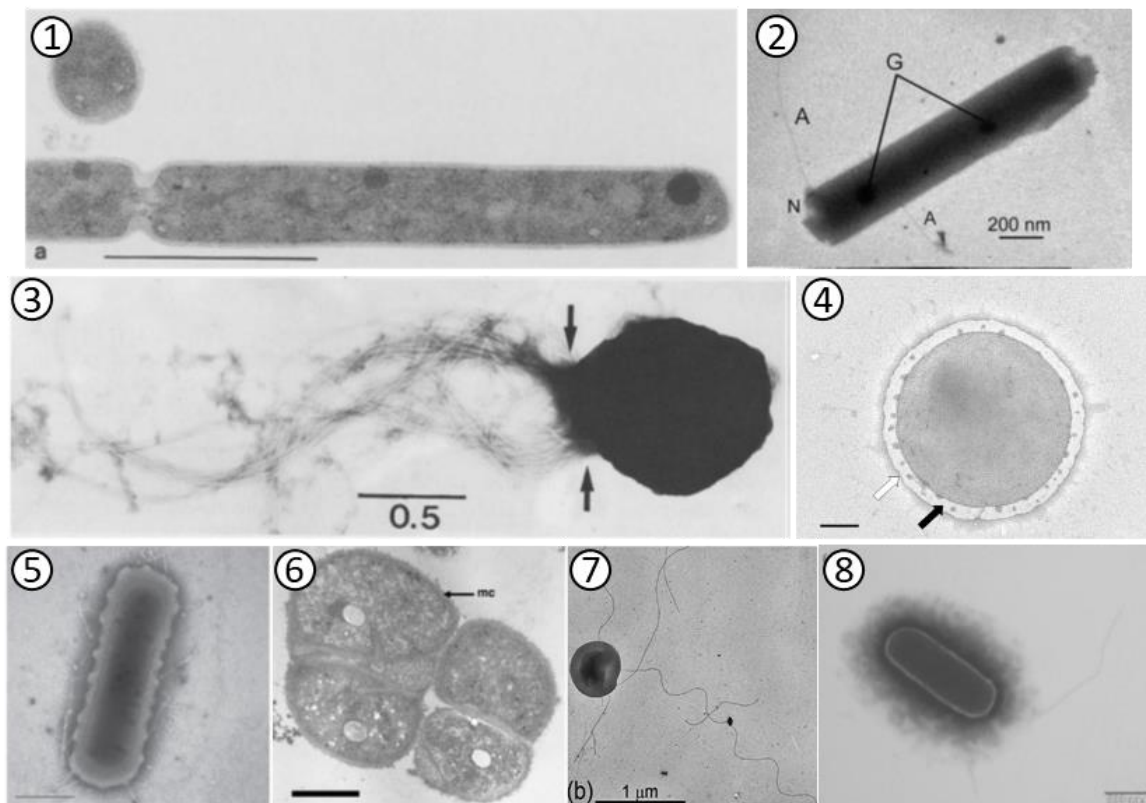


Figure 28 : Microphotographies illustrant un ou plusieurs représentants de chaque lignée d'archées méthanogènes possédant au moins un représentant isolé en culture clonale. (1) cellule en division de *Methanopyrus kandleri* AV19 (*Methanopyrales*, Kurr *et al.* (1991)), barre : 1 μm ; (2) *Methanoregula boonei* 6A8 (*Methanomicrobiales*, Bräuer *et al.* (2011)), barre : 0,2 μm ; (3) *Methanocaldococcus jannaschii* JAL-1 (*Methanococcales*, Jones *et al.* (1983)), barre : 0,5 μm ; (4) *Methanomassiliicoccus luminyensis* B10 (*Methanomassiliicoccales*, Dridi *et al.* (2012a)), barre : 0,3 μm ; (5) *Methanobacterium paludis* SWAN1 (*Methanobacteriales*, Cadillo-Quiroz *et al.* (2014)), barre : 0,5 μm ; (6) *Methanosarcina barkeri* Fusaro (*Methanosarcinales*, Maeder *et al.* (2006)), sous forme d'agrégat en milieu en modérément salé, barre : 1 μm ; (7) *Methanonatronarchaeum thermophilum* AMET1 (*Methanonatronarchaeia*, Sorokin *et al.* (2018)), barre : 1 μm ; (8) *Methanocella arvoryzae* MRE50 (*Methanocellales*, Sakai *et al.* (2010)), barre : 0,5 μm .

La grande majorité des archées méthanogènes synthétisent et exploitent le coenzyme F_{420} , un transporteur d'électrons (e^-) dérivé d'une flavine, dans le cadre de leur méthanogénèse (voir § 5.b). Le coenzyme F_{420} possède un maximum d'absorption à $\lambda = 420 \text{ nm}$ (lumière UV). Cette propriété est régulièrement exploitée pour faciliter l'observation au microscope à épifluorescence des cellules des archées ayant ce composé (Zinder, 1993). Il est néanmoins important de noter que toutes les archées méthanogènes ne possèdent pas forcément le coenzyme F_{420} (ex. : les *Methanomassiliicoccales*), et que certaines archées méthanotrophes anaérobies (ex. : ANME-1) le biosynthétisent également (Knittel & Boetius, 2009; Borrel *et al.*, 2013b).

b. Les six ordres d'archées méthanogènes décrits avant 2012

i. Les *Methanobacteriales*

Les *Methanobacteriales* regroupent deux familles, les *Methanobacteriaceae* (4 genres) et les *Methanothermaceae* (1 genre, *Methanothermus*) (Bonin & Boone, 2006). Ces archées sont en majorité des méthanogènes hydrogénotrophes, à l'exception des espèces affiliées au genre *Methanosphaera* qui consomment du méthanol et du dihydrogène (hydrogénotrophes méthyle-dépendants). Certaines espèces peuvent également utiliser le formate, le CO ou des alcools secondaires pour la réduction du CO₂ en méthane (Bonin & Boone, 2006).

D'un point de vue morphologique, les *Methanobacteriales* se présentent sous la forme de bâtonnets (Figure 28 (5)). Les *Methanobacteriales* sont majoritairement immobiles, bien que certaines possèdent un unique flagelle polaire ou une ciliature péritriche. Le contenu en bases guanine et cytosine de l'ADN génomique des *Methanobacteriales* varie entre 23 et 61 mol% (Bonin & Boone, 2006). Certaines *Methanobacteriales* forment des filaments (40 µm de long). Ces microorganismes sont en majorité mésophiles bien que certaines espèces soient hyperthermophiles (*Methanothermus fervidus*, 80-85 °C). Les *Methanobacteriales* sont présentes dans de nombreux environnements anoxiques : sédiments marins et d'eaux douces, eaux souterraines et sources géothermales, eaux usées, rizières et sol (Bonin & Boone, 2006). Certaines *Methanobacteriales* sont des endosymbiontes de mammifères et d'insectes (termites) où elles jouent un rôle important dans la dégradation de la matière organique (ex. : les *Methanobrevibacter* spp.).

ii. Les *Methanocellales*

Les *Methanocellales* ne comportent que trois espèces : *Methanocella arvoryzae*, *Methanocella conradii* et *Methanocella paludicola* (Sakai *et al.*, 2014). Les *Methanocellales* se présentent sous la forme de bâtonnets gainés ou de coques (Figure 28 (8)). Ces espèces sont non-mobiles, bien que *Methanocella arvoryzae* possède l'ensemble des gènes codant le flagelle. Ces microorganismes hydrogénotrophes sont capables d'utiliser de faibles concentrations d'H₂/CO₂ pour leur méthanogenèse. Les *Methanocellales* sont également modérément thermophiles, pouvant croître à 50 °C. Leur GC% est compris entre 53 et 55 mol% (Sakai *et al.*, 2014). Toutes les espèces de *Methanocellales* décrites à ce jour ont été isolées de rizières où elles consomment des dérivés carbonés sécrétés par les plantes. Ces archées peuvent synthétiser la catalase et une superoxyde dismutase, leur permettant ainsi de résister temporairement aux dérivés produits en présence d'oxygène, lorsque celui-ci est temporairement présent dans le milieu. Les *Methanocellales* sont également capables de résister à la dessiccation, ayant été retrouvées dans des sols asséchés exposés à l'air libre. Des séquences

de gènes codant l'ARNr 16S de ces microorganismes ont également été détectées dans des tourbières, marais, forêts tropicales, mines et sédiments lacustres (Sakai *et al.*, 2014).

iii. Les *Methanococcales*

Les *Methanococcales* regroupent deux familles : les *Methanococcaceae* (2 genres) et les *Methanocaldococcaceae* (2 genres) (Oren, 2014). D'un point de vue métabolique, les *Methanococcales* sont hydrogénotrophes, consommant de l' H_2/CO_2 et parfois du formate pour leur méthanogénèse. D'un point de vue morphologique, ce sont des coques réguliers (Figure 28). Les cellules se déplacent grâce à des flagelles regroupés en « touffes » denses ou en paquets (Figure 28 (3)). Leur temps de génération est le plus court des méthanogènes connues (2 h à 37 °C, 30 min à 85 °C) ce qui les rend relativement faciles à isoler. Leur contenu en GC% est d'environ 30 mol% (Whitman & Jeanthon, 2006). Les *Methanococcales* n'ont à ce jour été isolées qu'à partir d'environnements marins : estuaires, rivages, marais-salants, biofilms, sources hydrothermales profondes, sédiments géothermaux, réservoirs pétroliers. Ces microorganismes sont pour la plupart thermophiles ou hyperthermophiles. A titre d'exemple, *Methanocaldococcus jannashii* fut la première espèce hyperthermophile isolée d'une source hydrothermale océanique profonde (Whitman & Jeanthon, 2006).

iv. Les *Methanomicrobiales*

Les *Methanomicrobiales* regroupent cinq familles : les *Methanocalculaceae* (1 genre), les *Methanocorpusculaceae* (1 genre), les *Methanomicrobiaceae* (6 genres), les *Methanoregulaceae* (3 genres) et les *Methanospirillaceae* (1 genre) (Garcia *et al.*, 2006). Les *Methanomicrobiales* sont toutes hydrogénotrophes. En plus du dihydrogène, certaines peuvent également utiliser le formate et/ou des alcools pour oxyder le CO_2 . Ces microorganismes peuvent utiliser l'acétate comme source de carbone (Garcia *et al.*, 2006). D'un point de vue morphologique, les *Methanomicrobiales* sont de petits bâtonnets ou des coques irréguliers (Figure 28 (2)). Leurs membranes cellulaires ne comportent pas d'hydroxyarchéol mais des aminopentanetétrols, du galactose et du glycérol, caractéristiques propres à ce taxon. Les *Methanomicrobiales* ne possèdent pas de pseudopeptidoglycane. Leur contenu en GC% varie entre 38 et 61 mol% (Garcia *et al.*, 2006). Ces archées sont majoritairement mésophiles, bien que certaines soient psychrophiles (0 °C, *Methanogenium frigidum*) ou thermotolérantes (57 °C, *Methanoculleus thermophilicum*) (Garcia *et al.*, 2006). Certaines espèces, comme *Methanocalculus halotolerans*, sont halotolérantes (0,8 M NaCl). Cet ordre d'archées

méthanogènes est présent sous forme libre dans les sédiments marins et d'eau douce, les mangroves, le limon, les marais salants, les sources chaudes, les marais ou les solfatares, *etc.* Certaines *Methanomicrobiales* sont également connues pour être des endosymbiontes de protozoaires ciliés (*Ciliophora*) et jouent rôle important dans la dégradation de la matière lignocellulolytique (ex. : *Methanobrevibacter*) (Brune, 2014).

v. Les *Methanopyrales*

Les *Methanopyrales* sont des archées méthanogènes ne comprenant qu'une seule espèce décrite à savoir *Methanopyrus kandleri* (Kurr *et al.*, 1991). Morphologiquement, *Methanopyrus* est un bacille mobile dont la paroi est constituée de pseudopeptidoglycane complété avec de l'ornithine et de la lysine (Figure 28 (1)). *Methanopyrus* est un genre d'archée méthanogène hydrogénotrophe, utilisant l' H_2 et le CO_2 pour réaliser sa méthanogenèse. Le contenu en GC% de son ADN génomique est de 60 mol% (Kurr *et al.*, 1991). *Methanopyrus kandleri* est une espèce *hyperthermophile* qui a été isolée de sédiments du Golfe de Californie chauffés par l'activité hydrothermale profonde. Sa température optimale de croissance est de 98 °C, mais il peut également croître jusqu'à 116 °C, et même jusqu'à 122 °C lorsqu'il est incubé à 20 MPa de pression (Takai, 2019). Il s'agit à ce jour de l'espèce d'archée méthanogène la plus hyperthermophile connue et du microorganisme détenant le record de vie à haute température. Aucun représentant de cet ordre n'a, à ce jour, été décrit depuis d'autres environnements.

vi. Les *Methanosarcinales*

Les *Methanosarcinales* regroupent quatre familles : les *Methanosarcinaceae* (8 genres), les *Methanomicrococcaceae* (1 genre), les *Methanosaetaceae* (1 genre) et la famille candidate des *Ca.* 'Methanoperedenaceae' (anciennement ANME-2d), archées potentiellement méthanotrophes (Kendall & Boone, 2006; Haroon *et al.*, 2013). Les *Methanosarcinales* se présentent sous la forme de coques ou de bâtonnets enveloppés ou non dans une gaine. Certains ont une ciliature monotriche ou ditriche, tandis que d'autres sont dépourvus de flagelle (Figure 28 (6)). Les *Methanosarcinales* sont protégées par une paroi protéique parfois renforcée par une gaine ou des hétéropolysaccharides ; ces parois ne contiennent par ailleurs ni peptidoglycane ni pseudopeptidoglycane. Leur membrane cellulaire est souvent composée d'hydroxyarchéol, de myo-inositol, d'éthanolamine et de glycérol. Leur teneur en GC% varie entre 36 et 54 mol%.

Les *Methanosarcinales* sont des microorganismes extrêmement versatiles d'un point de vue métabolique. En effet, elles sont capables d'utiliser une très large diversité de substrats pour réaliser leur méthanogenèse et se démarquent ainsi des autres ordres d'archées méthanogènes. Elles peuvent en effet se développer par méthanogenèse hydrogénotrophe, acétoclastique et/ou méthylotrophe (Kendall & Boone, 2006).

Les *Methanosarcinales* semblent ubiquistes des écosystèmes anoxiques. Les *Methanosarcinaceae* sont halotolérantes, voire halophiles, et sont présentes principalement dans les lacs hypersalés et alcalins, les marais salants ou dans des sédiments hypersalés. Les autres familles sont présentes dans une plus grande diversité d'environnements anoxiques : estuaires, mangroves, sédiments lacustres, sédiments marins profonds. Ces microorganismes sont également retrouvés dans le tractus digestif de nombreux mammifères et insectes (termites) (Kendall & Boone, 2006)

c. Nouvelles lignées d'archées potentiellement méthanogènes

i. Les nouvelles lignées candidates

(1) *Candidatus* 'Methanofastidiosa'

Les *Ca.* 'Methanofastidiosa' (anciennement les « *Euryarchaeota* class WSA2 ») forment une classe candidate d'euryarchées méthanogènes (Nobu *et al.*, 2016; Borrel *et al.*, 2019). Nos connaissances de cette lignée ne reposent que sur la reconstruction et l'analyse de MAGs. Ces archées qui avaient été identifiées dès 1998 au travers d'inventaires moléculaires de diversité basés sur les gènes codant les ARNr 16S, a récemment été mise en évidence dans des métagénomiques reconstruits à partir d'échantillons de bioréacteurs de traitement d'eaux usées (Nobu *et al.*, 2016). Cette nouvelle classe affiliée aux *Euryarchaeota* ne comprend à ce jour qu'une unique espèce-candidate, *Ca.* 'Methanofastidiosum methylthiophilus' (Nobu *et al.*, 2016). D'un point de vue génétique, les *Ca.* 'Methanofastidiosa' ont la particularité de posséder les gènes codant la méthyl-coenzyme M réductase (Mcr) canonique et la méthylmalonyl-CoA suggérant qu'elles peuvent à la fois réaliser la méthanogenèse et la fermentation (Nobu *et al.*, 2016). Leur contenu en GC% est de 32,9 à 35,4 mol%. Les *Ca.* 'Methanofastidiosa' utiliseraient la voie de méthanogenèse hydrogénotrophe méthyle-dépendante en réduisant des composés thiolés (R-SH) et en oxydant du dihydrogène. Ces microorganismes se développeraient dans les eaux usées, les sédiments marins et d'eaux douces, ainsi que dans les aquifères (Nobu *et al.*, 2016).

(2) *Candidatus* ‘Methanoliparia’

La classe des *Ca.* ‘Methanoliparia’ est connue au travers de deux MAGs : NM1a (*Ca.* ‘Metanoliparium thermophilum’) et NM1b (*Ca.* ‘Methanolliviera hydrocarbonicum’) (Borrel *et al.*, 2019). Ces microorganismes atypiques possèderaient le capital génétique pour produire du méthane et de l’acétate à partir d’alcane à courtes chaînes (éthane, propane, butane) et d’acides gras à moyennes et longues chaînes (AGMLCs) (Borrel *et al.*, 2019). Pour produire du méthane à partir d’AGMLCs, ces archées utiliseraient une acyl-CoA synthase couplée à la voie de la β -oxydation et la voie de Wood-Ljungdahl. Les complexes Mtr et Mcr sont aussi codés afin de produire respectivement du méthyl-CoM et libérer du méthane. Comme indiqué précédemment, les *Ca.* ‘Methanoliparia’ possèdent également le complexe Mcr-like associé à la méthanotrophie anaérobie et à l’oxydation d’alcane à courtes chaînes (éthane et butane) (Laso-Pérez *et al.*, 2016; Borrel *et al.*, 2019). Les MAGs de NM1a et NM1b proviennent de cultures d’enrichissement respectivement inoculées avec des fluides pétroliers et des suintements pétroliers provenant d’un réservoir pétrolier situé au Brésil, et d’une zone de suintements située au large de la Californie (États-Unis).

(3) *Candidatus* ‘Verstraetearchaeota’

Les *Ca.* ‘Verstraetearchaeota’ forment un phylum candidat d’archées méthanogènes comportant plusieurs ordres et genres candidats, à savoir : les *Ca.* ‘Methanomethylicus’, les *Ca.* ‘Methanosuratus’, les *Ca.* ‘Methanohydrogenales’, les *Ca.* ‘Methanomethylovorus’, *Ca.* ‘Methanomethyiales’ et les *Ca.* ‘Methanomethyloarchaeum’ (Vanwonterghem *et al.*, 2016; Berghuis *et al.*, 2019; Hua *et al.*, 2019). Ces archées ont toutes le potentiel génétique pour réaliser la méthanogenèse hydrogénotrophe méthyle-dépendante, à l’exception de *Ca.* ‘Methanohydrogenales’ qui possède le capital génétique pour produire du méthane par méthanogenèse hydrogénotrophe, en se basant sur la branche méthyle de la voie de Wood-Ljungdahl (Vanwonterghem *et al.*, 2016; Berghuis *et al.*, 2019). A l’instar des *Ca.* ‘Methanofastidiosa’, les *Ca.* ‘Methanomethyiales’ semblent pouvoir fermenter. Ces archées possèdent en effet le capital génétique pour utiliser des sucres comme source de carbone et générer de l’acétyl-CoA *via* la voie de la glycolyse et la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase. La synthèse d’acétyl-CoA et sa conversion en acétate par phosphorylation au niveau du substrat offre une source d’énergie possible et inhabituelle pour des archées méthanogènes. Les *Ca.* ‘Methanohydrogenales’ ne semblent pas posséder cette capacité aux vues des portions reconstruites de leur génome.

D'un point de vue environnemental, des séquences de *Ca.* 'Verstraetearchaeota' ont été retrouvées dans des environnements tempérés riches en composés méthylés tels que le lac méromictique Pavin (Auvergne, France), des réservoirs de pétrole, une source chaude thermale, ou encore dans des zones humides, des sédiments (lacs, estuaires), des sols, des eaux souterraines, des suintements pétroliers, des sables bitumineux, des boues volcaniques, des zones de subduction et des monts hydrothermaux, ou des environnements plus chauds tels que les sources géothermales de Yellowstone (Obsidian pool, États-Unis) (Vanwonterghem *et al.*, 2016; Berghuis *et al.*, 2019).

(4) *Candidatus* 'Bathyarchaeota'

Les *Ca.* 'Bathyarchaeota' (anciennement et formellement, les « *Miscellaneous Crenarchaeotal Group* ») forment un phylum candidat d'archées potentiellement méthanogènes (Meng *et al.*, 2014). Les informations relatives à cette lignée se limitent à des données de métagénomique ou de *single cell genomics*. D'un point de vue phylogénétique, les *Ca.* 'Bathyarchaeota' sont proches des *Crenarchaeota* et sont actuellement réparties en 25 sous-groupes (numérotés de Subgroup-1 à Subgroup-25) (Zhou *et al.*, 2018). A ce jour, deux MAGs *quasi* complets de *Ca.* 'Bathyarchaeota' ont été reconstruits par Evans *et al.* (2015) : BA1 (91,6 % de complétude) et BA2 (93,8 % de complétude).

Les voies métaboliques des *Ca.* 'Bathyarchaeota' sont complexes. Il semble que la majorité des *Ca.* 'Bathyarchaeota' possèdent la voie de Wood-Ljungdahl, permettant de produire de l'acétate à partir d'acétyl-CoA (Borrel *et al.*, 2016). Suivant les sous-groupes, plusieurs voies métaboliques ont été mises en évidence, indiquant que certains groupes pourraient pratiquer : (i) la fermentation de protéines extracellulaires, de composés aromatiques et d'hydrates de carbone végétaux pour certains, (ii) la fermentation d'urée et de lipides pour d'autres, (iii) l'acétogénèse à partir de H₂/CO₂ et/ou (iv) la méthanogénèse. Cependant, ce dernier point reste un sujet de débats. En effet, bien que les MAGs BA1 et BA2 aient été associés à la méthanogénèse hydrogénotrophe méthyle-dépendante (Evans *et al.*, 2015), ces derniers codent le complexe Mcr-like (associé à l'alcanotrophie) et non le complexe Mcr canonique et sont dépourvus de presque tous les marqueurs de méthanogénèse (Borrel *et al.*, 2019).

Ces archées ont été détectées dans les sédiments marins, les sédiments d'eau douce, les marais salants, les lacs hypersalés, de la tourbe ou encore au niveau de zones d'émission de fluides froids ou de cheminées hydrothermales sous-marines.

ii. Les autres lignées méthanogènes candidates

En plus des lignées mentionnées ci-dessus, de récentes études se basant sur l'analyse de MAGs issus de divers écosystèmes suggèrent que la méthanogenèse serait un métabolisme également présent dans de nombreuses lignées non-euryarchéennes (Hua *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019).

Les *Ca.* 'Nezhaarchaeota' forment un phylum candidat d'archées méthanogènes comportant deux ordres, à savoir les *Ca.* 'Methanohydrogenotrophilum' et les *Ca.* 'Geoarchaeum' (Hua *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). Cette lignée candidate serait un phylum frère des *Crenarchaeota*. L'analyse des MAGs de *Ca.* 'Nezhaarchaeota' laisse penser que ces archées seraient des méthanogènes hydrogénotrophes (Hua *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). L'annotation des 2 MAGs démontre la présence des gènes codant les complexes enzymatiques Frh, Hdr, Mcr impliqués dans la conservation de l'énergie et la production de méthane chez ces archées. Ces MAGs ont été reconstruits à partir d'ADN extrait d'une source chaude chinoise (Source Jinze, Yunnan) (Wang *et al.*, 2019).

L'étude de Wang *et al.* (2019) propose l'hypothèse que certaines *Korarchaeota* (WYZ-LMO9) seraient très versatiles d'un point de vue métabolique, et seraient potentiellement capables d'oxyder des alcanes (en réduisant des sulfites), de réduire des composés soufrés, et de réaliser une méthanogenèse hydrogénotrophe méthyle-dépendante.

d) Nouvelles lignées d'archées méthanogènes récemment cultivées

i. Les *Methanonatronarchaeia*

Les *Methanonatronarchaeia* représentent une classe d'archées méthanogènes méthylotrophes qui a été découverte récemment et qui est décrite dans deux uniques publications (Sorokin *et al.*, 2017, 2018). Cette classe comprend une unique espèce décrite et disponible en culture clonale : *Methanonatronarchaeum thermophilum* (Figure 28 (7)). Cette espèce a été isolée d'un lac de soude hypersalé situé dans la steppe de Koulounda (Altaï, Russie). Il existe également une espèce candidate (*Ca.* 'Methanohalarchaeum thermophilum') enrichie à partir des eaux d'un lac hypersalé non alcalin de la même région (Sorokin *et al.*, 2018). Les *Methanonatronarchaeia* utilisent une méthanogenèse hydrogénotrophe méthyle-dépendante nécessitant un apport de coenzyme M exogène pour être cultivées (Sorokin *et al.*, 2018).

Les *Methanonatronarchaeia* sont des espèces thermophiles (température optimale de croissance : 50 °C) et halophiles se développant de manière optimale en présence de 4 M de Na⁺, en mettant en œuvre une stratégie ‘salt-in’ (*i.e.* : accumulation intracellulaire de solutés compatibles) pour réguler leur pression osmotique. D’un point de vue physiologique, *Methanonatronarchaeum thermophilum* est alcaliphile obligatoire se développant de manière optimale à un pH de 9,5, tandis que *Ca.* ‘*Methanohalarchaeum thermophilum*’ est neutrophile (Sorokin *et al.*, 2018). Ces archées ont des cellules coccoides (coques irréguliers de 0,4 µm de diamètre) avec une fine paroi cellulaire en monocouche recouverte d’exopolysaccharides.

ii. Les *Methanomassiliicoccales*

L’ordre d’archées méthanogènes sur lequel porte ce travail de thèse, les *Methanomassiliicoccales*, n’a été découvert que récemment (Dridi *et al.*, 2012a). Cet ordre euryarchéen est phylogénétiquement proche des *Thermoplasmatales*, un ordre d’archées non-méthanogènes. A ce jour, deux espèces sont cultivées : *Methanomassiliicoccus luminyensis*, espèce-type de l’ordre (Dridi *et al.*, 2012a) (Figure 28 (4)) et [formellement] *Ca.* ‘*Methanomethylophilus alvus*’ (Fadhlaoui *et al.*, 2020).

Ces travaux de thèse se focalisant sur cette nouvelle lignée d’archées, plus de détails les concernant sont présentés ci-après (§ 7.).

6. Hypothèses sur les origines de la méthanogenèse

La méthanogenèse est un métabolisme ancien qui pourrait être apparu au cours de l’Archéen (Battistuzzi *et al.*, 2004; Weiss *et al.*, 2016; Baker *et al.*, 2020). L’histoire évolutive de ce métabolisme reste toutefois non résolue et demeure un sujet de recherche très actif.

On a longtemps considéré que la voie de la méthanogenèse hydrogénotrophe basée sur la réduction du CO₂ était la voie la plus ancestrale des voies de méthanogenèse, car cette forme de méthanogénèse était omniprésente parmi les 6 ordres euryarchéens d’archées méthanogènes identifiés historiquement (Baptiste *et al.*, 2005). Ainsi, cette observation a longtemps laissé penser que la méthanogenèse hydrogénotrophe basée sur la réduction de CO₂ constituait un trait propre aux *Euryarchaeota*, qui aurait été perdu par la suite chez les taxa archéens non-

méthanogènes (ex. : *Halobacteriales*, *Thermoplasmatales* et les *Archaeoglobales*) (Baptiste *et al.*, 2005; Raymann *et al.*, 2015). Mais des découvertes ultérieures d'autres lignées d'archées méthanogènes ont bouleversé ce paradigme. En effet, l'isolement de nouvelles souches méthanogènes et l'obtention de MAGs de lignées candidates archéennes inconnues jusqu'à récemment ont bouleversé ce dogme en démontrant que la voie hydrogénotrophe n'était pas présente chez toutes les archées méthanogènes et que de plus, il y avait des archées méthanogènes en dehors des *Euryarchaeota*. En effet, des études physiologiques de *Methanomassiliicoccales* et de *Methanonatronarchaeales* ont démontré que ces taxa euryarchéens sont non-seulement phylogénétiquement distincts des classes I et II des méthanogènes, mais qu'ils sont de surcroît hydrogénotrophes méthyles-dépendants, et réduisent directement des composés méthylés *via* la Mcr (Dridi *et al.*, 2012a, 2012b; Borrel *et al.*, 2016; Sorokin *et al.*, 2018). Par ailleurs, la découverte des *Ca.* 'Verstraearchaeota' et des *Ca.* 'Nezhaarchaeota', deux nouveaux phyla candidats d'archées méthanogènes classés au sein des TACKs remet en cause la monophylie de la méthanogenèse. En effet, ces archées possèdent les gènes codant le complexe Mcr canonique et la plupart des enzymes liées à une méthanogenèse hydrogénotrophe basée sur la réduction de composés méthylés voire de CO₂ (Vanwonterghem *et al.*, 2016; Berghuis *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019).

Diverses études tendent à montrer que la voie de Wood-Ljungdahl (WL) serait une voie métabolique ancestrale utilisée par le dernier ancêtre commun universel (LUCA, Last Universal Common Ancestor), c'est-à-dire le plus récent type d'organisme dont seraient issues toutes les espèces vivant actuellement sur Terre. Selon l'analyse des caractères des descendants de LUCA, celui-ci serait un microorganisme thermophile, autotrophe H₂-dépendant utilisant le CO₂ comme accepteur terminal d'électrons pour son métabolisme énergétique (Weiss *et al.*, 2016; Adam *et al.*, 2018). Jusqu'à 2012, la branche méthyle de la WL (m-WL) était retrouvée exclusivement, pour les bactéries, chez les bactéries acétogènes, et pour les archées, chez les *Euryarchaeota* méthanogènes des classes I et II (Garcia *et al.*, 2000). Comme précisé ci-dessus, il est désormais établi que la m-WL n'est pas présente chez les ordres euryarchéens des *Methanomassiliicoccales* et des *Methanonatronarchaeales* (Dridi *et al.*, 2012a; Borrel *et al.*, 2016; Sorokin *et al.*, 2018). Dans l'état actuel des connaissances, les métabolismes hydrogénotrophes basés sur la réduction du CO₂ pour le premier, et sur la branche méthyle de la voie de WL pour le second, semblent donc tous deux très représentés au sein des archées méthanogènes identifiées à ce jour, et suscitent des interrogations quant à leur émergence. Le lien évolutif entre ces deux métabolismes hydrogénotrophes, demeure encore flou. Dans leurs

travaux, Berghuis *et al.* (2019) et Borrel *et al.* (2019) exposent deux grandes hypothèses similaires sur l'origine de ce métabolisme (Figure 29).

Le premier postulat voudrait que la voie de méthanogenèse hydrogénotrophe méthyle-dépendante soit évolutivement antérieure à la voie de WL CO₂-dépendante car cette dernière requiert plus de gènes pour être mise en œuvre. La méthanogenèse hydrogénotrophe méthyle-dépendante serait alors un héritage évolutif du dernier ancêtre commun des archées. Dans ce scénario, la méthanogenèse serait apparue dans des écosystèmes riches, où des molécules organiques complexes (ex. : composés méthylés) étaient facilement disponibles. La méthanogenèse hydrogénotrophe basée sur la réduction de CO₂ se serait ensuite développée par l'ajout de gènes supplémentaires, pour coloniser des environnements toujours plus extrêmes pauvres en nutriments (Berghuis *et al.*, 2019). La seconde hypothèse voudrait que la voie de réduction méthanogenèse hydrogénotrophe méthyle-dépendante ait émergé plus tard, suite à la perte ou l'évolution de la voie de WL CO₂-dépendante et/ou *via* des transferts horizontaux de gènes. Cette hypothèse est congruente avec l'idée d'une vie cellulaire primitive basée sur l'utilisation de CO₂ comme source de carbone dans des environnements encore très pauvres en nutriments. La méthanogenèse méthylotrophe serait apparue suite à des délétions de gènes lorsque le milieu est devenu plus riche en nutriments, notamment des composés méthylés (Berghuis *et al.*, 2019).

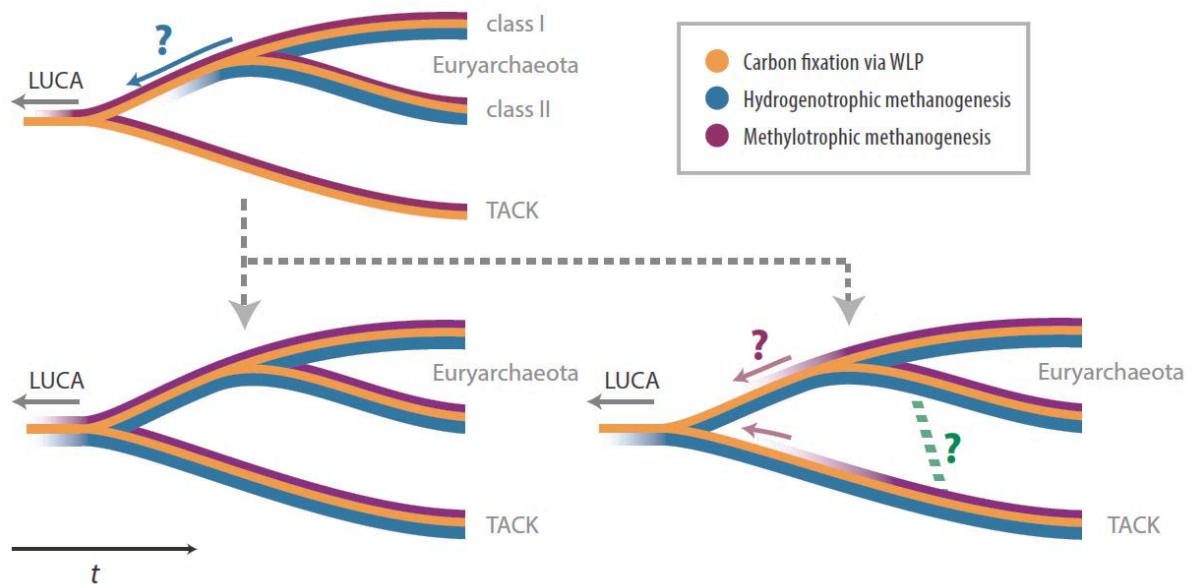


Figure 29 : Représentation schématique de l'évolution de la méthanogénèse. En haut : distribution actuelle des voies de méthanogénèse au sein des archées. En bas à gauche : hypothèse d'une origine hydrogénéotrophe basée sur la réduction de composés méthylés (en mauve). En bas à droite : hypothèse d'une origine hydrogénéotrophe de la méthanogénèse basée sur la réduction du CO₂ (en bleu). Pointillés verts : transferts horizontaux de gènes codant des méthyltransférases. Figure extraite et adaptée de Berghuis *et al.* (2019).

De surcroît, la découverte de plusieurs nouvelles lignées candidates (*Ca.* 'Bathyarchaeota', *Ca.* 'Methanoliparia' et *Ca.* 'Syntrophoarchaeum') codant le complexe Mcr-« like » capables d'activer les alcanes courtes et moyenne chaînes représente un nouveau défi pour reconstituer l'histoire évolutive de ce métabolisme et son lien avec la méthanogénèse et la méthanotrophie (Laso-Pérez *et al.*, 2016; Borrel *et al.*, 2019).

7. Les *Methanomassiliicoccales*

a) Aspects historiques

L'existence des *Methanomassiliicoccales* a été révélée avant l'isolement de *Methanomassiliicoccus luminyensis* (*Mmc. luminyensis*) B10^T, la première et unique souche de cet ordre à avoir fait l'objet d'une caractérisation physiologique approfondie (Großkopf *et al.*, 1998; Kemnitz *et al.*, 2005; Janssen & Kirs, 2008; Mihajlovski *et al.*, 2008, 2010). Avant l'isolement en culture clonale de cette souche, les connaissances de cette lignée se limitaient à des séquences de gènes codant les ARNr 16S ou les McrA (*mcrA*) détectées dans le cadre d'inventaires moléculaires de diversité. Dans les inventaires moléculaires de diversité, les séquences représentatives de l'ordre *Methanomassiliicoccales* étaient notamment désignées sous les appellations « Rice Cluster III » (RC-III) ou « Rumen Cluster C » (RCC), car les premières séquences génétiques de cet ordre provenaient de rizières ou de rumens (Großkopf

et al., 1998; Janssen & Kirs, 2008; Adam *et al.*, 2017). La congruence entre la topologie des arbres phylogénétiques basés sur le gène *mcrA* et le gène codant l'ARNr 16S a été établie à la fin des années 2000 et confirmée suite à l'isolement de *Mmc. luminyensis* (Mihajlovski *et al.*, 2008; Dridi *et al.*, 2012a; Paul *et al.*, 2012).

Il est intéressant de noter que dans leurs travaux, (Kemnitz *et al.*, 2005) avaient tenté d'isoler des représentants du RC-III à partir d'échantillons anoxiques de sols influencés par la rivière Wall (Pays-Bas). Un enrichissement en RC-III avait été mis en évidence, sans mener à l'isolement d'une souche. Bien que les conditions de culture mises en œuvre aient conduit les auteurs à conclure que les représentants du RC-III étaient des fermentaires (N.B. : la production de méthane avait été démontrée), cette étude n'en reste pas moins pionnière.

Dans la littérature, les *Methanomassiliicoccales* ont transitoirement été dénommées *Methanoplasmatales* du fait de leur relation phylogénétique avec les *Thermoplasmatales* (ordre d'archées non-méthanogènes et acidophiles), ou « Mx » suivant les auteurs (Mihajlovski *et al.*, 2008; Paul *et al.*, 2012). Le nom *Methanomassiliicoccales* a été proposé en 2013 et est accepté par le comité international sur la systématique des procaryotes CISP (Iino *et al.*, 2013; Oren & Garrity, 2013).

b) Phylogénie, taxonomie et écologie des *Methanomassiliicoccales*

a. Position phylogénétique et diversité taxonomique

Les *Methanomassiliicoccales* sont les premières archées méthanogènes connues à ne pas être phylogénétiquement affiliées à l'une des deux classes euryarchéennes de méthanogènes décrites avant 2012. En effet, cet ordre appartient aux *Diaforarchaea* (*Euryarchaeota*), une super-classe dont les représentants ne sont pas méthanogènes (Figure 30) (Petitjean *et al.*, 2015; Adam *et al.*, 2017; Borrel *et al.*, 2019). Les *Methanomassiliicoccales* sont phylogénétiquement apparentées aux *Thermoplasmatales*, au *Marine Group II*, au *Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotic Group* (TMEG) ainsi qu'à deux clades d'archées non-méthanogènes récemment identifiés (*Methanomassiliicoccales*-related, Figure 30) (Borrel *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2020). La parenté des *Methanomassiliicoccales* avec les *Thermoplasmatales* et le *Marine Group II* est notamment confirmée par l'organisation des gènes codant les ARNr 16S et 23S. Chez ces taxa, ces gènes ne sont pas regroupés et ne forment pas une unité transcriptionnelle comme chez la plupart des procaryotes, constituant ainsi un trait caractéristique de ces lignées (Borrel *et al.*, 2014b; Speth & Orphan, 2018). L'existence d'une lignée d'archées méthanogènes

au sein des *Euryarchaeota*, mais en dehors des classes méthanogènes I et II, pose également des questions quant à l'apparition et l'évolution de la méthanogénèse, tant au sein des *Euryarchaeota* qu'au sein des *Archaea*.

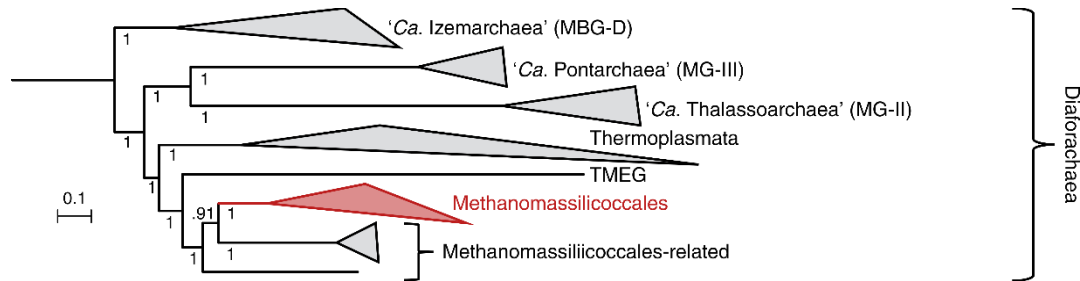


Figure 30 : Détail de la position phylogénétique des *Methanomassiliococcales* au sein des *Diaforarchaea*, une super-classe des *Euryarchaeota*. La construction de cet arbre est basée sur la comparaison de 40 marqueurs phylogénétiques. Figure extraite et adaptée de Borrel *et al.* (2019).

En s'appuyant sur des inventaires moléculaires de diversité basés sur le séquençage des gènes codant les ARNr 16S et ceux codant les McrA (*mcrA*), deux principaux clusters de séquences de *Methanomassiliococcales* sont aujourd'hui décrits dans la littérature (Figure 31) (Paul *et al.*, 2012; Borrel *et al.*, 2013b; Söllinger *et al.*, 2016) .

Le premier cluster est désigné sous l'appellation « associé à un hôte » (*host-associated*, en anglais) ou parfois « tractus gastro-intestinal » (*gastro-intestinal tract*, GIT, en anglais). Ce cluster comprend exclusivement des séquences appartenant à des représentants issus de tractus digestifs de divers animaux, tels que des arthropodes (blattes, coléoptères, millepattes, termites, *etc.*), des oiseaux (poulets), des reptiles (tortues), des marsupiaux (wallabys) ainsi que de divers mammifères (bovins, caprins, éléphants, humains, ovins, porcins, rats, grands singes) (Mihajlovski *et al.*, 2008, 2010; Horz *et al.*, 2012; Paul *et al.*, 2012; Borrel *et al.*, 2013b; Söllinger *et al.*, 2016; Raymann *et al.*, 2017; Guindo *et al.*, 2021). Le cluster *host-associated* comprend un représentant récemment cultivé en culture clonale (*Ca.* 'Methanomethylophilus alvus' Mx-05) (Fadhlaoui *et al.*, 2020) ; communication personnelle, Dr. Borrel Guillaume, Institut Pasteur, Paris) ainsi que des cultures mixtes enrichies en *Methanomassiliococcales*, incluant *Ca.* 'Methanomethylophilus alvus' Mx1201 (selles humaines ; Borrel *et al.* (2012)), *Ca.* 'Methanomethylophilus sp.' 1R26 (origine : rumen de vache ; Noel *et al.* (2016)), *Ca.* 'Methanogranum caenicola' Kjm51a (digesteur anaérobie ; Iino *et al.* (2013)), *Ca.* 'Methanoplasma termitum' MpT1 et la souche MpM2 (intestins de termites et millepattes ; Borrel *et al.*, (2012); Lang *et al.* (2015)), la souche RumEn-M2 (rumen de vache ; Söllinger *et al.* (2016)), ainsi que les souches ISO4-G1 et ISO5-H5 (rumens de moutons ; Kelly *et al.*, (2016); Y. Li *et al.* (2016)) (Tableau 7).

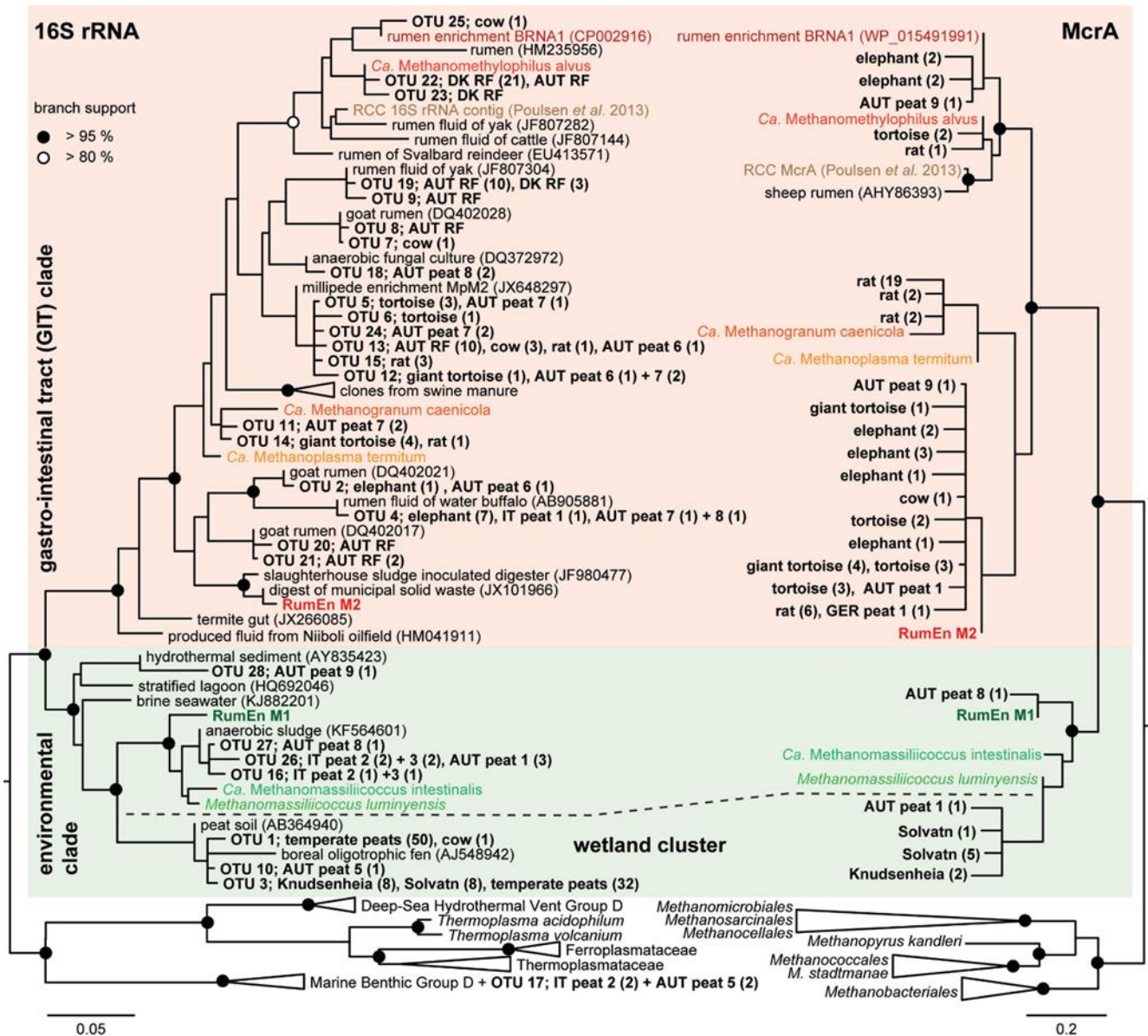


Figure 31 : Arbres phylogénétiques montrant la relation entre les séquences des gènes codant les ARNr 16S (à gauche) et celles codant les McrA (*mcrA*) (à droite) chez les *Methanomassiliococcales*. Les séquences ont été obtenues à partir d'échantillons de diverses fèces, du rumen de bovin ainsi que de sols de diverses zones humides. Le cluster « Lac Pavin »/wetland y apparaît. Une topologie similaire est décrite dans les travaux de Borrel *et al.* (2013b). Figure extraite de Söllinger *et al.* (2016).

Dans leurs travaux se basant sur des analyses de séquences codant les ARNr 16S et des reconstructions et analyses de génomes, les auteurs Mihajlovski *et al.* (2010) et Borrel *et al.* (2017) ont proposé l'existence d'au moins trois autres espèces de *Methanomassiliicoccales* (Mx-02, Mx-03 et Mx06) affiliées au cluster *host-associated* (Tableau 7).

Paradoxalement, trois souches enrichies en cultures mixtes ou isolées à partir d'environnements digestifs sont affiliées au cluster *free-living*. Il s'agit de la souche type de l'ordre *Methanomassiliicoccus luminyensis* B10^T, de *Ca.* 'Methanomassiliicoccus intestinalis' Issoire-Mx1 (fèces humaines ; Dridi *et al.* (2012a); Borrel *et al.* (2013a)) et de la souche RumEn-M1 (rumen de vache ; Söllinger *et al.* (2016)) (Tableau 7).

Le second cluster de séquences de *Methanomassiliicoccales*, est désigné, dans la littérature, sous l'appellation de cluster « environnemental » ou « mode de vie libre » (*free-living*, en anglais), par opposition au cluster « *host-associated* » (Figure 31). Le cluster *free-living* comprend majoritairement des représentants issus d'un large panel d'environnements non-digestifs « extrêmes » et « non-extrêmes » incluant, entre autres, des sols de rizières et d'autres sols, des sédiments hydrothermaux, des boues d'épuration, des saumures, des mangroves, des tourbières, des eaux lacustres anoxiques, des marais ou encore divers sédiments marins, dulçaquicoles ou estuariens, *etc.* (Großkopf *et al.*, 1998; Kemnitz *et al.*, 2005; Borrel *et al.*, 2013b; Söllinger *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2020). Dans leurs travaux de 2013, Borrel *et al.* avaient distingué un troisième cluster (« lac Pavin », parfois *wetland cluster*, en anglais) aujourd'hui englobé dans le cluster environnemental et toujours identifiable dans les reconstructions phylogénétiques (Figure 31) (Borrel *et al.*, 2013b).

Nos connaissances du cluster *free-living* se limitent à des annotations de génomes assemblés à partir de métagénomes (MAGs) et issus de divers écosystèmes (ex. : le MAG MALP, résidus de produits pétroliers), ainsi qu'aux 3 souches isolées ou enrichies en culture mixte à partir d'environnements digestifs : *Mmc luminyensis* B10^T (Dridi *et al.*, 2012a), *Ca.* 'Mmc intestinalis' Issoire-Mx1 (Borrel *et al.*, 2013a) et la souche RumEn-M1 (Söllinger *et al.*, 2016) (Tableau 7).

Tableau 7 : Exemples de souches isolées (en gras) ou de MAG de *Methanomassiliococcales* affiliés aux clades *free-living* (en vert) ou *host-associated* (en rouge) accompagné de données génomiques et physiologiques. ND : non déterminé ; * : nombre de gènes codant des protéines ; ** : ne prend pas en compte Mx-06 ; *** : incertain ; MS : méthylsulfures (MeSH et DMS).

Souche	Source	Génome (Mpb)	Complétude (%)	GC%	Nombre de CDS*	ARNt	Substrats (+ H ₂)	Numéro d'accèsion du génome	Référence
<i>Methanomassiliococcus luminyensis</i> B10 [†]	Fèces (<i>Homo sapiens</i>)	2,64	100	60,5	2661	48	MeOH, MMA/DMA/TMA, MS	CAJE01000001	(Gorlas <i>et al.</i> , 2012; Borrel <i>et al.</i> , 2014b)
<i>Ca.</i> 'Methanomassiliococcus intestinalis' Mx1-Issoire	Fèces (<i>Homo sapiens</i>)	1,93	100	41,3	1832	45	MeOH, MMA/DMA/TMA	CP005934	(Borrel <i>et al.</i> , 2014b)
<i>Ca.</i> 'Methanomassiliococcus intestinalis' 138	Fèces (<i>Homo sapiens</i>)	1,84	100	41,2	1780	45	MeOH, MMA/DMA/TMA	LVVS01000000	(Borrel <i>et al.</i> , 2017)
<i>Ca.</i> 'Methanomassiliococcus intestinalis' 183	Fèces (<i>Homo sapiens</i>)	1,89	100	41,4	1814	45	MeOH, MMA/DMA/TMA	LVVT01000000	(Borrel <i>et al.</i> , 2017)
MALP	Résidus pétroliers	1,55	> 92	59,1	ND	ND	MeOH, acétate***	SRR636597	(Speth & Orphan, 2018)
MMA1	Mangrove	1,98	99,2	52,1	2070	ND	MeOH, MMA/DMA/TMA, MS	PRJNA587831	(Zhang <i>et al.</i> , 2020)
MMA2	Mangrove	1,94	98,4	51,5	1951	ND	MeOH, MMA/DMA/TMA, MS	PRJNA587831	(Zhang <i>et al.</i> , 2020)
RumEn M1	Rumen (<i>Bos taurus</i>)	~ 2,21	96,6	62,5	ND	43	MeOH, MMA, TMA, MS	LJJK00000000	(Söllinger <i>et al.</i> , 2016)
MOYENNES	–	2,00	98,3	51,2	2018	45	–	–	–
<i>Ca.</i> 'Methanomethylophilus alvus' Mx-05	Fèces (<i>Homo sapiens</i>)	ND	ND	ND	ND	ND	TMA	ND	(Mihajlovski <i>et al.</i> , 2010; Borrel <i>et al.</i> , 2017; Fadhlouli <i>et al.</i> , 2020)
<i>Ca.</i> 'Methanomethylophilus alvus' Mx1201	Fèces (<i>Homo sapiens</i>)	1,67	100	55,6	1705	52	MeOH, MMA/DMA/TMA, MS	CP004049	(Borrel <i>et al.</i> , 2012, 2014b)
<i>Ca.</i> 'Methanomethylophilus alvus' 271	Fèces (<i>Homo sapiens</i>)	1,68	100	60,3	1594	45	MeOH, MMA/DMA/TMA, MS	LVVP01000000	(Borrel <i>et al.</i> , 2017)
<i>Ca.</i> 'Methanomethylophilus sp.' IR26	Rumen (<i>Bos taurus</i>)	1,72	93,0	60,4	2076	37	MeOH, MMA/DMA/TMA	LOPS01000000	(Noel <i>et al.</i> , 2016)
<i>Ca.</i> 'Methanogranum caenicola' Kjm51a	Déchets organiques	ND	ND	ND	ND	ND	MeOH	AB749767	(Iino <i>et al.</i> , 2013)
<i>Ca.</i> 'Methanoplasma termitum' MpT1	Intestins (<i>Cubitermes ugandensis</i>)	1,49	100	49,2	1415	46	MeOH, MMA	CP010070	(Lang <i>et al.</i> , 2015)
BRNA1	Rumen (<i>Bos spp.</i>)	1,46	100	58,3	ND	44	MMA/DMA/TMA	CP002916	(Söllinger & Urlich, 2019)
ISO4-H5	Rumen (<i>Bos taurus</i>)	1,94	100	54,0	1874	54	MeOH, MMA/DMA/TMA, MS	CP014214	(Y. Li <i>et al.</i> , 2016)
ISO4-G1	Rumen (<i>Ovis sp.</i>)	1,59	100	55,5	1501	ND	MeOH, MMA/DMA/TMA	CP013703	(Kelly <i>et al.</i> , 2016)
MpM2	Intestins (<i>Anadenobolus sp.</i>)	ND	ND	ND	ND	ND		CP002916	(Paul <i>et al.</i> , 2012)
Mx-02	Fèces (<i>Homo sapiens</i>)	1,42	100	47,6	1430	46	MeOH, MMA/DMA/TMA***	LVVQ01000000	(Borrel <i>et al.</i> , 2017)
Mx-03	Fèces (<i>Homo sapiens</i>)	1,91	100	59,6	1861	46	MeOH, MMA	LVVR01000000	(Borrel <i>et al.</i> , 2017)
Mx-06	Fèces (<i>Homo sapiens</i>)	1,48 – 1,70	87	58,3	1240	36	MeOH, MMA/DMA/TMA	LVVU01000000	(Mihajlovski <i>et al.</i> , 2010; Borrel <i>et al.</i> , 2017)
RumEn M2	Rumen (<i>Bos taurus</i>)	~ 1,28	94,1	54,8	ND	44	TMA	LJKL00000000	(Söllinger <i>et al.</i> , 2016)
MOYENNES **	–	1,61	98,7	55,5	1682	46	–	–	–

b. Aspects écologiques

La comparaison de divers génomes de *Methanomassiliicoccales* affiliés aux clusters *free-living* et *host-associated* suggère que ces deux clusters ont suivi une histoire évolutive distincte se traduisant par des adaptations à leurs environnements (Borrel *et al.*, 2014b).

i. Dans un contexte digestif

Avec les *Methanobacteriales* *Methanobrevibacter smithii* et *Methanosphaera stadtmanae*, les *Methanomassiliicoccales* sont les seules archées méthanogènes connues pour coloniser et se développer dans le tractus digestif d'animaux, incluant celui de l'Homme (Mihajlovski *et al.*, 2010; Dridi *et al.*, 2012a). Les représentants du cluster *host-associated* présentent plusieurs adaptations associées au développement dans des environnements digestifs semblant indiquer un mode de vie commensal dans le tube digestif (Borrel *et al.*, 2014b, 2017; Lang *et al.*, 2015; Cuesta-Zuluaga *et al.*, 2021). A titre d'exemple, la réduction de la taille du génome et du nombre de gènes chez les membres du cluster *host-associated* (ex. : *Ca.* 'Mm. alvus' et *Ca.* 'Mp. termitum') indique que ces archées ont probablement connu une réorganisation substantielle de leur génome en réponse à un milieu riche en nutriments (TMA, H₂) (Tableau 7) (Borrel *et al.*, 2014b; Lang *et al.*, 2015). Ce phénomène évolutif couramment observé chez les bactéries peut parfois mener à des auxotrophies, induisant une dépendance vis-à-vis d'un ou plusieurs métabolites alors fournis par les microorganismes dans le cadre d'un partenariat (Lang *et al.*, 2015; Borrel *et al.*, 2017). Cette possible auxotrophie des *Methanomassiliicoccales* pour un ou plusieurs composés pourrait expliquer les difficultés d'isolement d'une *Methanomassiliicoccales* en culture clonale (Lang *et al.*, 2015; Borrel *et al.*, 2017). A titre d'exemple, *Ca.* 'Mp. termitum' est auxotrophe pour le coenzyme M, ce qui impose à cette archée de trouver une source exogène de ce composé pour réaliser son métabolisme (ex. : auprès d'une autre archée méthanogène) (Lang *et al.*, 2015).

Par ailleurs, certaines *Methanomassiliicoccales* affiliées au cluster *host-associated* comme *Ca.* 'Mm. alvus' et *Ca.* 'Mp. termitum' possèdent : (i) les gènes de la voie du shikimate (voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques phénylalanine, tryptophane et tyrosine), une voie métabolique couramment retrouvée et conservée chez les bactéries et archées intestinales, (ii) un grand nombre de protéines membranaires d'adhésion potentiellement impliquées dans l'adhésion à un hôte (eucaryote) et à des bactéries commensales syntrophiques,

ainsi que (iii) les gènes impliqués dans la biosynthèse de la choloylglycine hydrolase impliquée dans la résistance aux sels biliaries (Borrel *et al.*, 2014b, 2017; Lang *et al.*, 2015; Cuesta-Zuluaga *et al.*, 2021). Ce dernier trait n'est pas retrouvé chez la souche RumEn M2. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que cette souche est issue d'une partie de l'intestin où l'on ne retrouve pas de bile, ou bien par la perte de cette capacité chez cette souche (Söllinger *et al.*, 2016). Plusieurs études tendent à montrer que les *Methanomassiliicoccales* seraient potentiellement capables de se développer dans le cytoplasme de certains protistes (ciliés anaérobies, amibes, flagellés). Cette localisation cytoplasmique pourrait trouver son explication par la présence, dans ce même compartiment, des hydrogénosomes qui fourniraient une source de dihydrogène à ces archées hydrogénotrophes méthyle-dépendantes (Levy & Jami, 2018; Borrel *et al.*, 2020).

Chez l'être humain, les *Methanomassiliicoccales* colonisent non seulement le tractus digestif de leur hôte dès les premiers mois de vie, mais peuvent également devenir les archées méthanogènes dominantes chez les personnes âgées (> 60 ans) en bonne santé (Mihajlovski *et al.*, 2010; Dridi *et al.*, 2012b; Clemente *et al.*, 2015; Vanderhaeghen *et al.*, 2015; Borrel *et al.*, 2017, 2020). Plusieurs études ont par ailleurs mis en évidence une corrélation positive entre la présence de TMA intestinal ou de bactéries possédant les voies de production de TMA et la présence de *Methanomassiliicoccales* dans les intestins (Borrel *et al.*, 2017; Cuesta-Zuluaga *et al.*, 2021). De la même manière, la présence de *Methanomassiliicoccales* dans le tube digestif semble négativement corrélée à la présence de TMA dans les selles (Borrel *et al.*, 2017; Fadhlouai *et al.*, 2020).

Dans leur étude de génomique comparative, Borrel *et al.* (2014b) ont montré que *Ca. 'Mmc. intestinalis'*, une *Methanomassiliicoccales* affiliée au cluster *free-living*, se serait récemment adaptée aux environnements digestifs. En effet, cette archée n'est que très rarement détectée dans des écosystèmes non digestifs. La comparaison des génomes de cette espèce candidate et de *Mmc. luminyensis* révèle notamment : (i) un GC% bien inférieur chez *Ca. 'Mmc. intestinalis'* (Tableau 7), (ii) la délétion des gènes impliqués dans la fixation du diazote (N₂), (iii) l'absence de transporteurs ABC de la glycine-bétaine, un soluté compatible impliqué notamment dans la régulation des chocs osmotiques, et (iv) une diminution de la diversité et du nombre de gènes impliqués dans la biosynthèse d'enzymes antioxydantes et de composés antioxydants (ex. : *prx*, *sodA*, *dfx*). Curieusement, *Ca. 'Mmc. intestinalis'* est majoritairement retrouvé dans le tractus digestif de personnes âgées présentant un état de santé précaire, au point

de supplanter *Ca. 'Mm. alvus'*, une *Methanomassiliicoccales* pourtant affiliée au cluster *host-associated* (Borrel *et al.*, 2014b, 2017). Cette observation pose des questions sur ses possibles rôles écologiques dans le tractus digestif (espèce opportuniste, pathobionte ?) et ses conséquences sur la santé des personnes hébergeant ces archées, mais également sur leur histoire évolutive (Borrel *et al.*, 2017).

ii. Dans un contexte non digestif

La plupart des représentants des *Methanomassiliicoccales* affiliées au cluster *free-living* isolées ou enrichies en cultures mixtes proviennent d'écosystèmes digestifs (Tableau 7). Comme indiqué ci-dessus, *Methanomassiliicoccus luminyensis* possède un panel de gènes associés au développement dans des environnements non-digestifs (Borrel *et al.*, 2014b). Dans leurs récents travaux, Zhang *et al.* (2020) ont montré par des approches de génomique et de méta-transcriptomique que les *Methanomassiliicoccales* affiliées au cluster *free-living* étaient abondantes et étaient aussi les archées méthanogènes les plus actives (*i.e.* : méthanogenèse hydrogénotrophe méthyle-dépendante) dans certains sédiments de mangroves (Shenzhen, Chine) (Zhang *et al.*, 2020). L'abondance de cette lignée dans des sédiments de mangrove et des sédiments d'estuaires a également été révélée dans d'autres études moléculaires de diversité (Zhou *et al.*, 2015; W. Li *et al.*, 2016). Néanmoins, la grande majorité des études publiées abordant cette question rapportent que l'abondance relative des *Methanomassiliicoccales* au sein des inventaires moléculaires de diversité est généralement faible, ne dépassant que rarement quelques pourcentages de la communauté procaryotique totale (Yakimov *et al.*, 2015; Söllinger *et al.*, 2016; Du *et al.*, 2018). Les valeurs d'abondances relatives des *Methanomassiliicoccales* recensées dans la littérature sont généralement comprises entre 0,7 et 4,7 % de la communauté totale des archées méthanogènes présentes. Cette dernière valeur correspondant à un échantillon de tourbe arctique (Söllinger *et al.*, 2016). Il apparaît également que l'abondance des *Methanomassiliicoccales* peut varier suivant la composition des communautés microbiennes présentes, mais également en fonction des saisons (Du *et al.*, 2018).

c) Métabolisme des *Methanomassiliicoccales*

a. Voie de méthanogenèse

Comme évoqué précédemment, les *Methanomassiliicoccales* sont des archées méthanogènes hydrogénotrophes méthyle-dépendantes.

Diverses études de (méta-)génomique comparative combinées à des travaux de physiologie et de (méta-)transcriptomique à partir de cultures de *Mmc. luminyensis* et/ou de cultures enrichies en *Methanomassiliicoccales* ont démontré que la majorité des *Methanomassiliicoccales* codent les méthyltransférases impliquées dans le transfert du méthanol (*mtaA*, *mtaBC*), de la MMA (*mtbA*, *mtmBC*), de la DMA (*mtbA*, *mtbBC*) et/ou de la TMA (*mtbA*, *mttBC*) (Figure 32) (Dridi *et al.*, 2012a; Borrel *et al.*, 2014b; Lang *et al.*, 2015; Y. Li *et al.*, 2016). Certaines *Methanomassiliicoccales* possèdent également le potentiel génétique pour synthétiser les méthyltransférases MtsAB impliquées dans le transfert du groupement méthyle du MeSH et du DMS, mais dans l'état actuel des connaissances, cette propriété putative d'utilisation du méthane-thiol et du diméthylsulfure n'a pas été confirmée par des approches physiologiques. Le MeSH et le DMS étaient jusqu'à récemment considérés comme exclusifs aux *Methanosarcinales* (Borrel *et al.*, 2013b). Comme chez les archées méthanogènes méthylotrophes, les *Methanomassiliicoccales* transfèrent le groupement méthyle du substrat à un coenzyme M (CoM-SH) pour former un CH₃-S-CoM. Un complexe Mcr canonique accomplit ensuite la réduction terminale du CH₃-S-CoM en CoB-S-S-CoM et CH₄ à partir d'un coenzyme HS-CoB (Figure 32).

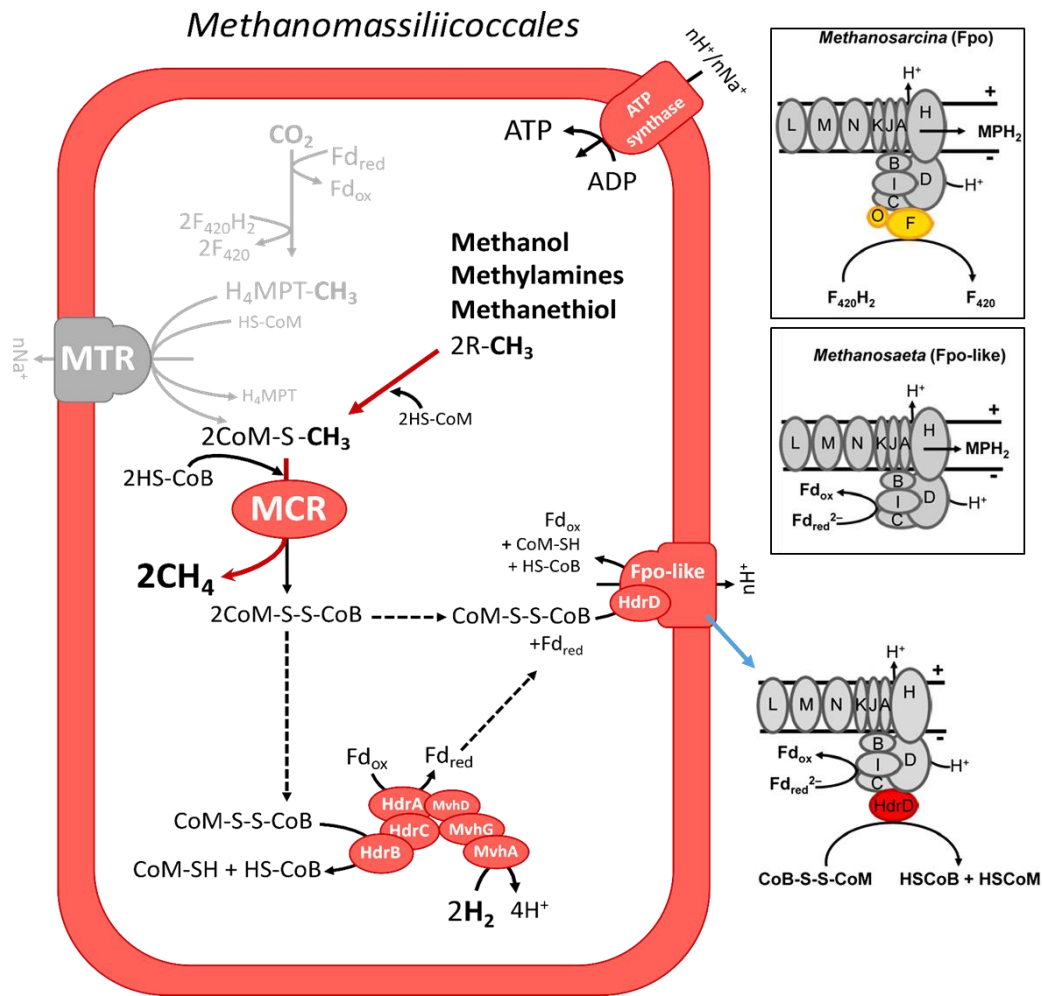
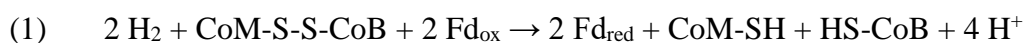


Figure 32 : Voie de méthanogenèse et conservation de l'énergie chez les *Methanomassiliicoccales* (à gauche). Détail de la conformation du complexe HdrD/Fpo-like chez les *Methanomassiliicoccales* (à droite) et détails du complexe Fpo canonique, ainsi que de celui du complexe Fpo-like présent chez *Methanosarcina* et *Methanosaeta* pour comparaison (encadrés). La flèche rouge droite dans la cellule illustre l'action des méthyltransférases. Les transporteurs membranaires des TMA et DMA ne sont pas indiqués sur la cellule. Les parties en gris clair dans la cellule indiquent l'absence d'une enzyme, d'un complexe, d'une réaction ou d'un composé. Figures extraites et adaptées de Lang *et al.* (2015) et de Borrel *et al.* (2019).

Contrairement aux archées méthanogènes hydrogénotrophes CO_2 -dépendantes, acétoclastes, et méthylotrophes affiliées aux Classes I et II des *Euryarchaeota* méthanogènes, les *Methanomassiliicoccales* ont la singularité de ne posséder ni le complexe Mtr, ni les enzymes impliquées dans la branche méthyle de Wood-Ljungdahl (m-WL) (Figure 32) (Borrel *et al.*, 2013b, 2014b; Lang *et al.*, 2015; Söllinger *et al.*, 2016). De ce fait, ces archées sont incapables d'oxyder des groupements méthyles (voir § 5.b) pour en extraire des électrons. Elles dépendent donc d'une source exogène d'électrons (H_2) pour équilibrer leur métabolisme.

Des études génomiques et biochimiques ont démontré que les *Methanomassiliicoccales* conservent leur énergie par le biais des deux hétérodisulfure réductases (Hdr) assez similaires

à celles retrouvées chez les archées méthanogènes pourvues de cytochromes (HdrDE + Fpo, typiques des voies acétoclastique et méthylotrophe) pour la première et celles n'en possédant pas pour la seconde (HdrABC-MvhADG, trouvées généralement dans la voie hydrogénéotrophe CO₂-dépendante) (Figure 32) (Borrel *et al.*, 2014b; Lang *et al.*, 2015; Kröninger *et al.*, 2016, 2019). La conservation de l'énergie est réalisée en trois étapes directement liées à la régénération des coenzymes M et B (CoM-SH et HS-CoB). La première étape consiste en la réduction d'un hétérodisulfure et d'une ferrédoxine (Fd_{ox}) par l'oxydation d'H₂ exogène *via* une HdrABC-MvhADG cytoplasmique (1) (Figure 32) (Borrel *et al.*, 2014b; Kröninger *et al.*, 2019). La deuxième induit la réduction d'une autre molécule d'hétérodisulfure (HdrD + Fpo-like) par une ferrédoxine Fd_{red} (2).



Cette seconde réduction est catalysée par un complexe ferrédoxine:hétérodisulfure oxydoréductase transmembranaire (Lang *et al.*, 2015; Kröninger *et al.*, 2016, 2019). Ce complexe enzymatique est composé d'une sous-unité HdrD associée à une Fpo tronquée (FpoABCDHIJKLMN, Fpo-like) (Figure 32) (Borrel *et al.*, 2014b). L'absence des sous-unités HdrE, impliquées dans l'interaction avec la méthanophénazine est notamment étayée par : (i) l'absence des gènes codant la biosynthèse de ces sous-unités (Borrel *et al.*, 2014b; Lang *et al.*, 2015; Y. Li *et al.*, 2016) et (ii) l'absence de méthanophénazine et de quinones (*i.e.* des transporteurs d'e⁻) dans la membrane lipidique des *Methanomassiliicoccales* (Becker *et al.*, 2016). L'absence des sous-unités catalytiques FpoF et FpoO et du coenzyme F₄₂₀ chez ces archées est étayée par : (i) l'absence des gènes *fpoF* et *fpoO* dans le génome (Borrel *et al.*, 2014b; Lang *et al.*, 2015; Y. Li *et al.*, 2016) et (ii) l'absence des gènes codant le cofacteur F₄₂₀ (Borrel *et al.*, 2013b). Ce dernier point est conforté par l'absence d'autofluorescence des cellules lors d'observations sous une lumière UV ($\lambda = 420 \text{ nm}$) (Paul *et al.*, 2012; Borrel *et al.*, 2013b; Lang *et al.*, 2015; Y. Li *et al.*, 2016).

La troisième et dernière étape de la conservation de l'énergie repose sur l'exploitation, *via* une ATP synthase, d'un gradient chimioosmotique de protons (H⁺) généré par le complexe Fpo-like (Figure 32) (Lang *et al.*, 2015; Kröninger *et al.*, 2016).

Dans leurs travaux, Speth & Orphan (2018) ont reconstruit un MAG (MALP) de *Methanomassiliicoccales* affilié au cluster « lac Pavin » comportant à la fois des gènes impliqués dans la biosynthèse des méthyltransférases spécifiques au méthanol, ainsi que ceux impliqués dans la biosynthèse des complexes enzymatiques impliqués dans la voie de méthanogenèse acétoclastique (Acs, Codh-Acs, et les gènes *mtrAH*) et la réduction du méthanol en formate. Ces résultats suggèrent que toutes les *Methanomassiliicoccales* ne sont peut-être pas capables de réduire des composés méthylés (MMA, DMA, TMA, MeSH, DMS) et que d'autres voies de méthanogenèse (*i.e.* : acétoclaste) pourraient être présentes chez ces archées. Néanmoins, les auteurs indiquent le MAG MALP ne contient pas l'ensemble des gènes impliqués dans la voie de méthanogenèse acétoclastique (ex. : gènes *mtrB-G*, gènes codant la N⁵-méthyl-H₄MPT:CoM-SH méthyltransférase) ou contient des gènes codant des sous-unités modifiées (*mtrA*, *mtrH*) et donc potentiellement non fonctionnelles.

b. Particularités des méthyltransférases des *Methanomassiliicoccales*

Des analyses en génomique comparative ont montré que toutes les *Methanomassiliicoccales* possèdent au minimum le capital génétique pour réduire le méthanol et au moins une des trois méthylamines suivantes : MMA, DMA et/ou TMA (Dridi *et al.*, 2012a; Borrel *et al.*, 2013b; Lang *et al.*, 2015; Y. Li *et al.*, 2016). Il est intéressant de noter que les méthyltransférases MtsAB dédiées à l'incorporation de DMS et de MeSH sont également codées par les génomes des représentants du clade *free-living* (ex. : *Mmc. luminyensis*, RumEn1), ou encore de *Ca. 'Mm. alvus'* et de la souche ISO4-H5 affiliés au cluster *host-associated*, qui sont eux issus d'environnements digestifs *a priori* dépourvus de ces substrats (Borrel *et al.*, 2013b; Söllinger & Urich, 2019). Cette observation pourrait laisser penser que la réduction de composés méthylés soufrés serait une caractéristique de l'ordre des *Methanomassiliicoccales* en générale et non pas une potentielle adaptation de certains représentants à leur écosystème (Borrel *et al.*, 2013b).

Dans leurs travaux de 2013, Borrel *et al.* ont montré qu'un alignement des séquences codant les MT2 MtaA (MeOH) et MtbA (méthylamines MMA, DMA et TMA) chez *Mmc. luminyensis* et *Ca. 'Mm. alvus'* ne permettait pas une distinction claire de chacune de ces deux enzymes, soulevant ainsi des questions quant à leur fonction exacte (Figure 33) (Borrel *et al.*, 2013b). Deux hypothèses sont dès lors possibles : soit ces séquences sont spécialisées dans le

transfert de leur substrat respectif, soit elles sont impliquées dans le transfert de méthanol et de méthylamines, mais au prix d'une efficacité moindre (Borrel *et al.*, 2013b).

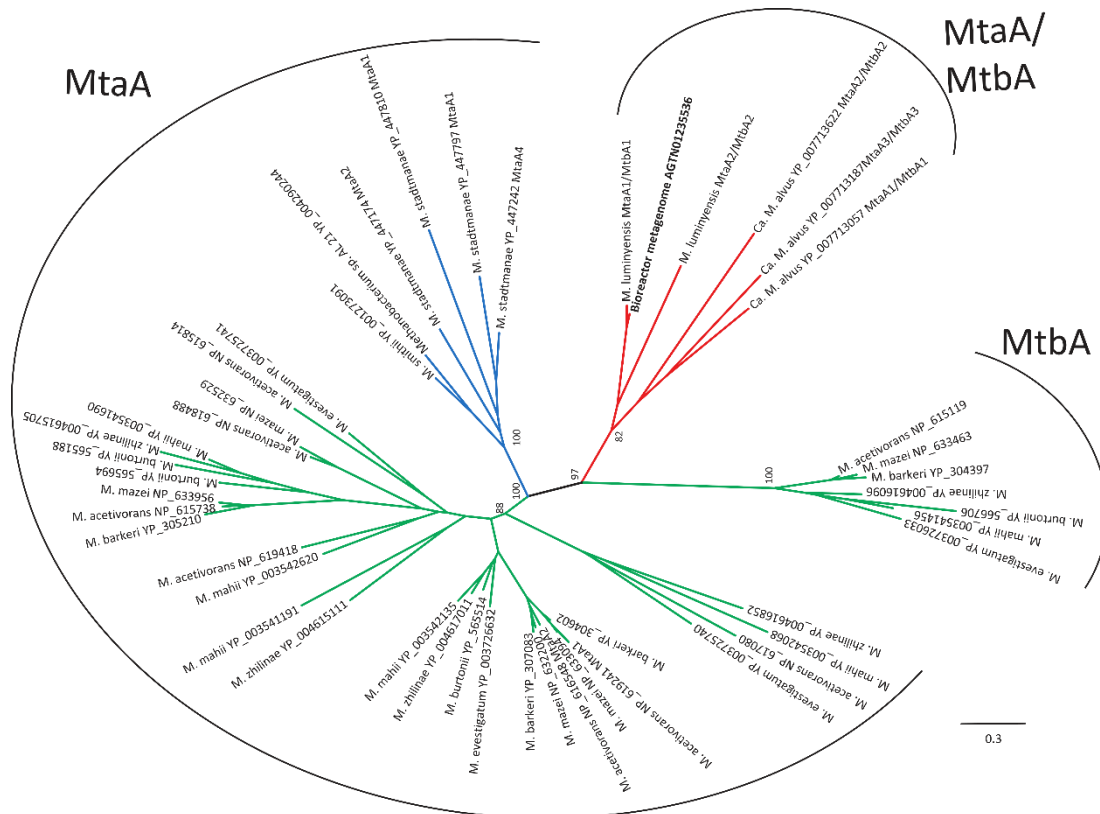


Figure 33 : Arbre phylogénétique des séquences des gènes codant les MtaA et Mtba chez plusieurs archées méthanogènes. Les *Methanosarcinales* sont colorées en vert, les *Methanobacteriales* en bleu et les *Methanomassiliococcales* en rouge. Figure extraite et adaptée de Borrel *et al.* (2013b).

c. Particularités de la pyrrolysine des *Methanomassiliococcales*

Comme indiqué précédemment (§ 5.b), la pyrrolysine (Pyl) est un acide aminé clef qui est présent dans le site actif des méthyltransférases impliquées dans l'incorporation des MMA, DMA et TMA. Des analyses de génomiques comparatives réalisées par Borrel *et al.* (2014a) et Y. Li *et al.* (2016) ont démontré que les *Methanomassiliococcales* possèdent des ^{Pyl}ARNt originaux comparés à ceux retrouvés chez d'autres microorganismes réduisant des composés méthylés, tels que les *Methanosarcinales* et certaines *Bacteria* (*Firmicutes*, *Deltaproteobacteria*).

Chez les *Methanosarcinales*, le système Pyl s'organise suivant le schéma *pylTSBCD*, alors que chez les bactéries méthylophiles, il s'organise suivant le schéma *pylTScBCDSn* (*N.B.* : *pylSc* et *pylSn* combinés remplissent la même fonction que *pylS*). Chez les *Methanomassiliococcales* étudiées à ce jour, l'organisation du système Pyl diffère quelque

peu de ces deux schémas. *Methanomassiliicoccus luminyensis* possède deux copies du système *pylTSBCD* ainsi qu'une copie surnuméraire probablement issue d'une duplication de gènes. Cette copie présente des gènes *pylC* et *pylT* supplémentaires (*pylTSBCDCT*) espacés d'environ 15 kb (kilobases) par rapport à *pylD* et code un ^{Pyl}ARNt particulier (Figure 34). Cet ^{Pyl}ARNt possède en effet à la fois un site accepteur tronqué et modifié (3'-ACU-5' contre 3'-ACCC-5' habituellement), une tige acceptrice modifiée de 2 bases ainsi que (iii) une boucle D tronquée et modifiée (Figure 34) (Borrel *et al.*, 2014a).

Dans leurs travaux, Borrel *et al.* (2014a) ont relevé d'autres particularités aux ^{Pyl}ARNt des *Methanomassiliicoccales* (Figure 34). Premièrement, ces ^{Pyl}ARNt sont caractérisés par une asymétrie de la tige anticodon due à l'incorporation de bases surnuméraires : une adénine chez *Ca. 'Mm. alvus'* et deux adénines et une cytosine chez *Mmc. luminyensis* et *Ca. 'Mmc. intestinalis'*. Deuxièmement, la séquence de la boucle variable n'est pas identique à celle retrouvée chez les *Methanosarcinales* (UAG) mais correspond à celle observée chez *Desulfotobacterium hafniense* (CAG). Troisièmement, la base adjacente à l'anticodon *ambre* (CUA) de *Ca. 'Mm. alvus'* est une adénine, comme chez *D. hafniense* et *Methanosarcina barkeri*. Chez les espèces du genre *Methanomassiliicoccus*, cette base est cependant remplacée par une cytosine.

Enfin, Borrel *et al.* (2014a) ont conduit des analyses phylogénétiques se basant sur la comparaison des séquences codant les différents gènes des systèmes Pyl de *Mmc.*, de *Mm.*, de *Methanosarcinales* et de bactéries méthylothropes (plusieurs *Firmicutes* et une *Deltaproteobacteria* intestinale). L'analyse de ces séquences montre que les séquences retrouvées chez les deux genres de *Methanomassiliicoccales* étudiées forment un cluster monophylétique, suggérant ainsi une origine commune au système Pyl chez ces archées. Par ailleurs, les séquences codant les gènes *pylS*, *pylC* et *pylD* semblent plus étroitement liées à leurs homologues bactériens qu'à ceux des *Methanosarcinaceae*, posant des questions quant à l'histoire évolutive du système Pyl et dans une plus large mesure, de la méthanogenèse méthylotrrophe (Borrel *et al.*, 2014a). Dans leurs travaux, les auteurs proposent, notamment, une émergence du système Pyl chez une archée méthanogène hydrogénotrophe réduisant le méthanol (MeOH + H₂).

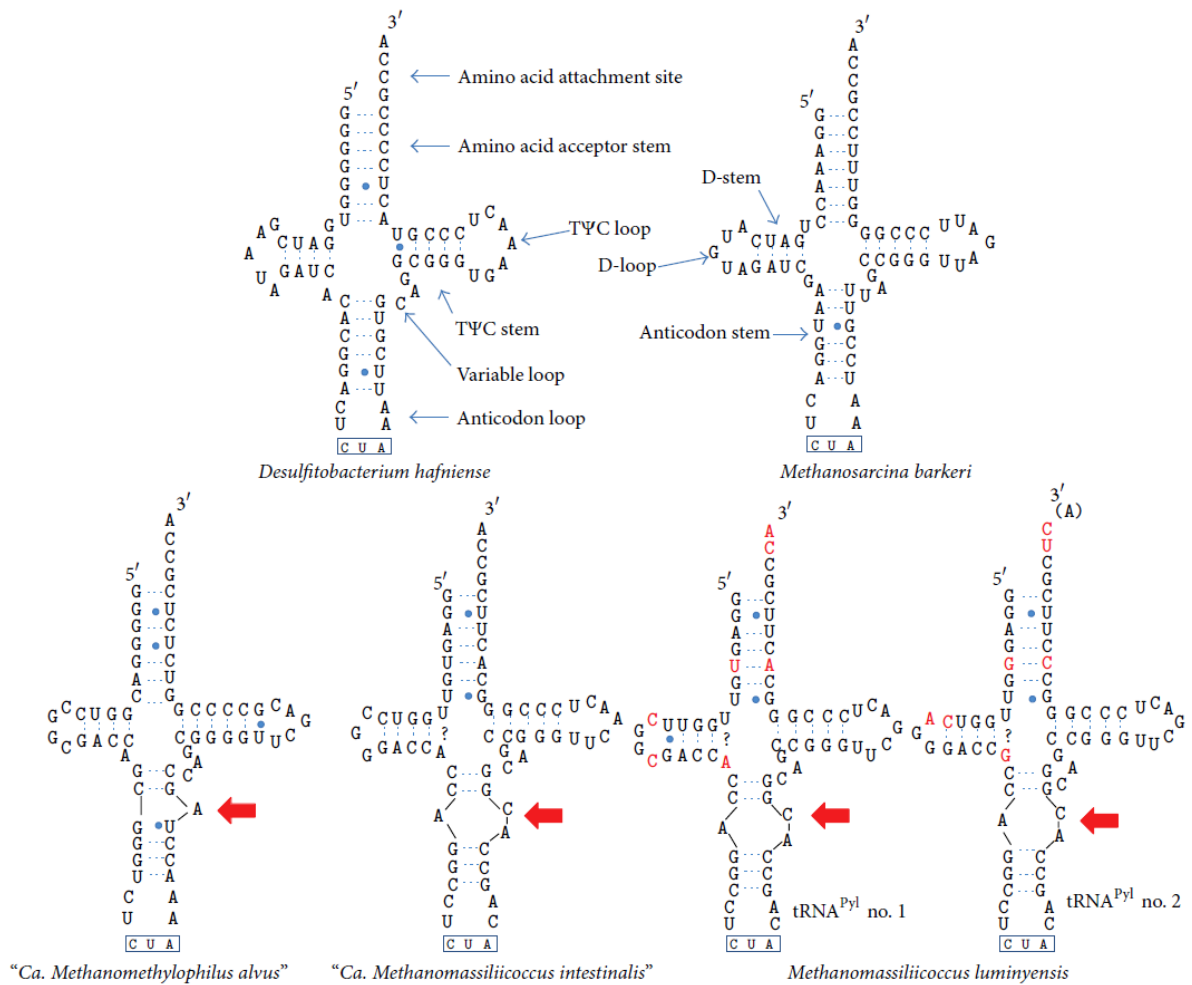


Figure 34 : Structures secondaires des ^{Pyl}ARNt chez *Mmc. luminyensis*, *Methanosarcina barkeri*, *D. hafriense*, *Ca. Mm. alvus*, et *Ca. Mm. intestinalis*. Les codons anti-sens ambre (CUA) sont encadrés en bleu. Les flèches rouges indiquent la tige d'anticodon raccourcie et asymétrique qui forme une boucle inhabituelle dans cette région. Les points d'interrogation représentent d'autres appariements de bases possibles. Les bases divergentes entre l'exemplaire n°1 et n°2 des ^{Pyl}ARNt de *Mmc. luminyensis* sont indiquées en rouge. Figure extraite de Borrel *et al.* (2014a).

d) Ultrastructure et lipides membranaires

a. Ultrastructure et autofluorescence

D'un point de vue morphologique, les cellules de *Mmc.luminyensis* B10^T sont des petits coques réguliers (ø 700 – 1000 nm), ne présentant pas de regroupement particulier (cellules libres), et non mobiles (Figure 35 (G) et (H)) (Dridi *et al.*, 2012a). Dans leurs travaux, les auteurs indiquent que la paroi de cette souche consiste en une bicouche comprenant une couche électronique dense vers l'extérieur de la cellule, et une épaisse couche (140 ± 20 nm) transparente remplie de granules près de la membrane plasmique.

En dehors de *Mmc. luminyensis*, la caractérisation morphologique des *Methanomassiliicoccales* reste peu documentée. A ce jour, *Ca. 'Mp. termitum'* (souche MpT1), une souche phylogénétiquement proche de *Ca. 'Mp. termitum'*(MpM2) (Lang *et al.*, 2015) et la souche ISO4-H5 (Y. Li *et al.*, 2016), ont également fait l'objet d'une caractérisation morphologique et ultrastructurale, notamment par des approches de microscopie électronique à transmission (MET). Les cellules de ces souches sont des petits coques (\varnothing 500 – 1000 nm) comportant deux membranes lipidiques séparées de 10 à 300 nm, et ne présentant pas de couche S (Figure 35, (A)–(F)).

Ainsi, il semble que les cellules des *Methanomassiliicoccales* possèdent une double membrane. Il est intéressant de noter que *Ca. 'Mm. alvus'* et *Ca. 'Mp. termitum'* ne possèdent pas les gènes codant la biosynthèse d'uridine diphosphate *N*-acétylglucosamine (*i.e.* : un précurseur de la pseudomuréine), à l'inverse des *Methanomassiliicoccus*.

La présence d'une double membrane est relativement peu répandue chez les *Archaea*. Ce type de structure pariétale est retrouvé chez *Ignicoccus (Crenarchaeota)* et chez certains ARMAN (« *Archaeal Richmond Mine acidophilic nanoorganisms* »), des archées affiliées au phylum des *Euryarchaeota* (Rachel *et al.*, 2002; Comolli *et al.*, 2009).

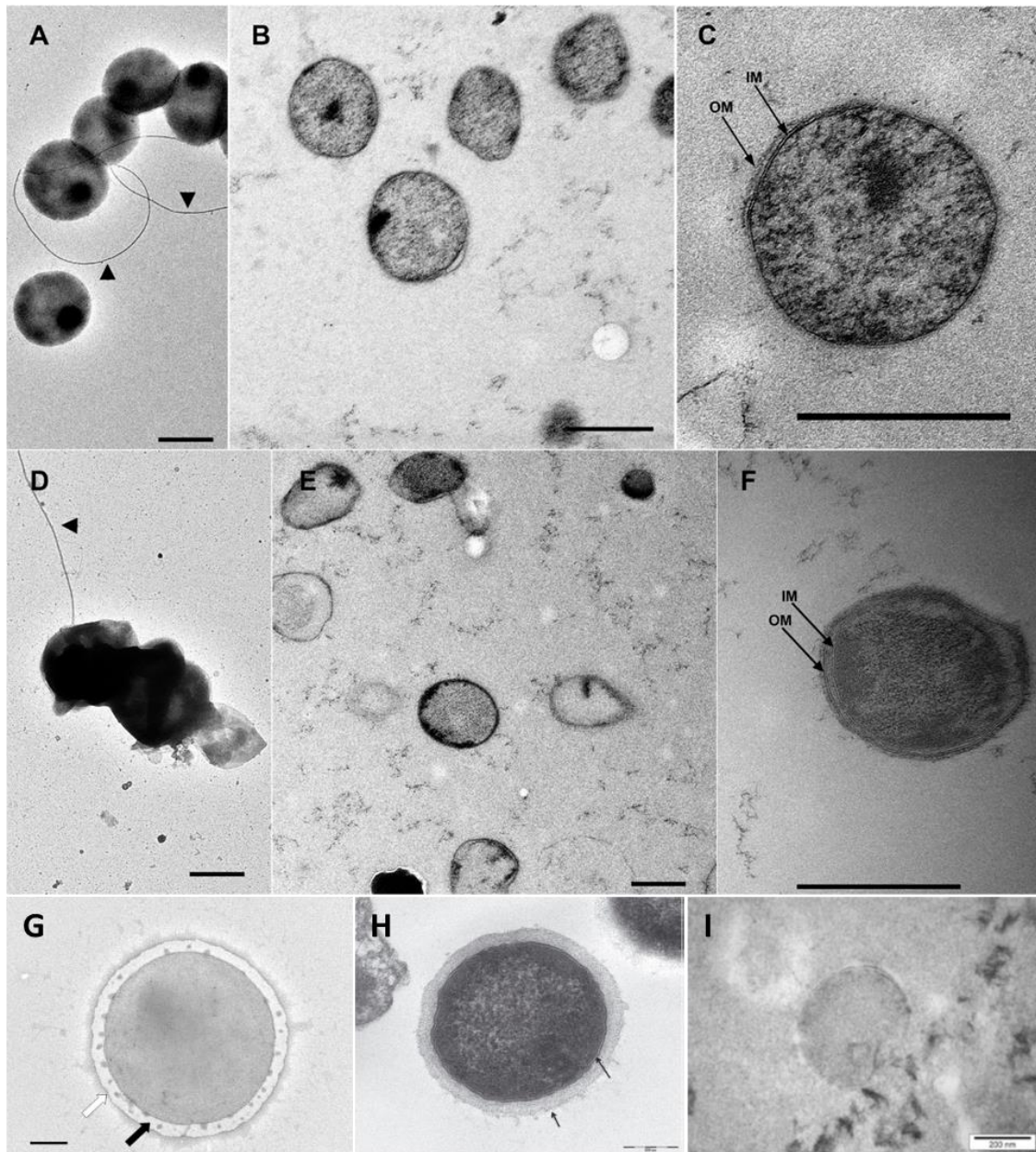


Figure 35 : Microphotographies de quelques *Methanomassiliicoccales* prises au microscope électronique à transmission (MET). A – C, *Ca. 'Methanoplasma termitum'* MpT1, barre : 0,5 μm ; de D – F, souche MpM2, barre : 0,5 μm ; G – H : *Methanomassiliicoccus luminyensis* B10^T, barres : 0,3 et 0,8 μm , respectivement ; I : souche ISO4-H5, barre : 0,2 μm . Les deux triangles noirs indiquent les appendices des cellules de *Ca. 'Methanoplasma termitum'*. IM : membrane cytoplasmique (*internal membrane* en anglais). OM : membrane externe (*outermost membrane* en anglais). Photographies extraites et adaptées de Dridi *et al.* (2012a), Lang *et al.* (2015), Nkamga & Drancourt (2016), Li *et al.* (2016).

Les observations au microscope électronique à transmission de la souche *Ca. 'Mp. termitum'* suggèrent également que les cellules possèdent un appendice moteur dont le diamètre (12 nm) rappelle celui de l'archaellum, l'homologue archéen du pilus bactérien de type IV (Figure 35 (A)) (Jarrell & Albers, 2012; Lang *et al.*, 2015). Cependant, bien que *Mmc. luminyensis*, *Ca. 'Mp. termitum'* et *Ca. 'Mm. alvus'* possèdent quelques gènes impliqués dans

la biosynthèse de l'archaellum (*i.e.* : *FlaK*, *FlaI* et/ou *FlaJ*), aucune des souches décrites à ce jour ne possède le gène codant l'archaelline (*FlaB*), le principal composant filamenteux de l'archaellum. Bien que les auteurs suggèrent que la structure observée soit potentiellement un analogue de l'archaellum, la nature exacte des appendices présents à la surface des cellules des souches MpT1 et MpM2 reste à ce jour indéterminée (Lang *et al.*, 2015).

Enfin, comme expliqué ci-dessus, les *Methanomassiliicoccales* ne possèdent pas les gènes impliqués dans la biosynthèse du cofacteur F₄₂₀. Elles n'autofluorescent donc pas sous lumière UV ($\lambda = 420$ nm), ce qui les rend plus difficiles à discriminer en culture de communauté que les méthanogènes des classes I et II (Paul *et al.*, 2012; Borrel *et al.*, 2013b; Lang *et al.*, 2015; Y. Li *et al.*, 2016).

b. Lipides membranaires

A ce jour, seuls les travaux de Becker *et al.* (2016) et Lang *et al.*, (2015) se sont intéressés à la composition lipidique des membranes des *Methanomassiliicoccales*. Becker *et al.* (2016) ont démontré par des approches biochimiques que les *Methanomassiliicoccales* possèdent des lipides membranaires particuliers composés (Figure 36) :

- (i) de lipides comme l'archéol, retrouvés usuellement chez les archées,
- (ii) de lipides usuellement retrouvés chez des archées non-méthanogènes thermophiles (*diextended archaeol*) ou halophiles (*extended archaeol*), et
- (iii) d'une majorité de lipides particuliers dans lesquels un squelette de glycérol (C3) est remplacé par du butanetriol (C4) ou du pentanetriol (C5), à savoir le butanetriol dibiphytanyle glycérol tétraéther (BDGT) (> 50 % d'abondance relative) et le pentanetriol dibiphytanyle glycérol tétraéther (PDGT).

Il est important de noter que ces deux derniers lipides n'avaient jusqu'ici jamais été détectés chez d'autres archées (Becker *et al.*, 2016). Les voies de synthèse et les rôles exacts de ces composés restent encore relativement méconnus à ce jour.

Enfin, des polyprénols (des alcools gras isoprénoïdes) (Figure 36) ont été détectés en abondance dans la membrane de *Mmc. luminyensis* (Becker *et al.*, 2016). Curieusement, ces porteurs de (poly)saccharides liés à la membrane et impliqués dans l'assemblage des parois cellulaires sont dénués de groupement phosphate terminal chez cette archée. Cette

caractéristique n'avait été précédemment détectée que chez l'archée méthanogène thermophile *Methanothermobacter thermautotrophicus* (*Methanobacteriales*, hydrogénotrophe CO₂-dépendante) cultivée dans des conditions limitantes en dihydrogène. Les auteurs suggèrent que ces composés pourraient jouer un rôle dans la stabilisation membranaire de *Mmc. luminyensis*.

L'analyse du génome de *Ca. 'Methanoplasma termitum' MpT1* montre que cette souche possède le potentiel génétique pour biosynthétiser une membrane similaire à celle de *Mmc. luminyensis* en termes de composition (Lang *et al.*, 2015).

Les lipides dont la présence n'a été rapportée que chez les *Methanomassiliicoccales* pourraient potentiellement servir de marqueurs chimiotaxonomiques de cette lignée, en complément ou remplacement des outils moléculaires usuels (Becker *et al.*, 2016).

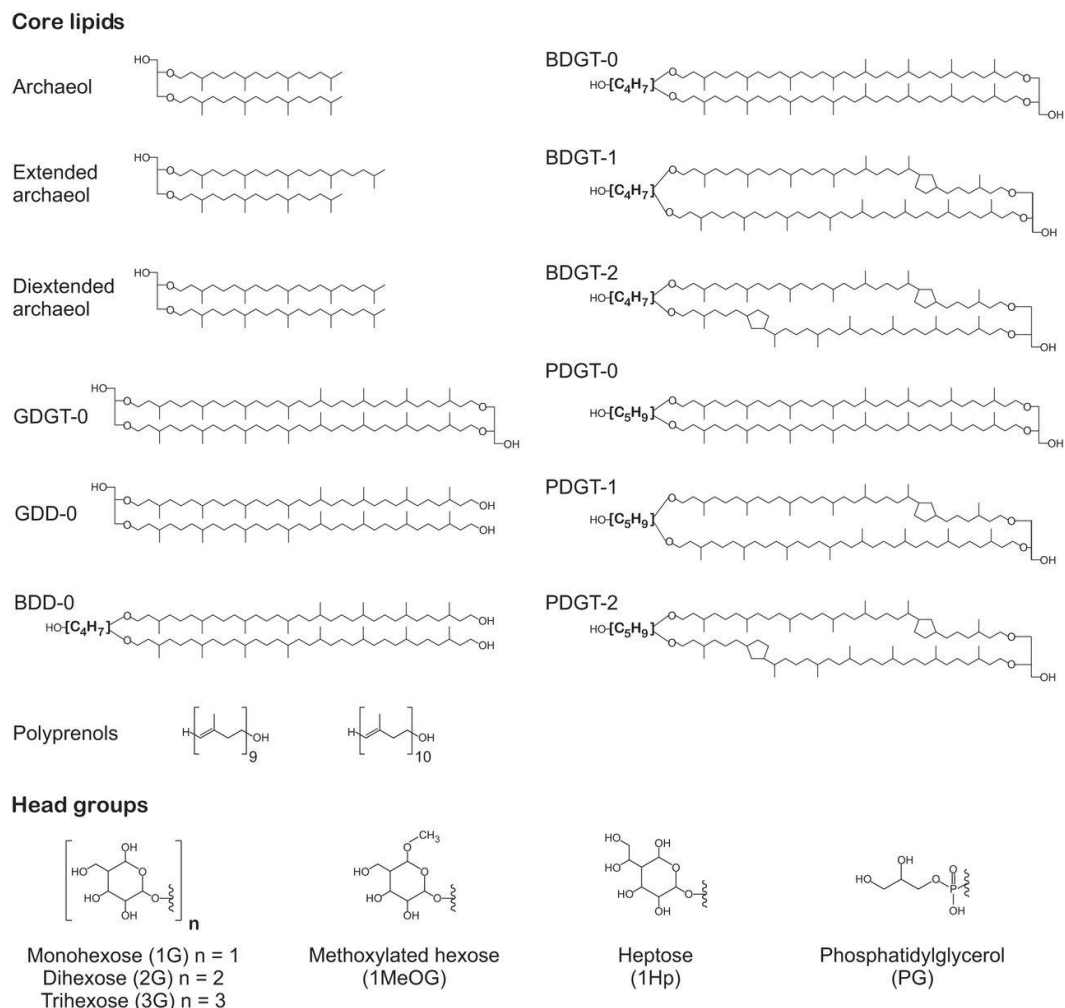


Figure 36 : Structures moléculaires des principaux lipides retrouvés dans les membranes de *Mmc. luminyensis* Figure extraite de Becker *et al.* (2016).

e) Vers de potentielles applications médicales ?

La composition et l'activité du microbiote sont aujourd'hui reconnues pour influencer l'état de santé (aussi bien physique que mentale) et la *fitness* (viabilité) de l'hôte (Sommer & Bäckhed, 2013; Borrel *et al.*, 2020).

Chez de nombreux animaux, le microbiote intestinal joue un rôle clef dans la dégradation des aliments. Un des sous-produits la dégradation bactérienne des aliments est la TMA. Les principaux précurseurs de cette molécule sont le *N*-oxyde de triméthylamine (TMAO) (présent dans les fruits de mer par exemple), la *L*-carnitine (viandes rouges, boissons énergétiques), la phosphatidylcholine (œufs), la glycine-bétaïne (fruits de mer, épinards, certaines céréales), la choline et la lécithine (œufs, poissons, pommes-de-terre, choux-fleurs, soja, lait et dérivés) (Borrel *et al.*, 2017; Fadhlaoui *et al.*, 2020; Arias *et al.*, 2020). La TMA est une molécule connue pour pouvoir traverser la membrane intestinale et rejoindre la circulation sanguine générale (Wishnok & Blusztajn, 1983). Sa présence dans le sang est également directement liée à l'augmentation de la pression artérielle. Des concentrations importantes en TMA ou en certains sous-produits de sa transformation (TMAO) peuvent engendrer des maux ou des pathologies plus ou moins sévères.

Chez les sujets possédant une flavine monooxygénase (FMO₃) fonctionnelle, la TMA passe dans le foie pour y être oxydée en TMAO par la FMO₃. Puis, le TMAO est généralement excrété *via* les urines (Figure 37). Le TMAO est impliqué dans l'apparition de nombreuses maladies sévères telles que des maladies rénales chroniques, le diabète de type 2, la stéatose hépatique non alcoolique, les cancers de la prostate et du colon, ou encore l'athérosclérose (Bennett *et al.*, 2013; Koeth *et al.*, 2013; Brugère *et al.*, 2014; Borrel *et al.*, 2017; Arias *et al.*, 2020; Fadhlaoui *et al.*, 2020). A titre d'exemple, l'athérosclérose est une maladie se manifestant par l'accumulation de plaques d'athérome – sous-produits sanguins (lipides, tissus adipeux, glucides, dépôts calcaires, produits sanguins...) agglomérés – sur la paroi des artères. Lorsque les plaques athéromateuses sont trop volumineuses, celles-ci bouchent les artères, augmentant la pression sanguine. Lorsque la pression sanguine devient trop importante, les plaques d'athéromes se détachent des artères, rejoignant la circulation générale et causant alors des accidents vasculaires cérébraux et/ou des infarctus du myocarde pouvant entraîner la mort (Brugère *et al.*, 2018).

Chez des sujets génétiquement déficients en FMO3, la TMA s'accumule dans le sang puis est excrétée *via* les urines, la transpiration ou l'haleine, induisant une forte odeur corporelle de poisson en décomposition, caractéristique de la TMA (Figure 37). Ce désordre métabolique nommé triméthylaminurie toucherait 0,5 à 11 % des individus suivant les ethnies. Ce trouble métabolique peut également apparaître chez des sujets possédant une FMO3 fonctionnelle dans certaines conditions (expressions hormonales et enzymatiques, régime alimentaire, métabolisme) (Mackay *et al.*, 2011). Il est par ailleurs important de noter que la triméthylaminurie engendre un mal-être et un isolement social chez de nombreux malades (Mitchell *et al.*, 1997; Mackay *et al.*, 2011).

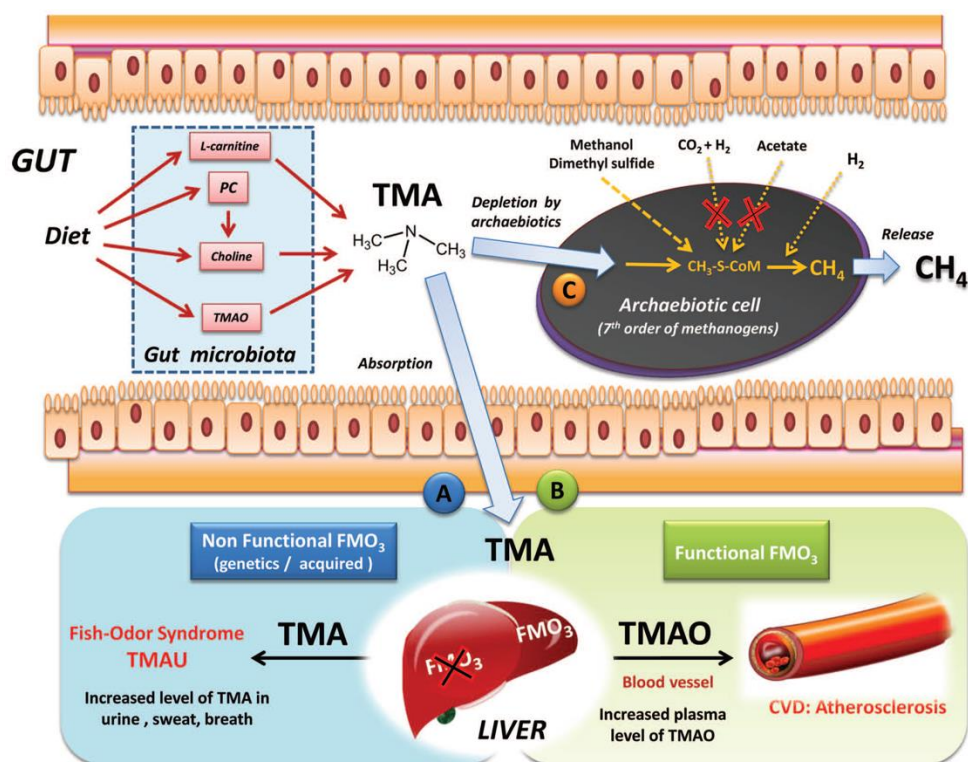


Figure 37 : Origines de la TMA intestinale, devenir et concept d'archébiotique. La TMA intestinale est issue de la dégradation bactérienne de composés organiques comme la choline, la phosphatidylcholine, la *L*-carnitine ou le TMAO. Une fois synthétisée par le microbiote, la TMA passe dans le sang. (A) Chez les sujets déficients en flavine mono-oxygénase (FMO3), la TMA n'est pas oxydée et est excrétée, causant la triméthylaminurie. (B) Chez les sujets sains, la TMA est oxydée en TMAO avant de repasser dans la circulation sanguine où elle va favoriser l'apparition de plaques d'athéromes et des maladies chroniques des reins. (C) Les *Methanomassiliicoccales* pourraient être utilisées comme « archébiotiques » pour prévenir ces maladies. Ces archées pourraient réduire la concentration en TMA sanguin en consommant celui-ci directement dans l'intestin. Figure extraite de Brugère *et al.* (2014).

Parmi les remèdes proposés pour prévenir les excès de TMA et de TMAO, et donc les pathologies qui en découlent, il a été suggéré de traiter de manière ciblée les microorganismes produisant du TMA par des antibiotiques, et /ou de suivre un régime alimentaire contrôlé et

amendé en charbon actif ou en chlorophylline de cuivre pour diminuer la concentration en TMA dans les urines (Yamazaki *et al.*, 2004). D'autres approches fondées sur l'utilisation de *Methanomassiliicoccales* ont également été proposées. En effet, les *Methanomassiliicoccales* sont des archées méthanogènes hydrogénotrophes méthyle-dépendantes naturellement présentes (*host-associated clade*) dans le microbiote de nombreux animaux (hommes, ruminants, éléphants, souris, termites par exemple) (Söllinger & Urich, 2019). Les *Methanomassiliicoccales* étant les seules archées méthanogènes du tube digestif potentiellement capables de métaboliser la TMA, il serait envisageable d'utiliser ces archées sous forme de probiotiques dans le but de limiter l'absorption épithéliale de la TMA intestinale. Ce concept d'utilisation d'archées sous forme de probiotiques a été appelé « concept d'archébiotiques » (Brugère *et al.*, 2014, 2018).

Concrètement, selon ce concept, ces *Methanomassiliicoccales* pourraient être directement amendées dans l'intestin des sujets pour prévenir les maladies énumérées ci-dessus (Brugère *et al.*, 2014, 2018) (Figures 37, 38). En effet, contrairement à d'autres archées méthanogènes de la flore digestive (ex. : *Methanobacteriales*), les *Methanomassiliicoccales* ne semblent pas entraîner de réponse immunitaire (inflammations) de la part de l'hôte (Borrel *et al.*, 2012; Bang *et al.*, 2017; Fadhlaoui *et al.*, 2020). Cette approche a récemment été testée Ramezani *et al.* (2018) sur un nombre restreint de souris ($n = 3$) dont les tubes digestifs vierges en archées méthanogènes ont été amendés en *Methanomassiliicoccus luminyensis*. Bien que statistiquement non-significatives, les données montrent une diminution du taux de TMAO dans le plasma des souris après 30 jours. Etant naturellement présentes dans les tractus digestifs, les *Methanomassiliicoccales* (notamment *Ca. 'Methanomethylophilus alvus'*) affiliées au cluster digestif/*host-associated clade* seraient de bons candidats pour ces approches. Ces données préliminaires sont par ailleurs confortées par les résultats d'une étude antérieure publiée par Borrel *et al.* (2017). Cette étude a démontré que la concentration en TMA dans les selles était moindre chez des personnes hébergeant des *Methanomassiliicoccales* ($> 10^8$ cellules g^{-1} de fèces) codant pour la MttB (triméthylamine méthyltransférase) que chez des personnes dépourvues de *Methanomassiliicoccales* ou possédant des *Methanomassiliicoccales* ne codant pas la MttB. En définitive, des études à plus larges échelles sont nécessaires pour développer cette stratégie et la valider.

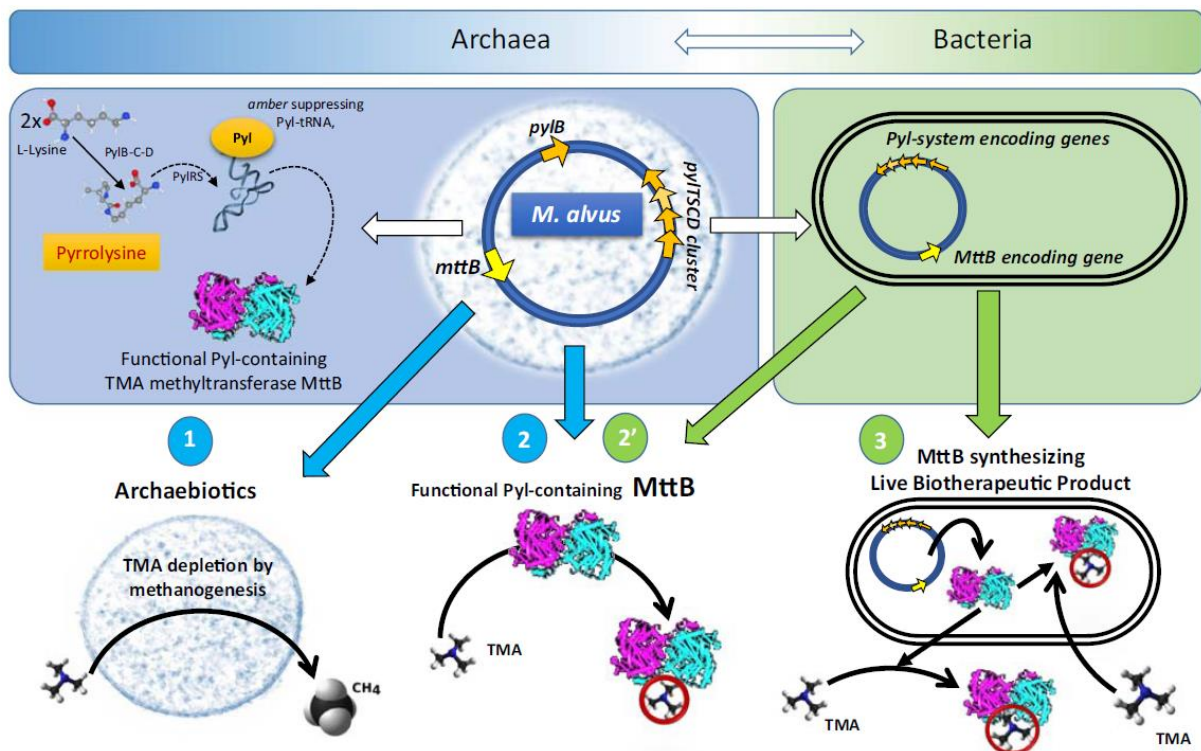


Figure 38 : Approches biotechnologiques visant à mettre au point des archébiotiques et des substituts basés sur des approches moléculaires. Ces techniques ont pour but de restreindre la concentration en TMA dans l'intestin, dans l'objectif de limiter/prévenir l'athérosclérose et la triméthylaminurie. Le concept d'archébiotique (1) se baserait sur un amendement intestinal en *Methanomassiliococcales* affiliées au cluster digestif. Des MttB fonctionnelles contenant un résidu Pyl biosynthétisées par des *Methanomassiliococcales* (2) ou des bactéries recombinées (2') pourraient également être directement amendées au tube digestif. Un amendement en bactéries recombinées Pyl pourrait également être envisagé afin de synthétiser et délivrer directement des MttB fonctionnelles contenant un résidu Pyl dans l'intestin (Fadhlaoui *et al.*, 2020). Figure extraite de Fadhlaoui *et al.* (2020).

Deux autres stratégies ont également été proposées par Fadhlaoui *et al.* (2020) dans le but de séquestrer la TMA intestinale (Figure 38). La première consisterait à biosynthétiser une MttB fonctionnelle comportant un résidu pyrrolysine (§ 5.b) afin de séquestrer la TMA intestinale. La production de ce composé serait réalisée par une *Methanomassiliococcales* (ex. : *Ca.* 'Methanomethylophilus alvus') (Figure 38, (2)) ou une bactérie intestinale (voire une levure) capable de se développer sans le codon *ambre* UAG afin de la recombiner avec un plasmide comportant les gènes codant la MttB et l'opéron Pyl (*pylB*, *pylTSCD*) (Figure 38, (2')). La seconde stratégie consisterait à amender directement le tube digestif avec des *Escherichia coli* (ou levures) recombinées (Figure 38, (2'), (3)). Cette approche permettrait de faire produire cette protéine MttB *in situ* par les bactéries hôtes amendées dans le tube digestif. A ce jour, une souche d'*Escherichia coli* recombinante (*E. coli* Nissle 1917) portant un plasmide portant l'opéron Pyl et la MttB (*mttB*) est d'ores et déjà disponible (Fadhlaoui *et al.*, 2020).

Objectifs de l'étude

Au cours des dix dernières années, les progrès remarquables des techniques de séquençage et des capacités de traitement de données ont permis d'accroître considérablement nos connaissances de la diversité taxonomique et fonctionnelle des microorganismes ainsi que de leurs relations évolutives. Dans ce contexte, diverses études basées sur des approches métagénomiques ou culturales ont démontré l'existence d'une grande diversité de nouvelles lignées d'archées méthanogènes, incluant notamment des lignées hydrogénotrophes méthyle-dépendantes, parfois phylogénétiquement éloignées des *Euryarchaeota*, et l'existence de voies de méthanogenèse basées sur un plus grand nombre de substrats que présumé. Ces observations ont dévoilé la présence de ce métabolisme dans des niches écologiques non soupçonnées, ébranlé notre perception de l'importance de la méthanogenèse sur Terre et bouleversé les paradigmes d'une origine et d'une évolution de la méthanogenèse basée sur une voie hydrogénotrophe CO₂-dépendante ancestrale ayant émergé au sein des *Euryarchaeota*.

Parmi les nouvelles lignées d'archées méthanogènes hydrogénotrophes méthyle-dépendantes figurent les représentants de l'ordre des *Methanomassiliicoccales*. Ces archées produisent de l'énergie *via* une méthanogenèse originale basée sur l'utilisation de deux complexes d'hétérodisulfure réductases. A ce jour, nos connaissances de cet ordre d'archées méthanogènes découlent principalement d'études centrées sur le cluster *host-associated*, dont une espèce d'origine digestive est disponible en culture clonale (*Ca.* 'Methanomethylophilus alvus') et plusieurs souches issues d'échantillons digestifs sont disponibles en cocultures. Divers inventaires moléculaires de diversité semblent indiquer que les *Methanomassiliicoccales* affiliées au cluster *free-living* sont ubiquistes dans les environnements anoxiques, digestifs comme non digestifs. Néanmoins, nos connaissances les concernant se cantonnent à quelques MAGs annotés, ainsi qu'à un isolat d'origine digestive (*Methanomassiliicoccus luminyensis*) et deux souches disponibles en culture d'enrichissement issues d'échantillons digestifs.

Ainsi, les données disponibles concernant la distribution, la diversité phylogénétique et la biologie des *Methanomassiliicoccales* affiliées au cluster *free-living* dans un contexte non digestif demeurent très fragmentaires. Ces données parcellaires ne permettent pas d'émettre des hypothèses quant aux rôles que pourraient avoir les *Methanomassiliicoccales* du cluster *free-living* dans leur environnement naturel, ni de connaître en détails le capital fonctionnel reclus

dans leur génome ou encore leurs tolérances aux différents paramètres physico-chimiques *in situ*.

Dans ce contexte, il serait intéressant d'améliorer nos connaissances sur la biologie des *Methanomassiliicoccales* du cluster *free-living* en abordant les questions suivantes :

- (i) Quelle est la distribution et la diversité des représentants du cluster *free-living* dans des écosystèmes non digestifs ? Ces archées sont-elles abondantes dans les environnements étudiés ?
- (ii) Est-il possible de cultiver des *Methanomassiliicoccales* affiliées au cluster *free-living* à partir d'échantillons non digestifs ? Si oui, quel est leur potentiel métabolique ? Quelles sont leurs potentielles adaptations et interactions avec leur environnement ?

Afin de répondre à ces objectifs, nos travaux se sont ainsi fondés sur une approche intégrée originale combinant à la fois des analyses moléculaires (amplifications par PCR, qPCR, métabarcodes), des analyses culturales (mise au point d'un milieu et de conditions de culture destinés à favoriser l'enrichissement de *Methanomassiliicoccales*), des suivis moléculaires et métaboliques des cultures, puis de la métagénomique, et enfin des analyses en réseaux. La combinaison d'approches moléculaires et culturales dans l'objectif d'enrichir et d'étudier un groupe taxonomique particulier et peu caractérisé représente une entreprise complexe et assez peu courante.

La majeure partie des résultats obtenus dans le cadre de cette thèse sont présentés sous la forme d'un article publié (§ chapitre I).

Des travaux complémentaires sont présentés dans le § chapitre II.

Préambule

Ces travaux de thèse sont présentés en deux chapitres.

- (I) Le premier chapitre est présenté sous la forme d'un article scientifique qui a été publié en toute fin d'année 2020. Cet article présente l'essentiel des résultats acquis durant cette thèse sous la forme d'une étude intégrée portant sur la biologie, la répartition ainsi que la diversité et les adaptations putatives des *Methanomassiliicoccales* du cluster free-living dans un large panel d'échantillons non digestifs.
- (II) Le second chapitre présente des résultats additionnels obtenus dans le cadre de ce travail.

A la base, ce projet de thèse avait deux objectifs principaux : (i) étudier la distribution, la diversité phylogénétique et l'abondance des *Methanomassiliicoccales* dans un panel d'échantillons non-digestifs collectés aux quatre coins du monde, dans des environnements extrêmes et non-extrêmes, aquatiques et terrestres et (ii) isoler et caractériser une nouvelle espèce de *Methanomassiliicoccales* affiliée au cluster free-living aux niveaux morphologique, physiologique, chimiotaxonomique et génomique. Cette seconde étude devait permettre d'étudier les différents substrats utilisés par cette souche, ses paramètres de croissance optimaux, ses gammes de tolérances physiologiques (pH, température, salinité, pression, *etc.*), et les facteurs favorisant sa croissance. Ce travail devait aussi aborder l'analyse du capital génomique de cet isolat. Cependant, de multiples difficultés expérimentales et organisationnelles, ainsi que des problèmes techniques (panne d'équipements sur de longues périodes), ont été rencontrés tout au long de cette thèse et font que les résultats qui ont été obtenus ne sont pas forcément ceux escomptés. Ainsi, en dépit de multiples efforts (voir chapitre II), il n'a pas été possible d'obtenir une culture clonale d'une souche de *Methanomassiliicoccales* à partir d'un échantillon non digestif. De plus, la dernière année de thèse a été marquée par 2 périodes de confinement (pandémie de la Covid-19). Pour toutes ces raisons, les travaux menés ont été recentrés en vue de rédiger un unique article scientifique dense recensant la majeure partie des données acquises dans cette thèse (chapitre I). Nous ne sommes pas parvenus à trouver de fil conducteur pour scinder l'ensemble de ces résultats en 2 parties et en faire deux « histoires ».

I. Etude intégrée des *Methanomassiliicoccales* en contexte non digestif : Aspects physiologiques et écologiques des *Methanomassiliicoccales* dans des environnements terrestres et aquatiques

L'objectif de cette étude était d'obtenir des informations sur la biologie, la répartition ainsi que la diversité et les possibles adaptations des *Methanomassiliicoccales* du cluster *free-living* dans un large panel d'échantillons non digestifs à l'aide d'une approche intégrée associant des analyses moléculaires, culturales, métagénomiques et des approches analytiques et statistiques.

Afin de sélectionner des échantillons naturellement enrichis en *Methanomassiliicoccales*, un premier criblage moléculaire par PCR avec des amorces ciblant spécifiquement ces archées a été réalisé sur un panel de 86 échantillons terrestres et aquatiques d'écosystèmes variés (sédiments marins, saumures, volcans de boue, sources hydrothermales, tourbières, lacs...) collectés en divers points du globe (tourbe de Bretagne, sédiments marins profonds de l'océan Indien, *etc.*). Vingt-deux échantillons ont donné un signal positif d'amplification avec ces amorces et ont été sélectionnés pour des analyses ultérieures. Un séquençage en métabarcode des régions V4 des gènes codant les ARNr 16S, couplé à une quantification par qPCR (ciblant les gènes codant les ARNr 16S de *Methanomassiliicoccales*) a ensuite été réalisé à partir de ces 22 échantillons environnementaux. Ces analyses ont permis de révéler la diversité taxonomique des procaryotes présents dans ces échantillons et de déterminer l'abondance des *Methanomassiliicoccales* dans ces échantillons.

Sur la base de ces résultats, 6 échantillons ont été sélectionnés pour tenter de cultiver des *Methanomassiliicoccales* sur un milieu sélectif, en réalisant des microcosmes. Un suivi temporel des microcosmes par qPCR et métabarcode a permis de suivre l'évolution de la diversité microbienne et de l'abondance des *Methanomassiliicoccales* au fil du temps. Parallèlement à cela, un suivi analytique des substrats et produits du métabolisme a été réalisé. La combinaison de ces approches a permis de mettre en évidence un enrichissement en *Methanomassiliicoccales* dans un microcosme inoculé à partir de sédiments d'eau douce, après 8 semaines d'incubation. Une analyse en métagénomique de cet enrichissement a permis de reconstruire deux MAGs (*metagenome assembled genomes*) de *Methanomassiliicoccales* (respectivement *Ca. 'Methanomassiliicoccus armoricus'* MXMAG1 et MXMAG2). L'analyse de ces deux MAGs a permis (i) de décrire les potentiels métaboliques et physiologiques de *Ca.*

‘*Methanomassiliicoccus armoricus*’ MXMAG1 et MXMAG2, et (ii) de mieux comprendre les adaptations de ces archées aux écosystèmes non digestifs, par comparaison avec les génomes d’autres *Methanomassiliicoccales* issues d’habitats digestifs et non-digestifs.

Enfin, des analyses en réseaux de cooccurrence intégrant les données de diversité microbienne obtenues d’une part sur les échantillons bruts environnementaux, et d’autre part sur la diversité au sein des microcosmes au fil de l’enrichissement, ont permis de révéler la cooccurrence des *Methanomassiliicoccales* avec certains taxa bactériens et d’émettre des hypothèses sur les interactions potentielles des *Methanomassiliicoccales* avec d’autres microorganismes.

Ces travaux ont fait l’objet d’une publication sous le titre :

« New insights into the Ecology and Physiology of *Methanomassiliicoccales* from Terrestrial and Aquatic Environments ».

Microorganisms, (2021), 9(1), 30. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010030>.

Une partie de ces travaux ont été réalisés dans le cadre d’un stage de M2 que j’ai encadré pendant 6 mois (Amandine Sanvoisin : qPCR sur les échantillons environnementaux), ainsi que dans le cadre de collaborations (Dr. Guillaume Borrel, BECM, Institut Pasteur, Paris : Reconstruction des MAGs et analyses phylogénomiques ; Maxime Allieux et Dr. Karine Alain, LM2E : analyses génomiques et génomique comparative ; Dr. Yann Moalic, LM2E : analyses en réseaux ; Dr. Erwan Roussel, M. Xavier Phillipon, LM2E et M. Ludovic Stephan, CEMCA, UBO : analyses chimiques).

Nota Bene : Pour ce chapitre, j’ai fait le choix d’intégrer la totalité des informations, comprenant la publication et l’ensemble des données supplémentaires.

Chapitre I : Étude intégrée des *Methanomassiliicoccales* en contexte non digestif : Aspects physiologiques et écologiques des *Methanomassiliicoccales* dans des environnements terrestres et aquatiques



Article

New Insights into the Ecology and Physiology of *Methanomassiliicoccales* from Terrestrial and Aquatic Environments

Marc Cozannet ¹ , Guillaume Borrel ², Erwan Roussel ¹, Yann Moalic ¹ , Maxime Allieux ¹, Amandine Sanvoisin ¹, Laurent Toffin ¹ and Karine Alain ^{1,*}

- ¹ Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes LM2E, Univ Brest, CNRS, IFREMER, IRP 1211 MicrobSea, UMR 6197, IUEM, Rue Dumont d'Urville, F-29280 Plouzané, France; Marc.Cozannet@univ-brest.fr (M.C.); Erwan.Roussel@ifremer.fr (E.R.); Yann.Moalic@univ-brest.fr (Y.M.); Maxime.Allieux@univ-brest.fr (M.A.); Amandine.Sanvoisin@univ-brest.fr (A.S.); Laurent.Toffin@ifremer.fr (L.T.)
- ² Unit Evolutionary Biology of the Microbial Cell, Department of Microbiology, Institute Pasteur, 75015 Paris, France; guillaume.borrel@pasteur.fr
- * Correspondence: Karine.Alain@univ-brest.fr; Tel.: +33-0298-4988-53



Citation: Cozannet, M.; Borrel, G.; Roussel, E.; Moalic, Y.; Allieux, M.; Sanvoisin, A.; Toffin, L.; Alain, K. New Insights into the Ecology and Physiology of *Methanomassiliicoccales* from Terrestrial and Aquatic Environments. *Microorganisms* **2021**, *9*, 30. <https://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9010030>

Received: 1 December 2020

Accepted: 21 December 2020

Published: 24 December 2020

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Members of the archaeal order *Methanomassiliicoccales* are methanogens mainly associated with animal digestive tracts. However, environmental members remain poorly characterized as no representatives not associated with a host have been cultivated so far. In this study, metabarcoding screening combined with quantitative PCR analyses on a collection of diverse non-host-associated environmental samples revealed that *Methanomassiliicoccales* were very scarce in most terrestrial and aquatic ecosystems. Relative abundance of *Methanomassiliicoccales* and substrates/products of methanogenesis were monitored during incubation of environmental slurries. A sediment slurry enriched in *Methanomassiliicoccales* was obtained from a freshwater sample. It allowed the reconstruction of a high-quality metagenome-assembled genome (MAG) corresponding to a new candidate species, for which we propose the name of *Candidatus* 'Methanomassiliicoccus armoricus MXMAG1'. Comparison of the annotated genome of MXMAG1 with the published genomes and MAGs from *Methanomassiliicoccales* belonging to the 2 known clades ('free-living'/non-host-associated environmental clade and 'host-associated'/digestive clade) allowed us to explore the putative physiological traits of *Candidatus* 'M. armoricus MXMAG1'. As expected, *Ca.* 'Methanomassiliicoccus armoricus MXMAG1' had the genetic potential to produce methane by reduction of methyl compounds and dihydrogen oxidation. This MAG encodes for several putative physiological and stress response adaptations, including biosynthesis of trehalose (osmotic and temperature regulations), agmatine production (pH regulation), and arsenic detoxication, by reduction and excretion of arsenite, a mechanism that was only present in the 'free-living' clade. An analysis of co-occurrence networks carried out on environmental samples and slurries also showed that *Methanomassiliicoccales* detected in terrestrial and aquatic ecosystems were strongly associated with acetate and dihydrogen producing bacteria commonly found in digestive habitats and which have been reported to form syntrophic relationships with methanogens.

Keywords: *Methanomassiliicoccales*; cultivation; methyl-compounds; environmental cluster; networks

1. Introduction

Methanogenic *Archaea* are responsible for production of biogenic methane (CH₄) on Earth, reported to release one-half of the annual output of this strong greenhouse gas into the atmosphere [1]. Methanogens inhabit a large variety of anoxic terrestrial and aquatic environments, as well as various animal gastrointestinal tracts (GITs) [2]. In these ecosystems, methanogenesis occurs under reduced conditions, in areas where substrates are produced

from fermentation (H_2 , CO_2 , acetate, or methylated compounds) or geological processes (H_2 , CO_2 , CO) [3–5]. Over the last decade, our knowledge of methanogenesis pathways and the taxa carrying out this process has changed considerably. For example, methoxylated aromatics and short-chain alkanes have been described as potential methanogenesis substrates for newly-described methanogenic lineages [6–8]. Furthermore, genome-centric metagenomics studies and cultivation efforts led to the discovery of several new taxa of methanogens phylogenetically distant from the euryarchaeal phylum [9–12]. Most of these taxa were predicted to perform a methyl-dependent hydrogenotrophic methanogenesis, challenging the paradigm of an ancestral euryarchaeal methanogenesis based on the consumption of H_2/CO_2 [8,12–14].

The recently described order *Methanomassiliicoccales* has been reported to perform a methyl-dependent hydrogenotrophic methanogenesis (reducing methyl-compounds with H_2 as electron donor), that involves two types of heterodisulfide reductases, HdrB and HdrD to conserve energy [15–17]. In addition, *Methanomassiliicoccales* possess rather rare metabolic properties because they require the 22nd amino acid, pyrrolysine, encoded by an UAG (amber) codon [16].

Based on 16S rRNA and *mcrA* (methyl co-enzyme M subunit A) genes, this order encompasses at least two family-level lineages, respectively, called *Methanomassiliicoccaceae* and *Candidatus 'Methanomethylophilaceae'* [18–20], frequently associated with the two specific habitats (host-associated habitats versus non-host associated ones), in which they are found and probably reflecting their ecological adaptation [21–24].

The first cluster, referred to as the 'host-associated' clade, corresponding roughly to *Ca. 'Methanomethylophilaceae'*, is the one that has been the most studied [24,25]. It comprises representatives originating exclusively from animal GITs (e.g., mammals, reptiles, and insects), suggesting an evolution specialized towards digestive tract microbiomes [23,24]. This clade has representatives grown in enrichment cultures, derived from animal and human GITs or kitchen wastes: *Ca. 'Methanomethylophilus alvus'*, *Ca. 'Methanoplasma termitum'*, and *Ca. 'Methanogranum caenicola'*, as well as strains RumEn M2 and ISO4-H5 [20–23,26,27]. It has notably been studied in human GITs, appears to be increasing with age of the person, and was predominantly associated with elderly subjects being in good health condition [9,24,28–30].

The second cluster of *Methanomassiliicoccales*, referred in the literature to as the 'free-living' clade, corresponding roughly to *Methanomassiliicoccaceae*, is much less documented. It comprises mainly members detected by molecular methods in terrestrial and aquatic ecosystems, and known in their vast majority only through 16S rRNA or *mcrA* gene sequences. Sequences affiliated with this 'free-living' clade have been detected in various common and extreme habitats, such as seafloor sediments, peatland soils, terrestrial hot springs, or mangroves [23,31–33]. To date, in addition to fragmentary environmental DNA sequences detected through molecular PCR-based methods, our knowledge of this 'free-living' clade is limited to few metagenome-assembled genomes (MAGs) and three cultured strains sometimes predominantly active in these environments [15,16,23,34]. So far, the few cultured strains from this clade are paradoxically derived from human GIT, i.e., *Methanomassiliicoccus luminyensis* (*M. luminyensis*, the only strain of *Methanomassiliicoccales* isolated in pure culture) and *Ca. 'Methanomassiliicoccus intestinalis'* or from ruminant GITs, i.e., strain RumEn M1 [15,16,23]. However, no *Methanomassiliicoccales* belonging to the 'free-living' clade has been isolated or enriched from an aquatic or terrestrial environment.

The goal of this study was to culture representatives of the 'free-living' clade of *Methanomassiliicoccales* from a natural environment, to obtain information on their biology and make assumptions about possible adaptations to terrestrial and aquatic ecosystems, and from a more general point of view, on a type of methanogenesis that seems to be widespread within the recently discovered methanogenic lineages. *Methanomassiliicoccales* abundance was determined for 22 samples from a variety of natural environments worldwide, with various physico-chemical characteristics, out of which, six samples were selected to perform enrichment in slurries. A metagenomic approach was applied and led

to reconstruct a high-quality MAG of a *Methanomassiliicoccales* strain from the 'free-living' clade coming from a natural setting, providing matter for a phylogenetic and functional characterization.

2. Materials and Methods

2.1. Site Description

Eighty-six samples were collected from reported reduced areas of various ecosystems (marine sediments, deep-sea hydrothermal vents, marine pockmarks, submarine mud volcano, deep-sea hypersaline anoxic brine, peatland soils, lakes, hot springs, river sediments) during several sampling expeditions from 40 worldwide locations and stored in the laboratory for further investigations. Location and detailed information on sampling sites, depths, and sampling expeditions are given in Table S1. After a first molecular screening (as described in Text S1) performed to detect *Methanomassiliicoccales*-containing samples by PCR targeting 16S rRNA gene sequences of *Methanomassiliicoccales* and then confirmation of their presence by metabarcoding, 22 positive samples were selected for further investigations (Table 1).

Table 1. Origin and main characteristics of the environmental samples selected after a pre-screening molecular stage targeting *Methanomassiliicoccales*. Environmental parameters were measured in situ during cruises/expeditions. –, not determined.

Sample Acronym	Sample Type	Geographical Origin	Water Depth (m)	Depth Below Surface/Subseafloor (cm)	pH	Temperature (°C)
COMRA	Deep-sea sediments	South-West Indian ocean	2267	0–20	7.5	–
DOUR	Coastal sediments	France (Bay of Morlaix, France)	0	5–10	7.25	8
HM1	Mud from a mud volcano	Barents sea, Norway	1285	0–1	–	–
HM2	Mud from a mud volcano	Barents sea, Norway	1285	1–6	–	–
HM3	Mud from a mud volcano	Barents sea, Norway	1285	6–11	–	–
HM4	Mud from a mud volcano	Barents sea, Norway	1282	1–6	–	–
KERG	Water from a geothermal hot spring	Kerguelen Island, Indian Ocean (French Southern and Antarctic lands)	–	–	7.0	50
KRY150	Deep-Sea Hypersaline Anoxic Basin	Mediterranean sea (Kryos basin)	~3338	–	7.5	15
KRY238	Deep-Sea Hypersaline Anoxic Basin	Mediterranean sea (Kryos basin)	~3338	–	6.5	15
MOUG1	Peatland soil	Peatland in France (Commana, France)	–	0–10	6.4	4
MOUG2	Peatland soil	Peatland in France (Commana, France)	–	–	4.78	2
MOUG3	Peatland soil	Peatland in France (Commana, France)	–	0–10	5.22	6
MOUG4	Peatland soil	Peatland in France (Commana, France)	–	0–10	4.75	2.3
MOUG5	Freshwater sediments	Peatland in France (Commana, France)	0.2	5–15	6.7	8
MOZ1	Sediments from a pockmarck area	Mozambique Channel (Madagascar shore)	762	2–4	8.0	8
MOZ2	Sediments from a pockmarck area	Mozambique Channel (Madagascar shore)	762	4–6	8.0	8
MOZ3	Sediments from a pockmarck area	Mozambique Channel (Madagascar shore)	762	6–11	8.0	8

Table 1. Cont.

Sample Acronym	Sample Type	Geographical Origin	Water Depth (m)	Depth Below Sub-surface/Subseafloor (cm)	pH	Temperature (°C)
PAV60	Anoxic water from a meromictic lake	Pavin lake (France)	60	–	5.3	4.2
PAV70	Anoxic water from a meromictic lake	Pavin lake (France)	70	–	5.3	4.75
PAV80	Anoxic water from a meromictic lake	Pavin lake (France)	80	–	5.3	5
PENF	Freshwater sediments	Tributary of the French river Penfeld (Brest, France)	0.15	0–5	6.0	8
XIA	Water from a geothermal hot spring	Hot spring in China (Xiamen Botanical Garden)	–	0	6.3	82

The 22 samples used for an in-depth study were the following ones: (i) five samples were collected in a peatland area (Brittany, France), including four soil samples (MOUG1–MOUG4) and one sediment sample from a freshwater stream (MOUG5); (ii) four samples were collected from the active center of the deep-sea methane-emitting Håkon Mosby mud volcano, in the Barents Sea (Arctic Ocean) (HM1–HM4); (iii) three anoxic samples were collected in the water column of the meromictic crater Lake Pavin (Auvergne, France) at 60, 70, and 80 m water depth (PAV60–PAV70–PAV80); (iv) one geothermal hot spring sediment sample was collected from the Xiada reservoir of the Xiamen botanical garden (China) (XIA); (v) one geothermal spring sediment sample was taken from a hot spring at the Kerguelen islands (Kerguelen archipelago, France, Indian Ocean) (KERG); (vi) two samples were originating from the athalassic (MgCl₂-rich) deep-sea hypersaline anoxic brine (DHAB) Kryos, in the Mediterranean Sea, respectively, collected from layers at 150 g L⁻¹ salts (mainly MgCl₂) (KRY150) and 238 g L⁻¹ (mainly MgCl₂) (KRY238); (vii) three sediments samples were collected in a pockmark field in the Mozambique Channel (off the Madagascar island) (MOZ1–MOZ3); (viii) one superficial marine sediment sample was collected from a marine bay influenced by freshwater inputs (DOUR) (English Channel, France); (ix) one deep-sea sediment sample was collected from the South West Indian Ocean (COMRA); and (x), finally, a freshwater sediment sample was taken from a stream (PENF) (Brittany, France). All the investigated samples were described and conditioned during each cruise and field expedition before being stored at 4 °C under anoxic conditions for culture and at –80 °C for DNA extraction. More detailed descriptions of these samples are given in Text S2 and Table S1.

2.2. DNA Extraction

Due to the various nature and composition of the environmental matrices, a standardized DNA extraction protocol, combining mechanical lysis by bead-beating and chemical lysis, was applied in triplicate to each sample onto 0.5 g of environmental matrix. One negative control was included and contained 0.5 mL of DNA-free sterile water. The mechanical lysis step was followed by a chemical lysis, based on the use of detergents (SDS and sarkozyl) and proteinase K, and was followed by a phenol/ chloroform/ isoamyl alcohol extraction of nucleic acids. The detailed procedure is described in Text S3. Elution of total DNA extracts was performed in 100 µL EB buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5). Nucleic acid solution quality was determined using the NanoDrop™ 8000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) spectrophotometer. Double-strand DNA concentration was measured using the kit Quantifluor™ dsDNA system (Promega, Madison, WI, USA), following the manufacturer's instructions.

2.3. Metabarcoding Sequencing and Sequence Analysis

The hypervariable partial SSU V4 region of the community 16S rRNA genes were analyzed to characterize the prokaryotic diversity in bulk samples and in substrate-amended slurries (DOUR, MOUG2, and PENE, respectively). Amplifications were carried out using the primer pair 515F-Y (5'-GTG YCA GCM GCC GCG GTA A-3') [35] and 806R (5'-GCA CTA CNV GGG TWT CTA AT-3') [36], with barcode on the forward primer, following the indexing and PCR conditions described elsewhere [37]; see <https://www.earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/16s/>. The amplicons were then sequenced by the company Molecular Research-MrDNA (Shallowater, TX, USA), using the Illumina MiSeq (2 × 300 bp, paired-end reads; amplicon size: ~390 bp) technology, as described elsewhere [37]; see <https://www.earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/16s/>. Raw reads were processed using the FROGS (Find, Rapidly, Operational taxonomic units (OTUs) with Galaxy Solution) pipeline [38] implemented on Galaxy (v. r3.0-1.4; Toulouse platform (see <https://www.genotoul.fr/>)) to generate FASTQ file, perform read quality controls, merge paired-end reads, remove unique singletons, and perform clustering by aggregation. Operational taxonomic units (OTUs) were generated from representative sequences (253 ± 20% bp) clustered as described elsewhere [38]. Singletons and potential chimeras were then removed to discriminate against sequencing artefacts. This resulted in 2,074,891 paired-end reads, forming, respectively, 14,096 and 11,843 OTUs, for bulk samples and cultures, respectively. Taxonomic affiliations of OTU representative sequences were done against the release 138 of the SILVA SSU database (www.arb-silva.de) and then double-checked against the RDP Classifier (v. 2.12). The taxonomic position of all *Methanomassiliicoccales*-related sequences was further analyzed by integrating the representative sequences into a reference dendrogram, using the distance-based phylogeny reconstruction algorithm BioNJ, as detailed in Text S4. The tree was visualized with iTOL (v. 5.7; <https://itol.embl.de/>) (Figure 2).

The 16S rRNA gene amplicons dataset was analyzed using the phyloseq package (v. 1.28.0 R) [39] on program R studio (v. 1.3.5001). The OTUs abundance, assigned taxonomy, and sample contextual data were integrated into a phyloseq object before removing potential reagent contaminants using the decontam package (v. 1.4.0) [40]. Then, the metagenomSeq package (v. 1.26.3) [41] was used to normalize the dataset of the different samples by cumulative sum scaling (CSS), a median-quantile normalization which corrects differences in library sizes. Finally, all statistical analyses were performed with the phyloseq package. Extraction of 16S rRNA gene sequences representative of the OTUs and phylogenetic analyses are detailed in Text S4. A Bray-Curtis index was calculated to assess the dissimilarity between total microbial communities in environmental samples by observing ecological distances.

2.4. Quantitative Polymerase Chain Reaction

The abundance of 16S rRNA genes from *Methanomassiliicoccales* in natural samples and substrate-amended slurries was estimated using quantitative PCR (qPCR) with the primers AS05 Fw (5'-GGG GTA GGG GTA AAA TCC TG-3') (this study)—AS2 Rv modified (5'-AAC AAC TTC TCT CCG GCA CT-3') [28]. Quantifications were performed in triplicate with 5 ng of DNA template (5 µL of 1 ng µL⁻¹ DNA template) (+ negative controls). Amplification reactions were carried out in a StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), in a final volume of 25 µL using the kit PerfeCTa® SYBR® Green SuperMix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD, USA, supplier: VWR), 200 nM primers targeting *Methanomassiliicoccales* partial 16S rRNA gene sequences, and 5 µL of DNA template. For 16S rRNA gene copies quantification, qPCR conditions were as follows: 1 initial denaturation step at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, then annealing and extension at 58 °C for 60 s. qPCR specificity was checked based on melting curve analysis, PCR efficiency (90–110%), r² of standard curves (>0.99), Ct (≤30), electrophoretic migration of amplicons, and sequencing checking of the PCR products. Standard curves were obtained from 10⁻¹ to 10⁸ copies µL⁻¹

of plasmids containing a full 16S rRNA gene insert of *Methanomassiliicoccus luminyensis* (DSM 25720) (cloned in the vector pCR™2.1-TOPO™ of the TOPO™TA cloning® kit (Invitrogen)). The r^2 of standard curves obtained by qPCR were equal to or more than 0.992 and PCR efficiencies between 97 and 105%. The qPCR results were expressed in terms of copy gene numbers per gram of wet weight sample or per ml. For the environmental samples, they were considered as exploitable and biologically relevant when reaching at least 1×10^3 gene copies per ml or gram of wet weight of sample.

2.5. Culture-Based Incubation Experiments

2.5.1. Medium Composition for Culture-Based Experiments with Environmental Slurries

Enrichment slurries targeting hydrogenotrophic methyl-dependent methanogens were performed with environmental samples either (i) having the highest *Methanomassiliicoccales* 16S rRNA copy number per gram of wet weight or ml quantified (ii) or corresponding to ecosystems with extreme and unusual physical-chemical parameters (KRY150—MgCl₂-rich brine subjected to more than 33 MPa pressure; KERG—geothermal hot spring). The medium composition was designed based upon (i) previously published recipes used by culture collections (DSMZ medium 141) (Text S5) to grow or enriched *Methanomassiliicoccales*, (ii) on published enrichment media [15,17,42,43], and (iii) on metabolic information derived from metagenome-assembled genomes (MAGs) of *Methanomassiliicoccales* available in public databases [27]. Most of these recipes were based on substrate-rich composition, notably comprising a high concentration of methanol and/or methyl-compounds to promote *Methanomassiliicoccales* growth.

Basal medium contained, for 1 L of distilled water: 1 g NH₄Cl, 1 g Na-acetate, 0.1 g peptone from casein (Merck, Germany), 0.5 g KH₂PO₄, 20 mL fatty-acid solution, 5 mL porcine hemin solution, 1 mL tungstate-selenite solution, 1 mL trace elements solution SL10 [44], 5 mL K3 vitamin solution, NaHCO₃ (10% m/v), and resazurin (0.0001%) (see Text S5 for more details concerning the preparation of these solutions).

For culture-based incubation experiments performed with anoxic freshwater (PAV60), peat (MOUG2), geothermal hot spring water (KERG), and river sediments (PENF), 5 g NaCl, 0.4 g MgSO₄·7H₂O, and 0.05 g CaCl₂·2H₂O were initially added to the basal medium. Since the MOUG2 sample had relatively high acetate concentrations (>4 mM), no Na-acetate was added to the medium. For culture-based incubation experiments performed with marine samples (DOUR, KRY150), 20 g NaCl, 3.45 g MgSO₄·7H₂O, and 0.14 g CaCl₂·2H₂O were added to the basal medium. As Kryos DHAB is concentrated in magnesium [45], the magnesium concentration was adjusted to 150 g L⁻¹ with MgCl₂ for the slurry KRY150. The pH of the media were adjusted to 5.5 or 7.5 before boiling. After boiling, 0.5 g L⁻¹ of cysteine HCl·H₂O was added to the degassed medium under a N₂/CO₂ (80:20, v/v; 0.3 bar) flow, and the medium was then dispensed into 500 mL Schott flasks (135 mL of medium per flask). The flasks were closed with butyl rubber stoppers, and filled with a N₂/CO₂ (80:20, v/v; 0.3 bar) atmosphere before autoclaving. Vitamins, bicarbonates, trace elements, and reducing agent Na₂S·9H₂O (10% w/v) were then added to the medium before addition of substrates and cofactors from anoxic sterile stocks solutions: 40 mM trimethylamine (TMA), 40 mM methanol, 10 μM coenzyme M, and a gas phase of H₂/CO₂ (80:20, v/v; 1 bar). Since all published *Methanomassiliicoccales* MAGs seem to not contain the gene set required for coenzyme M production, 10 μM of coenzyme M were added to the media to promote their growth [27]. Media were then inoculated with 10% (w/v or v/v) original samples and incubated in the dark, without shaking, at 30 °C (DOUR, PAV60, PENF, MOUG2), 37 °C (KRY150), and 60 °C (KERG), respectively. When depleted, methanogenesis substrates were renewed by the addition of 40 mM TMA, 40 mM MeOH, and a renewal of the gas phase with H₂/CO₂ (80:20, v/v; 1 bar) to maintain methanogenesis activity. Uninoculated media were used as negative controls.

2.5.2. Monitoring of Culture-Based Incubation Experiments

The evolution of microbial diversity within substrate-amended slurries has been monitored by carrying out metabarcoding (as described in Section 2.3) and by quantifying *Methanomassiliicoccales* (as described in Section 2.4), on a weekly basis, on three technical replicates. Although the metabarcoding and qPCR analyses were made from the same DNA extracts, amplifications were performed with different polymerases and different primers (see Sections 2.3 and 2.4). At the same time as these molecular analyses, an analytical monitoring of metabolic substrates and products, and, in particular, of those of hydrogenotrophic methyl-dependent methanogenesis, was carried out as described below.

2.5.3. Quantifications of Substrates and Metabolic Products

Headspace gas CH₄, H₂, N₂, and CO₂ were measured using a modified INFICON/Micro GC FUSION Gas Analyzer (INFICON, Basel, Switzerland) fitted with a pressure gauge and two conductivity detectors, and using argon as a carrier gas, as detailed in Text S6.

Samples for cation analyses were analyzed using a Dionex ICS-900 Ion Chromatography System (Dionex, Camberley, UK) coupled with a CERS 500 4 mm suppressor and a DS5 conductivity detector (40 °C) and fitted with an RFC-10 Reagent-Free Controller™, an ASDV autosampler, and an IonPac CS16 column maintained at 60 °C in an UltiMate™ 3000 Thermostated Column Compartment (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Anions concentrations were quantified by anion chromatography as described elsewhere [46]. The detailed protocol is given in Text S6. Analysis of methanol concentrations was carried out using an Agilent 6890N Gas Chromatograph (GC) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled with a Flame Ionization Detector (FID) instrument as described in Text S6.

2.6. MAG Sequencing and Annotation

Metagenomic sequencing was carried out with the DNA extracted after 8 weeks of incubation of the slurry PENF (corresponding to the T8 sample of the culture-based experiment). This sample was in fact the one with the highest qPCR estimation in *Methanomassiliicoccales*. The aim was to reconstruct a MAG of *Methanomassiliicoccales* in order to learn more about the genetic, physiological and adaptive potential of the 'free-living' *Methanomassiliicoccales* cluster. A comparison of this MAG with genomes of 'host-associated' representatives was also intended to identify potential adaptations to the environment. Short read DNA sequencing was performed by FASTER SA (Plan-les Ouates, Switzerland), using the NovaSeq 6000 technology (2 × 100 bp, 100,000,000 paired-end reads; Protocol genomic Nano, 250 bp insert size section). Libraries constructions and quality controls were performed by the sequencing facility and verified with FastQC (v. 0.11.8—<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

MAGs were reconstructed using the Let-it-bin pipeline (<https://github.com/QuentInLetourneur/Let-it-bin>). Reads were first trimmed with AlienTrimmer [47]. Redundant reads were then removed using khmer [48]. Filtered reads were assembled with Megahit [49] and metaSpades [50]. Binning was performed with MaxBin2 [51], MetaBAT [52], and MetaBAT2 [52]. MAGs assemblies' statistics were obtained with Quast (v. 5.0.2; <https://github.com/ablab/quast>). MAG completeness and potential contamination were controlled with CheckM (v. 1.1.2—<https://ecogenomics.github.io/CheckM/>) [53]. *Methanomassiliicoccales* MAGs were identified by phylogenetic approaches described below. Two *Methanomassiliicoccales* MAGs obtained from metaSpades and Megahit assemblies contained contigs with identical sequences but interrupted at different loci. In order to improve the contig length, the contigs from these two MAGs were assembled with cap3 [54], leading to MXMAG1 MAG. A second MAG, MXMAG2, was obtained with metaSpades. Both were analyzed and annotated with the fast annotation software Prokka (v. 1.14.6—<https://github.com/tseemann/prokka>), Dfast (v. 1.2.5—https://github.com/nigyt/dfast_core), the online version of the RAST software (v. 2.0—<http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>), and the MicroScope Microbial Genome Annotation and Analysis

Platform (MaGe) (<https://mage.genoscope.cns.fr/microscope/home/index.php>), using KEGG and BioCyc databases with default parameters and databases for all of the five software/pipelines [55–58]. Functional annotations of predicted CDSs were further compared with NCBI (v. 2.10.0+), and UniProtKB database (release 2020_07).

2.7. Phylogenetic Position of the MAGs and Comparative Genomics

The archaeal MAGs obtained from the T8 sample metagenome were first placed in the archaeal phylogeny, including all major lineages of archaea to identify *Methanomassiliicoccales* representatives. The two *Methanomassiliicoccales* MAGs were then placed in a tree, including 17 other *Methanomassiliicoccales* genomes and 14 of the closest non-*Methanomassiliicoccales* genomes. Both phylogenies were based a concatenation of 40 conserved phylogenetic markers [8] were constructed in IQ-TREE with Maximum Likelihood (LG + F + G4) [59]. Average Nucleotide Identity (ANI) scores were calculated using the ANI calculator tool provided by the EzBioCloud web server (<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>) [60] and using the JSpeciesWS (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>) [61], between the high-quality MAG and its closest relative organisms *Methanomassiliicoccus luminyensis* B10^T (Accession number NZ_CAJE00000000.1) and *Candidatus 'Methanomassiliicoccus intestinalis'* Issoire-Mx1 (Accession number: NC_021353.1). DNA-DNA hybridization (DDH) estimate values were calculated using the genome-to-genome distance calculator (GGDC, v. 2.1, formula 2) [62] between the high-quality MAG and two closest relative organisms cited above.

Representative *Methanomassiliicoccales* genomes from the 'host-associated' and 'free-living' clades were compared to reconstructed MAGs using the MaGE platform's Pan-genome Analysis tool (<https://mage.genoscope.cns.fr/microscope/home/index.php>), based on the clustering algorithm SiLiX (<http://lbbe.univ-lyon1.fr/~SiLiX-.html>) which clustered genomic CDSs by 50% or/and 80% amino-acid identity and 80% amino-acid alignment coverage, with permissive parameters. Resulting CDSs were blasted against the UniprotKB database, and hypothetical protein CDSs were analyzed with the InterProScan webserver (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) for functional predictions.

2.8. Co-Occurrence Network Analysis

Network analysis was used to describe co-occurrences/putative associations between taxa within the environmental samples and in the substrate-amended slurries, respectively. On the basis of the co-occurrences of taxa found in the different samples and cultures, a matrix of correlation was computed between all the previously assigned OTUs, defined as mentioned previously (non-parametric Spearman). In this network, each node represented an OTU, and the links between nodes represented the positive correlation between them. The strategy used to analyze its topology was the same as described elsewhere [63]. In order to catch the most relevant information embedded in these co-occurrences, we started to analyze the networks at their respective percolation thresholds, which are the values at which the overall organization of the networks is a minimal giant cluster bearing the minimum number of links required for an overall connectivity of the system [64]. The visualization and statistical analysis of the network at these thresholds was done with Gephi (v. 0.9.2) [65]. Notably, the hierarchical structure was explored through a modularity algorithm [66]. An in-depth bibliographical analysis of the metabolic characteristics of known representatives of the taxa co-occurring in this network was carried out to focus on potential physiological characteristics described for the cultured taxa of these groups and determine if a putative physiology could be inferred for a given group (Table S5). The connectivity of *Methanomassiliicoccales* in each of the modules was characterized according to the metabolic characteristics of each taxon belonging to the same module.

2.9. Availability of Data and Materials

The MAGs' bins generated and analyzed in this study are available under the Whole Genome Shotgun project deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession num-

bers JAEILR000000000 v.1 (MXMAG1) and JAEILS000000000 v.1 (MXMAG2). The 16S rRNA gene sequences k119_35148 and k119_91804 are, respectively, available under the accession numbers MW383280 and MW383279. The 16S rRNA gene sequence generated by metabarcoding are available under the accession numbers MW386093-MW386158 in DDBJ/ENA/GenBank databases.

3. Results and Discussion

3.1. Diversity and Abundance of *Methanomassiliicoccales* in a Wide Range of Habitats

3.1.1. Molecular Pre-Screening of Various Environmental Samples

In order to explore the distribution of *Methanomassiliicoccales* associated with terrestrial and aquatic ecosystems a first molecular screening was carried out on 86 anoxic samples collected worldwide. These samples comprised a wide diversity of habitats (marine sediments, deep-sea hydrothermal vents, marine pockmarks, submarine mud volcano, deep-sea hypersaline anoxic brine, peatland soils, lakes, hot springs, river sediments) displaying a large range of physico-chemical conditions (pH, temperature, salinity, pressure). *Methanomassiliicoccales* were detected using PCR-based metabarcode screening (with the GoTaq[®] G2 DNA polymerase) in 26% ($n = 22$) of all samples, including coastal and deep-sea marine sediments, submarine mud volcano samples, anoxic lake waters, freshwater sediments, deep-sea brine samples, hot spring sediments, and peatland soils (Figure 1). A Bray-Curtis index calculated between these 22 samples revealed that the microbial community compositions were mainly structured according to sample type and by sampling site (see network topology in Figure 1; Table 1). So far, some of the anoxic habitats where *Methanomassiliicoccales* have been detected were reported to contain fermentation products and methylated compounds [67–71]. The methylated compounds result from the anaerobic degradation of organic compounds, such as pectin (for methanol) or *N*-methylated compounds (e.g., choline, betaine or trimethylamine-*N*-oxide), which are particularly represented in marine habitats [72], where they mainly serve as osmoregulators in organisms. A large part of this work has focused on marine habitats where the terminal degradation of organic matter results from microbial sulfate-reduction or methanogenesis reactions [68].

This work highlighted the presence of *Methanomassiliicoccales* in new geographical areas (Kerguelen archipelago in the Indian Ocean and the Brittany region in France, respectively), in environments where their presence had not yet been reported (submarine mud volcanoes) and in habitats sometimes characterized by extreme conditions, such as high pressures, high salinities, high temperatures, or low pH (Table 1). As previously reported, the presence of *Methanomassiliicoccales* was detected in various ecosystems with various physical-chemical parameters, such as (i) in terrestrial hot springs where temperatures were between 50 and 82 °C (KERG, XIA) [31,73,74], (ii) in a large number of samples where temperatures were more moderate (between 8 and 30 °C), as in peatland soils, where the pH was slightly acidic (MOUG2, MOUG4) [23,75], (iii) in submarine mud volcanoes (HM1-4) and seafloor sediments (COMRA) located at significant depths (between 1200 and 3338 m) [32,76], (iv) in non-saline (PAV60, PAV70, PAV80) [22,77] (v) to hypersaline (KRY150, KRY238) [45] environments, and (vi), finally, in a habitat subject to anthropogenic pollution and freshwater inputs (DOUR) [78]. These results reinforce the hypothesis that *Methanomassiliicoccales* might have a physiological diversity and potentially encompass mesophilic, thermophilic, halophilic, neutrophilic, acidophilic, and maybe even piezophilic taxa, as long as the amplified sequences were derived from active cells, and not from free DNA or dormant cells.

Metabarcoding sequencing targeting variable regions of 16S rRNAs gene sequences from *Bacteria* and *Archaea* and qPCR targeting *Methanomassiliicoccales* were then carried out to confirm these results and determine the diversity and abundance of *Methanomassiliicoccales* in these samples.

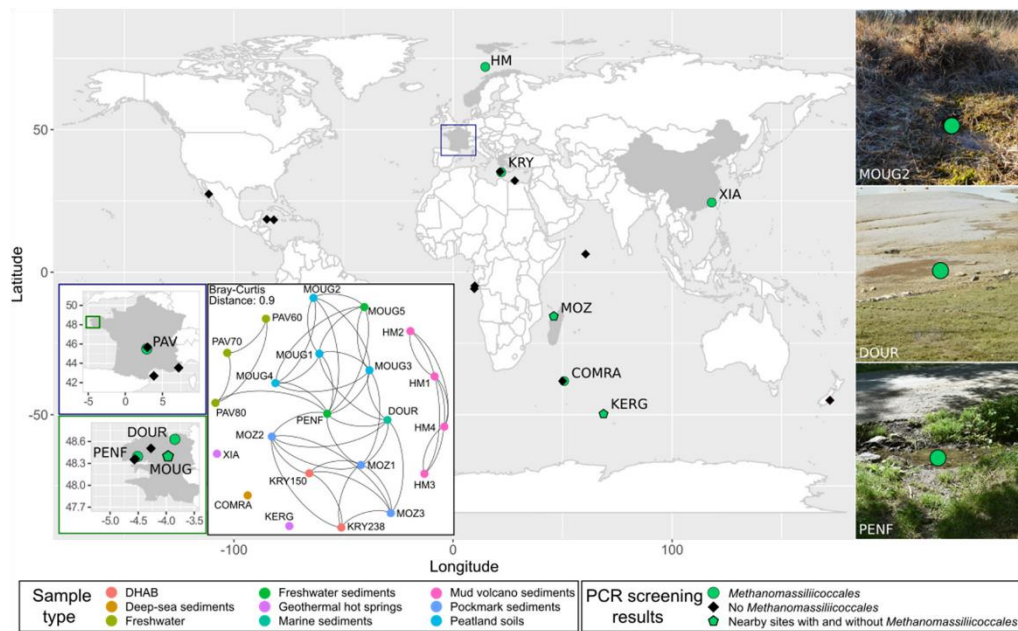


Figure 1. Distribution of environmental samples screened for *Methanomassiliicoccales*. On the map, green dots indicate the presence of Operational taxonomic units (OTUs) assigned to *Methanomassiliicoccales* in the sample; black diamonds indicate samples in which no *Methanomassiliicoccales* was detected by PCR with primers targeting *Methanomassiliicoccales*. Green and black pentagons show the position of nearby sites characterized by the presence of *Methanomassiliicoccales* for some, and their absence for others. The Network based on Bray-Curtis index shows the dissimilarity in the composition of total microbial communities between samples; pictures on the right represent, respectively, the MOUG2, DOUR, and PENF sampling sites.

3.1.2. Diversity and Abundance of *Methanomassiliicoccales*

Metabarcoding analyses confirmed the presence of *Methanomassiliicoccales* in the 22 samples where the presence of *Methanomassiliicoccales* was initially detected. The diversity of *Methanomassiliicoccales* in these samples was low. Indeed, out of the 14,809 prokaryotic OTUs identified by processing the dataset, only 6 OTUs were confirmed to belong to *Methanomassiliicoccales* based on the automatic assignment made by SILVA 138 database and by finer phylogenetic analyses performed with a set of *Methanomassiliicoccales* sequences and closely related lineages (Tables S2 and S3). These 6 OTUs (OTUs 21, 30, 101, 926, 137,628, and 137,784) fell into the ‘free-living’ cluster of the *Methanomassiliicoccales* (Figure 2), in the *Methanomassiliicoccales* family. Among them, OTU30 was tightly related to *M. luminyensis* B10^T 16S rRNA sequence (99.6% sequence similarity) and was present in all of the 22 selected samples, supporting the hypothesis that *M. luminyensis* might be inferred to a wide range of environmental conditions (Table 1) [24,79]. Eight other OTUs of the dataset were found to belong to very closely related lineages of *Methanomassiliicoccales* referenced as *Ca.* ‘Lunaplasmatales’ and UBA10834 [80].

The total abundance of *Methanomassiliicoccales* within samples was determined by quantitative PCR (Table S4). For samples where quantification has been possible, abundance of *Methanomassiliicoccales* was generally very low, ranging from 1.62×10^3 16S rRNA gene copies per gram of wet matrix in MOZ1 samples, to 7.5×10^4 16S rRNA gene copies per gram of wet weight soil in the peatland soil sample MOUG2. Many samples did not contain *Methanomassiliicoccales* abundances falling within the range set in this study as being biologically relevant for crude environmental samples ($\geq 1 \times 10^3$ gene copies per ml or gram of wet weight of sample). These results were congruent with the literature, which indicate that these methanogenic archaea are very scarce in the environment [14,23].

However five samples contained non-negligible effective of *Methanomassiliicoccales*: (i) soil samples from the Mougau peatland (MOUG1 and MOUG2) with respective abundances of 7.5×10^4 and 6.2×10^4 16S rRNA gene copies of *Methanomassiliicoccales* per gram of wet weight (and 34.4% and 1.7% of total known methanogen's sequences in the metabarcoding dataset, respectively); (ii) sediments from the stream tributary to the Penfeld river (PENF; 5.3×10^4 16S rRNA gene copies per gram of wet weight, 69.8% of total methanogen's sequences); (iii) a sample from the Pavin lake collected at 60 m depth (PAV60; 1.3×10^4 16S rRNA gene copies per ml; 60.0% of total methanogen's sequences), and iv) a sediment sample from the Dourduff-en-Mer marine Bay (DOUR, 6.5×10^3 16S rRNA gene copies per gram of wet weight, 38.6% of total methanogen's sequences) and a hot spring water sample from the Kerguelen Island (KERG, 6.4×10^3 16S rRNA gene copies per gram of wet weight, 79.5% of total methanogen's sequences).

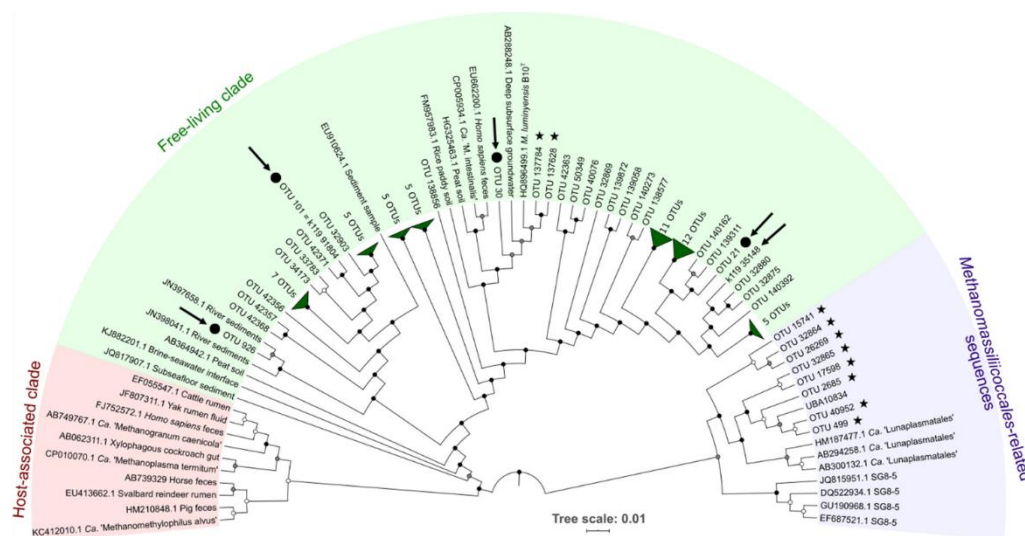


Figure 2. Dendrogram showing the relationships between 16S rRNA gene sequences (253 bp) detected in environmental samples, in substrate-amended slurry (PENF slurry) and inferred to metagenome-assembled genomes (MAGs), among *Methanomassiliicoccales* [22]. The 85 OTUs of *Methanomassiliicoccales* detected in this study are shown on this dendrogram. OTUs detected only in environmental samples are indicated by a black star. OTUs without a symbol were detected in the culture-based experiment performed with the sediment PENF. OTUs indicated by a circle were detected both in bulk samples and in the culture-based experiment. The 16S rRNA gene sequences k119_35148 and k119_91804 were extracted from the metagenome sequences of the culture-based experiment PENF, after 8 weeks of incubation. Sequences discussed in the text are indicated by black arrows. The *Methanomassiliicoccales*-related sequences encompassed representative 16S rRNA gene sequences of *Ca.* 'Lunaplasmatales', UBA10834 and SG8-5 [80]. This reconstruction was performed on partial 16S rRNA gene sequences (253 bp), using the BIONJ method [81], with the modifications of Jukes and Cantor and using 1000 bootstrap replicates. Black-filled dots indicate nodes with bootstrap supports <50%, grey-filled dots 50–75%, and white-filled dots show support values between 75 and 100%. The top-right insert indicates the relative abundance of the main *Methanomassiliicoccales*-affiliated OTUs in the substrate-amended slurry PENF, after 8 weeks of incubation.

3.2. Enrichment Cultures Targeting *Methanomassiliicoccales*

Six samples were selected for enrichment cultures of *Methanomassiliicoccales*. Sample selection was based on: (i) qPCR abundance values of *Methanomassiliicoccales* exceeding 1×10^3 16S rRNA gene copy numbers per ml or gram of wet weight sample (DOUR, MOUG2, PAV60, PENF), and/or (ii) corresponding to ecosystems different from those in the gastrointestinal tract from which the *Methanomassiliicoccales* strains were isolated to date (KRY150—MgCl₂-rich brine subjected to more than 33 MPa pressure; KERG—hot spring). To reach this objective, a medium was developed in this work to promote

growth of *Methanomassiliicoccales*. This medium contained methyl compounds (MeOH and TMA, 40 mM as described by Reference [15,43]) and dihydrogen in order to promote methyl-dependent hydrogenotrophic methanogenesis.

Of the 6 substrate-amended slurries incubated and monitored using geochemical and molecular approaches for 10 weeks, 3 did not produce methane de novo (PAV, KERG, KRY150). Two others led to methane and ammonium production but without *Methanomassiliicoccales* enrichment (DOUR and MOUG2) (Figure S1). No methane production or cell growth was detected in the uninoculated control culture. The only culture that showed production of methane associated with an increase in the copy number of *Methanomassiliicoccales* 16S rRNA sequences over time was the PENF freshwater sediment sample (Figure 3).

After 6 weeks of incubation, the added substrates were consumed. Hence, slurries were reamended with MeOH, TMA, and H₂ in order to overcome potential growth limitation of *Methanomassiliicoccales*. A constant increase in methane concentrations followed the consumption of these substrates in the first phase of the culture, as well as after the renewal of the substrates and the gas phase, suggesting that methanogenesis was occurring in this culture (Figure 3A,B). It is noteworthy that small amounts of dimethylamine (DMA) and monomethylamine (MMA) were detected one week after the beginning of the incubation (T1) (0.31 and 0.08 mM, respectively) and also one week after the new addition of TMA (T7) (0.16 and 0.10 mM, respectively). These products are intermediates in the degradation of TMA and probably reflect the progressive degradation of this substrate [72]. Additionally, a small amount (0.01 mM) of choline, a quaternary amine known to be degradable to TMA, ethanol, and acetate, by some fermentative microorganisms [68], was also detected at T6. A steady increase in propionate concentration over time also suggests that several fermentative microorganisms were active in this culture. In addition, variations in acetate concentrations were also observed throughout the incubation period, increasing from 11.53 to 15.53 mM between T0 and T2 before stabilizing between 1.08 and 4.94 mM between T3 and T10, interspersed with a sharp increase at T7 (10.14 mM), one week after the new addition of substrates. These variations reflect high microbial activity throughout the incubation period, since this compound can be a product and also a substrate of microbial metabolism (e.g., acetogenesis). Considering that the production of methane (respectively, 35.61 and 46.42 mol L⁻¹ at T6 and T10) was higher than that of the initial available dihydrogen (respectively, 31.74 and 37.66 mol L⁻¹ at T0 and T6), the stoichiometry of the methyl-dependent hydrogenotrophic methanogenesis was not conserved, confirming that several metabolisms were at work in this culture. In accordance, the metabarcoding analysis performed over time on this culture showed a large fraction of 16S rRNA gene sequences of methanogenic lineages (*Methanobacteriales*, *Methanomassiliicoccales*, *Methanomicrobiales*, and *Methanosarcinales*) and of taxa mainly reported in animal GITs [82,83] (*Firmicutes* (*Clostridiales*, *Desulfitobacteriales*, *Eubacteriales*, *Lachnospirales*, *Peptostreptococcales-Tissierellales*, and unclassified *Clostridia*), *Bacteroidales*, *Synergistales*, and taxa in lower relative abundance (<5%)), indicating that it was a complex microbial community, even after 10 weeks of incubation. Among the *Methanomassiliicoccales*-affiliated OTUs, sequences belonging to the OTUs 21, 30, 101, and 926 were detected throughout the incubation period and were predominant in the dataset.

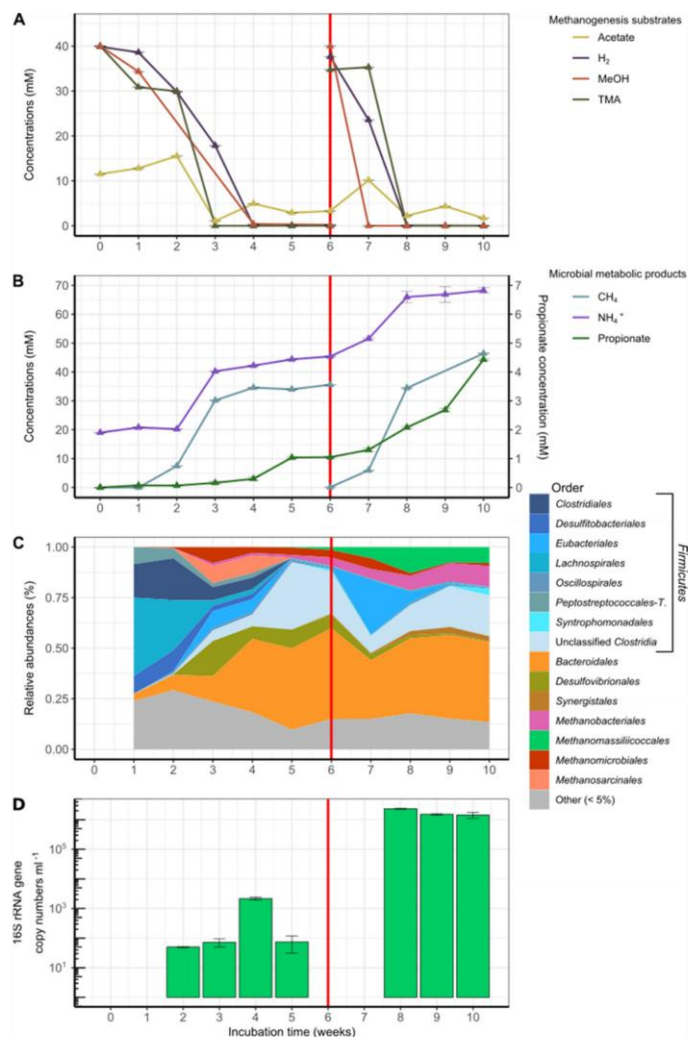


Figure 3. (A) Consumption kinetics of methanogenesis substrates during the weeks of incubation of the substrate-amended slurry performed with the PENF sample; (B) Consumption kinetics of some metabolic products (methane, ammonia, propionate) during the weeks of incubation of the substrate-amended slurry performed with the PENF sample. Concentrations of propionate are indicated on the right vertical axis of the figure and other microbial products (CH₄ and NH₄⁺) are indicated on the left vertical axis. The vertical red line indicates a novel addition of trimethylamine (TMA), methanol and H₂/CO₂ at T6 to stimulate methanogenesis; (C) Trends in microbial diversity revealed by metabarcoding; (D) *Methanomassiliicoccales* abundances determined by qPCR (logarithmic scale). *Methanomassiliicoccales* could not be quantified by qPCR in 4 samples (T0, T1, T6, and T7). Average copy numbers are given on the chart bars. Renewal of methanogenesis substrates (H₂, CO₂, MeOH, TMA) after six weeks of incubation is represented by the vertical red lines. *Peptostreptococcales-T.*: *Peptostreptococcales-Tissierellales*.

In terms of overall diversity, the species richness slightly decreased over incubation time (from T1 to T10: Shannon index, 3.11 to 2.61; Simpson index, 0.88 to 0.82) (Figure S2). It is noteworthy that the majority of lineages in which relative abundance increases over time (*Bacteroidales*, *Clostridiales*, *Desulfovibrionales*, and *Synergistales*), as well as those of

Methanomassiliicoccales, were similar to cohorts associated with *Methanomassiliicoccales* previously described that had been inoculated under mesophilic conditions with bovine rumen fluid, kitchen wastes, or mixtures of *Gracilaria* sp. algae and marine sediments [20,23,84]. In this culture, *Desulfovibrionales* were dominated by sequences affiliated to the genus *Desulfovibrio*, a genus within which certain species are known to produce TMA, ethanol, and acetate from choline fermentation [85]. A predominance of *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, and *Methanomassiliicoccales* was also reported for an environmental sample, in this case, a birch forest soil in winter [86]. Apart from methanogenic *Archaea*, other *Archaea* represented a marginal fraction of the total prokaryotic diversity, accounting for 46.2% and 2.3% of total read sequences at T1 and T2, respectively, to less than 0.1% of total sequences after the second week of incubation (Figure S3A,B).

A decrease in the number of sequences affiliated with the genera *Methanosarcina* (mainly composed of representative strains using H_2/CO_2 , or $R-CH_3$ or acetate) and *Methanomicrobiales* (using H_2/CO_2 /formate) was observed over time, while the number and relative fraction of sequences affiliated with the genus *Methanobacterium* (*Methanobacteriales*; mainly growing on H_2/CO_2) and the order *Methanomassiliicoccales* (using $H_2 + R-CH_3$) increased (Figure 3C). Between T1 and T5, the proportion of *Methanomassiliicoccales* sequences within total methanogenic archaea decreased from 29.2% to 4.6%. However, their relative abundance among methanogens increased after 6th week of incubation (16.4%) to reach a maximum value at T8 (63.1%) (Figure S3C). From the 8th week of incubation (T8), the relative fraction of *Methanomassiliicoccales* decreased slightly and that of *Methanobacterium* spp. (*Methanobacteriales*) increased slightly, to both stabilize at about 50%. Interestingly, some *Methanobacterium* representatives are able to use ammonium as the only source of nitrogen [87]. At 8 weeks incubation time (T8), 85 *Methanomassiliicoccales* OTUs were detected in the incubated slurry and were all affiliated to the 'free-living' environmental clade, forming various clusters of sequences within this clade (Figure 2), and representing, 63.1% of methanogens-affiliated sequences, 63.1% of all archaeal sequences (Figure S3D) and 14.9% of total sequences (Figure S3E). Interestingly, 22 OTUs, including OTU101 and OTU926, formed a cluster not related to the genus *Methanomassiliicoccus*. With the exception of 4 OTUs (OTUs 21, 30, 101, and 926, respectively), the majority of these sequences detected in the culture-based incubation experiment have not been detected by metabarcoding on the environmental sample, suggesting that these taxa were extremely scarce in situ.

The total abundance of *Methanomassiliicoccales* increased over the incubation period, from 5.00×10^1 at T2, to 2.35×10^6 16S rRNA gene copies of *Methanomassiliicoccales* mL^{-1} at 8 weeks of incubation (T8), before decreasing slightly to 1.43×10^6 copies at T10 (Figure 3D). Unfortunately, no qPCR quantification of *Methanomassiliicoccales* could be obtained at T1, T6, and T7. Nevertheless, this nearly 5-log increase in the abundance of *Methanomassiliicoccales* demonstrated that there was enrichment (p -value < 0.0001 , in ANOVA and Student's t -test) and, therefore, growth of the *Methanomassiliicoccales* during incubation, on the medium developed in this study with the freshwater sediment sample PENF. This result is reinforced by the fact the number of *Methanomassiliicoccales* sequences also increased gradually and concomitantly over the incubation period, until time T8.

The highest levels of *Methanomassiliicoccales* abundance results were obtained after 8 weeks of incubation, both in terms of copy number of the 16S rRNA gene sequences quantified by qPCR and among the total methanogenic community detected by metabarcoding (63.1% of the total methanogenic sequences). At that time, OTU21 was the predominant OTU of *Methanomassiliicoccales*, representing 86.5% of the total sequences of *Methanomassiliicoccales*, followed by OTU101 (13.4%) and then by the sequences of the other *Methanomassiliicoccales* OTUs ($<1\%$ in total) (Table S2). This result guided us to retain the T8 point for a metagenomic analysis.

3.3. Methanomassiliicoccales Genomic Features

Two *Methanomassiliicoccales*-affiliated MAGs were reconstructed from the T8 point of the substrate-amended slurry made from the PENF sample: one of high-quality (MXMAG1) and the other of low-quality (MXMAG2).

3.3.1. Taxonomic Position and General Features of the MAGs

Following genome-wide taxonomic analysis (with IQ-TREE) based on concatenated protein reference trees, both MAGs were robustly placed in the order *Methanomassiliicoccales* (Figure 4). ANI scores for the MXMAG1 MAG calculated against *M. luminyensis* B10^T and *Ca. 'Methanomassiliicoccus intestinalis'* Issoire-Mx1 had OrthoANIu values of 74.73% and 66.54%, respectively. These values are much lower than the threshold criterion for prokaryotic species delineation proposed to be 95–96% [88], suggesting that this MAG corresponds to a different *Methanomassiliicoccales* representative than those previously described.

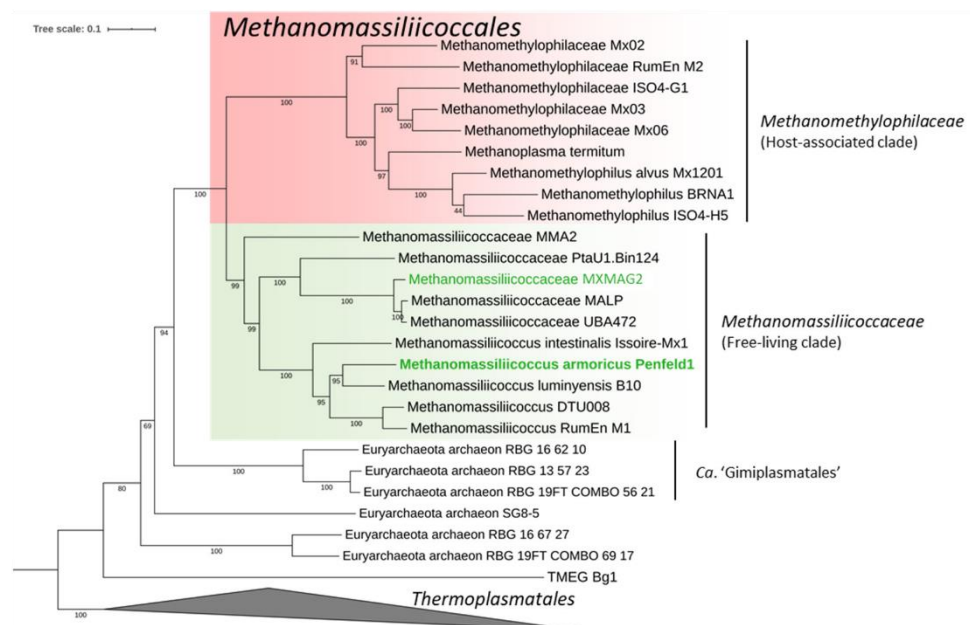


Figure 4. Maximum Likelihood phylogenomic tree (LG + F + G4) showing the position of the two *Methanomassiliicoccales* MAGs obtained in this study (in green) with respect to closely related MAGs and taxa. This phylogeny is based on a concatenation of 40 conserved phylogenetic markers (10,111 positions). The scale bar represents the average number of substitutions per site, and numbers indicate bootstrap replicates.

The digital DNA-DNA hybridization (DDH) estimate values between MXMAG1 MAG and *M. luminyensis* B10^T was 19.60%, and the one with *Ca. 'Methanomassiliicoccus intestinalis'* Issoire-Mx1 was 21.40%, both of which were values well below the standard criterion (70%) for the delineation of a prokaryotic species [89], confirming that the MXMAG1 MAG belongs to a different genomic species than *M. luminyensis* and *Ca. 'Methanomassiliicoccus intestinalis'*. Thus, we propose that MXMAG1 represents the type material of a novel *Methanomassiliicoccus* species, for which we propose the name *Candidatus 'Methanomassiliicoccus armoricus MXMAG1'* (ar.mo'ri.cus L. pl. fem. n. Armoricae, part of Gaul between the Seine and the Loire, including Brittany, where the sample used for the slurry were taken from; N.L. masc. adj. armoricus MXMAG1, pertaining to Brittany).

Apart from the 16S and 23S rRNA genes which were absent, the sequence of the MAG called *Ca. 'Methanomassiliicoccus armoricus MXMAG1'* met all of the criteria described

elsewhere [90] to be considered a high-quality draft. This MAG consisted of 37 contigs with an overall size of 2,230,712 bp and a G+C content of 62.13 mol%. This size was intermediate between the genome of closest species, *M. luminyensis* and *Ca. 'M. intestinalis'*, that are 2.6 Mbp and 1.9 Mbp, respectively [79]. CheckM estimated the genome to be 94.4% complete based on the presence of single-copy marker genes (9 markers were missing) and without contamination. Annotation with MaGe of *Ca. 'Methanomassiliicoccus armoricus MXMAG1'* resulted in the prediction of 2448 genomic objects, among which 2407 were protein-coding sequences. This reconstructed genome was relatively streamlined, with coding sequences covering approximately 90.87% of the entire genome. However, slightly different results were obtained with other annotation software: 2271 CDSs were found with RAST (745/1526 were not integrated to subsystem categories), 2261 CDSs with Prokka, and 2243 CDSs with Dfast.

Sequence of MXMAG2 consisted of 203 contigs with an overall size of 1,040,932 bp and a G + C content of 57.78 mol%. CheckM estimated the genome to be 48.2% complete based on the presence of single-copy marker genes (82 markers were missing) and with 2.1% contamination (4 markers were duplicated). Annotation with MaGe of MXMAG2 resulted in the prediction of 1305 genomic objects, among which 1281 were protein-coding sequences. MXMAG2 had a relatively streamlined genome with coding sequences covering approximately 91.34% of the entire genome. However, slightly different results were obtained with other annotation software: 1149 CDSs with Prokka and 954 CDSs with Dfast.

As for other *Methanomassiliicoccales* MAGs published previously, both MAGs did not contain one full complete 5S-16S-23S rRNA genes operon [79]. One and two 5S rRNA genes were found for MXMAG2 and *Ca. 'Methanomassiliicoccus armoricus MXMAG1'* MAGs, respectively. A partial 542 bp 23S rRNA gene was found in MXMAG2. We detected 24 and 38 tRNA for MXMAG2 and *Ca. 'Methanomassiliicoccus armoricus MXMAG1'* MAGs, respectively, according to ARAGORN RNA finder (<http://130.235.244.92/ARAGORN/>) associated to 18 standard amino acids for *Ca. 'Methanomassiliicoccus armoricus MXMAG1'*. Cysteine and tryptophan tRNA appeared to be missing, although the CDSs of the cysteine-tRNA and tryptophan-tRNA ligases were found.

The two *Methanomassiliicoccales* MAGs reconstructed did not contain any 16S rRNA sequences, probably due to the high degree of conservation of this gene and the closeness between 16S rRNA sequences of related organisms which make their binning challenging [91]. However, two 16S rRNA sequences referenced as k119_35148 and k119_91804 (1448 and 1397 bp, respectively) were independently reconstructed from the metagenomes and assigned to *Methanomassiliicoccales* (Table S3). Thus, it seems reasonable to assume that they correspond to the same 2 *Methanomassiliicoccales* genomes reflected by the MAGs. The similarity of the 16S rRNA gene sequence with the sequences of the closest cultured relatives, calculated using the "16-based ID" tool provided by the EzBioCloud web server (<https://www.ezbiocloud.net/>) showed that the sequence k119_35148 (probably the one corresponding to *Ca. 'Methanomassiliicoccus armoricus MXMAG1'*) was quite closely related to *M. luminyensis* (98.23% pairwise similarity) and *Ca. 'M. intestinalis'* (97.61%), indicating the enrichment of an undescribed representative of *Methanomassiliicoccus*. This sequence, even if it diverges at a nucleotide base (probably due to a sequencing error in the 16S rRNA gene sequence extracted from the metagenome), most likely corresponds to that of OTU21 present in the metabarcoding dataset throughout the PENF cultivation period, and also present in natural samples KERG, MOUG3, MOZ1–3, PAV60, and PENF. Since the level of similarity of the 16S rRNA gene sequence between sequence k119_35148 and those of its closest relatives was below the threshold value (98.7–99%) currently recommended for testing the genomic uniqueness of a new species, this value alone was sufficient to conclude that *Archaea* forming a new genomic species within the genus *Methanomassiliicoccus* have been enriched in this culture [92,93]. These results were congruent with the ANI and digital DDH scores calculated on *Ca. 'Methanomassiliicoccus armoricus MXMAG1'*, reinforcing the idea that this sequence corresponds well to the *Ca. 'M. armoricus MXMAG1'*. The nearly complete sequence of the 16S rRNA gene bearing the reference

k119_91804 (probably the one corresponding to MXMAG2), covered completely identically the representative sequence OTU101 (Figure 2), which was present in the environmental samples KERG, MOZ1–3, PAV70, PAV80, and PENE. This sequence was more distant from the sequences of the species and genera of *Methanomassiliicoccales* described to date, with a pairwise similarity ranging from 88.96 to 91.84%, respectively, to the closest relatives *Ca.* ‘*Methanogranum caenicola*’ and *M. luminyensis*, respectively. Although these sequences were incomplete, these 16S rRNA gene sequence similarity scores are far below the standard threshold level (<94.5%) generally accepted for the delineation of a new genus [93]. Thus, an archaeon belonging to an undescribed genus of *Methanomassiliicoccales*, which would be widely distributed in natural ecosystems, has likely been enriched in this culture-based incubation experiment.

3.3.2. Putative Metabolic Pathways

An extensive genomic characterization has been performed on the high-quality MXMAG1 *Ca.* ‘*Methanomassiliicoccus armoricus* MXMAG1’ to explore the pathways of methanogenesis, the biology, and the possible adaptations of the ‘free-living’ clade *Methanomassiliicoccales* Archaea from which this MAG originates, which appear to be widespread in natural ecosystems (Figure 5).

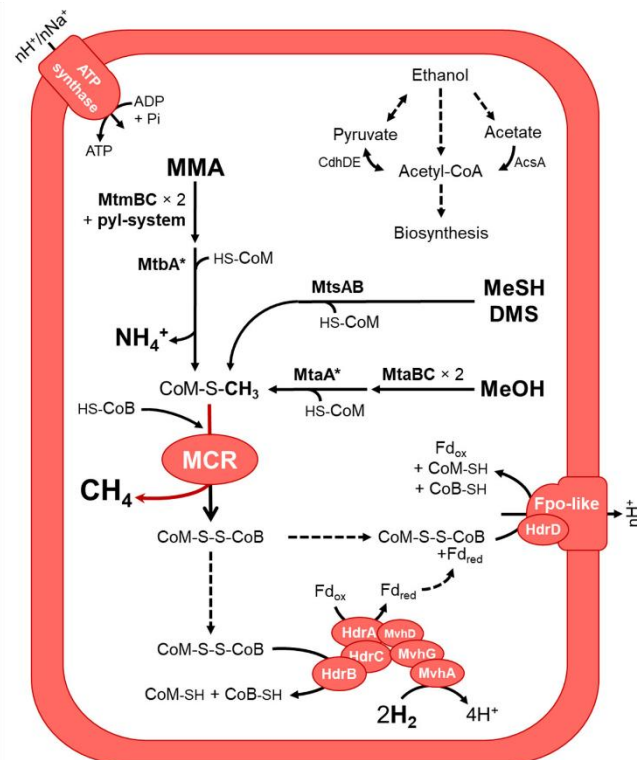


Figure 5. Predicted metabolic pathways for methanogenesis, carbon assimilation, and energy conservation in *Ca.* ‘*Methanomassiliicoccus armoricus* MXMAG1’, belonging to the ‘free-living clade’ of *Methanomassiliicoccales*. Genes encoding the MtmBC and MtaBC enzymes were found in two copies in the MAG. The “*” symbol indicates the presence of enzyme homologous to the MtaA/MtbA which are found in other *Methanomassiliicoccales* for MeOH and MMA incorporation, as described elsewhere [22]. Legend: CdhDE, Acetyl-CoA decarbonylase/synthase complex subunits; DMS, dimethylsulfide; MeOH, methanol; MeSH, methanethiol, MMA, monomethylamine.

Consistent with previous studies conducted on *Methanomassiliicoccales*, the methyl-dependent hydrogenotrophic methanogenesis pathway was predicted in *Ca. 'Methanomassiliicoccus armoricus MXMAG1'* MAG. Hence, the metabolism of the *Archaea*, from which this MAG was derived, was also probably similar to the other described *Methanomassiliicoccales* [16,22,23,26]. Methyltransferases for the production of methane from methanol (MtaA/MtaBC), monomethylamine (MtbA/MtmBC), dimethylsulfide and methanethiol (MtsAB) and HdrABC-MvhAGD electron-bifurcating complex (including an (NiFe)-hydrogenase) have been identified, suggesting that *Ca. 'Methanomassiliicoccus armoricus MXMAG1'* would be capable of reducing such methyl-compounds using H₂ as electron donor. As for *Ca. 'Methanoplasma termitum'* [26], the genes encoding the methyltransferases involved in the use of di- and trimethylamine (*mtbB* and *mttB*, respectively) are absent from the sequence of *Ca. 'M. armoricus MXMAG1'*. However, several non-binned *Methanomassiliicoccales*-affiliated *mttB* sequences have been found in the metagenome (Figure S4), suggesting that some *Methanomassiliicoccales* in this culture, and possibly even this one, were capable of reducing methyl-groups of TMA into methane. As in *Methanomassiliicoccales* from digestive environments, the presence of a complete *pyl* system (*pylBCD/pylS*), involved in the biosynthesis of the 22nd amino acid pyrrolysine, was found, and the presence of the amber codon was found in methyltransferase genes, as in other *Methanomassiliicoccales* methylamine methyltransferases [16,94]. A complete methyl-coenzyme M reductase (MCR) complex (*mcrABG*) gene set was present in the MAG. Of the N⁵-methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase (MTR) complex, only *mtrH* gene was present, and none of the genes of the methyl branch of the H₄MPT-type Wood-Ljungdahl pathway. Altogether, the presence of the identified genes in MXMAG1 strongly suggests that *Ca. 'M. armoricus'* produced energy from a methyl-dependent methanogenesis.

As described in all known *Methanomassiliicoccales*, *Ca. 'Methanomassiliicoccus armoricus MXMAG1'* harbored two heterodisulfide reductases systems (the methyl viologen-dependent hydrogenase/heterodisulfide reductase (MVR/HDR) complex (MvhADG/HdrABC) and the HdrD-like bonded to the Fpo-like complex) involved in the regeneration of the heterodisulfide complex (CoM-S-S-CoB) and the energy-conserving [23,26,95]. *Ca. 'M. armoricus MXMAG1'* encoded also an ADP-forming acetyl-CoA synthetase (*AscA*) [13,23,26], suggesting that acetate could be used as a carbon source. The MAG sequence also encodes the enzymes that allow the synthesis of acetyl-CoA from pyruvate (a pyruvate synthase complex; a pyruvate dehydrogenase complex), and a complete ethanol degradation pathway to acetyl-CoA, suggesting that pyruvate and ethanol may also serve as a carbon source for cellular biosynthesis.

Fourteen out of the 22 proteinogenic amino acid biosynthesis pathways were predicted as complete in *Ca. 'Methanomassiliicoccus armoricus MXMAG1'* MAG: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gly, His, Ile, Lys (biosynthesis VI), Pyl, Thr, Trp, and Val. The presence of numerous genes coding for cobalamin (vitamin B12) ATP-binding transporters involved in cobalamin import (*BtuD*) suggests that this genomic strain was capable to import this vitamin. Its de novo synthesis pathway is not present on the 94.4% complete reconstructed MAG. Several complete central metabolic pathways were also identified in the MAG, including: (i) gluconeogenesis/glycolysis, (ii) anaplerotic CO₂ fixation into oxaloacetate, (iii) the non-oxidative branch of the pentose phosphate pathway, and (iv) a fatty acid activation pathway. The presence of these complete paths, as well as those mentioned above, does not necessary imply that all of them were used.

The poor quality of the MXMAG2 MAG reconstruction allowed only partial metabolic pathways to be predicted. This MAG had genes encoding a nearly complete MCR complex (the *mcrB* subunit was missing) and several genes encoding subunits of a Fpo-like complex (*fpoMN*) and an MVR/HDR complex (*mvhAB* and *hdrBC*, respectively). The presence of the *mtbC* gene coding for the dimethyltransferase suggests that DMA could be used for methanogenesis. The presence of the *Methanomassiliicoccales mtaA/mtbA* gene encoding for a methyltransferase involved in methanol and methylamines incorporation was also

in line with this assumption [22]. Unlike the high-quality MAG, the MXMAG2 encoded a choline trimethylamine-lyase activating enzyme (*cutD*). This enzyme may be involved in the production of TMA from choline, possibly allowing the utilization of choline as substrate for methanogenesis. As described in *Ca. 'Methanomassiliicoccus armoricus MXMAG1'*, this MAG encoded the ADP-forming acetyl-CoA synthetase, as well as the pyruvate dehydrogenase complex.

3.3.3. Putative Physiological and Stress Response Functions

Several putative adaptive mechanisms known to be involved in microbial stress responses have been identified in *Ca. 'Methanomassiliicoccus armoricus MXMAG1'* MAG. Among them, complete biosynthesis and degradation pathways of trehalose were predicted, as well as 8 genes coding for a sub-unit (*malK*) of a trehalose/maltose importer. This could suggest that trehalose might be used to cope with external factors of the environment, such as temperatures, dehydration, or osmotic/oxidative stresses, or might be used as a storage compound, as described in other prokaryotes [96,97]. However, functional analyses will be useful to confirm this hypothesis.

As described in many microbial lineages including some methanogens, *Ca. 'M. armoricus MXMAG1'* MAG encoded a pyruvoyl-dependent arginine decarboxylase [98,99]. The presence of the gene encoding this enzyme suggests that *Ca. 'M. armoricus MXMAG1'* might regulate intracellular pH by converting a L-arginine to agmatine and CO₂ under acidic conditions [100]. In addition, this MAG encodes enzymes involved in (i) the degradation of agmatine to putrescine via an agmatinase; (ii) possessed a complete pathway for putrescine biosynthesis; and (iii) possessed numerous copies of the gene encoding the pH-dependent bidirectional putrescine-ornithine transporter PotE [100,101]. Putrescine is a common polyamine that could promote the growth of most living cells. Although present in most methanogenic archaea, the function of putrescine remains unclear [102,103]. The presence of complete pathways involved in putrescine incorporation and biosynthesis suggests that this compound might play a role in *Ca. 'M. armoricus MXMAG1'* physiology.

Several genes involved in arsenic metabolism were also found in this MAG. Arsenic is a harmful toxic pollutant at low concentrations that is widely distributed in natural environments (i.e., groundwater, sediments, soils), with the potential to inhibit methanogenesis depending on arsenic speciation and concentration [104,105]. *Ca. 'Methanomassiliicoccus armoricus MXMAG1'* genome contains a complete *arsRDABC* operon, similar to the one found in *Escherichia coli* [106]. The *arsRDABC* operon is involved in the arsenic detoxification and the active release of this compound outside the cell. The only difference with the canonical arsenic detoxification pathway is that the *arsB* gene is replaced in MXMAG1 by the *acr3* gene, which codes for a protein with the same function as ArsB (arsenite efflux pump). It has been shown that various *Bacteria* and *Archaea* prevent arsenic toxicity by using this pathway which, ironically, convert arsenate to the more toxic arsenite [106–108]. It should be noted that some MAGs of the sister lineage of *Methanomassiliicoccales* named *Candidatus 'Gimiplasmatales'* have also been reported to encode genes of this operon [109]. Interestingly, a comparative genomic analysis conducted on 5 genomes/MAGs belonging to the 'host-associated' clade and on 20 genomes/MAGs belonging to the 'free-living' clade showed that the complete *arsRDABC* operon was only present in MXMAG1 and MXMAG2. Several genes of this operon were also present in the genome of *M. luminyensis* strain B10^T and in the MAG referenced as RumEn M1. Genes coding for the arsenical pump-driving ATPase were not present in the genomes/MAGs from the host-associated clade analysed in this study. Furthermore, genes involved in arsenic methylation (e.g., *arsM*) by other methanogens were not found in *Ca. 'M. armoricus MXMAG1'* MAG nor in *Methanomassiliicoccales* genome comparisons [110]. Thus, reduction and excretion of arsenite could represent the only arsenic detoxification pathway available for *Methanomassiliicoccales*. It is noteworthy that the detoxification pathway of arsenate to arsenite was also present in MXMAG2. Finally, in opposition to *M. luminyensis*, *Ca. 'Methanomassiliicoccus armoricus MXMAG1'* and *Ca. 'Methanomassiliicoccus intestinalis'* do not harbor the *hgcAB*

operon [24,111]. This operon encodes an enzyme involved in the methylation of inorganic mercury (Hg) to form the highly toxic methylmercury [112,113]. Among methanogens, this metabolic capacity has only been confirmed for *M. luminyensis* and 7 species from various origins distributed among the *Methanomicrobia* class [113]. Therefore, if confirmed by functional approaches on isolates, this would demonstrate that this ability would not be uniformly present within the genus *Methanomassiliicoccus*, but only in some species of the genus.

3.4. Co-Occurrence Network Analysis

To explore potential interactions between *Methanomassiliicoccales* and other microorganisms, co-occurrence network analyses of 16S rRNA genes sequences were performed. These analyses were carried out on the 22 environmental samples and on culture-based incubation experiments performed with high substrate concentrations (Figure 6).

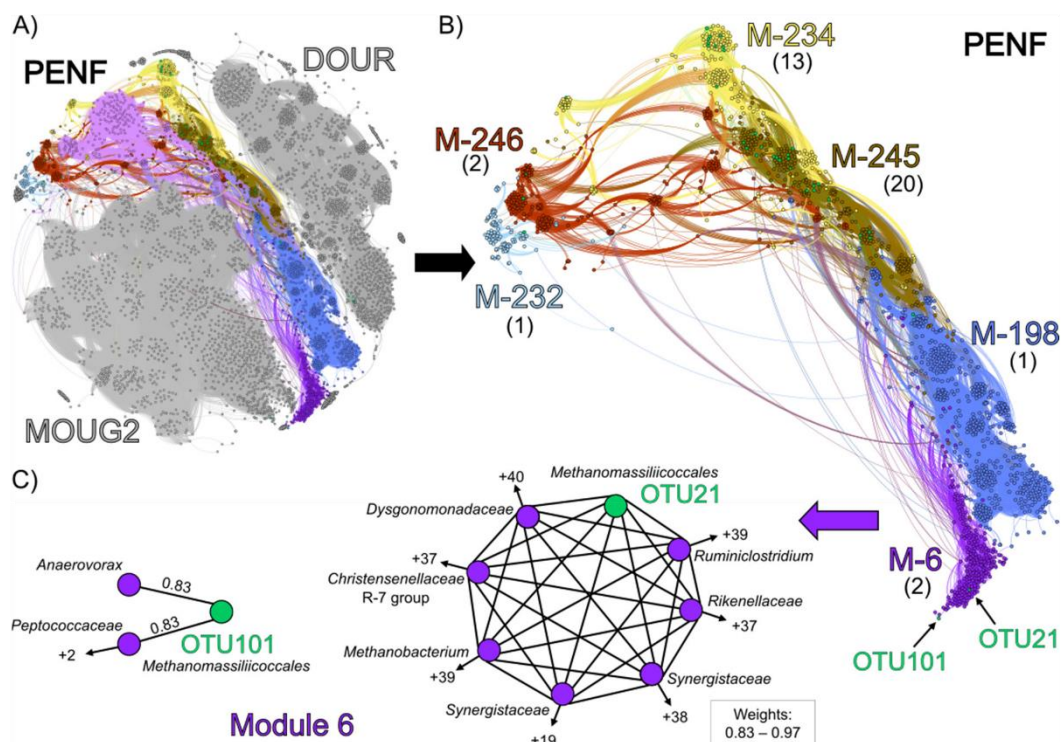


Figure 6. Co-occurrence network reconstructed based on 16S rRNA gene-sequencing data from substrate-amended slurries (DOUR, PENE, and MOUG2, respectively), based on a Spearman rank's correlation between OTUs and calculated with a percolation threshold of 0.79. (A) Clusters in slurries DOUR, PENE, and MOUG2, respectively. Modules in PENE network are colored to highlight them; (B) modules (M-6, module 6; M-198, module 198; M-232, module 232; M-234, module 234 and M-245, module 245, respectively) containing *Methanomassiliicoccales* in the cluster from the PENE culture-based incubation experiment. Modules consisting of a single *Methanomassiliicoccales* (modules 22 and 68, respectively) were excluded. The number of *Methanomassiliicoccales* in each module is shown in brackets; (C) non-random co-occurrences between *Methanomassiliicoccales* and other prokaryotes in module 6 showing co-occurrences of *Methanomassiliicoccales* (OTU21 and OTU101, respectively) with putative acetate- and H₂-producing bacteria. Black arrows followed by a plus and a number indicate the number of taxa non-randomly co-occurring with other prokaryotes outside the groups represented. The weights of the co-occurrences are written above the link (OTU101) or in the insert below the cluster of the OTU21.

Four modules were identified, each of which comprised *Methanomassiliicoccales* sequences sharing strong non-random associations (weight >0.7) with other taxa: module

1104 (OTU21), module 117 (OTU101), module 0 (OTU30), and module 927 (OTU926) (Table S5). Module 117 included 119 other OTUs distributed in more than 20 order-level lineages. Among others, this module contained 8 *Woesearchaeales*, 7 *Aminicenantales*, 18 *Omnitrophales*, and 13 Marine Benthic Group D/Deep-sea Hydrothermal Vent Euryarchaeota Group-1 (MBGD/DHVEG-1), as well as 3 *Methanofastidiosales* (hydrogenotrophic methyl-dependent methanogenesis) and a *Methanothermus* (*Methanobacteriales*; hydrogenotrophic methanogenesis). Interestingly, *Woesearchaeotales* and *Aminicenantales* present in this module have recently been proposed to maintain a nutritional relationship with various hydrogenotrophic methanogens, notably *Methanobacteria*, *Methanofastidiosales*, *Methanomicrobia*, and/or *Methanomassiliicoccales* [34,114–116]. When using a percolation threshold with a high-value of 0.83, OTU101 showed the highest non-random co-occurrence with two MBGD/DHVEG-1 sequences (weights: 0.85 and 0.87, respectively), and OTU30 showed significant non-random-co-occurrences with the poorly described bacterial phylum NKB15 and with a *Microgenomatia* (weights: 0.84 and 0.85, respectively) (Table S5). At this threshold of 0.83, no OTU was branched with OTU21 or OTU926. Thus, to observe their associated connectivity, a slightly lower threshold was used (0.7) (Figure S5) [117]. At this value, the *Methanomassiliicoccales* OTUs 21, 30, 101, and 926 showed significant non-random co-occurrences (weights: 0.70–0.87) with, respectively, 3, 5, 6, and 11 OTUs. Under these conditions, *Anaerolineaceae*, *Anaerovorax*, *Aminicenantales*, *Geobacteraceae*, MBGD/DHVEG-1, *Sporomusaceae*, and *Woesearchaeales* were the main lineages sharing strong connections with *Methanomassiliicoccales*. Interestingly, *Anaerolineaceae*, *Anaerovorax*, *Geobacteraceae*, and *Sporomusaceae* have also been reported to form syntrophic relationships with acetoclastic and hydrogenotrophic methanogens, notably *Methanobacteriales*, *Methanofastidiosales*, and *Methanomassiliicoccales* [118–122]. In contrast, if active, the *Desulfatiglans* and the *Methanoregulaceae* (*Methanomicrobia*) associated with OTU30 and OTU926, respectively, could represent hypothetical competitors for the acetate and/or H₂ resources of *Methanomassiliicoccales* [123–125].

Similarly, a co-occurrence network analysis was also performed (percolation threshold: 0.79) on the substrate-amended slurries incubated over 10 weeks (DOUR, MOUG2 and PENF) to reveal the narrow potential interactions between *Methanomassiliicoccales* and other microbial taxa (Figure 6). Our aim was to assess whether the microbial composition of the cultured community could be likely correlated with the enrichment of *Methanomassiliicoccales* in the PENF slurry. The overall topology of the network highlighted 3 clusters of nodes that clearly corresponded to the different culture-based incubation experiments (Figure 6A): (i) the cluster of nodes over-represented in the Dourduff-en-Mer slurry sampled throughout the incubation, is located at the top of the network, (ii) the cluster of nodes over-represented in the Mougau samples is located at the bottom, and (iii) the cluster of nodes over-represented in the Penfeld samples is located in between. The modularity analysis showed that 40 of the 42 the *Methanomassiliicoccales*-affiliated OTUs were detected inside modules from the Penfeld Cluster. This is congruent with the absence of *Methanomassiliicoccales* detected by metabarcoding approach in the DOURD and MOUG2 incubated slurries (Figure S1). In terms of overall community composition (Figure 6B), modules 232, 234, 245, and 246 showed close taxonomic patterns dominated by *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, taxa similar to those found in animal GITs from which most of the known *Methanomassiliicoccales* have been enriched or isolated so far [20–22,26]. These modules were predominantly composed of *Bacteroidales* (*Dysgonomonadaceae* and *Rikenellaceae*) and various *Clostridiales* (*Christensenellaceae* R-7 group, *Gracilibacteraceae*, *Hungateiclostridiaceae*, *Oscillospiraceae*, *Ruminococcaceae*) mainly reported to be able to produce acetate and/or H₂ as fermentative end products and sometimes to form partnerships with hydrogen-consuming methanogens (i.e., *Methanospirillum hungatei*, *Methanobrevibacter smithii*) (Table S5) [82,126–132]. Such bacteria pattern could possibly be explained by the utilization of a medium rich in organic compounds which could be used as substrates for fermentation or acetogenesis. As we used a complex culture medium comprising various substrates for methanogenesis, several methanogenic *Archaea* mainly affiliated to *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, and/or

Methanosarcinales were maintained throughout the incubation process and were also found in these modules. Despite strong similarities in microbial community composition with the four other modules (modules 232, 234, 245 and 246), module 6 contained a slightly higher taxonomic diversity among *Firmicutes*. This module contained the OTU21 and OTU101, which co-occurred strongly with *Ca.* 'Methanomassiliococcus armoricus MXMAG1' and MXMAG2, respectively. Since these OTUs were predominant throughout the PENF culture-based incubation experiment and were also present in various environmental samples examined in this study, we focused on these two OTUs to determine whether *Methanomassiliococcales* would significantly co-occur with given taxa (Figure 6C). OTU101 showed high non-random associations with an *Anaerovoracaceae* OTU (*Peptostreptococcales-Tissierellales*) (weight: 0.83) and a *Peptococcaceae* OTU (weight: 0.82). Several representatives from these lineages have been reported to ferment amino acids and to produce acetate or H₂ and to carry out a functional or syntrophic relationships with hydrogenotrophic methanogens that scavenge hydrogen to keep fermentation of fatty acids and alcohols energetically favorable (e.g., *Methanospirillum hungatei*) (Table S5) [118,120,133,134]. OTU21 showed strong non-random co-occurrences with 43 taxa (weights: 0.79–0.95). The six strongest non-random associations (weights: >0.9) occurred with taxa known to produce acetate and dihydrogen by fermentation: A *Dysgonomonadaceae* (weight: 0.96), two *Synergistaceae* (weights: 0.95 and 0.93), a *Ruminiclostridium* (weight: 0.95), a *Christensenellaceae* R-7 group (weight: 0.92) and a *Rikenellaceae* (weight: 0.91). Members of the *Synergistaceae* family and the *Ruminiclostridium* genus have been reported to be able to produce short-chain fatty acids from several proteins and peptides, and acetate from various complex substrates (Table S5) [135,136]. A representative of the genus *Methanobacterium*, potentially a competitor for H₂, was also strongly associated with OTU21 (weight: 0.91).

The results of these network analyses reinforce the hypothesis that *Methanomassiliococcales* of the 'free-living' clade appear to display strong co-occurrences with acetate- and H₂-producing bacteria, suggesting that they might maintain a metabolic interaction similar to that described between fermentative bacteria and other hydrogen-utilizing methanogens, by scavenging H₂ and promoting acetate production [136–138] (Figure 7).

Based on large-scale metagenome analysis, co-occurrence between the *Methanomassiliococcales* genera *Ca.* "Methanomethylphilus" and *Methanomassiliococcus* with various TMA-producing *Bacteria* in a GIT context was recently proposed, supporting the hypothesis of an interaction between these taxa and gut bacteria to earn TMA and H₂ [26]. However, metabolic interactions, such as those suggested here as a hypothesis, have also recently been highlighted between *Ca.* 'Methanomethylphilaceae' and various acetogenic *Bacteria* in another GIT context [111]. Thus, these results reinforce the idea that *Methanomassiliococcales* could develop relationships with acetogenic *Bacteria*, possibly to access acetate for cell growth in both GIT and environmental contexts [12,44]. Nevertheless, it cannot be excluded that another type of functional interaction would be at work between *Methanomassiliococcales* and their associated microbial cohorts. One or more other metabolite(s) produced by associated microorganisms could stimulate the growth of *Methanomassiliococcales* [24,26]. It also cannot be excluded that the interaction promoting the growth of *Methanomassiliococcales* is simply functional/metabolic. Finally, a strong metabolic relationship, close to syntrophy, based on H₂ moderation between *Methanomassiliococcales* and various fermentative bacteria could explain why the isolation of *Methanomassiliococcales* representatives in clonal culture, from natural environments, has not been successful so far.

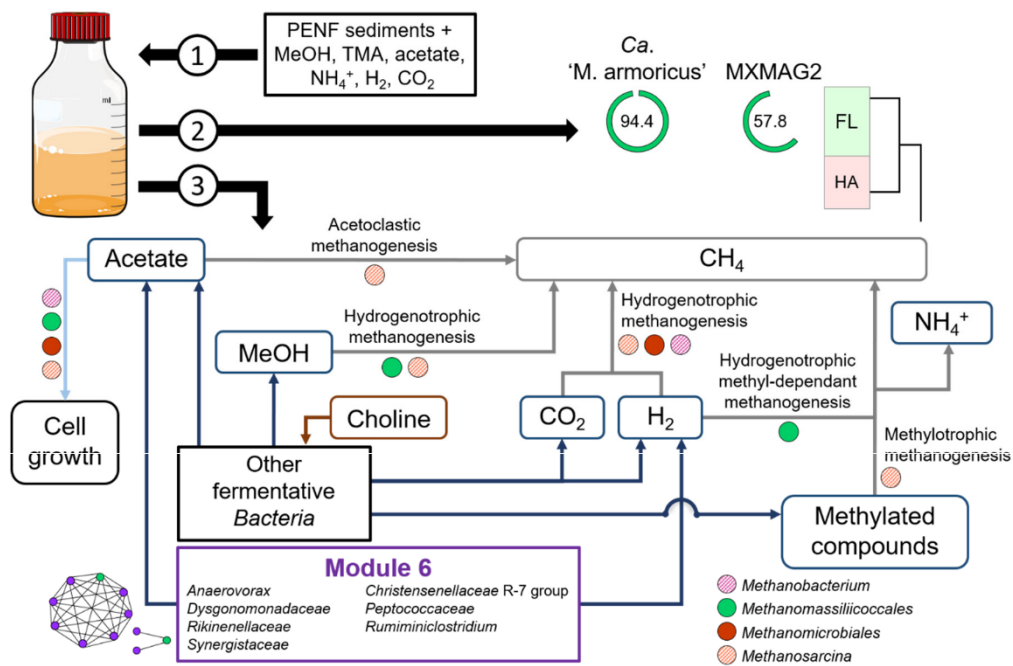


Figure 7. Schematic diagram representing the substrates amended to the original slurry in the culture-based incubation experiment PENF (1) which led to the reconstruction of two *Methanomassiliicoccales* MAGs (*Ca.* 'M. armoricus' MXMAG1' and MXMAG2) affiliated to the 'free-living' clade (2). Tentative reconstruction of the microbial metabolic interactions and substrate functions in this culture-based incubation experiment (3). The purple frame represents the module 6 of the co-occurrence network analysis, composed of reported fermentative *Bacteria* which maintained strong non-random co-occurrences with the dominant *Methanomassiliicoccales* OTUs sequences; FL: 'Free-living' clade; HA: 'Host-associated' clade; numbers in green rings indicate the completeness of the two *Methanomassiliicoccales* MAGs; dark blue arrows indicate fermentative products; grey arrows indicate the methanogenesis pathways probably occurring in this slurry; brown arrow indicates a fermentative substrate found in the enrichment slurry; light blue arrow indicates that acetate is potentially consumed for methanogens cell growth. The colored circles indicate the dominant methanogenic taxa during the enrichment process and their known metabolic properties. The hatched color indicates that this property is present in only a part of the taxa of the lineage.

4. Conclusions

Among the diverse marine and terrestrial ecosystem samples screened in this study, *Methanomassiliicoccales* never appeared to represent a significant fraction of the microbial diversity. Nevertheless, cultural approaches allowed us to obtain a slurry significantly enriched in *Methanomassiliicoccales*, from freshwater sediments. This enrichment allowed the reconstruction of a high-quality MAG (MXMAG1) corresponding to a new candidate genomic species named *Candidatus* 'Methanomassiliicoccus armoricus MXMAG1'. This genomic species seems to be present in several ecosystems and is affiliated to the 'free-living' clade of *Methanomassiliicoccales*. Analysis of its genome showed that the archaea from

and dihydrogen-producing bacteria previously reported to form syntrophic relationships with methanogens in animal GITs.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/1/30/s1>: Supplementary Material: Text S1. Pre-metabarcoding screening. Text S2. Origin and detailed description of environmental samples. Text S3. Total DNA extraction for metabarcoding screening. Text S4. Details of the barcoding and the phylogenetic analyses. Text S5. Media composition. Text S6. Quantification of substrates and metabolic products. Supplementary Tables and Figures: Figure S1. Trends in microbial diversity revealed by metabarcoding in DOUR (top) and MOUG2 (bottom) substrate-amended slurries over time. Figure S2. Evolution of the prokaryotic alpha-diversity during the incubation of the PENF sample, in the culture-based incubation experiment. Figure S3. Microbial diversity patterns revealed by metabarcoding (16S rRNA gene copy numbers) in the PENF substrate-amended slurry over time. Figure S4. Phylogenetic tree showing the relationships between the trimethylamine methyltransferases (*mttB*) sequences extracted from the metagenome (in red), and closest *mttB* sequences in public databases. Figure S5. Co-occurrence network reconstructed based on 16S rRNA gene sequencing data from bulk environmental samples, based on a Spearman rank's correlation between OTUs and calculated with a percolation threshold of 0.70. Table S1. Origin and location of the 86 environmental samples screened as a first approach for the research of *Methanomassiliicoccales*. Table S2. Abundance of *Methanomassiliicoccales*, other methanogens and total prokaryotic OTU 16S rRNA, representative sequences generated by metabarcoding sequencing in environmental samples and enrichment cultures PENF, DOUR, and MOUG2. Table S3. List of the *Methanomassiliicoccales* 16S rRNA gene sequences generated by metagenomics sequencing from the PENF enrichment culture (8th week of incubation), and 16S rRNA gene representative sequences of OTUs generated by metabarcoding sequencing. Table S4. Results of the quantification of *Methanomassiliicoccales* by qPCR in the different samples. Table S5. Taxonomic assignation of the taxa non-randomly associated with *Methanomassiliicoccales* OTUs and their reported metabolic features, within the PENF substrate-amended slurry.

Author Contributions: Conceptualization, M.C., K.A., G.B., L.T.; formal analysis, M.C., G.B., E.R., Y.M., M.A., A.S., K.A.; Writing—original draft preparation, M.C., K.A.; writing—review and editing, all co-authors; supervision, K.A., L.T.; funding acquisition, K.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was supported by grants from the French Ministry of Higher Education and Research, the Région Bretagne and the LabexMer (ANR-10-LABX-1) for MC. This work was supported by the program MERLIN Abyss, the “Laboratoire d’Excellence” LabexMER Axis 3 programs ENDIV and CULTIVENT (ANR-10-LABX-1), and the Sino-French IRP 1211 MicrobSea. Samples from the Mozambic Channel were provided in the frame of the PAMELA collaborative project (Ifremer/TOTAL SA).

Acknowledgments: The authors thank the co-chiefs, crew and shipboard scientific parties of the oceanographic expeditions that provide samples. We thank Jean-François Brugère for the discussions we had at the birth of this project. We are grateful to Antje Boetius, Marc Le Romancer, Sabrina Berlendis and Telesphore Sime-Ngando, who provided us samples from, respectively, the Håkon Mosby mud volcano, the Kerguelen archipelago, the Kryos Basin and the Pavin lake. We thank Valérie-Cueff-Gauchard and Guillaume Lannuzel for logistical and technical help with the qPCR. We thank Xavier Philippon and Ludovic Stephan for technical help with ionic chromatography and GC-FID analyses. LABGeM (CEA/Genoscope & CNRS UMR8030), the France Génomique and French Bioinformatics Institute national infrastructures (funded as part of Investissement d’Avenir program managed by Agence Nationale pour la Recherche, contracts ANR-10-INBS-09 and ANR-11-INBS-0013) are acknowledged for support within the MicroScope annotation platform.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ADP	Adenosine diphosphate
Ala	Alanine
ANI	Average Nucleotide Identity
ANOVA	Analysis of variance
Arg	Arginine
ASCII	American Standard Code for Information Interchange
ATP	Adenosine triphosphate
Asp	Asparagine
BIOM	Biological Observation Matrix
Bp	Base pair
BSA	Bovine Serum Albumin Acetylated
<i>Ca.</i>	<i>Candidatus</i>
CERS	Cation Electrolytically Regenerated Suppressor
CDS	Coding DNA sequences
CSS	Cumulative Sum Scaling
Cys	Cystine
DES	Deionized Elution Buffer
DDH	DNA-DNA Hybridization
Dfast	DDBJ Fast Annotation and Submission Tool
DHAB	Deep-sea Hypersaline Anoxic Brine
DHVEG-1	Deep-sea Hydrothermal Vent Euryarchaeota Group-1
DMA	Dimethylamine
DMS	Dimethylsulfide
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EB	Elution Buffer
FID	Flame Ionization Detector
GC	Gas Chromatograph
GGDC	Genome to Genome Distance Calculator
GIT	Gastro-Intestinal Tract
Glu	Glutamine
Gly	Glycine
GTDB-Tk	Genome Taxonomy Database Toolkit
HDR	HeteroDisulfide Reductase
His	Histidine
Ile	Isoleucine
iTOL	interactive Tree Of Life
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
Lys	Lysine
MAG	Metagenome-Assembled Genome
MaGe	MicroScope Microbial Genome Annotation and Analysis Platform
MBGD	Marine Benthic Group D
MCR	Methyl-Coenzyme M Reductase
MeOH	Methanol
MeSH	Methanethiol
MetaBAT	Metagenome Binning with Abundance and Tetra-nucleotide frequencies
MMA	Monomethylamine
MUSCLE	Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OTU	Operational Taxonomic Unit
PAMELA	Passive Margins Exploration Laboratories
PCI	Phenol Chloroform Isoamyl alcohol
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pyl	Pyrrolysine
Prokka	rapid prokaryotic genome annotation
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
Quast	Quality Assessment Tool

RAST	Rapid Annotations using Subsystems Technology
RDP	Ribosomal Database Project
rRNA	ribosomal Ribonucleic Acid
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SSU	Small Subunit
TE	Tris-Ethylene diamine tetra acetic acid
Thr	Threonine
TMA	Trimethylamine
tRNA	transfer RNA
Trp	Tryptophane
UniProtKB	Universal Protein resource Knowledgebase
Val	Valine

References

- Kirschke, S.; Bousquet, P.; Ciais, P.; Saunois, M.; Canadell, J.G.; Dlugokencky, E.J.; Bergamaschi, P.; Bergmann, D.; Blake, D.R.; Bruhwiler, L.; et al. Three decades of global methane sources and sinks. *Nat. Geosci.* **2013**, *6*, 813–823. [\[CrossRef\]](#)
- Chaban, B.; Ng, S.Y.M.; Jarrell, K.F. Archaeal habitats—From the extreme to the ordinary. *Can. J. Microbiol.* **2006**, *52*, 73–116. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Zinder, S.H. Physiological Ecology of Methanogens. In *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics*; Ferry, J.G., Ed.; Chapman & Hall: New York, NY, USA, 1993; ISBN 978-1-4615-2391-8. [\[CrossRef\]](#)
- Garcia, J.-L.; Patel, B.K.C.; Ollivier, B. Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic *Archaea*. *Anaerobe* **2000**, *6*, 205–226. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Parkes, R.J.; Cragg, B.; Rousell, E.; Webster, G.; Weightman, A.; Sass, H. A review of prokaryotic populations and processes in sub-seafloor sediments, including biosphere: Geosphere interactions. *Marine Geol.* **2014**, *352*, 409–425. [\[CrossRef\]](#)
- Evans, P.N.; Parks, D.H.; Chadwick, G.L.; Robbins, S.J.; Orphan, V.J.; Golding, S.D.; Tyson, G.W. Methane metabolism in the archaeal phylum *Bathyarchaeota* revealed by genome-centric metagenomics. *Science* **2015**, *350*, 434–438. [\[CrossRef\]](#)
- Mayumi, D.; Mochimaru, H.; Tamaki, H.; Yamamoto, K.; Yoshioka, H.; Suzuki, Y.; Kamagata, Y.; Sakata, S. Methane production from coal by a single methanogen. *Science* **2016**, *354*, 222–225. [\[CrossRef\]](#)
- Borrel, G.; Adam, P.S.; McKay, L.J.; Chen, L.-X.; Sierra-García, I.N.; Sieber, C.M.K.; Letourneur, Q.; Ghoulane, A.; Andersen, G.L.; Li, W.-J.; et al. Wide diversity of methane and short-chain alkane metabolisms in uncultured archaea. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 603–613. [\[CrossRef\]](#)
- Borrel, G.; Brugère, J.-F.; Gribaldo, S.; Schmitz, R.A.; Moissl-Eichinger, C. The host-associated archaeome. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 622–636. [\[CrossRef\]](#)
- Nobu, M.K.; Narihiro, T.; Kuroda, K.; Mei, R.; Liu, W.-T. Chasing the elusive *Euryarchaeota* class WSA2: Genomes reveal a uniquely fastidious methyl-reducing methanogen. *ISME J.* **2016**, *10*, 2478–2487. [\[CrossRef\]](#)
- Vanwonterghem, I.; Evans, P.N.; Parks, D.H.; Jensen, P.D.; Woodcroft, B.J.; Hugenholtz, P.; Tyson, G.W. Methylophilic methanogenesis discovered in the archaeal phylum *Verstraetearchaeota*. *Nat. Microbiol.* **2016**, *1*, 16170. [\[CrossRef\]](#)
- Adam, P.S.; Borrel, G.; Brochier-Armanet, C.; Gribaldo, S. The growing tree of *Archaea*: New perspectives on their diversity, evolution and ecology. *ISME J.* **2017**, *11*, 2407–2425. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Borrel, G.; Adam, P.S.; Gribaldo, S. Methanogenesis and the Wood—Ljungdahl Pathway: An Ancient, Versatile, and Fragile Association. *Genome Biol. Evol.* **2016**, *8*, 1706–1711. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Evans, P.N.; Boyd, J.A.; Leu, A.O.; Woodcroft, B.J.; Parks, D.H.; Hugenholtz, P.; Tyson, G.W. An evolving view of methane metabolism in the *Archaea*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 219–232. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Dridi, B.; Fardeau, M.-L.; Ollivier, B.; Raoult, D.; Drancourt, M. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **2012**, *62*, 1902–1907. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Borrel, G.; Gaci, N.; Peyret, P.; O'Toole, P.W.; Gribaldo, S.; Brugère, J.-F. Unique Characteristics of the Pyrrolysine System in the 7th Order of Methanogens: Implications for the Evolution of a Genetic Code Expansion Cassette. *Archaea* **2014**, *2014*, 1–11. [\[CrossRef\]](#)
- Kröniger, L.; Berger, S.; Welte, C.; Deppenmeier, U. Evidence for the involvement of two heterodisulfide reductases in the energy-conserving system of *Methanomassiliicoccus luminyensis*. *FEBS J.* **2016**, *283*, 472–483. [\[CrossRef\]](#)
- Borrel, G.; Harris, H.M.B.; Tottey, W.; Mihajlovski, A.; Parisot, N.; Peyretailade, E.; Peyret, P.; Gribaldo, S.; O'Toole, P.W.; Brugère, J.-F. Genome Sequence of “*Candidatus Methanomethylophilus alvus*” Mx1201, a Methanogenic Archaeon from the Human Gut Belonging to a Seventh Order of Methanogens. *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, 6944–6945. [\[CrossRef\]](#)
- Gaci, N.; Borrel, G.; Tottey, W.; O'Toole, P.W.; Brugere, J.-F. *Archaea* and the human gut: New beginning of an old story. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 16062–16078. [\[CrossRef\]](#)
- Iino, T.; Tamaki, H.; Tamazawa, S.; Ueno, Y.; Ohkuma, M.; Suzuki, K.; Igarashi, Y.; Haruta, S. *Candidatus Methanogramum caenicola*: A Novel Methanogen from the Anaerobic Digested Sludge, and Proposal of *Methanomassiliicoccales* fam. nov. and *Methanomassiliicoccales* ord. nov., for a Methanogenic Lineage of the Class *Thermoplasmata*. *Microbes Environ.* **2013**, *28*. [\[CrossRef\]](#)
- Paul, K.; Nonoh, J.O.; Mikulski, L.; Brune, A. “*Methanoplasmatales*,” *Thermoplasmatales*-Related *Archaea* in Termite Guts and Other Environments, Are the Seventh Order of Methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 8245–8253. [\[CrossRef\]](#)

22. Borrel, G.; O'Toole, P.W.; Harris, H.M.B.; Peyret, P.; Brugère, J.-F.; Gribaldo, S. Phylogenomic Data Support a Seventh Order of Methylophilic Methanogens and Provide Insights into the Evolution of Methanogenesis. *Genome Biol. Evol.* **2013**, *5*, 1769–1780. [CrossRef] [PubMed]
23. Söllinger, A.; Schwab, C.; Weinmaier, T.; Loy, A.; Tveit, A.T.; Schleper, C.; Urich, T. Phylogenetic and genomic analysis of *Methanomassiliicoccales* in wetlands and animal intestinal tracts reveals clade-specific habitat preferences. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2016**, *92*. [CrossRef] [PubMed]
24. Borrel, G.; McCann, A.; Deane, J.; Neto, M.C.; Lynch, D.B.; Brugère, J.-F.; O'Toole, P.W. Genomics and metagenomics of trimethylamine-utilizing *Archaea* in the human gut microbiome. *ISME J.* **2017**, *11*, 2059–2074. [CrossRef] [PubMed]
25. De la Cuesta-Zuluaga, J.; Spector, T.D.; Youngblut, N.D.; Ley, R.E. Genomic insights into adaptations of TMA-utilizing methanogens to diverse habitats including the human gut. *bioRxiv* **2020**. Unpublished work. [CrossRef]
26. Lang, K.; Schuldes, J.; Klingl, A.; Poehlein, A.; Daniel, R.; Brune, A. New Mode of Energy Metabolism in the Seventh Order of Methanogens as Revealed by Comparative Genome Analysis of “*Candidatus Methanoplasma termitum*”. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 1338–1352. [CrossRef]
27. Li, Y.; Leahy, S.C.; Jeyanathan, J.; Henderson, G.; Cox, F.; Altermann, E.; Kelly, W.J.; Lambie, S.C.; Janssen, P.H.; Rakonjac, J.; et al. The complete genome sequence of the methanogenic archaeon ISO4-H5 provides insights into the methylophilic lifestyle of a ruminal representative of the *Methanomassiliicoccales*. *Stand. Genomic Sci.* **2016**, *11*, 59. [CrossRef]
28. Mihajlovski, A.; Doré, J.; Levenez, F.; Alric, M.; Brugère, J.-F. Molecular evaluation of the human gut methanogenic archaeal microbiota reveals an age-associated increase of the diversity. *Environ. Microbiol. Rep.* **2010**, *2*, 272–280. [CrossRef]
29. Clemente, J.C.; Pehrsson, E.C.; Blaser, M.J.; Sandhu, K.; Gao, Z.; Wang, B.; Magris, M.; Hidalgo, G.; Contreras, M.; Noya-Alarcón, Ó.; et al. The microbiome of uncontacted Amerindians. *Sci. Adv.* **2015**, *1*, e1500183. [CrossRef]
30. Vanderhaeghen, S.; Lacroix, C.; Schwab, C. Methanogen communities in stools of humans of different age and health status and co-occurrence with bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **2015**, *362*. [CrossRef]
31. De León, K.B.; Gerlach, R.; Peyton, B.M.; Fields, M.W. Archaeal and bacterial communities in three alkaline hot springs in Heart Lake Geysers Basin, Yellowstone National Park. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*. [CrossRef]
32. Zhou, Z.; Chen, J.; Cao, H.; Han, P.; Gu, J.-D. Analysis of methane-producing and metabolizing archaeal and bacterial communities in sediments of the northern South China Sea and coastal Mai Po Nature Reserve revealed by PCR amplification of *mcrA* and *pmoA* genes. *Front. Microbiol.* **2015**, *5*. [CrossRef] [PubMed]
33. Li, W.; Guan, W.; Chen, H.; Liao, B.; Hu, J.; Peng, C.; Rui, J.; Tian, J.; Zhu, D.; He, Y. Archaeal communities in the sediments of different mangrove stands at Dongzhaigang, China. *J. Soils Sediments* **2016**, *16*, 1995–2004. [CrossRef]
34. Zhang, C.-J.; Pan, J.; Liu, Y.; Duan, C.-H.; Li, M. Genomic and transcriptomic insights into methanogenesis potential of novel methanogens from mangrove sediments. *Microbiome* **2020**, *8*, 94. [CrossRef] [PubMed]
35. Parada, A.E.; Needham, D.M.; Fuhrman, J.A. Every base matters: Assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ. Microbiol.* **2016**, *18*, 1403–1414. [CrossRef]
36. Apprill, A.; McNally, S.; Parsons, R.; Weber, L. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* **2015**, *75*, 129–137. [CrossRef]
37. Walters, W.; Hyde, E.R.; Berg-Lyons, D.; Ackermann, G.; Humphrey, G.; Parada, A.; Gilbert, J.A.; Jansson, J.K.; Caporaso, J.G.; Fuhrman, J.A.; et al. Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. *mSystems* **2016**, *1*. [CrossRef]
38. Escudé, F.; Auer, L.; Bernard, M.; Mariadassou, M.; Cauquil, L.; Vidal, K.; Maman, S.; Hernandez-Raquet, G.; Combes, S.; Pascal, G. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 1287–1294. [CrossRef]
39. McMurdie, P.J.; Holmes, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61217. [CrossRef]
40. Davis, N.M.; Proctor, D.M.; Holmes, S.P.; Relman, D.A.; Callahan, B.J. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome* **2018**, *6*, 226. [CrossRef]
41. Paulson, J.N.; Pop, M.; Bravo, H.C. metagenomeSeq: Statistical Analysis for Sparse High-Throughput Sequencing. Available online: <http://ccb.umd.edu/software/metagenomeSeq> (accessed on 20 November 2020).
42. Kemnitz, D.; Kolb, S.; Conrad, R. Phenotypic characterization of Rice Cluster III archaea without prior isolation by applying quantitative polymerase chain reaction to an enrichment culture. *Environ. Microbiol.* **2005**, *7*, 553–565. [CrossRef]
43. Kröninger, L.; Gottschling, J.; Deppenmeier, U. Growth Characteristics of *Methanomassiliicoccus luminyensis* and expression of methyltransferase encoding genes. *Archaea* **2017**, 2756573. [CrossRef] [PubMed]
44. Widdel, F.; Kohring, G.-W.; Mayer, F. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. *Arch. Microbiol.* **1983**, *134*, 286–294. [CrossRef]
45. Yakimov, M.M.; Cono, V.L.; Spada, G.L.; Bortoluzzi, G.; Messina, E.; Smedile, F.; Arcadi, E.; Borghini, M.; Ferrer, M.; Schmitt-Kopplin, P.; et al. Microbial community of the deep-sea brine Lake Kryos seawater—Brine interface is active below the chaotropy limit of life as revealed by recovery of mRNA. *Environ. Microbiol.* **2015**, *17*, 364–382. [CrossRef] [PubMed]
46. Webster, G.; Rinna, J.; Roussel, E.G.; Fry, J.C.; Weightman, A.J.; Parkes, R.J. Prokaryotic functional diversity in different biogeochemical depth zones in tidal sediments of the Severn Estuary, UK, revealed by stable-isotope probing. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2010**, *72*, 179–197. [CrossRef] [PubMed]

47. Criscuolo, A.; Brisse, S. AlienTrimmer removes adapter oligonucleotides with high sensitivity in short-insert paired-end reads. Commentary on Turner (2014) Assessment of insert sizes and adapter content in FASTQ data from NexteraXT libraries. *Front. Genet.* **2014**, *5*. [[CrossRef](#)]
48. Cruseo, M.R.; Alameldin, H.F.; Awad, S.; Boucher, E.; Caldwell, A.; Cartwright, R.; Charbonneau, A.; Constantinides, B.; Edverson, G.; Fay, S.; et al. The khmer software package: Enabling efficient nucleotide sequence analysis. *F1000Research* **2015**, *4*, 900. [[CrossRef](#)]
49. Li, D.; Luo, R.; Liu, C.-M.; Leung, C.-M.; Ting, H.-F.; Sadakane, K.; Yamashita, H.; Lam, T.-W. MEGAHIT v1.0: A fast and scalable metagenome assembler driven by advanced methodologies and community practices. *Methods* **2016**, *102*, 3–11. [[CrossRef](#)]
50. Nurk, S.; Meleshko, D.; Korobeynikov, A.; Pevzner, P.A. metaSPAdes: A new versatile metagenomic assembler. *Genome Res.* **2017**, *27*, 824–834. [[CrossRef](#)]
51. Wu, Y.-W.; Simmons, B.A.; Singer, S.W. MaxBin 2.0: An automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. *Bioinformatics* **2016**, *32*, 605–607. [[CrossRef](#)]
52. Kang, D.D.; Froula, J.; Egan, R.; Wang, Z. MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities. *PeerJ.* **2015**, *3*, e1165. [[CrossRef](#)]
53. Parks, D.H.; Imelfort, M.; Skennerton, C.T.; Hugenholtz, P.; Tyson, G.W. CheckM: Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* **2015**, *25*, 1043–1055. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Huang, X.; Madan, A. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. *Genome Res.* **1999**, *9*, 868–877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Seemann, T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2068–2069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Brettin, T.; Davis, J.J.; Disz, T.; Edwards, R.A.; Gerdes, S.; Olsen, G.J.; Olson, R.; Overbeek, R.; Parrello, B.; Pusch, G.D.; et al. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Vallenet, D.; Calteau, A.; Cruveiller, S.; Gachet, M.; Lajus, A.; Josso, A.; Mercier, J.; Renaux, A.; Rollin, J.; Rouy, Z.; et al. MicroScope in 2017: An expanding and evolving integrated resource for community expertise of microbial genomes. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D517–D528. [[CrossRef](#)]
58. Tanizawa, Y.; Fujisawa, T.; Nakamura, Y. DFAST: A flexible prokaryotic genome annotation pipeline for faster genome publication. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 1037–1039. [[CrossRef](#)]
59. Minh, B.Q.; Schmidt, H.A.; Chernomor, O.; Schrempf, D.; Woodhams, M.D.; von Haeseler, A.; Lanfear, R. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol. Biol. Evol.* **2020**, *37*, 1530–1534. [[CrossRef](#)]
60. Yoon, S.-H.; Ha, S.-M.; Kwon, S.; Lim, J.; Kim, Y.; Seo, H.; Chun, J. Introducing EzBioCloud: A taxonomically unified database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Micro.* **2017**, *67*, 1613–1617. [[CrossRef](#)]
61. Richter, M.; Rosselló-Móra, R.; Oliver Glöckner, F.; Peplies, J. JSpeciesWS: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics* **2016**, *32*, 929–931. [[CrossRef](#)]
62. Meier-Kolthoff, J.P.; Auch, A.F.; Klenk, H.-P.; Göker, M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinform.* **2013**, *14*, 60. [[CrossRef](#)]
63. Aires, T.; Moalic, Y.; Serrao, E.A.; Arnaud-Haond, S. Hologenome theory supported by cooccurrence networks of species-specific bacterial communities in siphonous algae (*Caulerpa*). *FEMS Microbiol. Ecol.* **2015**, *91*. [[CrossRef](#)]
64. Moalic, Y.; Desbruyères, D.; Duarte, C.M.; Rozenfeld, A.F.; Bachraty, C.; Arnaud-Haond, S. Biogeography Revisited with Network Theory: Retracing the History of Hydrothermal Vent Communities. *Syst. Biol.* **2012**, *61*, 127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Bastian, M.; Heymann, S.; Jacomy, M. Gephi: An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks. In Proceedings of the 3rd International AAAI Conference on Weblogs and Social Media, San Jose, CA, USA, 17–20 May 2009; Volume 8, pp. 361–362.
66. Blondel, V.D.; Guillaume, J.-L.; Lambiotte, R.; Lefebvre, E. Fast unfolding of communities in large networks. *J. Stat. Mech.* **2008**, *2008*, P10008. [[CrossRef](#)]
67. Lovley, D.R.; Klug, M.J. Methanogenesis from Methanol and Methylamines and Acetogenesis from Hydrogen and Carbon Dioxide in the Sediments of a Eutrophic Lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **1983**, *45*, 1310–1315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. King, G.M. Metabolism of Trimethylamine, Choline, and Glycine Betaine by Sulfate-Reducing and Methanogenic Bacteria in Marine Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **1984**, *48*, 719–725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Oren, A. Formation and breakdown of glycine betaine and trimethylamine in hypersaline environments. *Antonie van Leeuwenhoek* **1990**, *58*, 291–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Lomans, B.P.; Smolders, A.; Intven, L.M.; Pol, A.; Op, D.; Drift, C.V.D. Formation of dimethyl sulfide and methanethiol in anoxic freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 4741–4747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Hanna, E.; Keller, J.K.; Chang, D.; de Bruyn, W.; Zalman, C. The potential importance of methylated substrates in methane production within three northern Minnesota peatlands. *Soil Biol. Biochem.* **2020**, *150*, 107957. [[CrossRef](#)]
72. Watkins, A.J.; Roussel, E.G.; Webster, G.; Parkes, R.J.; Sass, H. Choline and N,N-Dimethylethanolamine as Direct Substrates for Methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 8298–8303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Merkel, A.Y.; Podosokorskaya, O.A.; Chernyh, N.A.; Bonch-Osmolovskaya, E.A. Occurrence, diversity, and abundance of methanogenic archaea in terrestrial hot springs of Kamchatka and Saõ Miguel Island. *Microbiology* **2015**, *84*, 577–583. [[CrossRef](#)]
74. Merkel, A.Y.; Podosokorskaya, O.A.; Sokolova, T.G.; Bonch-Osmolovskaya, E.A. Diversity of methanogenic archaea from the 2012 terrestrial hot spring (Valley of Geysers, Kamchatka). *Microbiology* **2016**, *85*, 342–349. [[CrossRef](#)]

75. Grodnitskaya, I.D.; Trusova, M.Y.; Syrtsov, S.N.; Koroban, N.V. Structure of microbial communities of peat soils in two bogs in Siberian tundra and forest zones. *Microbiology* **2018**, *87*, 89–102. [[CrossRef](#)]
76. Becker, K.W.; Elling, F.J.; Yoshinaga, M.Y.; Söllinger, A.; Urich, T.; Hinrichs, K.-U. Unusual Butane- and Pentanetriol-Based Tetraether Lipids in *Methanomassiliicoccus luminyensis*, a Representative of the Seventh Order of Methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 4505–4516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Biderre-Petit, C.; Jézéquel, D.; Dugat-Bony, E.; Lopes, F.; Kuever, J.; Borrel, G.; Viollier, E.; Fonty, G.; Peyret, P. Identification of microbial communities involved in the methane cycle of a freshwater meromictic lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2011**, *77*, 533–545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Chen, Y.; Mi, T.; Liu, Y.; Li, S.; Zhen, Y. Microbial Community Composition and Function in Sediments from the Pearl River Mouth Basin. *J. Ocean Univ. China* **2020**, *19*, 941–953. [[CrossRef](#)]
79. Borrel, G.; Parisot, N.; Harris, H.M.; Peyretailade, E.; Gaci, N.; Tottey, W.; Bardot, O.; Raymann, K.; Gribaldo, S.; Peyret, P.; et al. Comparative genomics highlights the unique biology of *Methanomassiliicoccales*, a *Thermoplasmatales*-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine. *BMC Genom.* **2014**, *15*, 679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Zinke, L.A.; Evans, P.N.; Schroeder, A.L.; Parks, D.H.; Varner, R.K.; Rich, V.I.; Tyson, G.W.; Emerson, J.B. Evidence for non-methanogenic metabolisms in globally distributed archaeal clades basal to the *Methanomassiliicoccales*. *Environ. Microbiol.* **2020**. [[CrossRef](#)]
81. Gascuel, O. BIONJ: An improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol. Biol. Evol.* **1997**, *14*, 685–695. [[CrossRef](#)]
82. Goodrich, J.K.; Waters, J.L.; Poole, A.C.; Sutter, J.L.; Koren, O.; Blekhan, R.; Beaumont, M.; Van Treuren, W.; Knight, R.; Bell, J.T.; et al. Human Genetics Shape the Gut Microbiome. *Cell* **2014**, *159*, 789–799. [[CrossRef](#)]
83. Xie, F.; Zhang, L.; Jin, W.; Meng, Z.; Cheng, Y.; Wang, J.; Zhu, W. Methane Emission, Rumen Fermentation, and Microbial Community Response to a Nitrooxy Compound in Low-Quality Forage Fed Hu Sheep. *Curr. Microbiol.* **2019**, *76*, 435–441. [[CrossRef](#)]
84. Azizi, A.; Kim, W.; Lee, J.H. Comparison of microbial communities during the anaerobic digestion of *Gracilaria* under mesophilic and thermophilic conditions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *32*, 158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Baker, F.D.; Papiska, H.R.; Campbell, L.L. Choline fermentation by *Desulfovibrio desulfuricans*. *J. Bacteriol.* **1962**, *84*, 973–978. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Du, C.; Xu, C.-Y.; Jian, J.-S.; He, W.-X.; Hou, L.; Geng, Z.-C. Seasonal dynamics of bacterial communities in a *Betula albosinensis* forest. *Eur. J. Soil Sci.* **2018**, *69*, 666–674. [[CrossRef](#)]
87. Bhatnagar, L.; Jain, M.K.; Aubert, J.-P.; Zeikus, J.G. Comparison of Assimilatory Organic Nitrogen, Sulfur, and Carbon Sources for Growth of *Methanobacterium* Species. *Appl. Environ. Microbiol.* **1984**, *48*, 785–790. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Richter, M.; Rosselló-Móra, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 19126–19131. [[CrossRef](#)]
89. Wayne, L.G.; Brenner, D.J.; Colwell, R.R.; Grimont, P.A.D.; Kandler, O.; Krichevsky, M.I.; Moore, L.H.; Moore, W.E.C.; Murray, R.G.E.; Stackebrandt, E.; et al. Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **1987**, *37*, 463–464. [[CrossRef](#)]
90. Bowers, R.M.; Kyrpides, N.C.; Stepanauskas, R.; Harmon-Smith, M.; Doud, D.; Reddy, T.B.K.; Schulz, F.; Jarett, J.; Rivers, A.R.; Eloe-Fadros, E.A.; et al. Minimum information about a single amplified genome (MISAG) and a metagenome-assembled genome (MIMAG) of bacteria and archaea. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 725–731. [[CrossRef](#)]
91. Parks, D.H.; Rinke, C.; Chuvochina, M.; Chaumeil, P.-A.; Woodcroft, B.J.; Evans, P.N.; Hugenholtz, P.; Tyson, G.W. Recovery of nearly 8000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*, 1533–1542. [[CrossRef](#)]
92. Stackebrandt, E.; Ebers, J. Taxonomic parameters revisited: Tarnished gold standards. *Microbiol. Today* **2006**, *33*, 152–155.
93. Yarza, P.; Yilmaz, P.; Pruesse, E.; Glöckner, F.O.; Ludwig, W.; Schleifer, K.-H.; Whitman, W.B.; Euzéby, J.; Amann, R.; Rosselló-Móra, R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 635–645. [[CrossRef](#)]
94. Krzycki, J.A. Function of genetically encoded pyrrolysine in corrinoid-dependent methylamine methyltransferases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 484–491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Kröninger, L.; Steiniger, F.; Berger, S.; Kraus, S.; Welte, C.U.; Deppenmeier, U. Energy conservation in the gut microbe *Methanomassiliicoccus luminyensis* is based on membrane-bound ferredoxin oxidation coupled to heterodisulfide reduction. *FEBS J.* **2019**, *286*, 3831–3843. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Nicolaus, B.; Gambacorta, A.; Basso, A.L.; Riccio, R.; De Rosa, M.; Grant, W.D. Trehalose in *Archaeobacteria*. *Syst. Appl. Microbiol.* **1988**, *10*, 215–217. [[CrossRef](#)]
97. Elbein, A.D.; Pan, Y.T.; Pastuszak, I.; Carroll, D. New insights on trehalose: A multifunctional molecule. *Glycobiology* **2003**, *13*, 17R–27R. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Graham, D.E.; Xu, H.; White, R.H. *Methanococcus jannaschii* Uses a Pyruvoyl-Dependent Arginine Decarboxylase in Polyamine Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 23500–23507. [[CrossRef](#)]
99. Tolbert, W.D.; Graham, D.E.; White, R.H.; Ealick, S.E. Pyruvoyl-Dependent Arginine Decarboxylase from *Methanococcus jannaschii*: Crystal Structures of the Self-Cleaved and S53A Proenzyme Forms. *Structure* **2003**, *11*, 285–294. [[CrossRef](#)]
100. Richard, H.T.; Foster, J.W. Acid resistance in *Escherichia coli*. *Adv. Appl. Microbiol.* **2003**, *52*, 167–186.

101. Sugiyama, Y.; Nakamura, A.; Matsumoto, M.; Kanbe, A.; Sakanaka, M.; Higashi, K.; Igarashi, K.; Katayama, T.; Suzuki, H.; Kurihara, S. A Novel Putrescine Exporter SapBCDF of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 26343–26351. [[CrossRef](#)]
102. Scherer, P.; Kneifel, H. Distribution of polyamines in methanogenic bacteria. *J. Bacteriol.* **1983**, *154*, 1315–1322. [[CrossRef](#)]
103. Michael, A.J. Polyamine function in archaea and bacteria. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 18693–18701. [[CrossRef](#)]
104. Sierra-Alvarez, R.; Cortinas, I.; Yenal, U.; Field, J.A. Methanogenic Inhibition by Arsenic Compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 5688–5691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Jomova, K.; Jenisova, Z.; Feszterova, M.; Baros, S.; Liska, J.; Hudecova, D.; Rhodes, C.J.; Valko, M. Arsenic: Toxicity, oxidative stress and human disease. *J. Appl. Toxicol.* **2011**, *31*, 95–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Chen, J.; Rosen, B. Biosensors for Inorganic and Organic Arsenicals. *Biosensors* **2014**, *4*, 494–512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Field, J.A.; Sierra-Alvarez, R.; Cortinas, I.; Feijoo, G.; Moreira, M.T.; Kopplin, M.; Gandolfi, A.J. Facile reduction of arsenate in methanogenic sludge. *Biodegradation* **2004**, *15*, 185–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Liu, Z.; Rensing, C.; Rosen, B.P. Toxicity: Resistance Pathways for Metalloids and Toxic Metals. In *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, WS, UK, 2013; pp. 1–13. ISBN 978-1-119-95143-8. [[CrossRef](#)]
109. Hu, W.; Pan, J.; Wang, B.; Guo, J.; Li, M.; Xu, M. Metagenomic insights into the metabolism and evolution of a new *Thermoplasmata* order (*Candidatus Gimiplasmatales*). *Environ. Microbiol.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Bentley, R.; Chasteen, T.G. Microbial Methylation of Metalloids: Arsenic, Antimony, and Bismuth. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, *66*, 250–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Podar, M.; Gilmour, C.C.; Brandt, C.C.; Soren, A.; Brown, S.D.; Crable, B.R.; Palumbo, A.V.; Somenahally, A.C.; Elias, D.A. Global prevalence and distribution of genes and microorganisms involved in mercury methylation. *Sci. Adv.* **2015**, *1*, e1500675. [[CrossRef](#)]
112. Parks, J.M.; Johs, A.; Podar, M.; Bridou, R.; Hurt, R.A.; Smith, S.D.; Tomanicek, S.J.; Qian, Y.; Brown, S.D.; Brandt, C.C.; et al. The Genetic Basis for Bacterial Mercury Methylation. *Science* **2013**, *339*, 1332–1335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Ma, M.; Du, H.; Wang, D. Mercury methylation by anaerobic microorganisms: A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2019**, *49*, 1893–1936. [[CrossRef](#)]
114. Gies, E.A.; Konwar, K.M.; Beatty, J.T.; Hallam, S.J. Illuminating Microbial Dark Matter in Meromictic Sakinaw Lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 6807–6818. [[CrossRef](#)]
115. Kadnikov, V.V.; Mardanov, A.V.; Beletsky, A.V.; Karnachuk, O.V.; Ravin, N.V. Genome of the candidate phylum *Aminicenantes* bacterium from a deep subsurface thermal aquifer revealed its fermentative saccharolytic lifestyle. *Extremophiles* **2019**, *23*, 189–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Liu, X.; Li, M.; Castelle, C.J.; Probst, A.J.; Zhou, Z.; Pan, J.; Liu, Y.; Banfield, J.F.; Gu, J.-D. Insights into the ecology, evolution, and metabolism of the widespread *Woesearchaeota* lineages. *Microbiome* **2018**, *6*, 102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Martínez-Álvaro, M.; Auffret, M.D.; Stewart, R.D.; Dewhurst, R.J.; Duthie, C.-A.; Rooke, J.A.; Wallace, R.J.; Shih, B.; Freeman, T.C.; Watson, M.; et al. Identification of Complex Rumen Microbiome Interaction Within Diverse Functional Niches as Mechanisms Affecting the Variation of Methane Emissions in Bovine. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Liu, P.; Klose, M.; Conrad, R. Temperature effects on structure and function of the methanogenic microbial communities in two paddy soils and one desert soil. *Soil Biol. Biochem.* **2018**, *124*, 236–244. [[CrossRef](#)]
119. Drake, H.L.; Gössner, A.S. *Sporomusa*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2015; pp. 1–7. ISBN 978-1-118-96060-8. [[CrossRef](#)]
120. Schink, B. *Anaerovorax*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2015; pp. 1–3. ISBN 978-1-118-96060-8. [[CrossRef](#)]
121. Zhang, S.; Chang, J.; Lin, C.; Pan, Y.; Cui, K.; Zhang, X.; Liang, P.; Huang, X. Enhancement of methanogenesis via direct interspecies electron transfer between *Geobacteraceae* and *Methanosaetaceae* conducted by granular activated carbon. *Bioresour. Technol.* **2017**, *245*, 132–137. [[CrossRef](#)]
122. Snell-Castro, R.; Méndez-Acosta, H.O.; Arreola-Vargas, J.; González-Álvarez, V.; Pintado-González, M.; González-Morales, M.T.; Godon, J.J. Active prokaryotic population dynamics exhibit high correlation to reactor performance during methane production from acid hydrolysates of *Agave tequilana* var. *azul bagasse*. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *126*, 1618–1630. [[CrossRef](#)]
123. Sakai, S.; Ehara, M.; Tseng, I.-C.; Yamaguchi, T.; Bräuer, S.L.; Cadillo-Quiroz, H.; Zinder, S.H.; Imachi, H. *Methanolinea mesophila* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from rice field soil, and proposal of the archaeal family *Methanoregulaceae* fam. nov. within the order *Methanomicrobiales*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2012**, *62*, 1389–1395. [[CrossRef](#)]
124. Suzuki, D.; Li, Z.; Cui, X.; Zhang, C.; Katayama, A. Reclassification of *Desulfobacterium anilini* as *Desulfatiglans anilini* comb. nov. within *Desulfatiglans* gen. nov., and description of a 4-chlorophenol-degrading sulfate-reducing bacterium, *Desulfatiglans parachlorophenolica* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2014**, *64*, 3081–3086. [[CrossRef](#)]
125. Zinder, S.; Bräuer, S. *Methanoregula*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2016; pp. 1–8. ISBN 978-1-118-96060-8. [[CrossRef](#)]
126. Morotomi, M.; Nagai, F.; Watanabe, Y. Description of *Christensenella minuta* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, which forms a distinct branch in the order *Clostridiales*, and proposal of *Christensenellaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2012**, *62*, 144–149. [[CrossRef](#)]

127. Graf, J. The Family *Rikenellaceae*. In *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*; Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2014; pp. 857–859. ISBN 978-3-642-38954-2. [[CrossRef](#)]
128. Lee, Y.-J.; Wiegel, J. *Gracilibacteraceae*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2017; pp. 1–3. ISBN 978-1-118-96060-8. [[CrossRef](#)]
129. Shiratori-Takano, H.; Ueda, K. *Lutispora*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2017; pp. 1–6. ISBN 978-1-118-96060-8. [[CrossRef](#)]
130. Murakami, T.; Segawa, T.; Takeuchi, N.; Sepúlveda, G.B.; Labarca, P.; Kohshima, S.; Hongoh, Y. Metagenomic analyses highlight the symbiotic association between the glacier stonefly *Andiperla willinki* and its bacterial gut community. *Environ. Microbiol.* **2018**, *20*, 4170–4183. [[CrossRef](#)]
131. Lee, J.; Koo, T.; Yulisa, A.; Hwang, S. Magnetite as an enhancer in methanogenic degradation of volatile fatty acids under ammonia-stressed condition. *J. Environ. Manag.* **2019**, *241*, 418–426. [[CrossRef](#)]
132. Waters, J.L.; Ley, R.E. The human gut bacteria *Christensenellaceae* are widespread, heritable, and associated with health. *BMC Biol.* **2019**, *17*, 83. [[CrossRef](#)]
133. Müller, N.; Worm, P.; Schink, B.; Stams, A.J.M.; Plugge, C.M. Syntrophic butyrate and propionate oxidation processes: From genomes to reaction mechanisms. *Environ. Microbiol. Rep.* **2010**, *2*, 489–499. [[CrossRef](#)]
134. Chojnacka, A.; Szczesny, P.; Błaszczyk, M.K.; Zielenkiewicz, U.; Detman, A.; Salamon, A.; Sikora, A. Noteworthy Facts about a Methane-Producing Microbial Community Processing Acidic Effluent from Sugar Beet Molasses Fermentation. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0128008. [[CrossRef](#)]
135. Vartoukian, S.R.; Palmer, R.M.; Wade, W.G. The division “*Synergistes*”. *Anaerobe* **2007**, *13*, 99–106. [[CrossRef](#)]
136. Yutin, N.; Galperin, M.Y. A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-Negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environ. Microbiol.* **2013**, *15*, 2631–2641. [[CrossRef](#)]
137. McInerney, M.J.; Struchtemeyer, C.G.; Sieber, J.; Mouttaki, H.; Stams, A.J.M.; Schink, B.; Rohlin, L.; Gunsalus, R.P. Physiology, Ecology, phylogeny, and genomics of microorganisms capable of syntrophic metabolism. *Ann. NY Acad. Sci.* **2008**, *1125*, 58–72. [[CrossRef](#)]
138. Sieber, J.R.; McInerney, M.J.; Gunsalus, R.P. Genomic Insights into Syntrophy: The Paradigm for Anaerobic Metabolic Cooperation. *Annu. Rev. Microbiol.* **2012**, *66*, 429–452. [[CrossRef](#)]



Supplementary Material

New insights into the ecology and physiology of *Methanomassiliicoccales* from terrestrial and aquatic environments.

Marc Cozannet¹, Guillaume Borrel², Erwan Roussel¹, Yann Moalic¹, Maxime Allieux¹, Amandine Sanvoisin¹, Laurent Toffin¹ & Karine Alain^{1,*}

¹ Univ Brest, CNRS, IFREMER, IRP 1211 MicrobSea, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes LM2E, UMR 6197, IUEM, Rue Dumont d'Urville, F-29280 Plouzané, France; Marc.Cozannet@univ-brest.fr (M.C.); Erwan.Roussel@ifremer.fr (E.R.); Yann.Moalic@univ-brest.fr (Y.M.); Maxime.Allieux@univ-brest.fr (M.A.); Laurent.Toffin@ifremer.fr (L.T.); Karine.Alain@univ-brest.fr (K.A.)

² Department of Microbiology, Unit Evolutionary Biology of the Microbial Cell, Institut Pasteur, Paris, France; guillaume.borrel@pasteur.fr (G.B.)

* Correspondence: Karine.Alain@univ-brest.fr; Tel.: +33-0298-4988-53

Received: date; Accepted: date; Published: date

Supplementary Text

Text S1. Pre-metabarcoding screening

Section 1.1. Total DNA extraction

In order to search for natural samples containing *Methanomassiliicoccales*, an initial large-scale molecular screening was carried out on a wide range of anoxic samples (86 in total).

DNA extractions were carried out in triplicate with a protocol adapted to each type of matrix. Two types of DNA extraction procedures have been implemented depending on the nature of the matrices: (i) Nucleic acids were extracted from sediments, mud and peatland soils by combining a mechanical lysis step to a commercial DNA extraction kit for soil type matrices. The first extraction step consisted of mechanical cell lysis of 0.5 g of sample by bead-beating (5500 rpm, 30 s), using the Precellys 24[®] tissue homogenizer (Bertin instruments, France). Then, the FastDNA[™] SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Thermo Fisher Scientific) was used following manufacturer's instructions. In order to optimize the precipitation of small amounts of DNA and to improve extraction yields, 10 µl of linear acrylamide (5 mg ml⁻¹, Ambion, Thermo Fisher Scientific) was added to the sample. After a chemical lysis step, DNA was purified on a silica column and eluted in 50 µl of DES buffer. (ii) Nucleic acids were extracted from liquid samples (brines, lake waters, geothermal hot spring fluids) using a phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25/24/1; pH 8.0; Sigma-Aldrich) (PCI) DNA extraction protocol. Fifteen ml of sample were first centrifuged (20 min, 13 000 rpm, 4 °C) to pellet the cells. Cell pellets were then resuspended in 1 ml TE-Na-1X lysis buffer, with 10 µl of linear acrylamide (5 mg ml⁻¹). Cell lysis and deproteinization were performed by addition of 100 µl sarkosyl (10% w/v), 100 µl sodium dodecyl sulfate (SDS; 10% w/v) and 20 µl proteinase K (20 mg ml⁻¹, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France), followed by a 3h incubation at 55 °C in a water bath. After incubation, 1 volume of PCI was added to 1 volume of lysis solution, solutions were mixed by gentle inversion and then centrifuged (15 min, 13 000 rpm, 4 °C) to extract the nucleic acids. After centrifugation, the upper aqueous phase was collected and extracted with chloroform. After centrifugation (15 min, 13 000 rpm, 4 °C), the upper aqueous phase was collected and nucleic acid precipitation was carried out by addition of 40 µl sodium acetate (3 M, pH 5.2) and 0.8 volume of isopropanol. In order to favour nucleic acids precipitation, each tube was placed 30 min at -80 °C. After thawing at room temperature, the solutions were centrifuged (20 min, 13 000 rpm, 4 °C) to collect DNA pellets and these were washed with 70% (v/v) ethanol. Finally, DNA were resuspended in 50 µl TE-1X buffer.

Section 1.2. PCR amplifications of regions of 16S rRNA gene sequences with *Methanomassiliicoccales*-specific primers

In order to select samples containing *Methanomassiliicoccales*, a 478 bp fragment of the V4 region of *Methanomassiliicoccales* 16S rRNA gene was selectively amplified using primers AS1_Fw (5'-CAG CAG TCG CGA AAA CTT C-3') [1] and AS2_Rv mod. (5'-AAC AAC TTC TCT CCG GCA CT-3') (this study) (this primer corresponds to a modified version of the AS2 primer described elsewhere [1]). These *Methanomassiliicoccales*-targeting primers specificity were retested *in silico* using online software's ProbeMatch (<https://rdp.cme.msu.edu/probematch/search.jsp>) (RDP2, ribosomal database project 2) and TestPrime (<https://www.arb-silva.de/search/testprime/>) (against the 132 version of the SILVA SSU database). This primer pair covered 87% of the diversity of correctly affiliated *Methanomassiliicoccales* sequences of the SILVA 138 SSU database without any mismatch, and 100% of the *Methanomassiliicoccales* sequences by allowing 1 mismatch. *In vitro* analyses were also performed by using genomic DNA from *Methanomassiliicoccus luminyensis* B10^T (DSM 25720) strain (positive control) and two negative controls: *Methanococcoides vulcani* SLH33^T (DSM 26966) strain (a methylophilic methanogenic *Archaea* belonging to the *Methanosarcinales* [2]) and *Thermococcus* sp. strain (an archaeal species belonging to the non-methanogenic order *Thermococcales*) [3], respectively. Positive amplifications were obtained only when using *M. luminyensis* genomic DNA as a template. The reaction mixtures used for DNA amplifications, carried out in triplicates, contained, for a volume of 25 µl (for one reaction): 15.86 µl molecular biology grade water, 5 µl buffer (10× GreenGoTaq® buffer, Promega, USA), 1 µl of each primer (at 10 mM), 0.5 µl dNTPs (10 mM of each primer), 0.12 µl GoTaq® G2 DNA Polymerase (5 U µl⁻¹, Promega), 0.12 µl Bovine Serum Albumin Acetylated (BSA, 10 mg ml⁻¹, Promega), 0.4 µl MgCl₂ (10 mM, Thermo Fisher Scientific™) and 1 µl of DNA template. Amplifications were performed in a PCR apparatus (GeneAmp®, PCR System 9700, Thermo Fisher Scientific™) using the following cycling program: 95 °C for 5 min, 34 to 40 cycles of 95 °C for 1 min, 60 °C for 1 min, 72 °C for 1 min, and a final extension period of 6 min at 72 °C. Genomic DNA solutions from *Methanomassiliicoccus luminyensis* were used as positive controls. Amplicons quality were then checked by electrophoretic migration. Twenty-two samples that led to a positive amplification of the sequences of interest (in ≥ 2 replicates) were selected for further investigation.

Text S2. Origin and detailed description of environmental samples

The eighty-six samples collected from anoxic zones of various ecosystems (marine sediments, deep-sea hydrothermal vents, marine pockmarks, submarine mud volcano, deep-sea hypersaline anoxic brine, peatland soils, lakes, hot springs, river sediments) from 40 worldwide locations, for the pre-screening stage are described in Table A1.

The 22 samples used for an in-depth study were the following ones: (i) five samples, collected in January 2017, were originating from the ombrotrophic Mougau peatland area (Brittany, France). They consisted of four peatland soil samples (MOUG1–MOUG4) collected in January 2017, in the peat surface layer (0–10 cm), and one sediment sample from a freshwater stream (MOUG5) collected in the upper sediment (5–10 cm); (ii) four samples were collected from the center of the deep-sea methane-emitting Håkon Mosby mud volcano, located at 1280 m water depth, in the Barents Sea (Arctic Ocean), during the 2009 ARK-XXIV/2 (PS74) oceanographic cruise. Sedimentary horizons selected after the pre-screening stage were the 0–1 cm (HM1), 1–6 cm (HM2) and 6–11 cm (HM3) sediments from the PS74/168 core, and the 1–6 cm (HM4) surface layer sediments from the PS74/189 core; (iii) three anoxic samples were collected in December 2018, in the water column of the meromictic crater Lake Pavin (Auvergne, France) at 60, 70 and 80 m water depth corresponding, respectively, to the mixolimnion-chemocline interface (PAV60), the chemocline-subchemocline interface (PAV70) and the subchemocline water (PAV80) [4]; (iv) one geothermal hot spring sediment sample was collected, in November 2013, from the Xiada reservoir of the Xiamen botanical garden (China) (XIA); (v) one geothermal spring sediment sample was taken from an ephemeral hot spring located in the tidal sway zone on the beach called Feu de Joie, at the Kerguelen islands (Kerguelen

archipelago, France, Indian Ocean) (KERG), in December 2016; (vi) two samples were originating from the athalassic (MgCl₂-rich) deep-sea hypersaline anoxic brine (DHAB) Kryos, in the Mediterranean Sea. They were respectively collected from layers at 150 g l⁻¹ salts (mainly MgCl₂) (KRY150) and 238 g l⁻¹ (mainly MgCl₂) (KRY238) [5], in May 2016; (vii) three sediments samples were collected in a pockmark field during the 2015 PAMELA-MOZ4 oceanographic survey in the Mozambique Channel (off the Madagascar island). Those samples consisted in the first 2–4, 4–6 and 6–11 cm layers of the CSF4 sediment cores referenced as MOZ1, MOZ2 and MOZ3, respectively; (viii) one surficial marine sediment sample (15–20 cm) was collected from the Dourduff-en-Mer marine bay (DOUR), in February 2017, on the coast of Brittany (English Channel, France); (ix) one deep-sea sediment sample was collected from the South West Indian Ocean (COMRA) during the April 2015 COMRA oceanographic cruise; (x) finally, a freshwater sediment sample was taken from a stream (0–10 cm) feeding the coastal river Penfeld in February 2017 (PENF) (Brittany, France). Given that the ultimate goal of this study was to grow *Methanomassiliicoccales*, all the investigated samples were stored at 4 °C.

Text S3. Total DNA extraction for metabarcoding screening

The standardized DNA extraction protocol which was used on the 22 samples selected for an in-depth characterization combined mechanical and chemical lysis. It was applied in triplicate to each sample (+ one negative control). In summary, each DNA extraction was performed onto 0.5 g of environmental matrix. A mechanical lysis of the sample was first carried out by bead-beating (5000 rpm, 15 s), using the Precellys 24[®] tissue homogenizer (Bertin instruments, France), in a FastDNA[®] Lysing Matrix tube E (FastDNA[®] SPIN kit for soil, MP Biomedicals) containing 1 ml of TE-Na-1× lysis buffer (100 mM Tris, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0) in addition to the sample. Then, the lysate supernatants were subjected to a DNA extraction protocol combining chemical and enzymatic lysis procedures, and a classical phenol/chloroform/isoamyl alcohol (PCI: 25/24/1; pH 8.0) extraction of nucleic acids, as described elsewhere [6]. Nucleic acids were then precipitated with 0.8 volumes of icecold isopropanol, in the presence of 400 µl Na-acetate (3M) and 5 µl linear acrylamide (Ambion, Applied Biosystems). Elution was performed in 40 µl EB buffer (Qiagen) before pooling. DNA extractions from enrichment cultures were performed as described above, except that the mechanical lysis stage has been omitted. For these extracts, elution was performed in 100 µl EB buffer.

Nucleic acid solution quality was determined using the NanoDrop[™] 8000 (Thermo Scientific) spectrophotometer. Double-strand DNA concentration was measured using the kit Quantifluor[™] dsDNA system (Promega), following the manufacturer's instructions.

Text S4. Details of the barcoding and the phylogenetic analyses

Section 4.1. FASTQ generation

Amplicons from bulk samples and enrichment cultures were generated by the company Molecular Research-MrDNA (Shallowater, Texas, USA), using the Illumina MiSeq (2 × 300 bp, paired-end reads) technology, with the kits and according to the manufacturer's instructions. FASTQ were generated using the "Combine FASTA and QUAL into FASTQ (Galaxy v. 1.0.1)" [7] tool on the FROGS pipeline. FASTA and Quality Score files were joined according to a mapping file and the ASCII force quality score to create a single FASTQ block for each read. The quality of raw sequence data were then checked using the "FastQC Read Quality reports" (v. 0.11.4) tool (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

Section 4.2. OTU generation and comparison

Once data from enrichment cultures were generated by the company and in order to facilitate OTU comparison between prokaryotic diversity in bulk samples and in enrichment cultures, raw FASTQ files from both sequencing runs were merged into a unique file before processing as described

in 2.3. *Sequencing and sequence analysis* (main manuscript). This resulted on the generation of a unique BIOM file comprising representative 16S rRNA OTU abundance, and taxonomy into each samples.

Section 4.3. Consensus sequences workflow

Extraction of potential reagent contaminants and normalization of representative 16S rRNA gene OTUs were performed using the R studio program (v. 1.3.5001), the phyloseq (v. 1.28.0 R), the decontam (v. 1.4.0) and the metagenomSeq (v. 1.26.3) packages. As the metadata between the bulk samples and in the enrichment cultures were different, two distinct sequence treatments were performed from the previously generated single BIOM file. The BIOM files were converted to a .csv file before being implemented in the R program. Our scripts were based on workflows described elsewhere (<https://bioconductor.org/help/course-materials/2017/BioC2017/Day1/Workshops/Microbiome/MicrobiomeWorkflowII.html> and https://benjineb.github.io/decontam/vignettes/decontam_intro.html, respectively). Workflow used to decontaminate and normalize 16S rRNA gene sequences representatives of the OTUs is listed below. Additional information about the script is preceded by a "#".

Step 1. Loading tables into R program

```
setwd("File_path")
OTUtable <- read.table("OTUs_file.csv",header = T, row.names = 1, sep = ";")
Metadata <- read.table("Bulk_Metadata_file.csv", header = T, row.names = 1, sep = ";")
Taxo <- read.table("Taxonomy_Table_file.csv", header = T, row.names = 1, sep = ";")
Taxo <- as.matrix(Taxo)
```

Step 2. Create a Phyloseq object

```
library(phyloseq)
OTU <- otu_table(OTUtable, taxa_are_rows = TRUE)
Meta <- sample_data(Metadata)
Tax <- tax_table(Taxo)
Phymatrice <- phyloseq(OTU, Meta, Tax)
Phymatrice
#Here, "Phymatrice" refers to the Phyloseq object.
```

Step 3. Remove unwanted taxa

Potential contaminant taxa such as *Chloroplast*, *Mitochondria*, *Eukaryota* or unclassified Kingdom level taxa are removed.

```
subset_taxa(Phymatrice, Order!="Chloroplast" )
Phy <- subset_taxa(Phymatrice, Order!="Chloroplast" )
Phy2 <- subset_taxa(Phy, Kingdom!="Unclassified" )
Phy3 <- subset_taxa(Phy2, Family!="Mitochondria" )
Phymatrice <- subset_taxa(Phy3, Kingdom!="Eukaryota" )
Phymatrice
```

Step 4. Sequence decontamination using the "Decontam" tool

```
# Library size inspection
library(ggplot2)
library(decontam)
df <- as.data.frame(sample_data(Phymatrice))
df$LibrarySize <- sample_sums(Phymatrice)
df <- df[order(df$LibrarySize),]
df$Index <- seq(nrow(df))
ggplot(data=df, aes(x=Index, y=LibrarySize, color=Sample_or_Control)) + geom_point()
```


Contaminant identification – Frequency approach, based on Picogreen technology DNA assay.

```
contamdf.freq <- isContaminant(Phymatrice, method="frequency", conc="quant_reading")
head(contamdf.freq)
table(contamdf.freq$contaminant)
head(which(contamdf.freq$contaminant))
plot_frequency(Phymatrice, taxa_names(Phymatrice)[c(1,3)], conc="quant_reading") + xlab("DNA
Concentration (PicoGreen fluorescent intensity)")
set.seed(100)
plot_frequency(Phymatrice, taxa_names(Phymatrice)[sample(which(contamdf.freq$contaminant),3)
], conc="quant_reading") + xlab("DNA Concentration (PicoGreen fluorescent intensity)")
Phymatrice.noncontam <- prune_taxa(!contamdf.freq$contaminant, Phymatrice)
Phymatrice.noncontam = filter_taxa(Phymatrice.noncontam, function(x) sum(x) > 0, TRUE)
Phymatrice <- Phymatrice.noncontam
```

Step 5. Data normalisation using the metagenomSeq tool

```
library(Biostrings)
library(ggplot2) + theme_set(theme_bw())
library("metagenomeSeq")
all_MR <- phyloseq_to_metagenomeSeq(Phymatrice)
all_MR_nor <- cumNorm(all_MR)
all_df_nor <- MRcounts(all_MR_nor, norm = T)
Phymatrice_norm <- phyloseq(otu_table(all_df_nor, taxa_are_rows = TRUE), tax_table(Phymatrice),
sample_data(Phymatrice))
rm(all_MR, all_MR_nor)
Phymatrice_norm #Normalised phyloseq object
```

Step 6. Export OTU, taxonomy and metadata tables

#Exporting OTU, taxonomy and metadata tables to separate .csv files could be useful for further investigations.

```
library(microbiome)
TaxoMarcEnrich = write_phyloseq(Phymatrice_norm, "TAXONOMY")
TaxoMarcEnrich = write_phyloseq(Phymatrice_norm, "OTU")
TaxoMarcEnrich = write_phyloseq(Phymatrice_norm, "METADATA")
```

Section 4.4. Ecological Network analysis

Beta-diversity between bulks samples was assessed by Network analysis using a Bray-Curtis index, as ecological distance. First, the distance matrix was computed with a script Perl, then the percolation threshold was computed (see methods section) and the Gephi was used to visualize it.

Section 4.5. Phylogenetic analyses of Methanomassiliicoccales OTUs

All 16S rRNA gene sequences representative of *Methanomassiliicoccales* OTUs, generated from metabarcoding and metagenomic analyses, have been aligned and refined manually with other *Methanomassiliicoccales* sequences from both *Methanomassiliicoccales* clades published elsewhere [8–15] using MUSCLE (with 16 iterations maximum) and GBLOCKS (without contiguous non-conserved positions). Sequences affiliated to various methanogen lineages and sequences belonging to the clades RG8 and *Ca. 'Thermoplasmata'* were also added to the dataset, and used as outgroup. The BIONJ method [16] was then applied on sequences with the modifications of Jukes and Cantor and using 1000 resampling bootstrap replicates to generate the final dendrogram.

Text S5. Media composition

Enrichment cultures targeting *Methanomassiliicoccales* were performed in a medium based on previously published recipes [8,17–19] and https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium141.pdf that included a basal medium described in the body of the text, and a number of additives (fatty acids solution, hemin solution, selenite-tungstate solution, polyvitamin solution, K3 vitamin solution and coenzyme M solution) described in this section.

The fatty-acid solution contained, per litre: 25 g valeric acid, 25 g isovaleric acid, 25 g 2-methylbutanoic acid and 25 g isobutyric acid. Its pH was adjusted to 7.5 with concentrated NaOH. It was then filter-sterilized (pore-size, \emptyset 0.2 μm), placed under a N_2 gas phase, and stored at 4 °C.

The porcine hemin solution was prepared as follows, for 100 ml: 50 mg porcine hemin (PanReac AppliChem, Barcelona, Spain) was dissolved into 1 ml NaOH before adjusting the volume to 100 ml with distilled water. The solution was then sterilized by filtration (pore-size, \emptyset 0.2 μm) before to be stored at 4 °C, under a N_2 atmosphere.

The tungstate-selenite solution contained, per litre: 0.5 g NaOH, 3 mg $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 4 mg $\text{NaWO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Solution was sterilized by autoclaving and stored under N_2 at 4 °C, until use.

The polyvitamin solution (from the DSMZ141 medium) contained, per litre: 2 mg biotin, 2 mg folic acid, 10 mg pyrodoxine-HCl, 5 mg thiamine-HCl $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 mg riboflavin, 5 mg nicotinic acid, 5 mg D-Ca-pantothenate, 0.10 mg cobalamin (= vitamin B12), 5 mg *p*-aminobenzoic acid and 5 mg lipoic acid. It was filter-sterilized (pore-size, \emptyset 0.2 μm), kept under a N_2 gas phase, and stored at 4 °C in the dark, preferentially in a bottle of brown glass.

The coenzyme-M solution contained, for 100 ml: 0.164 g Na-2-mercaptoethanesulfonate dissolved into 100 ml sterile water before filtering onto a \emptyset 0.2 μm membrane. Headspace was filled with pure N_2 gas and stored at 4 °C, in a bottle of brown glass, until use.

The K3 vitamin solution was prepared as follows: 5 mg/ml vitamin K3 was dissolved in 95% (v/v) ethanol and then diluted 1%th in distilled water (final concentration 0.05 mg/ml). The solution was then filter-sterilized and stored at 4 °C under N_2 , in an opaque flask, until use.

Text S6. Quantification of substrates and metabolic products

Headspace CH_4 , H_2 , N_2 and CO_2 were measured using a modified INFICON/Micro GC FUSION Gas Analyzer (INFICON, Basel, Switzerland) fitted with a pressure gauge and two conductivity detectors. Separation was performed using two columns: a 10m molecular sieve column at 65 °C and Ar as a carrier gas; and a 12m RT-Q at 60 °C using He as a carrier gas. Gas concentrations were calculated using the method of Mah and colleagues [20] and the results corrected for the decrease in culture medium volume caused by the withdrawal of samples for analysis by ion chromatography.

Samples for cation, anion and methanol analyses were collected in 2 ml tubes and stored at -20 °C. The dilution of each sample was optimized prior to analysis. Sodium, methylated amines (methylamine, dimethylamine, trimethylamine, choline) and ammonium were analyzed using a Dionex ICS-900 Ion Chromatography System (Dionex, Camberley UK) coupled with a CERS 500 4 mm suppressor and a DS5 conductivity detector (40 °C) and fitted with a RFC-10 Reagent-Free ControllerTM, an ASDV autosampler, and an IonPac CS16 column maintained at 60 °C in a UltiMateTM 3000 Thermostated Column Compartment (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The gradient program was as follows: 18 mM methanesulfonic acid (MSA) for 40 min, increase from 10.4 mM MSA min^{-1} to 70 mM (10 min), and then decrease from 52 mM MSA min^{-1} to 18 mM (9 min). Acetate, nitrate, thiosulfate and sulfate concentrations were quantified by anion chromatography as described elsewhere [21]. Analysis of methanol concentrations was carried out using an Agilent 6890N Gas

Chromatograph (GC) (Agilent, Santa Clara, USA) coupled with a Flame Ionization Detector (FID) instrument. 1 ml of a mixture composed of 400 μ l of culture supernatant, 450 μ l of ultrapure water and 150 μ l of internal standard (Butanol-1) were placed into a 10 ml vial for heating desorption. Then, 500 μ l of sample from the gaseous space were injected into the GC-FID using a CTC Combipal autosampler Headspace (Agilent, Santa Clara, USA). Compounds were separated using a Cp-Sil 8CB VARIAN column (30 m, 0.25 mm, *i.d.*; 0.25 μ m stationary film thickness) (Agilent, Santa Clara, USA) using the following program: 3 min at 40 °C, followed by an increase of 10 °C min⁻¹ up to 70 °C, held for 15 min; injector and detector temperatures, 250 °C; Nitrogen (2.9 ml min⁻¹) was used as a carrier gas.

Supplementary Tables and Figures

Table S1. Origin and location of the 86 environmental samples screened as a first approach for the research of *Methanomussiliicoccales*.

Sample acronym	Sample formal name	Sample type	Geographical Origin	Sampling expedition	Latitude	Longitude	Sampling date	Other characteristics	References
COMRA	COMRA 34-11 (TB, OJ)	Deep-sea sediments	SW Indian ocean	COMRA 2015	38°11'31.2S	50°42'57.6" E	12/14/2016	Marine sediments	
DOURD	DOURD	Coastal sediments	Morlaix bay (France)		48°37'47" N	03°50'47" W	01/28/2017	River-influenced marine sediments	
HM1	HM168 0-1	Volcano mud	Barents sea (Norway)	ARK-XXIV/2 (PS74)	72°0'N	14°44'E	07/23/2007	Methane emitting mud volcano	
HM2	HM168 1-6	Volcano mud	Barents sea (Norway)	ARK-XXIV/2 (PS74)	72°0'N	14°44'E	07/23/2007	Methane emitting mud volcano	
HM3	HM168 6-11	Volcano mud	Barents sea (Norway)	ARK-XXIV/2 (PS74)	72°0'N	14°44'E	07/23/2007	Methane emitting mud volcano	
HM4	HM189 1-6	Volcano mud	Barents sea (Norway)	ARK-XXIV/2 (PS74)	72°0'N	14°44'E	Sept. 2007	Methane emitting mud volcano	
KERG	Kerguelen - Rallier du Baty Source PTJ	Geothermal water	Kerguelen Island (French TAAF)	IPEV n° 1077, TALISKER program	49°38'40.4" S	68°47'02.1" E	12/14/2016	Hot spring located at the "Fou de Jole" beach	
KRY150	Kryos150	Deep-sea hypersaline anoxic brine	Kryos basin (Mediterranean sea)	-	35°02'N	22°01'E	05/17/2016	150 g.l ⁻¹ salts (Mg/Cl ⁻ rich)	
KRY238	Kryos238	Deep-sea hypersaline anoxic brine	Kryos basin (Mediterranean sea)	-	35°02'N	22°01'E	05/17/2016	238 g.l ⁻¹ salts (Mg/Cl ⁻ rich)	
MOUG1	TB3	Peatland soil	Communa peatland (France)	-	48°23'56" N	3°57'56" W	01/25/2017	Slightly acidic	
MOUG2	TB4	Peatland soil	Communa peatland (France)	-	48°23'53" N	3°57'56" W	01/25/2017	Acidic	
MOUG3	TB5	Peatland soil	Communa peatland (France)	-	48°23'48" N	3°57'51" W	01/25/2017	Acidic	
MOUG4	TB7	Peatland soil	Communa peatland (France)	-	48°23'53.16" N	3°57'55.8" W	03/29/2018	Acidic	
MOUG5	Riv1	Freshwater sediments	Communa peatland (France)	-	48°23'55" N	3°57'6" W	01/25/2017	Stream running through a bog	
MOZ1	MOZ4 MTB03 2-4 cm culture anaerobie 11/15	Sediments from a pockmark area	Mozambique Channel (Madagascar shore)	PAMELA-MOZ4	15°22'14" S	45°57'06" E	Nov. 2015	Area of cold fluid migration	
MOZ2	MOZ4 MTB03 4-6 cm culture anaerobie 11/15	Sediments from a pockmark area	Mozambique Channel (Madagascar shore)	PAMELA-MOZ4	15°22'14" S	45°57'06" E	Nov. 2015	Area of cold fluid migration	
MOZ3	MOZ4 MTB03 6-11 cm culture anaerobie 11/15	Sediments from a pockmark area	Mozambique Channel (Madagascar shore)	PAMELA-MOZ4	15°22'14" S	45°57'06" E	Nov. 2015	Area of cold fluid migration	
PAV1	PAVIN60	Aroxic water from a meromictic lake	Pavin lake (France)	-	45°29'45" N	2°53'18" E	12/17/2018	Ferruginous and sulfidic waters	

Microorganisms 2021, 9, 30; doi:10.3390/microorganisms9010030

Sample acronym	Sample formal name	Sample type	Geographical Origin	Sampling expedition	Latitude	Longitude	Sampling date	Other characteristics	References
PAV2	PAVIN70	Anoxic water from a micrometric lake	Pavin lake (France)	-	45°29'45" N	2°53'18" E	12/17/2018	Ferruginous and sulfidic waters	
PAV3	PAVIN80	Anoxic water from a micrometric lake	Pavin lake (France)	-	45°29'45" N	2°53'18" E	12/17/2018	Ferruginous and sulfidic waters	
PENF	Sed2 Pentfeld	Freshwater sediments	Brest Kervallon garden (France)	-	48°23'38.82" N	4°30'36.12" W	02/06/2017	Coarse sand	
XIA	XIA	Water from a geothermal hot spring	Xiamen Botanical Garden (China)	-	24°26'25" N	118°6'17" E	12/09/2013	Iron-rich hot spring with a salinity of 1.3%	
	Grand-Dellec	Coastal sediments	Brest bay (France)	-	48°21'5" N	4°34'12" W	Jan. 2017	Marine sediments	
	Sainte-Anne (TB:O)	Coastal sediments	Brest bay (France)	-	48°21'41" N	4°33'12" W	Jan. 2017	Marine sediments	
	COMRA 34-9 (TB:O)	Deep-sea sediments	South West Indian ocean	COMRA 2015				Marine sediments	
	COMRA 34-10 (TB:O)	Deep-sea sediments	South West Indian ocean	COMRA 2015	38°11'32" S	50°42'56" E	Avr. 2015	Marine sediments	
	COMRA 34-12 (TB:O)	Deep-sea sediments	South West Indian ocean	COMRA 2015	38°11'32.2" S	50°42'56.4" E	Avr. 2015	Marine sediments	
	COMRA 34-28 (TB:O)	Deep-sea sediments	South West Indian ocean	COMRA 2015	38°10'62.65" S	49°59'42.28" E	Mai 2015	Marine sediments	
	BIG, 4, CT4, 51 0-5 cm	Deep-sea hydrothermal vent	Guaymas basin (Mexico)	BIG	27°25.484" N	111°30.074" W	06/14/2010		https://campagnes.flotteoceanographique.fr/prf?id=BFBCX-43350
	BIG, 4, CT4, 51 15-20 cm	Deep-sea hydrothermal vent	Guaymas basin (Mexico)	BIG	27°25.484" N	111°30.074" W	06/14/2010		https://campagnes.flotteoceanographique.fr/prf?id=BFBCX-43350
	YK13-05 MCR 6K 1330 BEEBE WOOD lifemer	Deep-sea hydrothermal vent	Mid-Cayman Rise	YK13-05	18°32'76.41" N	81°43'08.86" W	06/22/2013		
	YK13-05 MCR 6K 1356 Hole to Hell	Deep-sea hydrothermal vent	Mid-Cayman Rise	YK13-05	18°22'58" N	81°47'89" W	06/28/2013		
	YK13-05 MCR 6K 1354 BVT lifemer	Deep-sea hydrothermal vent	Mid-Cayman Rise	YK13-05	18°32'78.77" N	81°43'09.55" W	06/26/2013		
	YK13-056K	Deep-sea hydrothermal vent	Mid-Cayman Rise	YK13-05	18°32'47" N	81°43'7.1" W	06/21/2013		
	FHI1349A BEEBE# Left	Deep-sea hydrothermal vent	Mid-Cayman Rise	YK13-05	18°32'47" N	81°43'7.1" W	06/21/2013		
	Urania	Deep-sea mud volcano	Mediterranean Sea		38°60'N	22°01'E	05/18/2016		
	KESC 9 - 14 50 cm	Deep-sea sediments	Var rîège, Mediterranean Sea (France)	RHOSOS	43°32'26" N	7°11'13.999" E	10/07/2008		
	KESC 9 - 14 180 cm	Deep-sea sediments	Var rîège, Mediterranean Sea (France)	RHOSOS	43°32'26" N	7°11'13.999" E	10/07/2008		
	KESC 9 - 14 140-10/08	Deep-sea sediments	Var rîège, Mediterranean Sea (France)	RHOSOS	43°23'016" N	07°44'187" E	10/07/2008		[22]
	KESC 9 - 14 180-10/08	Deep-sea sediments	Var rîège, Mediterranean Sea (France)	RHOSOS	43°23'016" N	07°44'187" E	10/07/2008		[22]
	KESC 9 - 14 200- ^{var} 10/08	Deep-sea sediments	Var rîège, Mediterranean Sea (France)	RHOSOS	43°23'016" N	07°44'187" E	10/07/2008		[22]

Sample acronym	Sample formal name	Sample type	Geographical Origin	Sampling expedition	Latitude	Longitude	Sampling date	Other characteristics	References
	KFSC 9 - 14 240 10/08	Deep-sea sediments	Var ridge (France)	RHOSOS	43°23'016" N	07°44'187" E	10/07/2008		[22]
	KFSC 9 - 14 280 10/08	Deep-sea sediments	Var ridge (France)	RHOSOS	43°23'016" N	07°44'187" E	10/07/2008		[22]
	Leg 317 3H1	Deep-sea sediments	Canterbury ridge (New-Zealand)		44°56'26.62" S	172°1'36" E	Nov. 2009		
	RHS-KS-33-50 10/08	Deep-sea sediments	Gulf of Lion, Western Mediterranean Sea (France)	RHOSOS	42°41'596" N	03°50'493" E	Oct. 2008		[22]; https://campagnes.flotteoceanographique.fr/prf?id=BFBGX-86654
	RHS-KS-33-150 10/08	Deep-sea sediments	Gulf of Lion, Western Mediterranean Sea (France)	RHOSOS	42°41'596" N	03°50'493" E	Oct. 2008		[22]; https://campagnes.flotteoceanographique.fr/prf?id=BFBGX-86654
	RHS-KS-33-350 10/08	Deep-sea sediments	Gulf of Lion, Western Mediterranean Sea (France)	RHOSOS	42°41'596" N	03°50'493" E	Oct. 2008		[22]; https://campagnes.flotteoceanographique.fr/prf?id=BFBGX-86654
	RHS-KS-33-450 10/08	Deep-sea sediments	Gulf of Lion, Western Mediterranean Sea (France)	RHOSOS	42°41'596" N	03°50'493" E	Oct. 2008		[22]; https://campagnes.flotteoceanographique.fr/prf?id=BFBGX-86654
	RHS-KS-33-550 10/08	Deep-sea sediments	Gulf of Lion, Western Mediterranean Sea (France)	RHOSOS	42°41'596" N	03°50'493" E	Oct. 2008		[22]; https://campagnes.flotteoceanographique.fr/prf?id=BFBGX-86654
	RHS-KS-33-710 10/08	Deep-sea sediments	Gulf of Lion, Western Mediterranean Sea (France)	RHOSOS	42°41'596" N	03°50'493" E	Oct. 2008		[22]; https://campagnes.flotteoceanographique.fr/prf?id=BFBGX-86654
	TVG10 - 20V - S20 Jaigo 3.12	Deep-sea sediments	North West Indian ocean	-	-	-	-		
	Sed3 Penfield	Freshwater sediments	Brest Kervallon garden (France)	-	48°23'39.5" N	4°30'35.9" W	02/06/2017		
	Kerguelen - Rallier du Baty Source 15	Water from a geothermal hot spring	Kerguelen Island (French TAAF)	IPEV n° 1077, TALISKER program	49°36'S	68°56'E	12/13/2016		
	Kerguelen - Rallier du Baty Source 18	Water from a geothermal hot spring	Kerguelen Island (French TAAF)	IPEV n° 1077, TALISKER program	49°36'S	68°56'E	12/13/2016		
	Kerguelen - Rallier du Baty Source 107	Water from a geothermal hot spring	Kerguelen Island (French TAAF)	IPEV n° 1077, TALISKER program	49°36'S	68°56'E	12/14/2016		
	XIA2	Water from a geothermal hot spring	Xiamen Botanical Garden (China)	-	24°26'25" N	118°6'17" E	12/09/2013		
	PAVIN60-2	Anoxic water from a meromictic lake	Pavin lake (France)	-	45°29'45" N	2°53'18" E	10/24/2016	Ferruginous and sulfidic waters	

Sample acronym	Sample formal name	Sample type	Geographical Origin	Sampling expedition	Latitude	Longitude	Sampling date	Other characteristics	References
	PAVIN70-2	Anoxic water from a meromictic lake	Pavin lake (France)	-	45°29'45" N	2°53'18" E	10/24/2016	Ferruginous and sulfidic waters	
	Aydat	Anoxic water from a meromictic lake	Aydat lake (France)	-	45°39'50" N	02°59'12" E	10/24/2016		
	TREM1	Peatland soil	Trémaouézan peatland (France)	-	48°30'19" N	04°16'21" W	01/25/2017	Slightly acidic	
	TREM2	Peatland soil	Trémaouézan peatland (France)	-	48°30'27" N	04°16'23" W	01/25/2017	Slightly acidic	
	TB6	Peatland soil	Communa peatland (France)	-	48°23'56.8" N	3°57'56.3" E	01/25/2017	Slightly acidic	
	TB8	Peatland soil	Communa peatland (France)	-	48°23'53.16" N	3°57'55.8" W	02/26/2018	Slightly acidic	
	TB9	Peatland soil	Communa peatland (France)	-	48°23'53.88" N	3°57'55.8" W	02/26/2018	Slightly acidic	
	TB10	Peatland soil	Communa peatland (France)	-	48°23'56.76" N	3°57'56.52" W	02/26/2018		
	131.18.1.52	Sediments from a pockmark area		-	04°45'605" S	9°56'423" E			[23]
	GeoB 13114-2-51	Sediments from a pockmark area	Hydrate Hole (Guinea)	M76/3a	04°48'57" S	09°54'50" E	06/26/2008		[23]
	GeoB 13114-2-52	Sediments from a pockmark area	Hydrate Hole (Guinea)	M76/3a	04°48'581 S	09°54'496 E	06/26/2008		[23]
	GeoB 13114-2-54	Sediments from a pockmark area	Hydrate Hole (Guinea)	M76/3a	04°48'581 S	09°54'496 E	06/26/2008		[23]
	GeoB 13118-1-51	Sediments from a pockmark area	Worm Hole (Guinea)	M76/3a	04°45'605" S	09°56'423" E	06/29/2008		[23]
	GeoB 13118-1-52	Sediments from a pockmark area	Worm Hole (Guinea)	M76/3a	04°45'605" S	09°56'423" E	06/29/2008		[23]
	GeoB 13121-2-53	Sediments from a pockmark area	REGAB (Guinea)	M76/3a	05°47'881 S	09°42'805 E	07/06/2008		[23]
	GeoB 13121-1-54	Sediments from a pockmark area	REGAB (Guinea)	M76/3a	05°47'881 S	09°42'805 E	07/06/2008		[23]
	GeoB 14-2-51	Sediments from a pockmark area		M76/3a					
	GeoB 14-2-52	Sediments from a pockmark area		M76/3a					
	GeoB 14-2-54	Sediments from a pockmark area		M76/3a					
	MOZ4 MTR03 11-16 cm culture anaerobic 11/15	Sediments from a pockmark area	Mozambique Channel (Madagascar shore)	PAMELA-MOZ4	15°22'14" S	45°57'06" E	Nov. 2015	Area of cold fluid migration	
	MOZ4 MTR03 16-21 cm culture anaerobic 11/15	Sediments from a pockmark area	Mozambique Channel (Madagascar shore)	PAMELA-MOZ4	15°22'14" S	45°57'06" E	Nov. 2015	Area of cold fluid migration	
	MOZ4 MTR03 21-24 cm culture anaerobic 11/15	Sediments from a pockmark area	Mozambique Channel (Madagascar shore)	PAMELA-MOZ4	15°22'14" S	45°57'06" E	Nov. 2015	Area of cold fluid migration	
	MOZ4 CZSF04 S1-25 culture anaerobic 11/2015	Sediments from a pockmark area	Mozambique Channel (Madagascar shore)	PAMELA-MOZ4			Nov. 2015	Area of cold fluid migration	

Sample acronym	Sample formal name	Sample type	Geographical Origin	Sampling expedition	Latitude	Longitude	Sampling date	Other characteristics	References
	MOZ4 CZSF04 52-38 culture anaerobic 11/2015	Sediments from a pockmark area	Mozambique Channel (Madagascar shore)	PAMELA-MOZ4			Nov. 2015	Area of cold fluid migration	
	MOZ4 CZSF04 53-25 culture anaerobic 11/2015	Sediments from a pockmark area	Mozambique Channel (Madagascar shore)	PAMELA-MOZ4			Nov. 2015	Area of cold fluid migration	
	MOZ4 CZSF04 55-25 culture anaerobic 11/2015	Sediments from a pockmark area	Mozambique Channel (Madagascar shore)	PAMELA-MOZ4				Area of cold fluid migration	
	PAMELA MOZ01 M1B7 7-12	Sediments from a pockmark area	Mozambique Channel (Madagascar shore)	PAMELA-MOZ01			Nov. 2015	Area of cold fluid migration	
	PAMELA MOZ01 KGS03	Sediments from a pockmark area	Mozambique Channel (Madagascar shore)	PAMELA-MOZ01			Nov. 2015	Area of cold fluid migration	
	MD-PL-20-T11 - 341-20-T11 10ml	Submarine brine	Chefren mud volcano, Nile Deep Sea fan, Eastern Mediterranean Sea (Egypt shore)	MEDECO	32° 6.584' N	28° 10.655' E	11/17/2007		
	MD-PL-20-MBS1 - 34-20-MBS-1	Submarine brine	Chefren mud volcano, Nile Deep Sea fan, Eastern Mediterranean Sea (Egypt shore)	MEDECO	31° 59.498' N	28° 3.512' E	11/17/2007		

Table S2. Number of 16S rRNA gene sequence reads of the various *Methanomassiliicoccales*/OTUs, other methanogens OTUs and total prokaryotic OTUs generated by metabarcoding, in the various studied environmental samples and in culture-based experiments PENE, DOUR and MOUG2. Other OTUs: sum of the reads in the scarce OTUs of *Methanomassiliicoccales*.

Origin	Sample	<i>Methanomassiliicoccales</i>								Other methanogens	Total Prokaryotes
		OTU21	OTU101	OTU499	OTU30	OTU926	OTU1789	OTU2685	Other <i>Methanomassiliicoccales</i> OTUs		
Environmental samples	COMRA	0	0	0	10	0	0	0	0	16	33543
	DOUR	0	0	0	26	1	0	2	1	70	27577
	HM1	0	0	0	19	0	0	0	0	1153	83723
	HM2	0	0	0	22	0	0	0	1	1152	115163
	HM3	0	0	4	27	0	0	0	0	2795	135293
	HM4	0	0	0	13	0	0	0	0	312	76722
	KERG	1	98	1	64	0	0	0	0	205	112160
	KRY150	0	0	0	4	0	0	0	0	199	33073
	KRY238	0	0	0	9	0	0	0	0	17	32803
	MOUG1	0	0	1	11	0	0	0	0	32	21147
	MOUG2	0	0	1	20	3	0	0	0	1323	42023
	MOUG3	4	0	1	18	3	0	0	0	425	19965
	MOUG4	0	0	0	24	1	0	0	0	2519	51257
	MOUG5	0	0	0	7	0	0	0	0	65	43768
	MOZ1	3	3	23	131	4	0	2	5	1042	51432
	MOZ2	2	3	396	141	12	0	39	3	952	82240
	MOZ3	1	3	590	187	6	0	27	6	1147	77662
	PAV60	1	0	3	26	0	0	0	0	45	133308
	PAV70	0	9	1	50	22	0	0	0	328	151718
	PAV80	0	0	4	46	62	0	0	0	425	128262
PENF	34	5	2	72	115	0	0	1	324	42386	
XIA	0	0	0	4	0	0	0	0	15	60330	
Enrichment culture	PF T1	13	1	0	2	31	0	0	0	47	113032
	PF T2	37	3	0	0	1	0	0	0	61	128451
	PF T3	74	12	0	1	0	0	0	0	87	158370
	PF T4	28	5	0	0	10	0	0	0	43	237339
	PF T5	603	21	0	0	2	0	0	1	627	255024
	PF T6	5039	262	0	3	5	0	0	10	5319	339383
	PF T7	10365	1254	0	1	5	0	0	15	11640	188034
	PF T8	41550	6435	0	17	2	1	0	56	48061	321670

PF T9	24161	3654	0	0	4	0	0	35	27854	319970
PF T10	30291	3070	0	2	0	1	0	27	33391	384057
DF T1	7	0	0	0	0	0	0	0	7	115420
DF T3	25	0	0	0	0	3	0	0	28	248964
DF T6	17	0	14	0	0	19	0	0	50	178985
DF T8	20	6	0	0	0	28	0	0	54	212050
DF T10	14	64	0	1	0	56	0	0	135	202382
TB T1	10	0	0	0	17	0	0	0	27	153856
TB T4	26	1	0	0	41	0	0	0	68	350070
TB T6	18	1	0	0	10	0	0	0	29	203877
TB T8	16	0	0	0	6	0	0	0	22	205008
TB T11	20	1	0	3	8	1	0	0	33	284002

Table S3. List of the *Methanomassiliicoccales* 16S rRNA gene sequences identified in the metagenome of the culture-based experiment PENF T8 (8th week of incubation), and 16S rRNA gene representative sequences of OTUs identified as *Methanomassiliicoccales* by the SILVA 138 database in in the metabarcoding analysis.

<p>>k119-35148 GCCACCGCTATTGGAATACGATTAAGACATGCGAGTCGAGAGCGTAAGGTCTCGGGCGACCGCTCACTAACACCTGGATAACATGCCCTAAGGTGGG GGATAATCTCGGGAACTGAGGATAATACCCCATAGGTCGTATCTGCTGGAATGCTTTTCAGGCCGAAAACCTCCGGTGCCTTAGGATTTGGTCTCGGGTCTA TCAGGCTGTAGTGGGTGTAACCGACCCACTAGCCCGTGACGGATATGGGCCCTTGAGAGAGGGAGCCAGAGATGGACTCTGAGACATGAGTCCAGGCC CTACGGGGCGCAGCAGTCGCGAAAACCTTCGCAATGGGGCAACCCCGACGAGGGAATTCGAAGTCCAGCAGCTTTGTTGTTGGCTGTTCTCTGCTCTAAA AAACAGGAGGAGTAAGGGGGCGGTAAGACGGGTGCCAGCCCGCGGGTAATACCCCGCCCTAGTGGTGGTCGATATATTGAGCCTAAAAACGTCGG TAGCCGGTCTTCTAAATCCTTTGGTAAATCGGGCAGCTTAACTGTCCGAAGTCCGGGGAGACTGGGAGACTTGGGACCCGGAGAGGTCAGAGGTAATCTC TGGGGTAGGGTAAAATCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGGCGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAAGGACGAAGCCCTGGGGCG CAAACGGGATTAGATACCCCGTAGTCCAGGGTGTAAACGCTCGGGCTTTGGTGTGGGGTCTTTAGTGGGGCCCACTGCCGGAGAGAAGTTGTTAA CCCTGCTGCTTGGGGAGTATGTCGCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCCGGGAGCACCAGCAACGGGAGGAGCGTGGCGTTCAATTTGGATTCAAC GCCGAAAACCTACCAGGAGCGACGGATATATGAAGGTCAAGCTGATGACTTTACCTGATTTTCCGAGAGGTGGTGCATGGCCGTCGTAGTTCGTACC GTAAGGCGTCTCTTAAGTGTAGATAACGAACGAGACCCCTACCAITTAATTGCTAGTCCCTTCTCCGAGGGGGCGCAATTAATGGGACCGCTGGGGCTA AGTCAAGGAAAGGAGAGGTCACCGTAGGTCCGTATGCCCGAATCCCTGGGCAACACGCGCGCTACAAAGGGTGGGACAATGGGCTTCGACACCGA AAGGTGAAGACAATCTGAAACCCATCCATAGTTGCGATTGGGGGTGTAAACCCGCCCATGAAGCTGGATTCCGTAGTAATCGCTGTCAACATCAA CCGGTGAATATGCCCTGCTCTTGCACACACCCCGCTCAAAACCCAGTTCGGTTTCACTAAGGATGTCTTAATTTGGGGCTTCGAACTGAGATT CAGCAAGGAGGGTAAAGTCGTAACAAGGTATCTGAGGGGAACCTGCAGATGGATCACCTCTAC</p>
<p>>k119-91804 GCCACCGCTATTGGAATTCGATTAAGACATGCGAGTCGACAGTCCGAAAGACTCGGGCGACCGCTCAGTAACACCGGGATAACATCCCTTGGGTGGG GGATAACCTCGGGAACTGAGAAATAATACCCCATAGATCTAGAAAAGCTGGAATGCTTTTAGATCCAAAACCTCCGGTGCCTTAGGATTTGGTCTCGGGCGG ATCAGGTTGATGGGTGTAACCGACCCCTACCCATGACGCGTAAGGGCTTGACAGAGGGAGCCCTGAGATGGACTCTGAGACATGAGTCCAGGCC CTACGGGGCGCAGCAGTCGCGAAAACCTTCACAATGGGGAAACCCCGATGAGGGAATTCGAAGTCCAGCAGCATACTGTTGTTGGCTGTTCTCTGCTCTAAA AAACAGAGAAAGTAAGCGCCGGTAAAGACGGGTGCCAGCCCGCGGGTAATACCCCGCCCGAGTGGTGGTCGATATATTGAGCCTAAAAACGTCGG TAGCCGGTCTTCTAAAATCCTTTGGTAAATCGACCAGCTTAACTGTCCGAAGTCCGGGGAGACTGCAAGACTTGGGATCGGGAGAGGTCAGAGGTAATCTC CGGGTAGGGTAAAATCTGTAATCCTAGAAGGACCACCGGTGGCGAAGGCGTCTACTAGAACGAATCCGACGGTGAAGGACGAAGCCCTGGGGCGC AAACGGGATAGATACCCCGTAGTCCAGGGTGTAAACGCTCGGGCTTTGGTGTGGGGTCTTTAGTGGGGCCCACTGCCGGAGAGAAGTTGTTAA CCTGCTGCTTGGGGAGTACGTCGCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTCGCGGGGAGCACCAGCAACGGGAGGAGCGTGGCGTTCAATTTGGATTCAACA CCGGACAACCTACCAGGAGCGACGGTACATGAAGGCCAGGCTGATGACTTTGCCGATTTTCCGAGAGGTGGTGCATGGCCGTCGTAGTTCGTACC TAAGGCGTCTCTTAAGTGTAGATAACGAACGAGACCCCTACCCGTAATTTGCTAGTCTCTCCGAGAGCACCAGCATAAACCGGACCGCTGTCGCTAA GACAGAGGAAGGAGAGGTCACCGTAGGTCCGTATGCCCGAATCTCTGGGCTACACGCGCGCTACAAAGGTGGGACAATGGGCTCCGACATCGAA AGGTGAAGGCAATCTGAAACCCATCCATAGTTGCGATTGGGGGTGTAACTCACCCATGAAGCTGGATTCCGTAGTAATCGCGGATCAACAATCCG CCGTGAATATGCCCTGCTCTTGCACACACCCCGCTCAAAACCCAGTTCGGTTTCACTAAGGATGTCTTAATTTGGGGCTTCGAACTGAGATTCA CCAAGGAGGGT</p>
<p>>OTU21 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTTAGGCTAAAACGTCCTGAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTTAACTGTCCGAAGT CCGGGGAGACTGGAAGACTTGGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTAATCTTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGAAACCGG</p>
<p>>OTU30 TACCCGCGCCCAAGTGGTGGTCGATATTTAGGCTAAAACGTCCTGAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTCAACTGTCCGAATT CCGGGGAGACTGGAAGACTTGGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTAATCTTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGAAACCGG</p>
<p>>OTU101 TACCCGCGCCCGACTGGTGGTCGATATTTAGGCTAAAACGTCCTGAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGACCAGCTTAACTGTTCGAAGT CCGGGGAGACTGCAAGACTTGGGATCGGGAGAGGTCAGAGGTAATCTTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTAGAAGGACCACCGTGGCGAAGG CGTCTACTAGAACGAATCCACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGAAACCGG</p>
<p>>OTU499 TACCCGCGCCCGAGTGGTGGTCATTTATTAGGCTAAAACGTCCTGAGCCGGCTGTAAATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTCAACTGTTCGAATTC CGAGGAGACTGCAAGGCTCGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTAATCTTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTAGAAGGACCACCGTGGCGAAGG GTCGAACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGAAACCGG</p>
<p>>OTU926 TACCCGCGCCCGACTGGTGGTCGATATTTAGGCTAAAACGTCCTGAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTTAACTGTCCGAAGT CCGGGGAGACTGCAAGACTTGGGATCGGGAGAGGTCAGAGGTAATCTTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTAGAAGGACCACCGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGAATCCACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGAAACCGG</p>
<p>>OTU1789 TACCCGCGCTCGAGTGGTGGTCGATATTTAGGCTAAAACGTCCTGAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGGGTACTTAACTAACCAGATT CCGAGGAGACTGTGATCTTGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTAATCTTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTAGAAGGACCACCGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGAAACCGG</p>
<p>>OTU2685 TACCCGCGCCCGAGTGGTGGTCATTTATTAGGCTAAAACGTCCTGAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTCAACTGTTCGAATTC CGAGGAGACTGCAAGGCTCGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTAATCTTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTAGAAGGACCACCGTGGCGAAGG GTCGAACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGAAACCGG</p>
<p>>OTU16699 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTTAGGCTAAAACGTCCTGAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTTAACTGTTCGAAGT CCGGGGAGACTGGAAGACTTGGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTAATCTTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTAGAAGGACCACCGTGGCGAAG GCGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGAAACCGG</p>
<p>>OTU16700 TACCCGCGCCCGAGTGGTGGTCGATATTTAGGCTAAAACGTCCTGAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGACCAGCTTAACTGTTCGAAGT CCGGGGAGACTGCAAGACTTGGGATCGGGAGAGGTCAGAGGTAATCTTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTAGAAGGACCACCGTGGCGAAGG CGTCTACTAGAACGAATCCGACGGTGAGGGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG</p>

<p>>OTU15634 CACCCGCAGCTCAAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTTTTGTAAATCCTTGGGTAAATCGACCAGCTTAACTGTTCCGAAGT CCGGGGAGACTGCAAGACTTTGGATCCGGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGCTAAAATCCTGTAATCCTAGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTACTAGAACGGAATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU15741 TACCCGCAGCCCGAGTGGTGGTCATTTTTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGACTAATAAATCCTTGGGTAAATCGAACGGCTTAAACGGTTCGAATT CCGGGGAGACTGTTAGTCTTTGGAACCGGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTCGAAGGACCACAGTGGCGAAGG CGTCTGACTGAAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU17456 CACCCGCAGCTCAAGTGGTGGCCATTTTTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTTTTGTAAATCCTTGGGTAAATCGACCAGCTTAACTGTTCCGAAGT CCGGGGAGACTGCAAGACTTTGGATCCGGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU17598 TACCCGCAGCTCGAGTGGTGGTCATTTTTACTGAGCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTAGTAAATCCTTGGGTAAATCGGGCAGCTTAACTGTTCCGAATTC CGAGCGGACTGCTGGACTTTGGACCGGAAGAGCTCAAAAGTACTTCTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCACGAGGACTACCAGTGGCGAAGG GTTGGACTAGGACGGATCCAAACGGTAAGGAACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU19010 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAATCGGGCAGCTTAACTGTCCGAAGT CCGGGGAGACTGGGAGACTTTGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGCTAACTGGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU21513 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAATCGGGCAGCTTAACTGTCCGAAGT CCGGGGAGACTGGAAGACTTTGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGGAGCGCAACCGG</p>
<p>>OTU23995 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAATCGGGCAGCTTAACTGTCCGAAGT CCGGGGAGACTGGAAGACTTTGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTATGACAGAAAGCGTGGGATCAAAACGG</p>
<p>>OTU26269 TACCCGCAGCCCGAGTGGTGGTCATTTTTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGACAGCTAAATCCTTGGGTAAATCGAACGGCTTAAACGGTTCGAATT CCGGGGAGACTGCTGCTGTCATTGAGACCGGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTGACTGAAACGGATTTGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU28842 TACCCGCGCCCAAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAATCGGGCAGCTTAACTGTCCGAAGT CCGGGGAGACTGCAAGACTTTAGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTACTTCCAGGGTAGGAGTAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAG GCGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU28843 TACCCGCGCCCAAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTTTTGTAAATCCTTGGGTAAATCGACCAGCTTAACTGTTCCGAAGT CCGGGGAGACTGCAAGACTTTGGATCCGGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGTAACGAAGCCAGGGGCGCAACCGG</p>
<p>>OTU28844 TACCCGCGCCCGAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTTTTGTAAATCCTTGGGTAAATCGACCAGCTTAACTGTTCCGAAGT CCGGGGAGACTGCAAGACTTTGGATCCGGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTAGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTACTAGAACGAATCCGACGGTGAGGGACGAAGCTGGGGCGCAACCGG</p>
<p>>OTU28845 TACCCGCGCCCGAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTTTTGTAAATCCTTGGGTAAATCGACCAGCTTAACTGTTCCGAAGT CCGGGGAGACTGGAAGACTTTGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGGTAACCTGGAACGAACCTGACGGTGAGTAACGAAGCCAGGGGCGCAACCGG</p>
<p>>OTU30110 CACCCGCAGCTCAAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAATCGGGCAGCTTAACTGTCCGAAGTCCG GGGAGACTGGAAGACTTTGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGGCGT CTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU30122 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTATCCTTGGGTAAATCGGGCAGCTTAACTGTTCCGAAGTCCG GGGAGACTGGAAGACTTTGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTAGAAGGACCACCGGTGGCGAAGGCGT CTGACTAGAACGAATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACCGG</p>
<p>>OTU32864 TACCCGCAGCCCGAGTGGTGGTCATTTTTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAATCGACCAGCTTAACTGTTCCGAAGT CCGAAGACTGCAATCTTTGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTCGAAAGGACCACAGTGGCGAAGG CGTACAGACTGAAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU32865 TACCCGCAGCTCGAGTGGTGGTCATTTTTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCCAGTAAATCCTTGGGTAAATCGGGCAGCTTAACTGTTCCGAATTC CGAGGGGACTGCTGGACTTTGGACCGGAAGAGGTCAAAAGTACTTCTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCACGAGGACTACCAGTGGCGAAGGC GTTGGACTAGGACGGATTCGACGGTAAGGAACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU32869 TACCCGCGCCCAAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAATCGGGCAGCTTAACTGTTCCGAAGT CCGGGGAGACTGGGAGACTTTGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU32875 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAATCGGGCAGCTTAACTGTTCCGAAGT CCGGGGAGACTGGGAGACTTTGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU32876 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAATCGGGCAGCTTAACTGTTCCGAAGT CCGAGGAGACTGTTGATCTTTGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGGTAATAATCCTGTAATCCTAGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>

<p>>OTU32879 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTTAACGTTCGAAGTC CGGGGAGACTGCAAGACTTGGGATCGGGAGAGGTGAGAGGTACTTCTGGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTAGAGGACCACCGGTGGCGAAGGC GTCTACTAGAACGAATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGG</p>
<p>>OTU32880 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAGTCGGGCAGCTTAACGTTCGAAGT CCGGGAGACTGGAAGACTTGGGATCGGGAGAGGTGAGAGGTACTTCTGGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGGCCCGGTGGCGAAGG CGTCTACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCCCTGGGGCGCAAACCGG</p>
<p>>OTU32881 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAGTCGACCAGCTTAACGTTCGAAGTC CGGGGAGACTGCAAGACTTGGGATCGGGAGAGGTGAGAGGTACTTCTGGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTAGAGGACCACCGGTGGCGAAGGC GTCTACTAGAACGAATCCGACGGTGAGGGCGAAAGCCAGGGGAGCGAACCGG</p>
<p>>OTU32895 TACCCGCGCCCGAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAGTCGACCAGCTTAACGTTCGAAGT CCGGGAGACTGCAAGACTTGGGATCGGGAGAGGTGAGAGGTACTTCTGGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGCGAAAGCCAGGGGAGCGAACCGG</p>
<p>>OTU32903 TACCCGCGGCTCGAGTGGTGGCCACTATTACTGGGCTAAAAGCTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAGTCGACCAGCTTAACGTTCGAAGT CCGGGAGACTGCAAGACTTGGGATCGGGAGAGGTGAGAGGTACTTCTGGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCCCTGGGGCGCAAACCGG</p>
<p>>OTU33783 TACGGAGGATCCGACGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAGTCGACCAGCTTAACGTTCGAAGT CCGGGAGACTGCAAGACTTGGGATCGGGAGAGGTGAGAGGTACTTCTGGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTAGAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTACTAGAACGAATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCCCTGGGGCGCAAACCGG</p>
<p>>OTU34173 TACGGAGGATCCGAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAGTCGACCAGCTTAACGTTCGAAGT CCGGGAGACTGCAAGACTTGGGATCGGGAGAGGTGAGAGGTACTTCTGGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCCCTGGGGCGCAAACCGG</p>
<p>>OTU40076 TTAGAAACCCCGCCCGACTGCTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAGTCGGGCAGCTTAACGTTC GAAGTCCGGGAGACTGGGAGACTTGGGACCGGGAGAGGTGAGAGGTACTTCTGGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGC GAAGGCGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCCCTGGGGCGCAAACCGG</p>
<p>>OTU40932 AACCAGCTCTTCGAGTGGTGTCCATGATTAATTGAGCTTAAAGCGTTCGTAGCCGGCCCTGTAATCCTTGGGTAAGTCGGGACAGCTCAACTGTTCGAATTC CGAGGAGACTGCAAGGCTTCGGACCGGGAGAGGTGAGAGGTACTTCTGGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGAGAGGACCACCGGTGGCGAAGGC GTCGAACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCCCTGGGGCGCAAACCGG</p>
<p>>OTU41089 CACCGGCACTCAAGTGGTGGCCATTTTTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAGTCGACCAGCTTAACGTTCGAAGT CCGGGAGACTGCAAGACTTGGGATCGGGAGAGGTGAGAGGTACTTCTGGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTAGAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTACTAGAACGAATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCCCTGGGGCGCAAACCGG</p>
<p>>OTU42355 TACCCGCGCCCGAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAGTCGTCGGCTTAACCGACAGCGGTT TAAGGATACCTGGCAATCTAGGGACCGGGAGAGGTGAGAGGTACTTCTGGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCCCTGGGGCGCAAACCGG</p>
<p>>OTU42356 TACCCGCGCCCGAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAGTCCTACAGCTTAACGTTCGAAGTC CGGGGAGACTGCAAGACTTGGGATCGGGAGAGGTGAGAGGTACTTCTGGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTAGAGGACCACCGGTGGCGAAGGC GTCTACTAGAACGAATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCCCTGGGGCGCAAACCGG</p>
<p>>OTU42357 TACCCGCGCCCGAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAGTCGACCAGCTTAACGTTCGAAGT CCGGGAGACTGCAAGACTTGGGATCGGGAGAGGTGAGAGGTACTTCTGGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCCCTGGGGATCAAACAGG</p>
<p>>OTU42358 TACCCGCGCCCGAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAGTCGGGCAGCTTAACGTTCGAAGT CCGGGAGACTGGAAGACTTGGGACCGGGAGAGGTGAGAGGTACTTCTGGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTAGAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTACTAGAACGAATCCGACGGTGAGGGCGAAAGCCCTGGGGGAGCAAACAGG</p>
<p>>OTU42363 TACCCGCGCCCGAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAGTCGGGCAGCTTAACGTTCGAAGT CCGGGAGACTGGAAGACTTGGGATCGGGAGAGGTGAGAGGTACTTCTGGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGTAGG CGTCTACCAGAACGGCTCCGACAGTGAGGGACGAAAGCCCTGGGGCGCAAACCGG</p>
<p>>OTU42365 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAGTCGGGCAGCTTAACGTTCGAAGT CCGGGAGACTGGAAGACTTGGGATCGGGAGAGGTGAGAGGTACTTCTGGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCCCTGGGGCGCAAACCGG</p>
<p>>OTU42368 TACCCGCGCCCAAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAGTCGACCAGCTTAACGTTCGAAGT CCGGGAGACTGCAAGACTTGGGATCGGGAGAGGTGAGAGGTACTTCTGGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCCCTGGGGATCAAACAGG</p>
<p>>OTU42371 TACCCGCGCCCGAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAGTCGACCAGCTTAACGTTCGAAGT CCGGGAGACTGCAAGACTTGGGATCGGGAGAGGTGAGAGGTACTTCTGGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTAGAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTACCAGAACGGCTCCGACAGTGAGGGACGAAAGCCCTGGGGCGCAAACCGG</p>
<p>>OTU45367 TACGTAGGGGGCAGCGTTATCCGGAATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAAGTCGGGCAGCTTAACGTTCGAAGT CCGGGAGACTGGAAGACTTGGGACCGGGAGAGGTGAGAGGTACTTCTGGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCCCTGGGGCGCAAACCGG</p>

<p>>OTU47307 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTTAACGTGCGGAATT CCTCGAGATACTATTAGCCTTAGGTCGGGAGACGTTACCGGTAAGGTCAGGGTAAATCCTATAATCCTGGGAGGACCACCGGTGCCGAAG GCGTCTGACTAGAACCGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU50349 TACCCGCGCCCGAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTTAACGTGCGGAAGT CCTGGGAGACTTGGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTAAGGTCAGGGTAAATCCTGTAAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGCGGTCTGAC TAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU93191 CACCCGCGAGCTCAAGTGGTGGCCATTATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTTAACGTGCGGAAGT CCGGGGAGACTGGAAGACTTGGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTAAGGTCAGGGTAAATCCTGTAAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTACTAGAACGAATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU93217 CACCCGCGAGCTCAAGTGGTGGCCATTATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTTAACGTGCGGAAGT CCGGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTAAGGTCAGGGTAAATCCTGTAAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU93532 CACCCGCGCCCGAGTGGTGAATCGTATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTGTAAATCCTTGGGTAATCGACCAGCTTAACGTGTCGAAGT CCGGGGAGACTGCAAGACTTGGGATCGGGAGAGGTCAGAGGTAAGGTCAGGGTAAATCCTGTAAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTACTAGAACGAATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU93561 CACCCGCGCCCGAGTGGTGAATCGTATTATTGGGTCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTGTAAATCCTTGGGTAATCGACCAGCTTAACGTGTCGAAGT CCGGGGAGACTGCAAGACTTGGGATCGGGAGAGGTCAGAGGTAAGGTCAGGGTAAATCCTGTAAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGAATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU137628 TACCCGCGCCCAAGTGGCGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAGATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTCAACTGCCCCAATT CCGGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTAAGGTCAGGGTAAATCCTGTAAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU137784 TACCCGCGCCCAAGTGGTGGTCGATATTATTAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAGATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTCAACTGTCCGGATT CCGGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTAAGGTCAGGGTAAATCCTGTAAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU138153 TACCCGCGCCCAAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTTAACGTGTCGAAGT CCGGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTAAGGTCAGGGTAAATCCTGTAAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG GCGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU138161 TACCCGCGCCCAAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTTAACGTGTCGAAGT CCGGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTAAGGTCAGGGTAAATCCTGTAAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU138577 TACCCGCGCCCAAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTTAACGTGTCGAAGT CCGGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTAAGGTCAGGGTAAATCCTGTAAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU138814 TACCCGCGCCCAAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTTAACGTGTCGAAGT CCGGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTAAGGTCAGGGTAAATCCTGTAAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTAGCTAGAACGGATCCGACGGTGAGGAACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU138856 TACCCGCGCCCGAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTTAACGTGTCGAAGT CCGGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTAAGGTCAGGGTAAATCCTGTAAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU139058 TACCCGCGCCCGAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTTAACGTGTCGAAGT CCGGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTAAGGTCAGGGTAAATCCTGTAAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU139250 TACCCGCGCCCAAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTTAACGTGTCGAAGT CCGGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTAAGGTCAGGGTAAATCCTGTAAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU139311 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTAGATATTATTGAGACTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTTAACGTGTCGAAGT CCGGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTAAGGTCAGGGTAAATCCTGTAAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU139582 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTTAACGTGTCGAAGT CCGGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTAAGGTCAGGGTAAATCCTGTAAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGGCTAACTGGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU139596 TACCCGCGCCCAAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTTAACGTGTCGAAGT CCGGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTAAGGTCAGGGTAAATCCTGTAAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>
<p>>OTU139635 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCGGGCAGCTTAACGTGTCGAAGT CCGGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCGGGAGAGGTCAGAGGTAAGGTCAGGGTAAATCCTGTAAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGG</p>

<p>>OTU139663 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCAGGCAGCTTAACTGTCCGAAGT CCGGGAGACTGGGAGACTTGGGACCCGGAGAGGTCAGAGTACTTCTGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGCTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACAGG</p>
<p>>OTU139667 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCAGGCAGCTTAACTGTTCGAAGTC CCGGGAGACTGGGAGACTTGGGACCCGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG GTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACAGG</p>
<p>>OTU139671 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCAGGCAGCTTAACTAACC GAATT CGAGGAGACTGTGGATCTTGGGACCCGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTAGAAAGGACCACCGGTGGCGAAGG GTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAATCCCTGGGGCGCAAACAGG</p>
<p>>OTU139707 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCAGGCAGCTTAACTGTCCGAAGT CCGGGAGACTGGGAGACTTGGGACCCGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAG CGCTCTGACTAGAACGAATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACAGG</p>
<p>>OTU139710 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCAGGCAGCTTAACTGTCCGAAGT CCGGGAGACTATTAGGCTTGGGACCCGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACAGG</p>
<p>>OTU139763 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCAGGCAGCTTAACTGTCCGAAGT CCGGGAGACTGGAAGACTTGGGACCCGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGGCTAACTGGAACGGACCTGACGGTGAGTAACGAAGCCCTGGGGCGCAAACAGG</p>
<p>>OTU139857 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCAGGCAGCTTAACTGTCCGAAGT CCGGGAGACTGGGAGACTTGGGACCCGGAGAGGTCAGAGGCACTTCTGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAG GGCTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAATAGG</p>
<p>>OTU139866 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCAGGCAGCTTAACTGTCCGAAGT CCGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCCGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGGGAGGAGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAG CGCTCTGACTAGAACGAATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACAGG</p>
<p>>OTU139868 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCAGGCAGCTTAACTGTCCGAAGT CCGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCCGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGGAAAGATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAG GCGTCTGACTAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACAGG</p>
<p>>OTU139872 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCAGGCAGCTTAACTGTCCGAAGT CCGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCCGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGTAAAATCCTATAATCCTGGGAGGACCACCTGTGGCGAAG CGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAGGCCCTGGGGCGCAAACAGG</p>
<p>>OTU139890 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCAGGCAGCTTAACTGTCCGAAGT CCGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCCGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAG CGCTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACAGG</p>
<p>>OTU139906 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCAGGCAGCTTAACTGTCCGAAGT CCGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCCGGAGAGGTCAGGGTACTTCTGGGTAGGGGAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAG CGCTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACAGG</p>
<p>>OTU139935 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCAGGCAGCTTAACTGTCCGAAGT CCGGGAGAGTGGGAGACTTGGGACCCGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAGGG CGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACAGG</p>
<p>>OTU140162 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAACACGTCCGGAGCCGGTCTTCTACATCCTCGGTAAAATCAGGCAGCTTAACTGTCCGAAGT CCGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCCGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAG GCGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACAGG</p>
<p>>OTU140273 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCAGGCAGCTTAACTGTCCGAAGT CCGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCCGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAG GCGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACAGG</p>
<p>>OTU140392 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCAGGCAGCTTAACTGTCCGAAGT CCGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCCGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG GTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACAGG</p>
<p>>OTU140596 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCAGGCAGCTTAACTGTCCGAAGT CCGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCCGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACAGG</p>
<p>>OTU140729 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCAGGCAGCTTAACTGTCCGAAGT CCGGGAGACTTGGGAGACTTGGGACCCGGAGAGGTCAGAGGTACTTCTGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTAGAAAGGACCACCGGTGGCGAAGG CGTCTGACTAGAACGAATCCGACGGTGAGTAACGAAGGCCAGGGGCGCAAACAGG</p>
<p>TU407971 TACCCGCGCCCTAGTGGTGGTCGATATTATTGAGCCTAAAACGTCCGTAGCCGGTCTTCTAAATCCTTGGGTAATCAGGCAGCTTAACTGTCCGAAGT GCTGGAGACTATCAGGCTTGGGACCCGGAGAGGTAAGGGTACTCCAGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCCTGGAAGGACCACCGGTGGCGAAG GCGTCTGACTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACAGG</p>

Table S4. Results of the quantification of *Methanomassiliicoccales* by qPCR in the different samples. Quantification is expressed as the number of copies of the target gene $\times 10^3$ per gram of wet matrix. Legend, NQ: non-quantifiable, *i.e.* a sample with no signal or less than 3 Ct difference from the extraction control, in qPCR experiments where $90 < \text{PCR efficiency} < 110\%$ and r^2 of standard curve > 0.99 ; Below the detection limit: Less than 10^3 gene copies per ml or gram of wet weight of sample.

Sample	<i>Methanomassiliicoccales</i> 16S rRNA gene copies per gram of wet weight ($\times 10^3$)
COMRA	NQ
DOUR	6.51 ± 4.84
HM1	Below the detection limit
HM2	Below the detection limit
HM3	Below the detection limit
HM4	Below the detection limit
KERG	6.41 ± 0.93
KRY150	Below the detection limit
KRY238	NQ
MOUG1	75.02 ± 4.59
MOUG2	62.63 ± 5.10
MOUG3	1.86 ± 0.19
MOUG4	Below the detection limit
MOUG5	NQ
MOZ1	1.62 ± 1.02
MOZ2	1.76 ± 0.5
MOZ3	Below the detection limit
PAV60	13.2 ± 0.69
PAV70	0.45 ± 0.18
PAV80	3.79 ± 2.48
PENF	53.24 ± 4.27
XIA	Below the detection limit

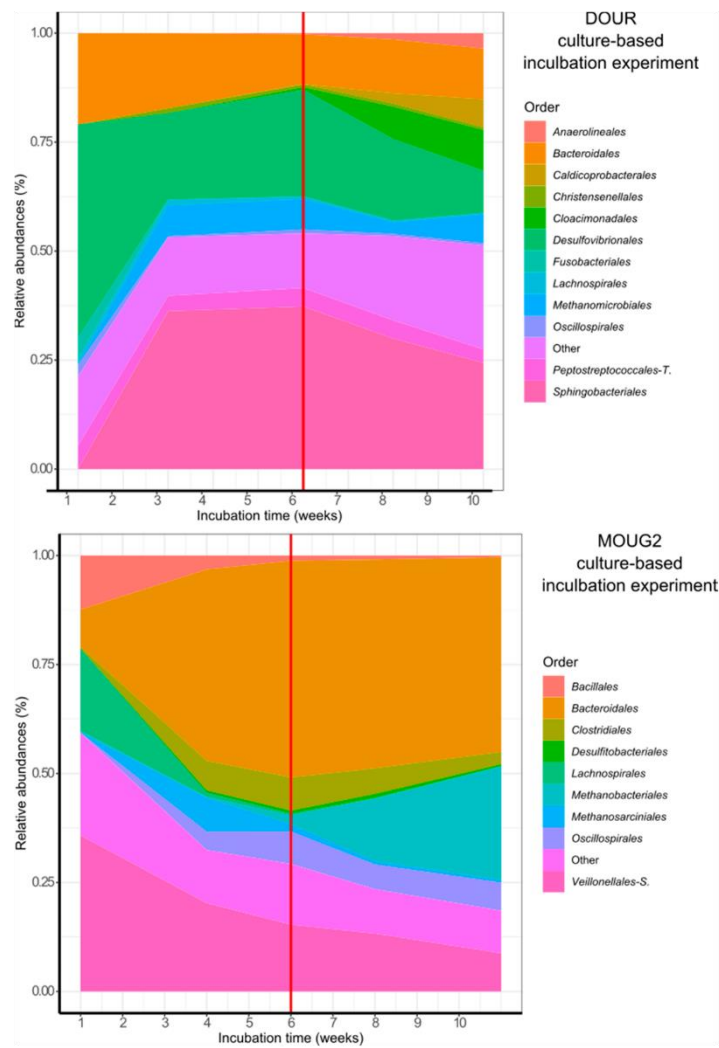


Figure S1. Trends in microbial diversity revealed by metabarcoding in DOUR (top) and MOUG2 (bottom) substrate-amended slurries, over time. Other: microbial diversity representing less than 5% of the sequences in the culture-based experiment.

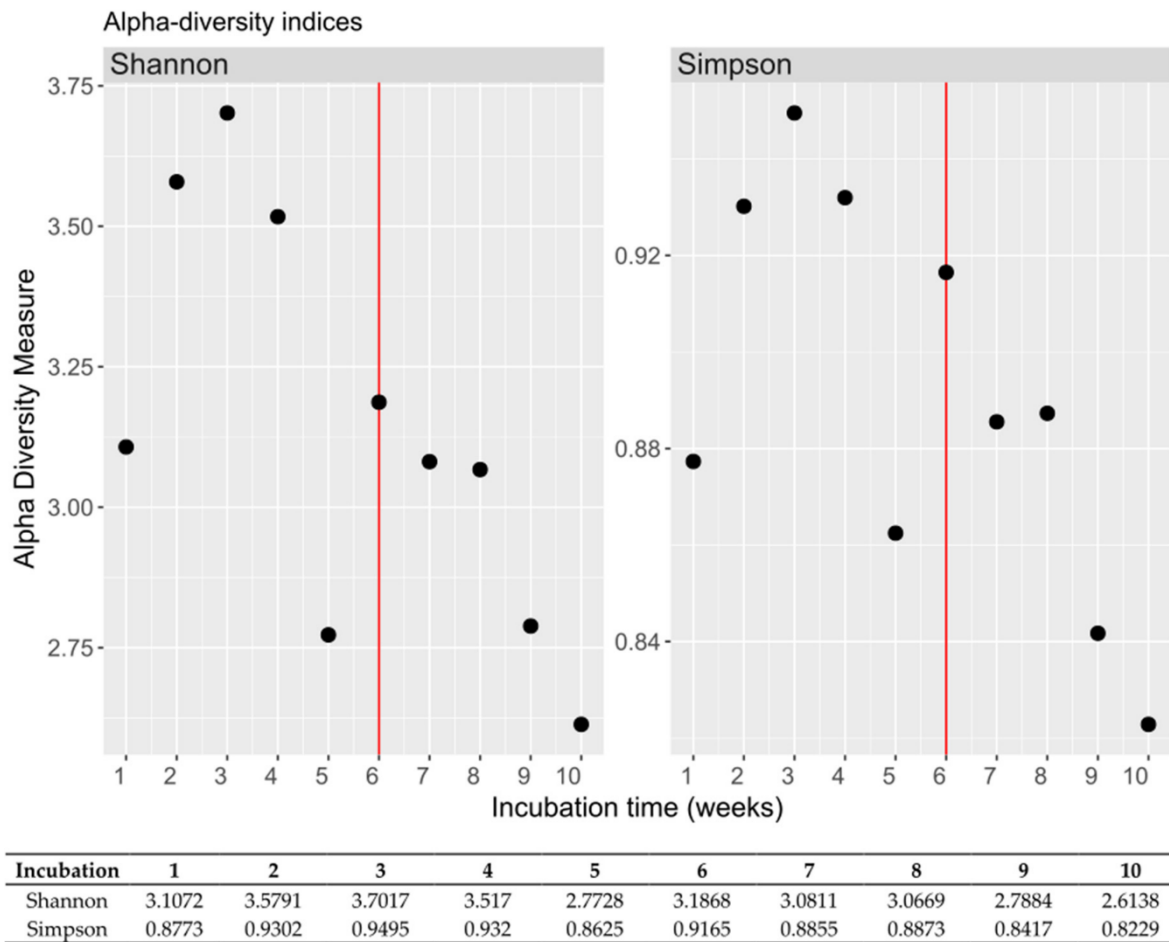


Figure S2. Evolution of the prokaryotic alpha-diversity during the incubation of the PENF sample, in the culture-based incubation experiment. The vertical red line indicates an addition of TMA, methanol and H₂/CO₂ after 6 weeks of incubation.



Figure S3. Microbial diversity patterns revealed by metabarcoding (16S rRNA gene copy numbers) in the PENF substrate-amended slurry over time. (A) Relative abundance of *Archaea* with respect to *Bacteria* sequences (B) Relative abundance of methanogen's and non-methanogen's archaeal sequence reads. (C) Relative abundance of sequences affiliated to the various methanogen's orders. (E) Relative abundance of sequences of *Methanomassiliicoccales* with respect to other *Archaea* sequences. (E) Relative abundance of *Methanomassiliicoccales* sequences with respect to non-methanogenic *Archaea*, other methanogens and *Bacteria* sequences..

Table S5. Taxonomic assignment of the taxa non-randomly associated with *Methanomassiliicoccales* OTUs and their reported metabolic features, within the PENF substrate-amended slurry. * the taxonomic affiliation does not allow to infer any possible metabolic characteristics; ** from genome annotation; ND : Not Determined; *Peptostreptococcales-T.*; *Peptostreptococcales-Tissierellales*; *Veillonellales-S.*; *Veillonellales-Selenomonadales*.

Origin	Percolation threshold	OTU source	Weight	Targeted OTU	Consensus Silva138, RDP database taxonomic affiliations			Representative reported to maintained (putative) partnership with methanogens	Reported metabolic products	References	
					Order	Family	Genus				
Culture-based incubation experiment (PENF)			0.96	OTU2	<i>Bacteroidales</i>	<i>Dysgonomonadaceae</i>	Multi-affiliation	No	Acids, acetate**	[24,25]	
			0.95	OTU52	<i>Synergistales</i>	<i>Synergistaceae</i>	Unknown genus	Yes	Short-chain fatty acids Acetate, ethanol, H ₂	[26]	
			0.95	OTU6	Unknown order	<i>Hungateichostriaceae</i>	<i>Ruminoclostridium</i>	ND	CO ₂ lactate, propionate, butyrate, and others	[27]	
		0.79	OTU21	OTU90	<i>Synergistales</i>	<i>Synergistaceae</i>	Unknown genus	Yes	Short-chain fatty acids	26]	
				0.92	OTU213	<i>Christensenellales</i>	<i>Christensenellaceae</i>	<i>Christensenellaceae R-7 group</i>	Yes	Acids, butyrate, H ₂ , CO ₂	[28-31]
				0.91	OTU44	<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanobacterium</i>	No	CH ₄	
				0.91	OTU8	<i>Bacteroidales</i>	<i>Rikenellaceae</i>	Bact-08	No	Acetate, alcohols, succinate	[30,32]
			OTU101	0.83	OTU521	<i>Peptococcales</i>	<i>Peptococcaceae</i>	Unknown genus	Yes	Acetate	[33]
				0.83	OTU693	<i>Peptostreptococcales-T.</i>	<i>Anaerotruncaceae</i>	<i>Anaerotruncax</i>	Yes	Acetate, H ₂ , butyrate	[34]
Bulk samples			0.73	OTU1052	<i>Woesencheriales</i>	Unknown family	Unknown genus	Yes	Acetate, H ₂	[35]	
		0.70	OTU21	OTU2361	<i>Spirochaetales</i>	<i>Spirochaetaceae</i>	Unknown genus	Yes	Acetate, H ₂ , CO ₂	[36]	
			0.71	OTU1174	<i>Woesencheriales</i>	Unknown family	Unknown genus	Yes	Acetate, H ₂	[37]	
		OTU30	0.85	OTU481	Unknown order	Unknown family	Unknown genus	*	*		

	0.84	OTU360	Unknown order	Unknown family	Unknown genus	*	*	*	
	0.80	OTU1228	Omnitrophales	Omnitrophaceae	Candidatus 'Omnitrophus'	*	*	*	
	0.79	OTU1624	Desulfatigiminales	Desulfatigimnaceae	Desulfatigans	No	CO ₂	[38,39]	
	0.77	OTU1749	MSB1.5	Unknown family	Unknown genus	*	*		
	0.77	OTU206	Animicenantales	Unknown family	Unknown genus	Yes	Acetate, H ₂ , CO ₂	[33]	
	0.73	OTU2574	Napoli-4B-65	Unknown family	Unknown genus	*	*		
	0.73	OTU2864	Omnitrophales	Omnitrophaceae	Candidatus 'Omnitrophus'	*	*		
	0.72	OTU2675	Babeliales	Unknown family	Unknown genus	No	ND	[40]	
	0.71	OTU308	FW22	Unknown family	Unknown genus	*	*		
	0.70	OTU2279	Desulfatibulbales	Desulfatopsaceae	Multi-affiliation	ND	ND	ND	
	0.87	OTU667	MBGD/DHVEG-1	Unknown family	Unknown genus	*	*		
	0.85	OTU2691	MBGD/DHVEG-1	Unknown family	Unknown genus	*	*		
OTU101	0.76	OTU2638	Anaerobiales	Anaerobineaceae	Unknown genus	Yes	Acetate	[41]	
	0.72	OTU21041	Geobacterales	Geobacteraceae	Multi-affiliation	Yes	Acetate	[33,42]	
	0.72	OTU2591	MBGD/DHVEG-1	Unknown family	Unknown genus	*	*		
	0.70	OTU2584	Veillonellales-S.	Sporemusaceae	Unknown genus	Yes	Acetate, R-CH ₃	[35]	
	0.81	OTU1049	Methanomicrobiales	Methanoregulaeae	Methanoregula	No	CH ₄	[43]	
	0.80	OTU2449	Peptostreptococcales-T.	Anaerotruncaceae	Anaerotruncax	Yes	Acetate, H ₂ , butyrate	[34]	
OTU926	0.71	OTU2815	Wasearchaentes	Unknown family	Unknown genus	Yes	Acetate, H ₂	[37]	
	0.71	OTU2148	RBC-13-54-9	Unknown family	Unknown genus	*	*		
	0.70	OTU2706	Anaerolineales	Anaerolineaceae	Leptolina	No	Acetate	[41]	
OTU30	0.85	OTU481	Unknown order	Unknown family	Unknown genus	*	*		
	0.85	OTU360	Unknown order	Unknown family	Unknown genus				
OTU101	0.87	OTU667	MBGD/DHVEG-1	Unknown family	Unknown genus	*	*		
	0.85	OTU2691	MBGD/DHVEG-1	Unknown family	Unknown genus	*	*		

Bulk samples

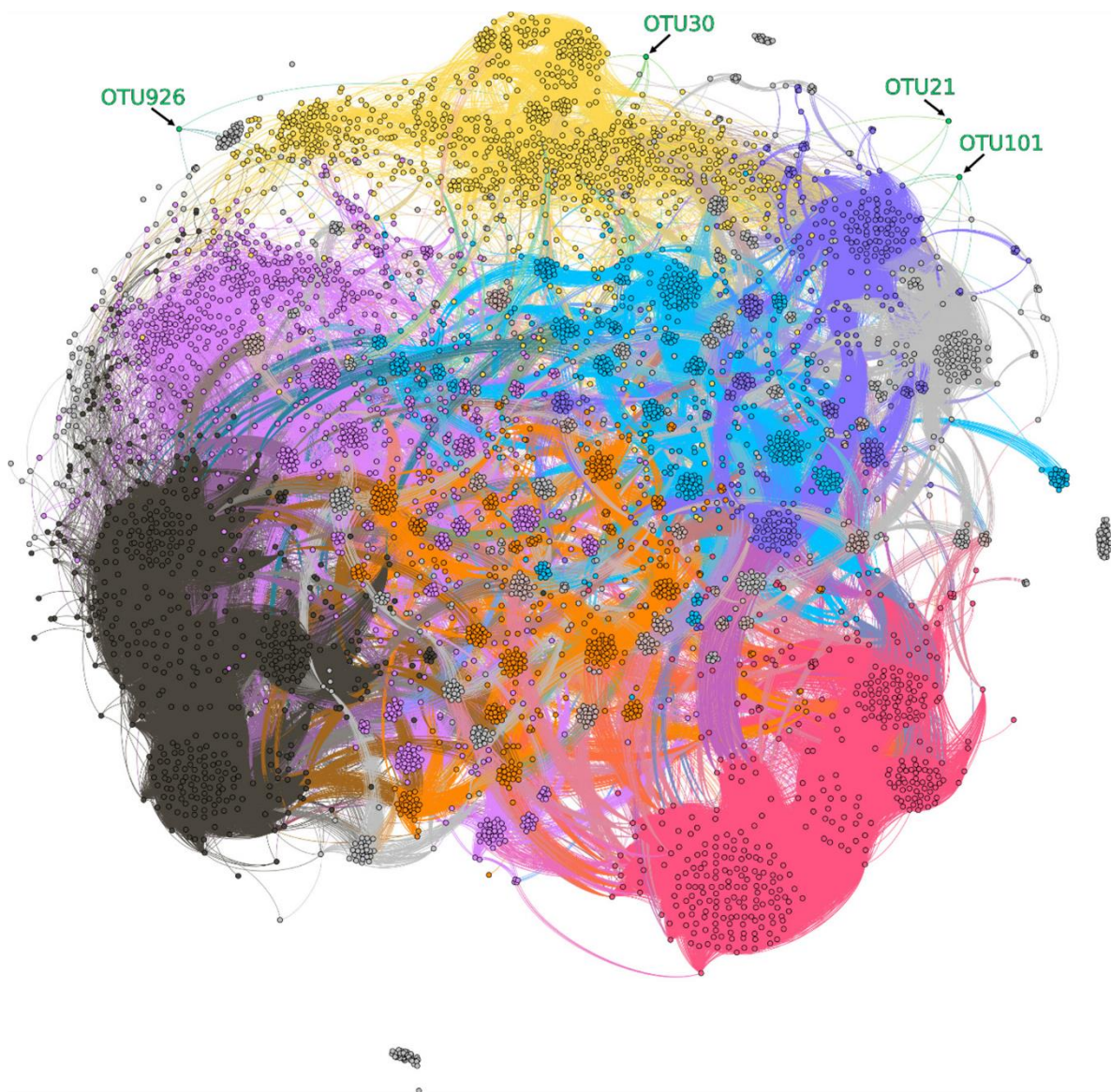


Figure S5. Co-occurrence network reconstructed based on 16S rRNA gene sequencing data from bulk environmental samples, based on a Spearman rank's correlation between OTUs and calculated with a percolation threshold of 0.70. Different colour nodes show different modules. *Methanomassiliicoccales* are in green.

References

- Mihajlovski, A.; Doré, J.; Levenez, F.; Alric, M.; Brugère, J.-F. Molecular evaluation of the human gut methanogenic archaeal microbiota reveals an age-associated increase of the diversity. *Environ. Microbiol. Rep.* **2010**, *2*, 272–280, doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00116.x.
- L'Haridon, S.; Chalopin, M.; Colombo, D.; Toffin, L. *Methanococcoides vulcani* sp. nov., a marine methylotrophic methanogen that uses betaine, choline and N,N-dimethylethanolamine for methanogenesis, isolated from a mud volcano, and emended description of the genus *Methanococcoides*. *Int. Syst. Evol. Micr.* **2014**, *64*, 1978–1983, doi:10.1099/ijs.0.058289-0.
- Zillig, W.; Holz, I.; Klenk, H.-P.; Trent, J.; Wunderl, S.; Janekovic, D.; Imsel, E.; Haas, B. *Pyrococcus woesei*, sp. nov., an ultra-thermophilic marine archaeobacterium, representing a novel order, *Thermococcales*. *Syst. Appl. Microbiol.* **1987**, *9*, 62–70, doi:10.1016/S0723-2020(87)80057-7.
- Lehours, A.-C.; Evans, P.; Bardot, C.; Joblin, K.; Gérard, F. Phylogenetic Diversity of *Archaea* and *Bacteria* in the Anoxic Zone of a Meromictic Lake (Lake Pavin, France). *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 2016–2019, doi:10.1128/AEM.01490-06.
- Yakimov, M.M.; Cono, V.L.; Spada, G.L.; Bortoluzzi, G.; Messina, E.; Smedile, F.; Arcadi, E.; Borghini, M.; Ferrer, M.; Schmitt-Kopplin, P.; et al. Microbial community of the deep-sea brine Lake Kryos seawater—Brine interface is active below the chaotropy limit of life as revealed by recovery of mRNA. *Environ. Microbiol.* **2015**, *17*, 364–382, doi:10.1111/1462-2920.12587.
- Alain, K.; Callac, N.; Ciobanu, M.-C.; Reynaud, Y.; Duthoit, F.; Jebbar, M. DNA extractions from deep subsurface sediments: Novel cryogenic-mill-based procedure and comparison to existing protocols. *J. Microbiol. Methods* **2011**, *87*, 355–362, doi:10.1016/j.mimet.2011.09.015
- Blankenberg, D.; Gordon, A.; Von Kuster, G.; Coraor, N.; Taylor, J.; Nekrutenko, A.; the Galaxy Team. Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 1783–1785, doi:10.1093/bioinformatics/btq281.
- Dridi, B.; Fardeau, M.-L.; Ollivier, B.; Raoult, D.; Drancourt, M. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **2012**, *62*, 1902–1907, doi:10.1099/ijs.0.033712-0.
- Iino, T.; Tamaki, H.; Tamazawa, S.; Ueno, Y.; Ohkuma, M.; Suzuki, K.; Igarashi, Y.; Haruta, S. *Candidatus Methanogranum caenicola*: A Novel Methanogen from the Anaerobic Digested Sludge, and Proposal of *Methanomassiliicocaceae* fam. nov. and *Methanomassiliicoccales* ord. nov., for a Methanogenic Lineage of the Class *Thermoplasmata*. *Microbes Environ.* **2013**, *28*, doi:10.1264/jsm.2.ME12189
- Borrel, G.; O'Toole, P.W.; Harris, H.M.B.; Peyret, P.; Brugère, J.-F.; Gribaldo, S. Phylogenomic Data Support a Seventh Order of Methylotrophic Methanogens and Provide Insights into the Evolution of Methanogenesis. *Genome Biol. Evol.* **2013**, *5*, 1769–1780, doi:10.1093/gbe/evt128.
- Söllinger, A.; Schwab, C.; Weinmaier, T.; Loy, A.; Tveit, A.T.; Schleper, C.; Urich, T. Phylogenetic and genomic analysis of *Methanomassiliicoccales* in wetlands and animal intestinal tracts reveals clade-specific habitat preferences. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2016**, *92*, doi:10.1093/femsec/fiv149.
- Borrel, G.; McCann, A.; Deane, J.; Neto, M.C.; Lynch, D.B.; Brugère, J.-F.; O'Toole, P.W. Genomics and metagenomics of trimethylamine-utilizing *Archaea* in the human gut microbiome. *ISME J.* **2017**, *11*, 2059–2074, doi:10.1038/ismej.2017.72.
- Lang, K.; Schuldes, J.; Klingl, A.; Poehlein, A.; Daniel, R.; Brune, A. New Mode of Energy Metabolism in the Seventh Order of Methanogens as Revealed by Comparative Genome Analysis of “*Candidatus Methanoplasma termitum*.” *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 1338–1352, doi:10.1128/AEM.03389-14.
- Borrel, G.; Parisot, N.; Harris, H.M.; Peyretailade, E.; Gaci, N.; Tottey, W.; Bardot, O.; Raymann, K.; Gribaldo, S.; Peyret, P.; et al. Comparative genomics highlights the unique biology of *Methanomassiliicoccales*, a *Thermoplasmatales*-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine. *BMC Genom.* **2014**, *15*, 679, doi:10.1186/1471-2164-15-679.
- Zinke, L.A.; Evans, P.N.; Schroeder, A.L.; Parks, D.H.; Varner, R.K.; Rich, V.I.; Tyson, G.W.; Emerson, J.B. Evidence for non-methanogenic metabolisms in globally distributed archaeal clades basal to the *Methanomassiliicoccales*. *Environ. Microbiol.* **2020**, *n/a*, doi:10.1101/2020.03.09.984617.
- Gascuel, O. BIONJ: An improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol. Biol. Evol.* **1997**, *14*, 685–695, doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a025808.
- Kröniger, L.; Berger, S.; Welte, C.; Deppenmeier, U. Evidence for the involvement of two heterodisulfide reductases in the energy-conserving system of *Methanomassiliicoccus luminyensis*. *FEBS J.* **2016**, *283*, 472–483, doi:10.1111/febs.13594.
- Kemnitz, D.; Kolb, S.; Conrad, R. Phenotypic characterization of Rice Cluster III archaea without prior isolation by applying quantitative polymerase chain reaction to an enrichment culture. *Environ. Microbiol.* **2005**, *7*, 553–565, doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00723.x.
- Kröniger, L.; Gottschling, J.; Deppenmeier, U. Growth Characteristics of *Methanomassiliicoccus luminyensis* and expression of methyltransferase encoding genes. *Archaea* **2017**, 2756573, doi:10.1155/2017/2756573
- Mah, R.A.; Smith, M.R.; Baresi, L. Studies on an acetate-fermenting strain of *Methanosarcina*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1978**, *35*, 1174–1184.
- Webster, G.; Rinna, J.; Roussel, E.G.; Fry, J.C.; Weightman, A.J.; Parkes, R.J. Prokaryotic functional diversity in different biogeochemical depth zones in tidal sediments of the Severn Estuary, UK, revealed by stable-isotope probing. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2010**, *72*, 179–197, doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00848.x.
- Ciobanu, M.-C.; Rabineau, M.; Droz, L.; Révillon, S.; Ghiglione, J.-F.; Denniclou, B.; Jorry, S.-J.; Kallmeyer, J.; Etoubleau, J.; Pignet, P.; et al. Sedimentological imprint on subsurface microbial communities in Western Mediterranean Sea Quaternary sediments. *Biogeosciences* **2012**, *9*, 3491–3512, doi:10.5194/bg-9-3491-2012.

23. Pierre, C.; Blanc-Valleron, M.-M.; Demange, J.; Boudouma, O.; Foucher, J.-P.; Pape, T.; Himmler, T.; Fekete, N.; Spiess, V. Authigenic carbonates from active methane seeps offshore southwest Africa. *Geo Mar. Lett.* **2012**, *32*, 501–513, doi:10.1007/s00367-012-0295-x.
24. Murakami, T.; Segawa, T.; Takeuchi, N.; Sepúlveda, G.B.; Labarca, P.; Kohshima, S.; Hongoh, Y. Metagenomic analyses highlight the symbiotic association between the glacier stonefly *Andiperla willinki* and its bacterial gut community. *Environ. Microbiol.* **2018**, *20*, 4170–4183, doi:10.1111/1462-2920.14420.
25. Olsen, I. *Dysgonomonas*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*; John Wiley & Sons, Inc: Hoboken, NJ, USA, 2015; pp. 1–8, ISBN 978-1-118-96060-8, doi:10.1002/9781118960608.gbm00243.
26. Vartoukian, S.R.; Palmer, R.M.; Wade, W.G. The division “*Synergistes*.” *Anaerobe* **2007**, *13*, 99–106, doi:10.1016/j.anaerobe.2007.05.004.
27. Yutin, N.; Galperin, M.Y. A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-Negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environ. Microbiol.* **2013**, *15*, 2631–2641, doi:10.1111/1462-2920.12173.
28. Goodrich, J.K.; Waters, J.L.; Poole, A.C.; Sutter, J.L.; Koren, O.; Blekhman, R.; Beaumont, M.; Van Treuren, W.; Knight, R.; Bell, J.T.; et al. Human Genetics Shape the Gut Microbiome. *Cell* **2014**, *159*, 789–799, doi:10.1016/j.cell.2014.09.053.
29. Morotomi, M.; Nagai, F.; Watanabe, Y. Description of *Christensenella minuta* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, which forms a distinct branch in the order *Clostridiales*, and proposal of *Christensenellaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2012**, *62*, 144–149, doi:10.1099/ijs.0.026989-0.
30. Lee, J.; Koo, T.; Yulisa, A.; Hwang, S. Magnetite as an enhancer in methanogenic degradation of volatile fatty acids under ammonia-stressed condition. *J. Environ. Manag.* **2019**, *241*, 418–426, doi:10.1016/j.jenvman.2019.04.038.
31. Waters, J.L.; Ley, R.E. The human gut bacteria *Christensenellaceae* are widespread, heritable, and associated with health. *BMC Biol.* **2019**, *17*, 83, doi:10.1186/s12915-019-0699-4.
32. Graf, J. The Family *Rikenellaceae*. In *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*; Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2014; pp. 857–859, ISBN 978-3-642-38954-2, doi:10.1007/978-3-642-38954-2_134.
33. Liu, P.; Klöse, M.; Conrad, R. Temperature effects on structure and function of the methanogenic microbial communities in two paddy soils and one desert soil. *Soil Biol. Biochem.* **2018**, *124*, 236–244, doi:10.1016/j.soilbio.2018.06.024.
34. Schink, B. *Anaerovorax*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*; John Wiley & Sons, Inc: Hoboken, NJ, USA, 2015; pp. 1–3, ISBN 978-1-118-96060-8, doi:10.1002/9781118960608.gbm00725.
35. Drake, H.L.; Gössner, A.S. *Sporomusa*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*; John Wiley & Sons, Inc: Hoboken, NJ, USA, 2015; pp. 1–7, ISBN 978-1-118-96060-8, doi:10.1002/9781118960608.gbm00706.
36. Fowler, S.J.; Dong, X.; Sensen, C.W.; Sufliya, J.M.; Gieg, L.M. Methanogenic toluene metabolism: Community structure and intermediates. *Environ. Microbiol.* **2012**, *14*, 754–764, doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02631.x.
37. Liu, X.; Li, M.; Castelle, C.J.; Probst, A.J.; Zhou, Z.; Pan, J.; Liu, Y.; Banfield, J.F.; Gu, J.-D. Insights into the ecology, evolution, and metabolism of the widespread *Woesearchaeotal* lineages. *Microbiome* **2018**, *6*, 102, doi:10.1186/s40168-018-0488-2.
38. Suzuki, D.; Li, Z.; Cui, X.; Zhang, C.; Katayama, A. Reclassification of *Desulfobacterium anilini* as *Desulfatiglans anilini* comb. nov. within *Desulfatiglans* gen. nov., and description of a 4-chlorophenol-degrading sulfate-reducing bacterium, *Desulfatiglans parachlorophenolica* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2014**, *64*, 3081–3086, doi:10.1099/ijs.0.064360-0.
39. Galushko, A.; Kuever, J. *Desulfatiglans*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*; John Wiley & Sons, Inc: Hoboken, NJ, USA, 2019; pp. 1–4, ISBN 978-1-118-96060-8, doi:10.1002/9781118960608.gbm01679.
40. Deeg, C.M.; Zimmer, M.M.; George, E.E.; Husnik, F.; Keeling, P.J.; Suttle, C.A. *Chromulinavorax destructans*, a pathogen of microzooplankton that provides a window into the enigmatic candidate phylum Dependuntiae. *PLoS Pathog.* **2019**, *15*, e1007801, doi:10.1371/journal.ppat.1007801.
41. Snell-Castro, R.; Méndez-Acosta, H.O.; Arreola-Vargas, J.; González-Álvarez, V.; Pintado-González, M.; González-Morales, M.T.; Godon, J.J. Active prokaryotic population dynamics exhibit high correlation to reactor performance during methane production from acid hydrolysates of *Agave tequilana* var. *azul* bagasse. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *126*, 1618–1630, doi:10.1111/jam.14234.
42. Zhang, S.; Chang, J.; Lin, C.; Pan, Y.; Cui, K.; Zhang, X.; Liang, P.; Huang, X. Enhancement of methanogenesis via direct interspecies electron transfer between *Geobacteraceae* and *Methanosaetaceae* conducted by granular activated carbon. *Bioresour. Technol.* **2017**, *245*, 132–137, doi:10.1016/j.biortech.2017.08.111.
43. Zinder, S.; Bräuer, S. *Methanoregula*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*; John Wiley & Sons, Inc: Hoboken, NJ, USA, 2016; pp. 1–8, ISBN 978-1-118-96060-8, doi:10.1002/9781118960608.gbm01368

Chapitre II : Travaux supplémentaires

1. Quantification des bactéries et archées totales dans les échantillons environnementaux et les mésocosmes

Dans le cadre de l'étude présentée dans le chapitre I, la quantification des *Methanomassiliicoccales* par PCR quantitative (qPCR) s'est accompagnée de la quantification (i) des archées totales dans les échantillons environnementaux analysés et tout au long du processus d'enrichissement dans le *slurry* PENF et (ii) des bactéries totales dans les échantillons du *slurry* PENF. La quantification des archées a été réalisée avec le couple d'amorces ARC-787F (5'-ATTAGATACCCSBGTAGTCC-3') / ARC-1059R (5'-GCCATGCACCWCCTCT-3') (Yu *et al.*, 2005). Malheureusement, même si toutes les étapes de validation du protocole de quantification par qPCR des archées totales ont pu être mises au point (concentrations d'amorces ; validation *in silico* et *in vitro* de la spécificité de amorces), des résultats de quantification fiables et reproductibles n'ont pas pu être obtenus sur nos échantillons, en dépit de nombreux efforts. La quantification des bactéries totales dans les échantillons environnementaux criblés par métabarcodes n'a pas pu être réalisée faute d'ADN suffisant. Pour cette raison, ces données parcellaires d'abondance n'ont pas été intégrées à l'article.

a) Procédure expérimentale

La quantification des gènes codant les ARNr 16S des bactéries a été réalisée au cours de l'incubation du microcosme PENF. Les amorces utilisées pour l'amplification des gènes codant les ARNr 16S des *Bacteria* étaient BACT1369F (5'-CGGTGAATACGTTTCYCGG-3') et PROK1492R (5'-GGWTACCTTGTTACGACTT-3') (123 paires de bases) (Suzuki *et al.*, 2000). Différentes concentrations d'amorces ont été testées (respectivement 200, 300, 400, 500, 600 et 900 nM) afin de sélectionner celle donnant les meilleurs résultats d'amplifications (*i.e.* : $90 < \text{Eff\%} < 110$ et $r^2 > 0,99$). Suite à ce travail, la concentration en amorces de 500 nM a été retenue pour les analyses. La spécificité du couple d'amorces a été validée *in vitro* par PCR sur un panel de bactéries (*Thermodesulfator atlanticus*, *Desulfobacterium indicum*, *Escherichia* sp. et *Pseudomonas* sp.) et d'archées (*Mmc. luminyensis*, *Haloferax vulcanii*, *Thermococcus barophilus*) disponibles au laboratoire afin de s'assurer de la spécificité des amorces envers les bactéries (résultat concluant = spécificité attendue). Les courbes standards ont été préparées en triplicats avec des dilutions allant de 10^{-1} à 10^9 copies μl^{-1} du gène codant les ARNr 16S de *Thermodesulfator atlanticus* (Alain *et al.*, 2010).

Les réactions d'amplifications ont été réalisées à l'aide d'un appareil StepOnePlus™ System (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific) dans un volume final de 25 µl en utilisant le kit PerfeCTa® SYBR® Green SuperMix (Quanta, VWR). Les quantifications ont été réalisées en triplicate avec 5 ng d'ADN matrice (5 µl de matrice à 1 ng µl⁻¹ ajoutés à 20 µl de solution réactionnelle) (+ témoins négatifs). Les conditions d'amplifications étaient les suivantes : 1 étape initiale de dénaturation de 10 min à 95°C, et 40 cycles de dénaturation à 95 °C (15 s) suivis d'une hybridation et extension à 60 °C (60 s). La spécificité et la qualité des amplifications ont été vérifiées par l'analyse des courbes de fusion ainsi que des efficacités (%) et coefficients de détermination (r²) des gammes étalons. Les résultats ont été conservés si (i) l'efficacité était comprise entre 90 et 105%, avec un r² ≥ 0,99, (ii) un nombre de Ct (Threshold Cycle) ≤ 30 et (iii) en l'absence d'amplification des témoins négatifs d'extraction, ou avec une différence d'amplification > 3 Ct par rapport aux contrôles d'extraction. Les produits d'amplifications ont été déposés sur gel d'agarose puis soumis à une migration électrophorétique (90 V, 400 mA, 30 min) afin de s'assurer de l'amplification spécifique des gènes-cibles.

b) Résultats des quantifications des bactéries totales dans les microsomes

Un suivi par qPCR de l'évolution du nombre de copies des gènes codant les ARNr 16S des *Methanomassiliicoccales*, des archées totales et des bactéries totales devait être réalisé tout au long du processus d'incubation du *slurry* PENF afin d'évaluer l'évolution de l'abondance relative des *Methanomassiliicoccales* au cours du temps, par rapport à celles des archées et bactéries totales (Figure 39). Malheureusement, nous avons été confrontés à la fois à un problème de panne de l'appareil de qPCR qui fait que ces données n'ont pas pu être traitées en temps réel, et à des problèmes d'amplification. Pour ces raisons, ce jeu de données est incomplet et ne comprend que des valeurs d'abondances en *Methanomassiliicoccales* (présentées dans l'article) et en *Bacteria* (présentées ci-dessous).

En règle générale, les quantifications ciblant les bactéries totales n'ont pas non plus fonctionné pour les extraits d'ADN à partir desquels les *Methanomassiliicoccales* n'ont pas été quantifiées. Les seules exceptions concernaient les échantillons PENF5 et PENF10 (représentant respectivement 5 et 10 semaines d'incubations), pour lesquels des quantifications des *Methanomassiliicoccales* ont été obtenues, contrairement aux *Bacteria*. Plusieurs tentatives infructueuses de quantification des gènes ciblant les ARNs 16S des *Bacteria*, des *Archaea* et

des *Methanomassiliicoccales* ont été réalisées pour les points manquants, mais sans succès. La source du problème n'a pas été identifiée.

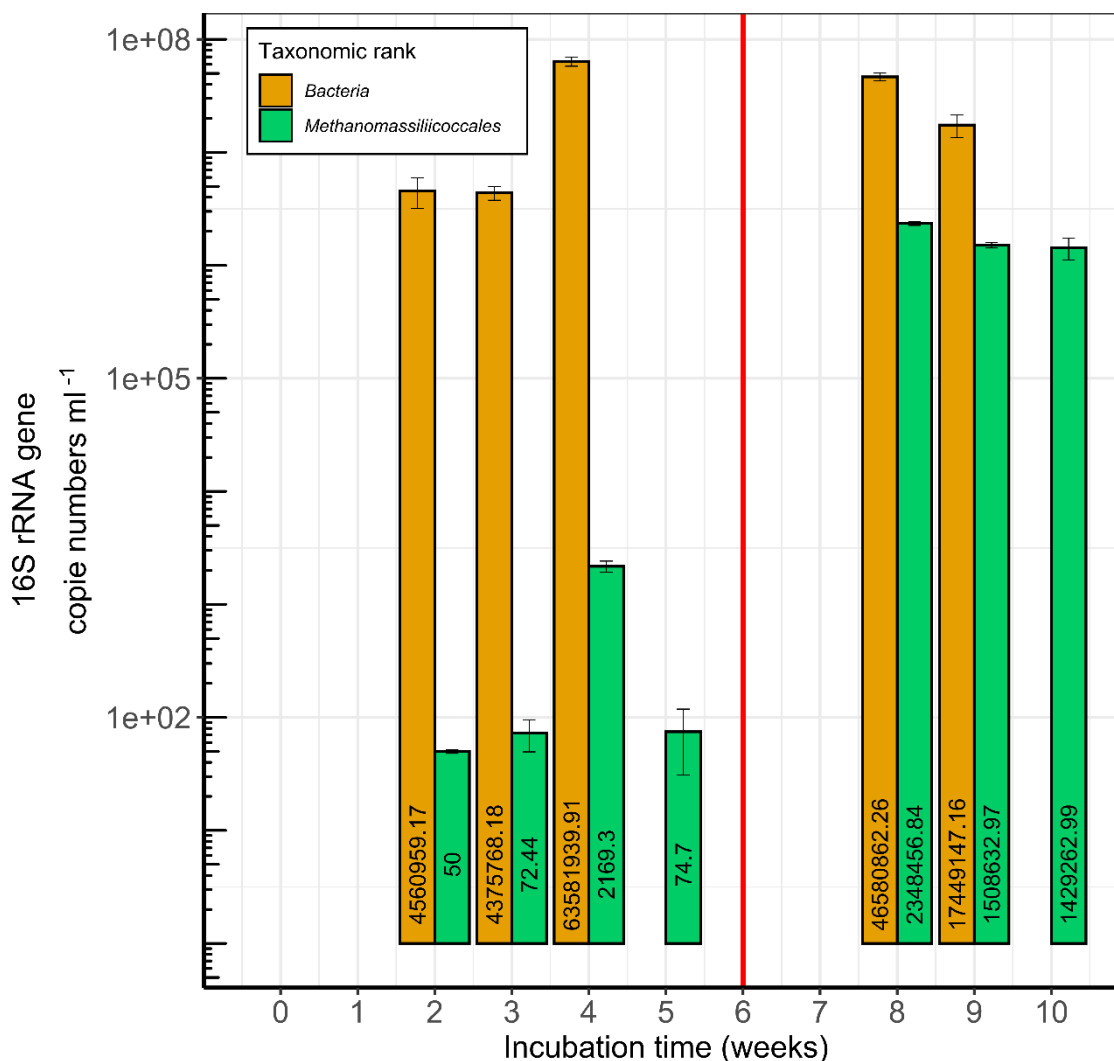


Figure 1 : Evolution du nombre de copies des gènes codant les ARNr 16S des Methanomassiliicoccales et des bactéries totales au cours du temps dans le slurry PENF. L'axe des ordonnées est en échelle logarithmique. La ligne verticale rouge représente un renouvellement de substrat (H₂/CO₂ 80 : 20 1 bar, 40 mM de triméthylamine, 40 mM de méthanol). Les valeurs de quantification des Methanomassiliicoccales sont identiques à celles présentées dans l'étude du chapitre I (Cozannet *et al.*, 2021). Les valeurs moyennes d'abondance sont indiquées dans chaque histogramme.

La quantification des gènes codant les ARNr 16S des bactéries totales a tout de même pu être réalisée pour quelques points. Le nombre de copies des gènes codant les ARNr 16S a augmenté entre les points T2 et T4, passant de $4,56 \times 10^6$ copies ml⁻¹ à $6,36 \times 10^7$ copies ml⁻¹ à T4, avant de rester relativement stable jusqu'à T9 ($1,74 \times 10^7$ copies ml⁻¹) (soit après 2, 4 et 9 semaines d'incubation). Ces résultats sont toutefois à considérer avec précaution au vu des lacunes du jeu de données. Cependant, cette tendance globale est également celle qui est observée dans les données de diversité (abondances relatives) obtenues par *metabarcoding* (voir

Figure 3 (C) de l'article du chapitre I, (Cozannet *et al.*, 2021). Ces données d'abondance concernant les *Bacteria* auraient pu être ajoutées aux données présentées dans l'article présenté dans le chapitre I. Cependant, nous avons fait le choix de ne pas le faire, car, sans les données d'abondance concernant les archées totales, les données d'abondance concernant les *Bacteria* n'ont que peu d'intérêt.

Toutefois, ce jeu de données d'abondance, même s'il est imparfait, a permis de démontrer qu'il y a bien eu développement de *Methanomassiliicoccales* au fil du temps. Comme mentionné dans le chapitre I, une augmentation de près de 5 log de l'abondance en *Methanomassiliicoccales* a été obtenue après 8 semaines d'incubation et démontre qu'il y a bien eu un enrichissement significatif en ces archées ($p < 0,0001$, pour l'analyse de la variance et le test t de Student) au fil de l'incubation.

2. Tentatives d'isolement d'une souche de *Methanomassiliicoccales* par une approche d'étalement sur milieu gélosé

Par ailleurs, au début de la thèse, des tentatives d'enrichissement et d'isolement d'une souche de *Methanomassiliicoccales* à partir d'un échantillon de tourbe (MOUG2, (Cozannet *et al.*, 2021)) ont été entreprises en combinant une première phase d'enrichissement en milieu liquide suivie d'un étalement sur gélose. Ces travaux avaient pour objectif de cultiver et d'isoler une colonie de *Methanomassiliicoccales* affiliée au cluster *free-living*, en s'inspirant des travaux de Dridi *et al.* (2012a) qui avaient permis l'isolement de *Methanomassiliicoccus luminyensis* B10^T.

a) Procédure expérimentale

La composition du milieu et les techniques utilisées pour la culture d'enrichissement sont identiques à celles décrites précédemment (Cozannet *et al.*, 2021), hormis que le milieu renfermait 0,2 g d'extrait de levure (OXOID, Basingstoke, Hampshire, Royaume-Uni) à la place de la peptone. Le pH du milieu a été ajusté à 5,5. Le milieu a été aliquoté en fioles pénicilline, sous un flux gazeux de N₂/CO₂, à raison de 30 ml de milieu par fiole (dans des

fioles de 100 ml), puis les fioles ont été scellées avec des bouchons en butyl et serties d'une capsule en aluminium.

Après autoclavage et ajout des substrats (TMA et MeOH : 40 mM chacun) (Cozannet *et al.*, 2021) en conditions stériles, une fiole de milieu a étéensemencée avec 3 ml d'eau interstitielle de l'échantillon de tourbe MOUG2. La phase gazeuse de la fiole a ensuite été balayée puis pressurisée avec 1 bar de H₂/CO₂ (80/20), avant que cette dernière soit incubée à 30 °C, à l'obscurité, sans agitation. Après un mois d'incubation, une faible production de méthane (~ 3,5 mM) a été mesurée grâce à un micro-chromatographe en phase gazeuse (microGC INFICON/MicroGC FUSION (INFICON, Bâle, Suisse) couplé à un manomètre (CTE8005AY0, SensorTechnics GmbH) et équipé de deux détecteurs de conduction. La culture a alors été repiquée en milieu liquide (10% v/v), dans des conditions identiques. A partir de cette étape, une panne du micro-GC nous a conduit à suivre le développement des *Methanomassiliicoccales* en culture par une approche moléculaire de PCR (Remarque : à ce stade, le protocole de qPCR n'avait pas encore été mis au point), à l'aide d'amorces (AS1_Fw et AS2_Rv mod.) ciblant les gènes codant les ARNr 16S des *Methanomassiliicoccales*, comme décrit précédemment (Cozannet *et al.*, 2021). Un signal PCR positif (taille des amplicons attendus) ayant été obtenu avec les amorces ciblant spécifiquement les *Methanomassiliicoccales*, des tentatives de purification de la culture sur milieu gélosé ont été entreprises.

La base minérale du milieu solide était identique à celle décrite ci-dessus, hormis que celui-ci comprenait en plus 20 g ml⁻¹ d'agar lavé (pour éliminer les molécules de faibles poids moléculaires et limiter le développement de microorganismes hétérotrophes dégradant l'agar) (Widdel & Bak, 1992). Les milieux de culture ont été autoclavés puis aliquotés dans 3 fioles à raison de 13 ml de milieu par fiole de Wolfe (*i.e.* : des fioles ayant 2 faces aplaties), sous un flux gazeux de N₂/CO₂ (80/20, 0,3 bar), avant d'êtreensemencés avec 400 µl de culture liquide (stries) dans une enceinte anaérobie (N₂/H₂, 97/3) (Coy laboratory, Grass lake, Michigan, États-Unis). L'atmosphère gazeuse des fioles a ensuite été remplacée par un mélange d'H₂/CO₂ (80/20, 1 bar) avant incubation à 30 °C. Après un mois d'incubation, de petits agrégats macroscopiques (ressemblant à des colonies et dénommés ci-après « agrégats macroscopiques » ou « colonies-like ») bleus clairs, ras et circulaires se sont développés à la surface des milieux gélosés de deux fioles de Wolfe (Figure 40). Cette description ressemblait à celle qui avait été faite de l'aspect des colonies de *Methanomassiliicoccus luminyensis* B10^T

(Dridi *et al.*, 2012a). Huit « colonies-like » ont donc été sélectionnées pour être repiquées sur un milieu gélosé frais pour tenter de purifier les souches en culture. Dans une enceinte anaérobie, 8 agrégats macroscopiques d'aspect identique ont été prélevés puis étalés sur un nouveau milieu gélosé à l'aide d'une öse, puis incubés sous H₂/CO₂ (80/20, 1 bar) à 30 °C. L'extrémité de chaque öse a ensuite été plongée dans 50 µl d'eau stérile et osmosée dans l'objectif de lyser les cellules adsorbées à leur surface en vue de séquencer leurs gènes d'ARN 16S. Chaque « colonie-like » a ensuite fait l'objet d'un nouveau prélèvement en vue d'inoculer 3 ml de milieu liquide en tube Hungate.

Afin de rechercher la présence de *Methanomassiliicoccales* au sein des agrégats sélectionnés, des amplifications par PCR ont été réalisées à partir des extraits cellulaires prélevés sur les öses avec des amorces ciblant les *Methanomassiliicoccales* (AS1_Fw / AS2_Rv mod.), d'une part, et les *Bacteria* (amorces Bac8F/U1492R) d'autre part, comme décrit par ailleurs (Cozannet *et al.*, 2021). Des signaux d'amplifications spécifiques (479 paires de bases) avec les amorces ciblant les *Methanomassiliicoccales* ont été obtenus pour 4 (nommées respectivement A, B, C et D) des 8 agrégats macroscopiques sélectionnés. Les bandes d'intérêt ont été découpées sur les gels d'électrophorèse, puis purifiées à l'aide du kit Wizard[®] DV Gel and PCR Clean-UP System (Promega) en suivant les instructions du fabricant. Les amplicons ont ensuite été clonés à l'aide dans le vecteur pCR[®]2.1-TOPO du kit « TOPO TA Cloning Kit » (Invitrogen, Carlsbad, Californie, États-Unis), puis transformées dans des cellules compétentes TOP 10F' (Invitrogen), en suivant le protocole du fabricant. Quinze clones positifs (blancs) ont ensuite été séquencés par séquençage Sanger (Genewiz, Leipzig, Allemagne) avec les amorces AS1_Fw. et AS2_Rv mod.

Un second clonage ciblant les *Bacteria* a également été réalisé sur les extraits cellulaires des 4 « colonies-like » ayant présenté un signal PCR positif en *Methanomassiliicoccales*, ces dernières ayant également donné un signal d'amplification avec les amorces spécifiques des *Bacteria*. Après clonage, 38 colonies ont été séquencées avec les amorces Bac8F et U1492R.

L'ensemble des séquences de *Methanomassiliicoccales* d'une part, et de *Bacteria* d'autre part, ont été alignées à l'aide de l'algorithme MUSCLE, puis curées et coupées à l'aide de GBLOCKS. Une reconstruction phylogénétique a ensuite été réalisée avec PhyML (Guindon *et al.*, 2010), avec un rééchantillonnage de 1000 bootstraps.

b) Résultats des tentatives d'isolement

Après une étape d'enrichissement en milieu liquide ayant conduit à une croissance cellulaire et à une production de méthane, puis un repiquage en milieu liquide ayant permis la stabilisation de cette culture, des tentatives d'isolement sur milieu solide ont été réalisées. Comme précisé ci-dessus, de petits agrégats macroscopiques bleutés se sont développés à la surface des géloses après un mois d'incubation (Figure 40). Des résultats positifs d'amplification par PCR avec le couple d'amorces AS1_Fw / AS2_Rv mod. ciblant les gènes codant les ARNr 16S des *Methanomassilioccales* ont été obtenus pour 4 de ces agrégats. Pour ces 4 « colonies-like », des clonages-séquençages ciblant les *Bacteria* et les *Methanomassilioccales* ont ensuite été réalisés afin de s'assurer (i) de la présence de ces archées au sein des agrégats et connaître leur diversité phylogénétique et (ii) d'identifier les bactéries présentes dans ces agrégats.



Figure 2 : Photographies des agrégats macroscopiques bleutés qui se sont développés à la surface de la gélose d'une fiole de Wolfe.

L'alignement des 15 séquences des gènes codant les ARNr 16S des *Methanomassilioccales* a révélé que ces séquences étaient toutes identiques entre-elles. Ces séquences étaient affiliées au cluster *free-living*. Elles présentaient une forte similitude avec la séquence du gène de l'ARNr 16S de *Methanomassiliococcus luminyensis* (99 % de recouvrement et d'identité de séquence, sur ~ 450 pb) et étaient identiques (100% de recouvrement et d'identité de séquence, sur ~ 250 pb) à la séquence de l'OTU30 discutée dans le chapitre I (Cozannet *et al.*, 2021) (*Rappel* : cette OTU a été détectée dans l'ensemble des 22 échantillons environnementaux renfermant des *Methanomassilioccales*, ainsi que dans le microcosme PENF) (Figure 41). Ces résultats et ceux présentés dans l'article suggèrent que le

genre *Methanomassiliicoccus* pourrait avoir colonisé un large panel d'environnements non digestifs et être relativement ubiquistes (Borrel *et al.*, 2017; Cozannet *et al.*, 2021). Il n'est pas non plus exclu que le milieu utilisé dans cette étude pour la culture des *Methanomassiliicoccales* affiliées au cluster *free-living* favorise le développement des représentants de ce genre.

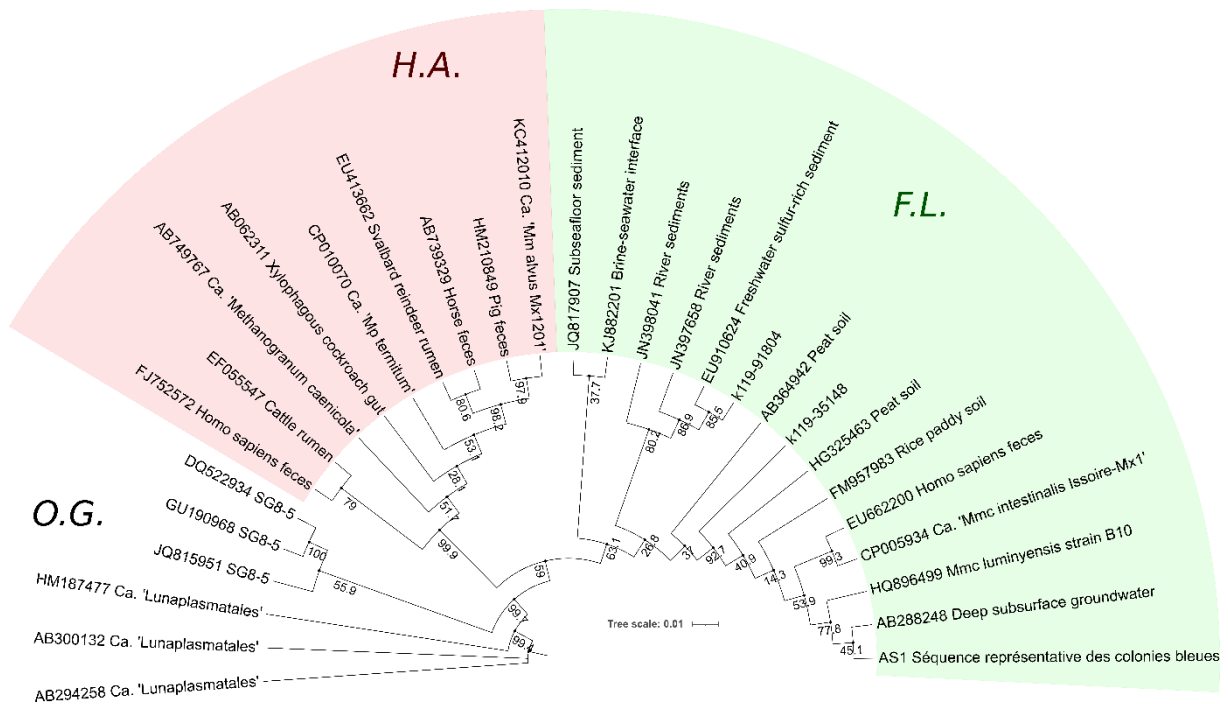


Figure 3 : Dendrogramme représentant la relation entre la séquence du gène de l'ARNr16S représentative des *Methanomassiliicoccales* détectée dans les agrégats macroscopiques, et les séquences d'autres *Methanomassiliicoccales*. Les séquences k119_35148 et k119_91804 sont issues du *slurry* PENF (Cozannet *et al.* 2021). Cette reconstruction a été réalisée à partir d'une portion des gènes codant les ARNr 16S alignées avec MUSCLE, puis traitées avec GBlock et PhyML, avec un rééchantillonnage de 1000 bootstraps. *F.L.* : cluster *free-living* ; *H.A.* : cluster *host-associated* ; *O.G.* : out-group.

Un clonage-séquençage ciblant les *Bacteria* totales a également été réalisé à partir des lysats cellulaires réalisés à partir des 4 agrégats macroscopiques renfermant des *Methanomassiliicoccales* (Figure 42). Sur les 38 séquences obtenues, cinq n'ont pas été incluses dans l'analyse phylogénétique car elles n'étaient pas de bonne qualité. Sur les 33 séquences restantes, 7 étaient affiliées au phylum des *Bacteroidetes* et 26 au phylum des *Firmicutes*. Ces séquences étaient équitablement réparties entre les différents agrégats (A–D), indiquant que la composition bactérienne au niveau du phylum était probablement relativement homogène au sein des agrégats macroscopiques. Aucune comparaison entre les séquences bactériennes provenant des agrégats et les séquences représentatives des OTUs détectées dans les jeux de données du chapitre I n'a pu être réalisée, faute d'un chevauchement de séquences suffisant (~ 40 paires de bases seulement). L'absence d'affiliations taxonomiques précises en deçà du

phylum pour les 7 séquences de *Bacteroidetes* ne permet pas d'émettre des hypothèses sur leur métabolisme. Sur les 26 séquences affiliées aux *Clostridiales* (*Firmicutes*), 7 étaient affiliées à des familles incertaines (A1, A2, A3, A9, B7, C4 et C6), 9 au genre *Bacillus* (A4, A7, A8, A12, B2, B8, B10, B11 et C8), 1 aux *Clostridiaceae* (B3) et 9 séquences étaient affiliées à des familles identifiées dans les modules de cooccurrences décrits dans les travaux de Cozannet *et al.* (2021) et Lang *et al.* (2015) (§ chapitre I), à savoir des *Oscillospiraceae* (B5 et B6), des *Ruminococcaceae* (B1, D2 et D1) et des *Tissierellaceae* (A5, A10, C10 et C12).

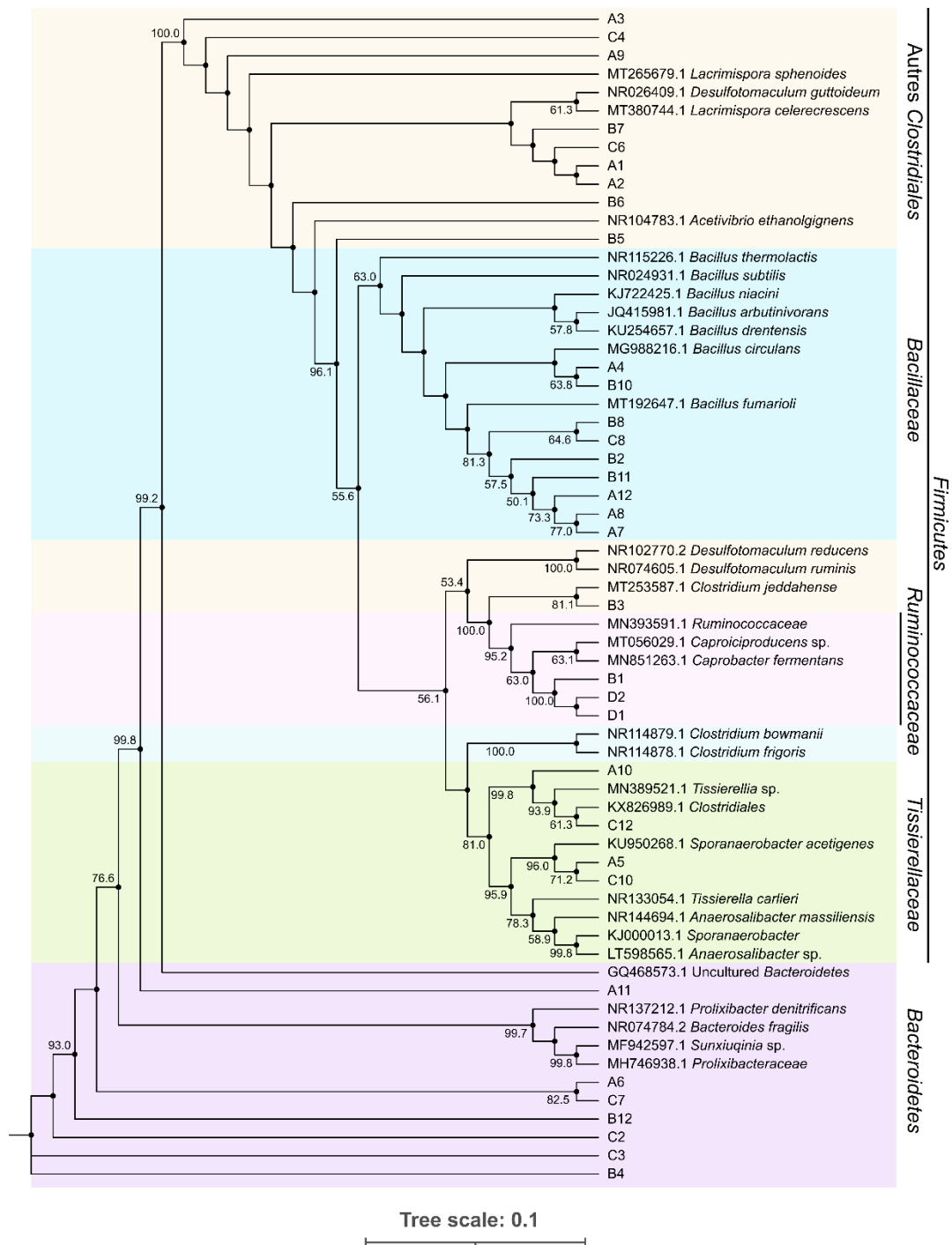


Figure 4 : Dendrogramme comportant les séquences de gènes codant des ARNr 16S bactériens présents dans les agrégats macroscopiques bleutés qui se sont développés sur milieux gélosés. Chaque séquence a été blastée sur NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) afin d'identifier les séquences génétiques les plus proches et les intégrer à l'arbre. Cette reconstruction a été réalisée à partir d'une portion des gènes codant les ARNr 16S (~ 710 paires de bases) avec MUSCLE, GBlock et PhyML avec un rééchantillonnage de 1000 bootstraps. Les valeurs de bootstraps inférieures à 50 ne sont pas indiquées. Autres Clostridiales : *Lachnospiraceae*, *Oscillospiraceae* et *Peptococcaceae*. *Prolixibacteraceae* est un nom synonyme de *Draconibacteriaceae* (<https://psn.dsmz.de>).

Ces travaux ont donc révélé que les agrégats macroscopiques qui ont été obtenus sur milieux gélosés et qui ressemblaient à des colonies n'en étaient pas, mais étaient tous des consortia microbiens multi-espèces.

L'observation répétée de consortia macroscopiques multiespèces renfermant des *Methanomassiliicoccales* soulève des interrogations. On peut en effet se demander si les *Methanomassiliicoccales* n'entretiennent pas des relations syntrophiques ou une interdépendance d'un autre type avec des *Bacteria*.

Les repiquages réalisés, d'une part sur milieu solide, et d'autre part, en milieu liquide, à partir de ces consortia macroscopiques n'ont pas permis de maintenir les *Methanomassiliicoccales* en culture. Aucune colonie ne s'est développée à la surface des nouveaux milieux gélosés, et aucun signal PCR positif en *Methanomassiliicoccales* n'a pu être obtenu à partir des cultures liquides réalisées en tube Hungate.

Si aucun isolat de *Methanomassiliicoccales* n'a pu être obtenu en culture clonale, ces résultats culturels restent néanmoins encourageants. Ils démontrent en effet qu'il semble possible de cultiver des représentants du cluster *free-living* à l'aide du protocole développé.

3. Criblage moléculaire ciblant les *Methanomassiliicoccales* à partir de matrices digestives où leur présence n'est pas documentée

A ce jour, la majorité des *Methanomassiliicoccales* sont connues à travers des représentants du cluster *host-associated*, exclusivement associés aux tractus digestifs de divers animaux (ex. : ruminants, primates et insectes).

Au début de cette thèse, dans le cadre d'une collaboration avec le centre de culture scientifique Océanopolis (Brest, France ; <https://www.oceanopolis.com/>), nous avons eu l'opportunité d'accéder à des échantillons digestifs de divers animaux marins ou semi-aquatiques élevés dans le parc. Ceci nous a offert l'opportunité de déterminer si les *Methanomassiliicoccales* se développent également dans le tractus digestif de ces animaux. Les échantillons digestifs acquis dans ce cadre comprenaient des fèces : de phoques gris sauvages (*Halichoerus grypus*), de loutres européennes (*Lutra lutra*), de phoques barbues (*Erignathus barbatus*), de manchots royaux (*Aptenodytes patagonicus*) et de veaux marins (*Phoca vitulina*). Ces échantillons ont été prélevés le jour même du rejet, au sol ou dans l'eau, par les équipes et plongeurs du parc, à l'aide de matériels stériles, dans des tubes stériles de 50 ml. L'ensemble

de ces échantillons digestifs ont ensuite été placés à 4 °C avant analyse (Remarque : la culture était notre priorité), n'ayant pas suffisamment de matériel pour conserver des aliquots supplémentaires à – 20 °C.

Des échantillons ont également été prélevés au niveau de deux tas de fumiers (F1 et F2) (d'origine porcine ou bovine inconnue), entre 5 et 15 cm d'enfouissement, avec du matériel stérile, puis conservés à 4°C jusqu'à leur analyse.

Les ADNs reclus dans ces échantillons digestifs ont été extraits en suivant le protocole d'extraction au phénol-chloroforme-alcool isoamylique décrit dans Cozannet *et al.* (2021 ; Section 1.1.). En raison de la forte biomasse microbienne et des inhibiteurs présents dans les échantillons, 2 à 4 extractions au PCI et au moins deux extractions au chloroforme ont été nécessaires pour extraire les acides nucléiques.

Des amplifications par PCR ont été réalisées à partir de ces ADNs, à l'aide du couple d'amorces AS1_Fw et AS2_Rv mod. ciblant les gènes codant les ARNr 16S des *Methanomassiliicoccales*, comme décrit précédemment (Cozannet *et al.*, 2021). Trois échantillons digestifs (les deux fumiers et les fèces de *Halichoerus grypus* sauvage) ont présenté des signaux d'amplifications de taille attendue avec ce couple d'amorce, mais avec la présence concomitante de signe de dégradation des ADNs ou d'amplifications non spécifiques (*smears*). Ces échantillons ont ensuite fait l'objet d'une analyse en métabarcodage, comme décrit dans le chapitre I. A ce moment-là, l'affiliation taxonomique des OTUs avait été réalisée à l'aide de la base de données en ligne Silva 32, une version antérieure et moins résolutive que celle employée pour l'étude du § chapitre I (Cozannet *et al.*, 2021).

Contrairement aux 2 autres échantillons, aucune séquence affiliée à des *Methanomassiliicoccales* n'a été détectée dans l'échantillon de fumier F2. La forte teneur en inhibiteurs dans ce type d'échantillons pourrait expliquer cette mauvaise amplification des ADNs dans cet échantillon digestif. Alternativement, la profondeur de séquençage pourrait ne pas avoir été suffisante pour détecter les *Methanomassiliicoccales*.

Les principaux ordres d'archées retrouvés dans les fèces du phoque gris sauvage (*H. grypus*) étaient les *Nitrosopumilales* (24,5 % des archées totales), les *Methanosarcinales* (22,3 %) et les *Methanobacteriales* (20,2 %). Des *Methanomassiliicoccales* y ont également été détectées en très faibles abondances relatives. En effet une OTU affiliée à *Ca.*

'*Methanomassiliicoccus intestinalis*' (100 % de similitude sur ~ 250 pb) (1,0 % des archées totales) et une OTU affiliée à *Methanomassiliicoccus* sp. (2,1 % des archées totales) (99,2 % de similitude) ont été détectées dans le jeu de donnée. A notre connaissance, il s'agit de la première mise en évidence de *Methanomassiliicoccales* dans le tractus digestif d'un mammifère marin. La présence de cet ordre, et plus particulièrement du genre *Methanomassiliicoccus* *Ca.* '*Methanomassiliicoccus intestinalis*' dans cet échantillon soulève également des questions quant à l'acquisition de ces archées dans le tube digestif de ces animaux au mode de vie semi-aquatique. On peut également se demander dans quelle mesure ces archées sont actives dans ces environnements au vu de leur faible abondance et si elles leur abondance est soumise à une variation au cours de la vie de l'animal, à l'image de ce qui est observé chez l'être humain (Mihajlovski *et al.*, 2010; Borrel *et al.*, 2017).

Le fumier F1 présentait, quant à lui, une communauté microbienne dominée par des ordres archéens encore inconnus (39,9 % des archées totales), des *Methanobacteriales* (27,5 %) et des *Methanomicrobiales* (18,1 %). Des *Methanomassiliicoccales*, toutes affiliées au genre *Methanomassiliicoccus*, y ont également été détectées. Parmi elles, il a été possible d'identifier les mêmes OTUs de *Methanomassiliicoccus* sp. (1,6 % des archées totales) et *Ca.* '*Methanomassiliicoccus intestinalis*' (0,5 %) identifiées dans le tractus digestif du phoque, ainsi qu'une OTU affiliée à *Methanomassiliicoccus luminyensis* (1,1 %) (100 % de similitude sur ~ 250 pb). La présence de *Ca.* '*Methanomassiliicoccus intestinalis*' et *Methanomassiliicoccus luminyensis* dans cet échantillon est moins surprenante dans la mesure où ces archées ont déjà été identifiées dans des échantillons digestifs de nombreux animaux ruminants ou porcins (Söllinger *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2017).

Pour résumer, ces travaux annexes ont principalement permis de révéler, pour la première fois, que les tubes digestifs de phoques renferment des *Methanomassiliicoccales*.

Discussion générale, perspectives et conclusion

L'amélioration constante des techniques de séquençage et d'analyse des (méta)génomés au cours des dernières années a permis de mettre en lumière l'existence d'une grande diversité de nouvelles lignées d'archées et de bactéries aux métabolismes variés et parfois jusqu'ici inconnus (Meng *et al.*, 2014; Borrel *et al.*, 2019; Lewis *et al.*, 2020). L'accumulation de ces données nous amène à reconsidérer les relations évolutives qu'entretiennent ces lignées entre-elles, mais également à réévaluer l'impact environnemental de ces lignées sur les grands cycles biogéochimiques. Dans un contexte de changement climatique lié à l'accumulation de gaz à effet de serre dans l'atmosphère, l'étude des lignées d'archées méthanogènes récemment découvertes s'avère cruciale pour connaître les substrats qu'ils utilisent, leurs préférences de croissance pour l'ensemble des facteurs écologiques et l'impact de ces microorganismes sur le cycle du carbone. Parmi ces nouvelles lignées d'archées méthanogènes figurent les *Methanomassiliicoccales*. Jusqu'à aujourd'hui, nos connaissances de cet ordre d'archées hydrogénotrophes méthyle-dépendantes restaient principalement conscrrites à un contexte digestif (cluster *host-associated*). Avant le début de cette étude, divers inventaires moléculaires de diversité tendaient toutefois à indiquer que les *Methanomassiliicoccales* pourraient également peupler une variété d'environnements non digestifs. Cependant, les données disponibles concernant la distribution, la diversité phylogénétique et la biologie de ces archées dans un contexte non digestif demeuraient très parcellaires. C'est dans ce cadre que s'inscrivent ces travaux de thèse, centrés sur l'étude des *Methanomassiliicoccales* affiliées au cluster *free-living* dans un contexte non digestif.

En termes de distribution, le criblage par métabarcodage (ciblant une portion restreinte des gènes codant les ARNr 16S) qui a été réalisé dans le cadre de l'étude présentée dans le chapitre I, conforte l'idée selon laquelle les *Methanomassiliicoccales* sont des microorganismes ubiquistes et probablement versatiles d'un point de vue physiologique (Söllinger *et al.*, 2016; Evans *et al.*, 2019). En effet, des séquences affiliées à ces archées ont été détectées dans l'ensemble des environnements anoxiques criblés (sédiments marins COMRA et MOZ1–3, sédiments côtiers DOOR, volcan de voue sous-marin HM1–4, sources géothermales terrestres KERG et XIA, bassin hypersalé anoxique profond KRY, tourbières MOUG1–5, eaux lacustres PAV60–80, sédiments d'eau douce PENF) et caractérisés par des paramètres physico-chimiques « extrêmes » et « non extrêmes » en termes de pH, températures, salinités ou pressions par exemple. Ainsi, des séquences affiliées à cet ordre ont été détectées dans des écosystèmes aux conditions physico-chimiques très variées, avec par exemple un pH de 4,7

pour certains échantillons de tourbe, une salinité de 238 g l^{-1} de MgCl_2 et une pression d'environ 33 MPa pour le lac hyper salé sous-marin Kryos, ou encore une température d'environ $82 \text{ }^\circ\text{C}$ pour la source chaude chinoise. Des taxa de cette branche du vivant ont aussi été mis en évidence pour la première fois dans des environnements (volcan de boue sous-marin) ou des sites géographiques (îles Kerguelen et Bretagne, France) où leur présence n'était jusqu'ici pas rapportée. Plus particulièrement, la séquence représentative d'une OTU proche de *Methanomassiliicoccus luminyensis* (N.B. : seule *Methanomassiliicoccales* affiliée au cluster *free-living* à ce jour disponible en culture clonale) (identité de 99,6% sur 253 paires de bases) a été détectée dans l'ensemble des échantillons environnementaux criblés par métabarcodes. Si ces résultats se confirmaient par l'obtention de séquences génétiques plus longues (plus résolutive d'un point de vue phylogénétique) et des données génomiques (ANI > 95–96% pour confirmer l'appartenance à la même espèce), cela appuierait l'hypothèse selon laquelle ce genre, et voire même cette espèce, serait généraliste et engloberait des écotypes adaptés à un large éventail de paramètres environnementaux (Borrel *et al.*, 2014b, 2017). Par ailleurs, cela permettrait également d'utiliser *Mmc. luminyensis* comme espèce modèle du cluster *free-living* dans le cadre de futures investigations écologiques et physiologiques, dans l'attente de l'isolement d'une nouvelle espèce isolée à partir d'écosystèmes non digestifs. En effet, l'isolement de *Mmc. luminyensis* à partir de selles humaines (Dridi *et al.*, 2012a) pose toujours des questions quant au rôle écologique et la représentativité de cette espèce pour le cluster *free-living*. Si cette espèce s'avérait effectivement représentative du cluster *free-living*, il serait dès lors possible de l'utiliser pour tester l'hypothèse d'une potentielle association entre les *Methanomassiliicoccales* affiliées à ce cluster et des cohortes microbiennes similaires à celles identifiées dans le chapitre I (*i.e.* : principalement des bactéries hétérotrophes). Pour se faire, il serait par exemple possible de réaliser des cultures de communautés en bioréacteurs, associant *Mmc. luminyensis* et des bactéries qui cooccurrent régulièrement avec cette souche, afin d'étudier les métabolomes et les protéomes microbiens au cours du temps. Afin d'améliorer nos connaissances fondamentales de cette lignée et de sa place potentielle dans les cycles géochimiques globaux, il serait aussi intéressant de valider *in vivo* l'incorporation des méthylsulfures (diméthylsulfure et méthane-thiol) par *Mmc. luminyensis*, car cette voie de méthanogénèse impacte non seulement le cycle du carbone, mais aussi celui du soufre.

Si des informations nouvelles sur la distribution et l'abondance des *Methanomassiliicoccales* dans les environnements naturels ont été obtenues dans le cadre de ce

travail, des travaux de biogéographie plus étendus pourraient être entrepris dans le futur afin de mieux évaluer les relations entre la présence et l'abondance des *Methanomassiliicoccales*, et les différentes variables géographiques et écologiques des milieux colonisés. Ces informations nous permettraient de formuler des hypothèses sur les facteurs environnementaux structurant la répartition des *Methanomassiliicoccales*. Les données nécessaires pour effectuer ce type d'analyse pourraient : (i) reposer sur un échantillonnage basé sur au moins 5 réplicats environnementaux par site d'étude (N.B. : indisponibles au laboratoire dans le cadre des travaux de thèse ; dans cette thèse, seuls des triplicatas techniques ont été réalisés), couplé à (ii) des mesures et analyses de multiples paramètres environnementaux (concentrations en substrats notamment). Ces échantillons pourraient ensuite faire l'objet (iii) d'une analyse en métabarcodage (voire en métagénomique) avec une profondeur de séquençage importante, et (iv) d'analyses en composantes principales afin de déterminer s'il existe une corrélation entre les paramètres environnementaux mesurés et l'abondance et la diversité phylogénétique des *Methanomassiliicoccales*.

En termes de diversité « phylogénétique », l'analyse en métabarcodage menée ici (sur environ 2 millions de *paired-end reads*) a permis d'identifier 6 OTUs dont les séquences représentatives étaient affiliées aux *Methanomassiliicoccales*, parmi les 22 échantillons où ces archées ont été détectées. Parmi ces OTUs, une correspondait à *Mmc. luminyensis*, une autre à *Ca. 'Mmc. armoricus MXMAG1'* et une dernière correspondait fort probablement au MAG MXMAG2. Si ces résultats tendent à montrer que la diversité phylogénétique des *Methanomassiliicoccales* au sein du cluster *free-living* serait faible, ils sont cependant à mettre en perspective avec les résultats du ciblage par métabarcodage réalisé tout au long du processus d'enrichissement (*slurry* PENF) qui a révélé, lui, la présence de 83 OTUs de *Methanomassiliicoccales* pour le seul échantillon de sédiment (PENF). Il convient aussi de mettre ces données en regard des résultats disponibles dans la littérature qui sont concordants avec ces dernières observations et suggèrent qu'il existe une diversité taxonomique relativement importante chez ces archées méthanogènes (Borrel *et al.*, 2013b; Söllinger *et al.*, 2016; Söllinger & Urich, 2019). En conclusion, ces données suggèrent que les *Methanomassiliicoccales* pourraient faire partie de la biosphère rare des environnements mais présenter tout de même une diversité en leur sein. Cette hypothèse nécessitera d'être confirmée expérimentalement sur un plus grand nombre d'échantillons environnementaux (N.B. :

indisponibles au laboratoire dans le cadre des travaux de thèse) traités en métabarcodes (ex. : *via* une approche *long-reads* en MinIon) avec une profondeur de séquençage très importante.

En termes d'abondance dans l'environnement, nos quantifications par qPCR ciblant les gènes codant les ARNr 16S des *Methanomassiliicoccales* indiquent que ces archées ne sont généralement pas abondantes dans les habitats naturels étudiés dans le cadre de cette thèse. En effet, les abondances mesurées ici étaient comprises entre $4,5 \times 10^2$ copies des gènes codant les ARNr 16S ml⁻¹ (dans l'échantillon d'eau anoxique PAV70) et $7,5 \times 10^4$ copies g⁻¹ (pour l'échantillon de tourbe MOUG2). Ces résultats vont dans le même sens que les quelques données d'abondances relatives présentes dans la littérature qui montrent que les *Methanomassiliicoccales*, bien que semblant ubiquistes, ne semblent généralement pas être prédominantes au sein des communautés archéennes (Söllinger *et al.*, 2016). Une des hypothèses qui pourrait être avancée pour expliquer la faible abondance de ces archées dans l'environnement serait que ces archées exploitent des niches écologiques restreintes, dont le principal facteur structurant pourrait être la présence de substrats méthylés. En effet, dans leurs récents travaux, Feldewert *et al.* (2020) proposent que le facteur limitant la méthanogenèse des *Methanomassiliicoccales* n'est pas le dihydrogène, mais plutôt la disponibilité en substrats méthylés. Bien que ces composés soient particulièrement abondants dans les écosystèmes (hyper)salés, ils le sont généralement en concentrations moindres dans d'autres écosystèmes anoxiques, probablement du fait des multiples voies de dégradation de la matière organique qui existent. A titre d'exemple, le xylane et la pectine (N.B. : composés issus de végétaux) peuvent soit être dégradés en méthanol, soit en acétate, CO₂ et H₂ suivant les différentes cohortes microbiennes présentes dans l'écosystème (Conrad, 2020). Il se pourrait ainsi que le développement des *Methanomassiliicoccales* soit favorisé dans des écosystèmes détritiques présentant d'importantes concentrations en substrats méthylés. Cette hypothèse pourrait être testée en mesurant les concentrations en substrats méthylés dans des échantillons environnementaux frais et riches en *Methanomassiliicoccales*, et des échantillons peu riches en *Methanomassiliicoccales*, et en y mesurant l'activité de méthanogenèse hydrogénotrophe méthyle-dépendante grâce à des mesures d'activité basées sur l'emploi de substrats méthylés marqués (isotopes stables ou radioactifs). Une seconde hypothèse pouvant expliquer la faible abondance des *Methanomassiliicoccales* dans ces écosystèmes pourrait résider dans la compétition de ces archées avec d'autres archées méthanogènes méthylotrophes, pour les substrats méthylés.

Si aucune souche de *Methanomassiliicoccales* affiliée au cluster *free-living* n'a pu être isolée dans le cadre de ces travaux de thèse, deux points positifs sont néanmoins à noter. Le premier point intéressant concerne la culture sur milieu solide de *Methanomassiliicoccales* affiliées au cluster *free-living* suite à une tentative d'isolement sur gélose. Si les efforts d'isolement d'une souche par ce biais n'ont pas été concluants, le développement d'un consortium microbien macroscopique à la surface de la gélose suggère qu'il serait peut-être possible à l'avenir de purifier une souche en utilisant cette technique à condition d'adapter la stratégie d'isolement (voir partie perspectives ci-dessous), pour peu que ces archées ne soient pas des syntrophes obligatoires. Le second point positif concerne l'obtention et l'annotation d'un nouveau MAG de *Methanomassiliicoccales* (*Ca.* 'Methanomassiliicoccus armoricus MXMAG1') à partir d'un échantillon non digestif (*i.e.* : des sédiments d'eaux douces) en combinant des expériences basées sur de la culture à des travaux de métagénomique. La combinaison de ces 2 grands types d'approches demeure encore assez confidentielle. La comparaison des gènes composant ce MAG avec ceux des représentants des clusters *free-living* et *host-associated* a montré que *Ca.* 'Methanomassiliicoccus armoricus MXMAG1' possède le capital génétique pour s'adapter à certains paramètres physico-chimiques (pH, température, pression osmotique, présence d'arsenic). Par ailleurs, l'analyse de la culture PENF dont est issu ce MAG a montré un enrichissement significatif ($> 10^6$ copies des gènes codant les ARNr 16S ml^{-1}) en *Methanomassiliicoccales*. Ce résultat démontre (i) qu'il est possible de cultiver des représentants du cluster *free-living* et (ii) que la stratégie mise en œuvre a été payante. De nouveaux efforts d'enrichissement et d'isolement d'une souche de *Methanomassiliicoccales* pourront être menés dans le futur à partir de la culture PENF ou d'un autre échantillon en suivant une démarche similaire à celle entreprise dans les travaux présentés dans le chapitre I (voir ci-dessous).

Jusqu'à ce jour, seules deux espèces de *Methanomassiliicoccales* ont été isolées et cultivées en culture clonales : *Methanomassiliicoccus luminyensis* B10^T et 'Methanomethylophilus alvus' Mx05 (Dridi *et al.*, 2012a; Fadhlaoui *et al.*, 2020). 'Methanomethylophilus alvus' Mx05 a été isolée en culture axénique, et est cultivée en routine en employant un facteur de croissance bactérien qui est additionné au milieu de culture sous forme d'un extrait stérile d'une culture bactérienne du genre *Eggerthella* (*Actinobacteria*) (Brevet FR 3 074 501, n° d'enregistrement national 17 61536). En dehors de ces 2 isolats, nos connaissances de cette lignée d'archées méthanogènes proviennent de données acquises sur des

souches cultivées en culture mixte (ex. : *Ca.* ‘*Methanoplasma termitum*’, ISO4-H5, *Ca.* ‘*Methanogranum caenicola*’ et RumEn M1 et RumEn M2) (Iino *et al.*, 2013; Lang *et al.*, 2015; Y. Li *et al.*, 2016; Söllinger *et al.*, 2016). Étonnamment, beaucoup de travaux ayant visé à cultiver des *Methanomassiliicoccales* se sont limités à leur enrichissement en coculture et ne sont pas allés jusqu’à leur purification en culture clonale. Il est intéressant de souligner que certaines de ces souches ont été enrichies en co-culture avec des bactéries inféodées au tubes digestifs et taxonomiquement similaires à celles obtenues dans le microcosme PENF et au sein des agrégats macroscopiques obtenues sur gélose en renfermant également des *Methanomassiliicoccales* (Paul *et al.*, 2012). Dans ce contexte, on peut se demander s’il n’existerait pas une interaction métabolique entre ces bactéries et les *Methanomassiliicoccales*, qui compliquerait l’isolement de ces archées, à l’image de ce qui est déjà décrit pour l’espèce ‘*Methanomethylophilus alvus*’.

Dans la continuité directe de cette thèse, et afin d’approfondir nos connaissances des *Methanomassiliicoccales* du cluster *free-living*, plusieurs pistes pourraient être explorées : (i) approfondir les travaux portant sur l’écologie des *Methanomassiliicoccales*, et (ii) poursuivre les tentatives d’isolement d’une souche de *Methanomassiliicoccales* affiliée au cluster *free-living* à partir d’environnements non digestifs. Afin d’atteindre ces objectifs, il semble pertinent d’approfondir l’exploration des données (méta)génomiques et de poursuivre les efforts de mise en culture.

En effet, des analyses en réseaux de cooccurrence des données de diversité microbienne dans les microcosmes et les échantillons bruts ont montré que les *Methanomassiliicoccales* présentent des cooccurrences robustes avec diverses bactéries ou archées connues pour produire de l’acétate et/ou de l’H₂, ce qui suggère l’existence d’interactions métaboliques avec ces microorganismes. Afin de mieux cerner les potentielles interactions qu’entretiennent les *Methanomassiliicoccales* avec d’autres procaryotes et pour étayer l’hypothèse d’une interaction métabolique avec certains microorganismes, les métagénomiques séquencés à partir du *slurry* PENF incubé en présence de substrats (*i.e.* : la culture à partir duquel ont été reconstitués les *metagenome assembled genomes* (MAGs) de *Ca.* ‘*Methanomassiliicoccus armoricus* MXMAG1’ et MXMAG2) pourront être analysés en vue de reconstruire les MAGs des partenaires bactériens identifiés dans les analyses en réseaux (ex. : Module 6 du réseau de cooccurrences ; ex. : *Christensenellaceae* R-7 group, *Gracilibacteraceae*, *Hungateiclostridiaceae*, *Oscillospiraceae*, *Ruminococcaceae*) et de prédire leurs voies

métaboliques. L'objectif de ces travaux serait (i) de tenter de déterminer s'il existe une redondance métabolique ou fonctionnelle potentielle (ex. : métabolites produits) au sein des modules du réseau renfermant des *Methanomassiliicoccales* (Modules 6, 198, 232, 234 et 245) ; (ii) établir une cartographie métabolique des archées et bactéries présentes dans le microcosme PENF après 8 semaines d'incubation, afin d'émettre des hypothèses concernant les potentielles interactions métaboliques entre bactéries et archées méthanogènes ; (iii) comparer le métagénome PENF T8 aux métagénomés renfermant des *Methanomassiliicoccales* qui ont été obtenus directement à partir d'échantillons bruts environnementaux et qui sont disponibles dans les banques de données publiques (ex. : données de Zhang *et al.*, (2020)). Contrairement au métagénome généré durant ce travail à partir d'un échantillon environnemental incubé en présence de substrats, les métagénomés environnementaux ne sont pas soumis aux biais inhérents à l'incubation en microcosmes (ex. : températures constantes, fortes concentrations en nutriments, *etc.*), et permettent de s'affranchir de la sélection de certains taxa liée aux conditions d'incubation. Toutefois, il est important de garder à l'esprit que les interactions entre microorganismes ne sont pas nécessairement identifiables par des analyses moléculaires.

Il serait également pertinent de poursuivre les efforts de mise en culture dans le but d'isoler une espèce de *Methanomassiliicoccales* affiliée au cluster *free-living*, depuis un ou plusieurs environnements non digestifs. En effet, les prédictions métaboliques et fonctionnelles faites à partir de données génétiques – y compris celles réalisées durant cette thèse – nécessitent d'être validées par des approches fonctionnelles biochimiques ou culturelles. L'obtention d'un taxon en culture clonale reste le moyen le plus aisé d'étudier son fonctionnement cellulaire et ses gammes de tolérance physiologique. Dans cette optique d'isoler une souche du cluster *free living*, et suite aux résultats obtenus durant ces travaux, il pourrait être pertinent, dans le futur, (i) de modifier en partie la composition du milieu de culture, et/ou (ii) d'adapter la procédure d'isolement selon les suggestions figurant ci-après :

- (i) Modifications de la recette du milieu de culture.

La recette du milieu de culture employée dans cette thèse avait été élaborée en adjoignant différents ingrédients de recettes et des conditions de culture décrites dans des travaux précédemment publiés ayant permis d'isoler et/ou d'enrichir une souche de *Methanomassiliicoccales* d'origine digestive (*i.e.* : avec une forte biomasse de bactéries hétérotrophes, présence d'archées méthanogènes hydrogénotrophes CO₂-dépendantes). Nos

résultats tendent à montrer que le milieu que nous avons mis au point dans le cadre de l'étude présentée dans le chapitre I semble également avoir favorisé le développement de *Methanomassiliicoccales* affiliées au cluster *free-living*. Néanmoins, l'ajout ou le retrait d'un ou plusieurs composés pourrait potentiellement faciliter l'isolement d'une nouvelle souche :

- Les *Methanomassiliicoccales* étant *a priori* capables de se développer à de très faibles pressions partielles d' H_2 ($P_{H_2} < 0,1$, (Feldewert *et al.*, 2020)), la diminution de la concentration de ce gaz dans la phase gazeuse pourrait être envisagée pour défavoriser la croissance d'autres compétiteurs hydrogénotrophes. L'élimination du CO_2 dans la phase gaz pourrait aussi être envisagée.
- Les archées méthanogènes étant généralement peu sensibles aux antibiotiques (Whitman *et al.*, 2006), l'élimination des bactéries associées à ces archées en culture peut être facilitée par l'addition ponctuelle ou progressive d'un antibiotique ou d'un cocktail de ces composés. Ce type d'approche a d'ailleurs été mis en œuvre pour purifier *Methanomassiliicoccus luminyensis* B10^T (vancomycine à 25 mg l⁻¹). Nos résultats suggèrent qu'il serait probablement utile de cibler dans un premier temps l'élimination des bactéries à Gram négatif (ex. : acide nalidixique, pénicillines) car celles-ci ne sont que marginalement présentes dans les modules des réseaux de cooccurrence (exception : des *Synergistaceae* spp.) renfermant des *Methanomassiliicoccales*. Etant donné que les *Methanomassiliicoccales* semblent entretenir des interactions avec des bactéries à Gram positif (ex. : *Firmicutes*) (chapitre I), l'élimination de ces partenaires putatifs à l'aide d'antibiotiques (ex. : érythromycine, lysozyme, vancomycine) pourrait potentiellement freiner ou stopper la croissance des archées méthanogènes.
- Alternativement, si les bactéries produisent un facteur de croissance favorisant le développement des *Methanomassiliicoccales*, il pourrait s'avérer intéressant d'amender (périodiquement ?) le milieu de culture avec un surnageant de culture stérile préparé à partir d'un milieu riche en composés organiquesensemencé avec diverses bactéries affiliées aux *Christensenellaceae* R-7 group, *Gracilibacteraceae*, *Hungateiclostridiaceae*, *Oscillospiraceae* et/ou *Ruminococcaceae* (i.e. : des bactéries hétérotrophes principalement inféodées aux milieux digestifs), ces bactéries cooccurrent fortement avec les *Methanomassiliicoccales*.

(ii) Stratégie d'isolement

La stratégie d'isolement pourrait également être revue à la lumière des travaux réalisés, et plusieurs pistes d'isolement pourraient être explorées :

- Plusieurs tentatives d'isolement de *Methanomassiliicoccales* ont été réalisées en effectuant des étalements sur géloses en fioles de Wolfe. Bien que des résultats intéressants aient tout de même été obtenus (*i.e.* : des consortia microbiens macroscopiques sur gélose), aucune souche de *Methanomassiliicoccales* n'a pu être purifiée. De nouvelles tentatives d'isolement sur milieu solide seront à reconsidérer dans le futur, en adaptant le milieu de culture par exemple.
- De manière plus générale, une stratégie d'isolement originale décrite récemment (Cross *et al.*, 2019) et appelée « génomique inversée » (*reverse genomics*, en anglais) pourrait être envisagée dans le futur pour tenter d'isoler des représentants de *Methanomassiliicoccales* du cluster *free-living*. Cette approche consiste à identifier des protéines membranaires hautement exprimées et comportant des domaines extracellulaires à partir d'un microorganisme-cible dont le génome a été reconstruit, puis à synthétiser des anticorps ciblant ces protéines. Les anticorps purifiés sont ensuite couplés à des marqueurs fluorescents puis injectés dans un échantillon (culture d'enrichissement, échantillon brut liquide...) contenant les microorganismes-cibles, sur lequel ces anticorps vont venir se lier. Enfin, les cellules sont ensuite triées à l'aide d'un cytomètre en flux en se basant sur la présence ou l'absence de signal de fluorescence dû à l'anticorps. Les cellules comportant l'anticorps peuvent ensuite être inoculées sur milieu liquide ou solide. Cette stratégie d'isolement, qui a d'ores et déjà été validée sur une bactérie (Cross *et al.*, 2019) pourrait être adaptée pour l'isolement de *Methanomassiliicoccales* affiliées aux clusters *free-living* en réalisant les étapes d'injection de l'anticorps, de tri des cellules par cytométrie en flux et de culture en conditions anaérobies (ex. : cytomètre placé dans une enceinte anaérobie ou sous un flux d'azote).

Des perspectives de travaux de recherche futurs dépassant le périmètre de ces travaux de thèse peuvent également être proposées. En effet, même si les *Methanomassiliicoccales* ne semblent pas représenter une lignée majoritaire des écosystèmes naturels, ces archées semblent peupler un très large éventail d'écosystèmes variés et avoir une répartition planétaire assez large. Dans ce contexte, comme évoqué au début de ce chapitre, il semble important de mener des investigations en vue de déterminer quels sont les facteurs environnementaux qui déterminent la répartition des *Methanomassiliicoccales* dans des environnements non-digestifs.

Des méta-analyses intégrant des données de diversité microbienne et un grand nombre de variables environnementales (pH, températures, salinités, pressions, concentrations en substrats, espèces dissoutes) pourraient être réalisées afin de déterminer les paramètres régissant la colonisation des écosystèmes par les *Methanomassiliicoccales*.

Dans une perspective plus large, ce travail a produit de nouveaux MAGs de *Methanomassiliicoccales* affiliés au cluster *free-living* (*Ca.* ‘*Methanomassiliicoccus armoricus* MXMAG1’ et MXMAG2) qui viennent s’ajouter à ceux déjà disponibles dans les banques de données. Ce matériel génétique pourra aider la communauté scientifique à aborder des questions évolutives brûlantes telles que la compréhension de l’histoire évolutive de la méthanogenèse ou encore celle du système Pyl.

Enfin, dans le contexte actuel de changement climatique, il serait intéressant de s’interroger sur l’impact des changements globaux sur les biomes hébergeant des méthanogènes et sur les communautés méthanogènes. Plus spécifiquement, il serait intéressant de se demander si des espèces méthanogènes ubiquistes avec une large plasticité physiologique et métabolique, comme les *Methanomassiliicoccales*, seront écologiquement avantagées par rapport à d’autres espèces plus spécialisées connues pour se développer dans des conditions environnementales comparativement plus stringentes et à partir d’une gamme de substrats plus restreinte (mais abondants et répandus comme l’H₂/CO₂).

En conclusion, cette thèse a permis d’améliorer nos connaissances des habitats naturels peuplés par des *Methanomassiliicoccales*, et de la physiologie et des adaptations putatives du cluster *free-living*.

Activités annexes aux travaux de thèse

Plusieurs activités transversales ont été menées tout au long de ce travail de thèse.

Activités d'enseignements :

- 2019/2020 : 6 heures de Travaux Pratiques de Mycologie (Licence 2, UBO) *
- 2018/2019 : 48 heures de Travaux Pratiques de Mycologie (Licence 2, UBO)
- 2017/2018 : 20 heures de Travaux Pratiques de Mycologie (Licence 2, UBO)

* interruption des enseignements suite au confinement national dans le cadre de la lutte contre la crise sanitaire liée à la pandémie de la Covid-19.

Implications au sein du laboratoire :

- Représentant du Collège des Doctorants et Post-Doctorants au sein du Conseil de Laboratoire (2019 – 2021)
- Membre de l'équipe éditoriale de la Newsletter du LM2E

Encadrement d'étudiants :

- Amandine Sanvoisin :
 - o Stage de Master II (janvier 2019 – juin 2019)
 - o Stage de Master I (janvier 2017 – mars 2018)
- Stagiaires de 3^{ème} :
 - o Décembre 2017, 2 jours

Présentations orales :

- Présentation de mon sujet de recherche puis échange avec des étudiants de Master II dans le cadre de l'Unité d'Enseignement « Diversité des Ecosystèmes Bactériens » du parcours de master II en Microbiologie fondamentale et appliquée de l'UBO (2 heures, septembre 2020)
- Présentation intitulée « Les archées méthanogènes : Du changement climatique à la médecine de demain » – dans le cadre des conférences grand public organisées par le GDR Archaea et l'évènement « Pint of Science » (16 octobre 2018)

- Présentation sur le thème de la biosphère profonde à des classes de Première et Terminale S (Lycée Tristan Corbière, Morlaix), dans le cadre du forum des doctorants organisé par l'école doctorale EDSML (1 journée, avril 2018)

Publications scientifiques soumises :

- Karine Alain, Marc Cozannet, Maxime Allieux, Sarah Thiroux, Jordan Hartunians. "Archées : habitats et physiologies associées". Dans Clouet d'Orval, B., Franzetti, B., Oger, P. (eds.), Biologie des archées, Volume 3: Les archées dans leur environnement. Editions ISTE. (soumis)

Activités de médiation scientifique :

- Nuit Européenne des Chercheurs (Océanopolis, Brest)
 - o Editions 2017, 2018 et 2019
- Journées Portes ouvertes de l'IUEM
 - o Edition 2019
- « L'Actu des publis » : rédaction d'un article de vulgarisation scientifique de l'IUEM (<https://www-iuem.univ-brest.fr/les-dinokystes-des-capsules-in-temporelles/>)

Formations :

- Traitement de données métagénomiques : « Assemblage et annotation de génomes », théorie et travaux pratiques (formateur : Maxime Allieux (LM2E)) (1 journée, octobre 2020, IUEM)
- PCR quantitative : théorie et pratique (formatrice : Valérie Cueff-Gauchard (LM2E)) (2 jours, janvier 2018, IUEM)
- Traitement de données de métabarcodes : « Analyse de données métagénomiques 16S » (Formateurs : Anne-Laure Abraham, Mahendra Mariadassou et Olivier Rué) (5 jours, mai 2018, Station biologique de Roscoff)
- Autoclave : Formation Apave (1 journée, novembre 2017, IUEM)

Participation à des congrès, colloques :

- Participation aux 5^{ème} Journées du GdR Archaea autour du thème « From Environmental Biodiversity to Fundamental Cellular Processes » (17-19 octobre 2018, Plouzané)

- Participation au VIII^{ème} colloque de l'Association Francophone d'Écologie Microbienne autour du thème « Microbiomes : des environnements naturels à l'homme » (17-20 octobre 2017, Camaret-sur-Mer)

Bibliographie

A

- Adam, P.S., Borrel, G., Brochier-Armanet, C., Gribaldo, S., 2017. The growing tree of *Archaea*: new perspectives on their diversity, evolution and ecology. *ISME J* 11, 2407–2425. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.122>
- Adam, P.S., Borrel, G., Gribaldo, S., 2018. Evolutionary history of carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, one of the oldest enzymatic complexes. *PNAS* 115, E1166–E1173. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716667115>
- Alain, K., Postec, A., Grinsard, E., Lesongeur, F., Prieur, D., Godfroy, A., 2010. *Thermodesulfatator atlanticus* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 33–38. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.009449-0>
- Anisimov, O.A., 2007. Potential feedback of thawing permafrost to the global climate system through methane emission. *Environ. Res. Lett.* 2, 045016. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/2/4/045016>
- Ansbaek, J., Blackburn, T.H., 1980. A method for the analysis of acetate turnover in a coastal marine sediment. *Microb Ecol* 5, 253–264. <https://doi.org/10.1007/BF02020333>
- Arias, N., Arboleya, S., Allison, J., Kaliszewska, A., Higarza, S.G., Gueimonde, M., *et al.*, 2020. The Relationship between Choline Bioavailability from Diet, Intestinal Microbiota Composition, and Its Modulation of Human Diseases. *Nutrients* 12, 2340. <https://doi.org/10.3390/nu12082340>
- Asakawa, S., Sauer, K., Liesack, W., Thauer, R.K., 1998. Tetramethylammonium:coenzyme M methyltransferase system from *Methanococcoides* sp. *Arch Microbiol* 170, 220–226. <https://doi.org/10.1007/s002030050636>
- Avramescu, M.-L., Yumvihoze, E., Hintelmann, H., Ridal, J., Fortin, D., R.S. Lean, D., 2011. Biogeochemical factors influencing net mercury methylation in contaminated freshwater sediments from the St. Lawrence River in Cornwall, Ontario, Canada. *Science of The Total Environment* 409, 968–978. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.11.016>

B

- Baker, B.J., Anda, V.D., Seitz, K.W., Dombrowski, N., Santoro, A.E., Lloyd, K.G., 2020. Diversity, ecology and evolution of *Archaea*. *Nat Microbiol* 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0715-z>
- Bang, C., Vierbuchen, T., Gutschmann, T., Heine, H., Schmitz, R.A., 2017. Immunogenic properties of the human gut-associated archaeon *Methanomassiliicoccus luminyensis* and its susceptibility to antimicrobial peptides. *PLOS ONE* 12, e0185919. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185919>
- Bapteste, É., Brochier, C., Boucher, Y., 2005. Higher-level classification of the *Archaea*: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea* 1, 353–363. <https://doi.org/10.1155/2005/859728>
- Battistuzzi, F.U., Feijao, A., Hedges, S.B., 2004. A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC Evol Biol* 4, 44. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-4-44>

- Becker, K.W., Elling, F.J., Yoshinaga, M.Y., Söllinger, A., Urich, T., Hinrichs, K.-U., 2016. Unusual Butane- and Pentanetriol-Based Tetraether Lipids in *Methanomassiliicoccus luminyensis*, a Representative of the Seventh Order of Methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 4505–4516. <https://doi.org/10.1128/AEM.00772-16>
- Beifuss, U., Tietze, M., Bäumer, S., Deppenmeier, U., 2000. Methanophenazine: Structure, Total Synthesis, and Function of a New Cofactor from Methanogenic *Archaea*. *Angewandte Chemie International Edition* 39, 2470–2472. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20000717\)39:14<2470::AID-ANIE2470>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20000717)39:14<2470::AID-ANIE2470>3.0.CO;2-R)
- Bennett, B.J., Vallim, T.Q. de Aguiar, Wang, Z., Shih, D.M., Meng, Y., Gregory, J., *et al.*, 2013. Trimethylamine-N-Oxide, a Metabolite Associated with Atherosclerosis, Exhibits Complex Genetic and Dietary Regulation. *Cell Metabolism* 17, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.011>
- Berghuis, B.A., Yu, F.B., Schulz, F., Blainey, P.C., Woyke, T., Quake, S.R., 2019. Hydrogenotrophic methanogenesis in archaeal phylum *Verstraetearchaeota* reveals the shared ancestry of all methanogens. *PNAS* 116, 5037–5044. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815631116>
- Berner, R.A., 1981. A new geochemical classification of sedimentary environments. *Journal of Sedimentary Research* 51, 359–365. <https://doi.org/10.1306/212F7C7F-2B24-11D7-8648000102C1865D>
- Bleicher, K., Zellner, G., Winter, J., 1989. Growth of methanogens on cyclopentanol/CO₂ and specificity of alcohol dehydrogenase. *FEMS Microbiol Lett* 59, 307–312. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb03130.x>
- Bock, A.-K., Prieger-Kraft, A., Schönheit, P., 1994. Pyruvate — a novel substrate for growth and methane formation in *Methanosarcina barkeri*. *Arch. Microbiol.* 161, 33–46. <https://doi.org/10.1007/BF00248891>
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C.J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., *et al.*, 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* 407, 623–626. <https://doi.org/10.1038/35036572>
- Bok, F.A.M. de, Leerdam, R.C. van, Lomans, B.P., Smidt, H., Lens, P.N.L., Janssen, A.J.M., *et al.*, 2006. Degradation of Methanethiol by Methylotrophic Methanogenic Archaea in a Lab-Scale Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7540–7547. <https://doi.org/10.1128/AEM.01133-06>
- Bonin, A.S., Boone, D.R., 2006. The Order *Methanobacteriales*, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. Springer, New York, NY, pp. 231–243. https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_11
- Boone, D.R., 2015. *Methanohalophilus*, in: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. American Cancer Society, pp. 1–4. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00516>
- Borrel, G., Harris, H.M.B., Tottey, W., Mihajlovski, A., Parisot, N., Peyretailade, E., *et al.*, 2012. Genome Sequence of “*Candidatus* Methanomethylophilus alvus” Mx1201, a Methanogenic Archaeon from the Human Gut Belonging to a Seventh Order of Methanogens. *Journal of Bacteriology* 194, 6944–6945. <https://doi.org/10.1128/JB.01867-12>
- Borrel, G., Harris, H.M.B., Parisot, N., Gaci, N., Tottey, W., Mihajlovski, A., *et al.*, 2013a. Genome Sequence of “*Candidatus* Methanomassiliicoccus intestinalis” Issoire-Mx1, a Third *Thermoplasmatales*-Related Methanogenic Archaeon from Human Feces. *Genome Announc.* 1. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00453-13>
- Borrel, G., O’Toole, P.W., Harris, H.M.B., Peyret, P., Brugère, J.-F., Gribaldo, S., 2013b. Phylogenomic Data Support a Seventh Order of Methylotrophic Methanogens and Provide Insights into the Evolution of Methanogenesis. *Genome Biol Evol* 5, 1769–1780. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt128>

- Borrel, G., Gaci, N., Peyret, P., O'Toole, P.W., Gribaldo, S., Brugère, J.-F., 2014a. Unique Characteristics of the Pyrrolysine System in the 7th Order of Methanogens: Implications for the Evolution of a Genetic Code Expansion Cassette [WWW Document]. *Archaea*. <https://doi.org/10.1155/2014/374146>
- Borrel, G., Parisot, N., Harris, H.M., Peyretailade, E., Gaci, N., Tottey, W., *et al.*, 2014b. Comparative genomics highlights the unique biology of *Methanomassiliicoccales*, a *Thermoplasmatales*-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine. *BMC Genomics* 15, 679. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-679>
- Borrel, G., Adam, P.S., Gribaldo, S., 2016. Methanogenesis and the Wood–Ljungdahl Pathway: An Ancient, Versatile, and Fragile Association. *Genome Biol Evol* 8, 1706–1711. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw114>
- Borrel, G., McCann, A., Deane, J., Neto, M.C., Lynch, D.B., Brugère, J.-F., *et al.*, 2017. Genomics and metagenomics of trimethylamine-utilizing *Archaea* in the human gut microbiome. *ISME J* 11, 2059–2074. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.72>
- Borrel, G., Adam, P.S., McKay, L.J., Chen, L.-X., Sierra-García, I.N., Sieber, C.M.K., *et al.*, 2019. Wide diversity of methane and short-chain alkane metabolisms in uncultured archaea. *Nature Microbiology* 4, 603–613. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0363-3>
- Borrel, G., Brugère, J.-F., Gribaldo, S., Schmitz, R.A., Moissl-Eichinger, C., 2020. The host-associated archaeome. *Nature Reviews Microbiology* 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0407-y>
- Bräuer, S.L., Cadillo-Quiroz, H., Ward, R.J., Yavitt, J.B., Zinder, S.H., 2011. *Methanoregula boonei* gen. nov., sp. nov., an acidiphilic methanogen isolated from an acidic peat bog. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 45–52. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.021782-0>
- Bridgham, S.D., Cadillo-Quiroz, H., Keller, J.K., Zhuang, Q., 2013. Methane emissions from wetlands: biogeochemical, microbial, and modeling perspectives from local to global scales. *Global Change Biology* 19, 1325–1346. <https://doi.org/10.1111/gcb.12131>
- Brugère, J.-F., Borrel, G., Gaci, N., Tottey, W., O'Toole, P.W., Malpuech-Brugère, C., 2014. Archaeobiotics. *Gut Microbes* 5, 5–10. <https://doi.org/10.4161/gmic.26749>
- Brugère, J.-F., Ben Hania, W., Arnal, M.-E., Ribière, C., Ballet, N., Vandekerckove, P., *et al.* *Archaea: Microbial Candidates in Next-generation Probiotics Development*. *Journal of Clinical Gastroenterology* 52, S71–S73. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001043>
- Brune, A., 2014. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nature Reviews Microbiology* 12, 168–180. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3182>
- Bryant, M.P., 1979. Microbial Methane Production—Theoretical Aspects. *J Anim Sci* 48, 193–201. <https://doi.org/10.2527/jas1979.481193x>

C

- Caccavo, F., Lonergan, D.J., Lovley, D.R., Davis, M., Stolz, J.F., McInerney, M.J., 1994. *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3752–3759.
- Cadillo-Quiroz, H., Bräuer, S.L., Goodson, N., Yavitt, J.B., Zinder, S.H., 2014. *Methanobacterium paludis* sp. nov. and a novel strain of *Methanobacterium lacus* isolated from northern peatlands. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, 1473–1480. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.059964-0>

- Canfield, D.E., Jørgensen, B.B., Fossing, H., Glud, R., Gundersen, J., Ramsing, N.B., *et al.*, 1993. Pathways of organic carbon oxidation in three continental margin sediments. *Marine Geology, Marine Sediments, Burial, Pore Water Chemistry, Microbiology and Diagenesis* 113, 27–40. [https://doi.org/10.1016/0025-3227\(93\)90147-N](https://doi.org/10.1016/0025-3227(93)90147-N)
- Carrión, O., Pratscher, J., Curson, A.R.J., Williams, B.T., Rostant, W.G., Murrell, J.C., *et al.*, 2017. Methanethiol-dependent dimethylsulfide production in soil environments. *The ISME Journal* 11, 2379–2390. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.105>
- Carrión, O., Pratscher, J., Richa, K., Rostant, W.G., Farhan Ul Haque, M., *et al.*, 2019. Methanethiol and Dimethylsulfide Cycling in Stiffkey Saltmarsh. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01040>
- Cavicchioli, R., 2011. *Archaea* — timeline of the third domain. *Nature Reviews Microbiology* 9, 51–61. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2482>
- Chaban, B., Ng, S.Y.M., Jarrell, K.F., 2006. Archaeal habitats - From the extreme to the ordinary. *Canadian Journal of Microbiology* 52, 73–116. <https://doi.org/10.1139/w05-147>
- Cicerone, R.J., Oremland, R.S., 1988. Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Global Biogeochemical Cycles* 2, 299–327. <https://doi.org/10.1029/GB002i004p00299>
- Clemente, J.C., Pehrsson, E.C., Blaser, M.J., Sandhu, K., Gao, Z., Wang, B., *et al.*, 2015. The microbiome of uncontacted Amerindians. *Science Advances* 1, e1500183. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500183>
- Comolli, L.R., Baker, B.J., Downing, K.H., Siegerist, C.E., Banfield, J.F., 2009. Three-dimensional analysis of the structure and ecology of a novel, ultra-small archaeon. *The ISME Journal* 3, 159–167. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.99>
- Conrad, R., 2007. Microbial Ecology of Methanogens and Methanotrophs, in: *Advances in Agronomy, Advances in Agronomy*. Academic Press, pp. 1–63. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(07\)96005-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(07)96005-8)
- Conrad, R., 2009. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environmental Microbiology Reports* 1, 285–292. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00038.x>
- Conrad, R., 2020. Importance of hydrogenotrophic, acetoclastic and methylotrophic methanogenesis for methane production in terrestrial, aquatic and other anoxic environments: A mini review. *Pedosphere* 30, 25–39. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(18\)60052-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(18)60052-9)
- Cozannet, M., Borrel, G., Roussel, E., Moalic, Y., Allieux, M., Sanvoisin, A., *et al.*, 2021. New Insights into the Ecology and Physiology of *Methanomassiliicoccales* from Terrestrial and Aquatic Environments. *Microorganisms* 9, 30. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010030>
- Cross, K.L., Campbell, J.H., Balachandran, M., Campbell, A.G., Cooper, S.J., Griffen, A., *et al.*, 2019. Targeted isolation and cultivation of uncultivated bacteria by reverse genomics. *Nature Biotechnology* 37, 1314–1321. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0260-6>
- Cuesta-Zuluaga, J. de la, Spector, T.D., Youngblut, N.D., Ley, R.E., 2021. Genomic Insights into Adaptations of Trimethylamine-Utilizing Methanogens to Diverse Habitats, Including the Human Gut. *mSystems* 6. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00939-20>
- Curson, A.R.J., Todd, J.D., Sullivan, M.J., Johnston, A.W.B., 2011. Catabolism of dimethylsulphoniopropionate: microorganisms, enzymes and genes. *Nature Reviews Microbiology* 9, 849–859. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2653>

D

- Dickens, G.R., 2001. The potential volume of oceanic methane hydrates with variable external conditions. *Organic Geochemistry* 32, 1179–1193. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(01\)00086-9](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(01)00086-9)
- Dlugokencky, E.J., Bruhwiler, L., White, J.W.C., Emmons, L.K., Novelli, P.C., Montzka, S.A., *et al.*, 2009. Observational constraints on recent increases in the atmospheric CH₄ burden. *Geophysical Research Letters* 36. <https://doi.org/10.1029/2009GL039780>
- Dridi, B., Fardeau, M.-L., Ollivier, B., Raoult, D., Drancourt, M., 2012a. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 1902–1907. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.033712-0>
- Dridi, B., Henry, M., Richet, H., Raoult, D., Drancourt, M., 2012b. Age-related prevalence of *Methanomassiliicoccus luminyensis* in the human gut microbiome. *APMIS* 120, 773–777. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2012.02899.x>
- Du, C., Xu, C.-Y., Jian, J.-S., He, W.-X., Hou, L., Geng, Z.-C., 2018. Seasonal dynamics of bacterial communities in a *Betula albosinensis* forest. *European Journal of Soil Science* 69, 666–674. <https://doi.org/10.1111/ejss.12568>

E

- Ehhalt, D.H., 1974. The atmospheric cycle of methane. *Tellus* 26, 58–70. <https://doi.org/10.3402/tellusa.v26i1-2.9737>
- Ermler, U., Grabarse, W., Shima, S., Goubeaud, M., Thauer, R.K., 1997. Crystal Structure of Methyl-Coenzyme M Reductase: The Key Enzyme of Biological Methane Formation. *Science* 278, 1457–1462. <https://doi.org/10.1126/science.278.5342.1457>
- Ettwig, K.F., Butler, M.K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M.M.M., *et al.*, 2010. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* 464, 543–548. <https://doi.org/10.1038/nature08883>
- Ettwig, K.F., Zhu, B., Speth, D., Keltjens, J.T., Jetten, M.S.M., Kartal, B., 2016. *Archaea* catalyze iron-dependent anaerobic oxidation of methane. *PNAS* 113, 12792–12796. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609534113>
- Evans, P.N., Parks, D.H., Chadwick, G.L., Robbins, S.J., Orphan, V.J., Golding, S.D., *et al.*, 2015. Methane metabolism in the archaeal phylum *Bathyarchaeota* revealed by genome-centric metagenomics. *Science* 350, 434–438. <https://doi.org/10.1126/science.aac7745>
- Evans, P.N., Boyd, J.A., Leu, A.O., Woodcroft, B.J., Parks, D.H., Hugenholtz, P., *et al.*, 2019. An evolving view of methane metabolism in the *Archaea*. *Nat Rev Microbiol* 17, 219–232. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0136-7>

F

- Fadhlaoui, K., Arnal, M.-E., Martineau, M., Camponova, P., Ollivier, B., O'Toole, P.W., *et al.*, 2020. *Archaea*, specific genetic traits, and development of improved bacterial live biotherapeutic products: another face of next-generation probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 4705–4716. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10599-8>
- Feldewert, C., Lang, K., Brune, A., 2020. The hydrogen threshold of obligately methyl-reducing methanogens. *FEMS Microbiol Lett* 367. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa137>
- Ferguson, T., Soares, J.A., Lienard, T., Gottschalk, G., Krzycki, J.A., 2009. RamA, a Protein Required for Reductive Activation of Corrinoid-dependent Methylamine Methyltransferase Reactions in Methanogenic *Archaea*. *J. Biol. Chem.* 284, 2285–2295. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807392200>
- Ferretti, D.F., Miller, J.B., White, J.W.C., Etheridge, D.M., Lassey, K.R., Lowe, D.C., *et al.*, 2005. Unexpected Changes to the Global Methane Budget over the Past 2000 Years. *Science* 309, 1714–1717. <https://doi.org/10.1126/science.1115193>
- Ferry, J.G., 1992. Biochemistry of Methanogenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 27, 473–503. <https://doi.org/10.3109/10409239209082570>
- Ferry, J.G., 2010. The chemical biology of methanogenesis. *Planetary and Space Science* 58, 1775–1783. <https://doi.org/10.1016/j.pss.2010.08.014>
- Fetzer, S., Conrad, R., 1993. Effect of redox potential on methanogenesis by *Methanosarcina barkeri*. *Arch. Microbiol.* 160, 108–113. <https://doi.org/10.1007/BF00288711>
- Forster, P., Ramaswamy, V., Artaxo, P., Berntsen, T., Betts, R., Fahey, D.W., *et al.*, 2007. Changes in Atmospheric Constituents and in Radiative Forcing. Chapter 2. *Climate Change 2007. The Physical Science Basis*.
- Franzmann, P.D., Liu, Y., Balkwill, D.L., Aldrich, H.C., Conway De Macario, E., Boone, D.R., 1997. *Methanogenium frigidum* sp. nov., a Psychrophilic, H₂-Using Methanogen from Ace Lake, Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47, 1068–1072. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-1068>
- Frimmer, U., Widdel, F., 1989. Oxidation of ethanol by methanogenic bacteria. *Arch. Microbiol.* 152, 479–483. <https://doi.org/10.1007/BF00446933>
- Froelich, P.N., Klinkhammer, G.P., Bender, M.L., Luedtke, N.A., Heath, G.R., Cullen, D., *et al.*, 1979. Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the eastern equatorial Atlantic: suboxic diagenesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 43, 1075–1090. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(79\)90095-4](https://doi.org/10.1016/0016-7037(79)90095-4)
- Fu, H., Metcalf, W.W., 2015. Genetic Basis for Metabolism of Methylated Sulfur Compounds in *Methanosarcina* Species. *Journal of Bacteriology* 197, 1515–1524. <https://doi.org/10.1128/JB.02605-14>

G

- Garcia, J.-L., Patel, B.K.C., Ollivier, B., 2000. Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic *Archaea*. *Anaerobe* 6, 205–226. <https://doi.org/10.1006/anae.2000.0345>

- Garcia, J.-L., Ollivier, B., Whitman, W.B., 2006. The Order *Methanomicrobiales*, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. Springer, New York, NY, pp. 208–230. https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_10
- Gaston, M.A., Jiang, R., Krzycki, J.A., 2011. Functional context, biosynthesis, and genetic encoding of pyrrolysine. *Current Opinion in Microbiology, Ecology and industrial microbiology / Special section: Archaea* 14, 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.001>
- GIEC, 2013. Changements climatiques 2013: les éléments scientifiques : résumé à l'intention des décideurs : rapport du groupe de travail I du GIEC : résumé technique : rapport accepté par le Groupe de travail I du GIEC mais non approuvé dans le détail et foire aux questions : extraits de la contribution du groupe de travail I au cinquième rapport d'évaluation du Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat. Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat, Geneva, Switzerland.
- Gopal, M., Gupta, A., 2016. Microbiome Selection Could Spur Next-Generation Plant Breeding Strategies. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01971>
- Gorlas, A., Robert, C., Gimenez, G., Drancourt, M., Raoult, D., 2012. Complete Genome Sequence of *Methanomassiliicoccus luminyensis*, the Largest Genome of a Human-Associated *Archaea* Species. *Journal of Bacteriology* 194, 4745–4745. <https://doi.org/10.1128/JB.00956-12>
- Grahame, D.A., 1991. Catalysis of Acetyl-coA Cleavage and Tetrahydrosarcinapterin Methylation by a Carbon Monoxide Dehydrogenase-Corrinoid Enzyme Complex” 7.
- Grant, W.D., Jones, B.E., 2016. Bacteria, archaea and viruses of Soda Lakes, in: *Soda Lakes of East Africa*. pp. 97–147. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28622-8_5
- Großkopf, R., Stubner, S., Liesack, W., 1998. Novel Euryarchaeotal Lineages Detected on Rice Roots and in the Anoxic Bulk Soil of Flooded Rice Microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4983–4989. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.12.4983-4989.1998>
- Guindo, C.O., Davoust, B., Drancourt, M., Grine, G., 2021. Diversity of Methanogens in Animals' Gut. *Microorganisms* 9, 13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010013>
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59, 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>

H

- Hansen, J., Sato, M., Ruedy, R., 1997. Radiative forcing and climate response. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 102, 6831–6864. <https://doi.org/10.1029/96JD03436>
- Haroon, M.F., Hu, S., Shi, Y., Imelfort, M., Keller, J., Hugenholtz, P., *et al.*, 2013. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage. *Nature* 500, 567–570. <https://doi.org/10.1038/nature12375>
- Hattori, S., 2008. Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments. *Microbes and Environments* 23, 118–127. <https://doi.org/10.1264/jsme2.23.118>
- Hester, K.C., Brewer, P.G., 2009. Clathrate Hydrates in Nature. *Annual Review of Marine Science* 1, 303–327. <https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163824>

- Hines, M.E., Duddleston, K.N., Kiene, R.P., 2001. Carbon flow to acetate and C1 compounds in northern wetlands. *Geophysical Research Letters* 28, 4251–4254. <https://doi.org/10.1029/2001GL012901>
- Hines, M.E., Duddleston, K.N., Rooney-Varga, J.N., Fields, D., Chanton, J.P., 2008. Uncoupling of acetate degradation from methane formation in Alaskan wetlands: Connections to vegetation distribution. *Global Biogeochemical Cycles* 22. <https://doi.org/10.1029/2006GB002903>
- Hoedt, E.C., Cuív, P.Ó., Evans, P.N., Smith, W.J.M., McSweeney, C.S., Denman, S.E., *et al.*, 2016. Differences down-under: alcohol-fueled methanogenesis by archaea present in Australian macropodids. *The ISME Journal* 10, 2376–2388. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.41>
- Horz, H.-P., Seyfarth, I., Conrads, G., 2012. McrA and 16S rRNA gene analysis suggests a novel lineage of *Archaea* phylogenetically affiliated with *Thermoplasmatales* in human subgingival plaque. *Anaerobe* 18, 373–377. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.04.006>
- Hu, W., Pan, J., Wang, B., Guo, J., Li, M., Xu, M., 2020. Metagenomic insights into the metabolism and evolution of a new Thermoplasmata order (*Candidatus Gimiplasmatales*). *Environmental Microbiology* n/a. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15349>
- Hua, Z.-S., Wang, Y.-L., Evans, P.N., Qu, Y.-N., Goh, K.M., Rao, Y.-Z., *et al.*, 2019. Insights into the ecological roles and evolution of methyl-coenzyme M reductase-containing hot spring *Archaea*. *Nature Communications* 10, 4574. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12574-y>
- Huang, Y., Busk, P.K., Lange, L., 2015. Cellulose and hemicellulose-degrading enzymes in *Fusarium commune* transcriptome and functional characterization of three identified xylanases. *Enzyme and Microbial Technology* 73–74, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.03.001>
- Hug, L.A., Baker, B.J., Anantharaman, K., Brown, C.T., Probst, A.J., Castelle, C.J., *et al.*, 2016. A new view of the tree of life. *Nature Microbiology* 1, 1–6. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48>

I

- Iino, T., Tamaki, H., Tamazawa, S., Ueno, Y., Ohkuma, M., Suzuki, K., *et al.*, 2013. *Candidatus Methanogranum caenicola*: a Novel Methanogen from the Anaerobic Digested Sludge, and Proposal of *Methanomassiliicoccaceae* fam. nov. and *Methanomassiliicoccales* ord. nov., for a Methanogenic Lineage of the Class *Thermoplasmata*. *Microbes and Environments* advpub. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME12189>
- Iverson, R.L., Nearhoof, F.L., Andreae, M.O., 1989. Production of dimethylsulfonium propionate and dimethylsulfide by phytoplankton in estuarine and coastal waters. *Limnology and Oceanography* 34, 53–67. <https://doi.org/10.4319/lo.1989.34.1.0053>

J

- James, R.H., Bousquet, P., Bussmann, I., Haeckel, M., Kipfer, R., Leifer, I., *et al.*, 2016. Effects of climate change on methane emissions from seafloor sediments in the Arctic Ocean: A review. *Limnology and Oceanography* 61, S283–S299. <https://doi.org/10.1002/lno.10307>
- Janssen, P.H., Kirs, M., 2008. Structure of the Archaeal Community of the Rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3619–3625. <https://doi.org/10.1128/AEM.02812-07>

- Jarrell, K.F., Albers, S.-V., 2012. The archaellum: an old motility structure with a new name. *Trends in Microbiology* 20, 307–312. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.04.007>
- Jones, B.E., Grant, W.D., Duckworth, A.W., Owenson, G.G., 1998. Microbial diversity of soda lakes. *Extremophiles* 2, 191–200. <https://doi.org/10.1007/s007920050060>
- Jones, W.J., Paynter, M.J.B., Gupta, R., 1983. Characterization of *Methanococcus maripaludis* sp. nov., a new methanogen isolated from salt marsh sediment. *Arch. Microbiol.* 135, 91–97. <https://doi.org/10.1007/BF00408015>
- Jørgensen, B.B., Kasten, S., 2006. Sulfur Cycling and Methane Oxidation, in: Schulz, H.D., Zabel, M. (Eds.), *Marine Geochemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 271–309. https://doi.org/10.1007/3-540-32144-6_8

K

- Kallistova, A.Y., Merkel, A.Y., Tarnovetskii, I.Y., Pimenov, N.V., 2017. Methane formation and oxidation by prokaryotes. *Microbiology* 86, 671–691. <https://doi.org/10.1134/S0026261717060091>
- Kaster, A.-K., Moll, J., Parey, K., Thauer, R.K., 2011. Coupling of ferredoxin and heterodisulfide reduction *via* electron bifurcation in hydrogenotrophic methanogenic archaea. *PNAS* 108, 2981–2986. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016761108>
- Kelly, W.J., Li, D., Lambie, S.C., Jeyanathan, J., Cox, F., Li, Y., *et al.*, 2016. Complete Genome Sequence of Methanogenic Archaeon ISO4-G1, a Member of the *Methanomassiliicoccales*, Isolated from a Sheep Rumen. *Genome Announc.* 4. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00221-16>
- Keltjens, J.T., Vogels, G.D., 1993. Conversion of Methanol and Methylamines to Methane and Carbon Dioxide, in: Ferry, J.G. (Ed.), *Methanogenesis*. Springer US, Boston, MA, pp. 253–303. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2391-8_6
- Kemnitz, D., Kolb, S., Conrad, R., 2005. Phenotypic characterization of Rice Cluster III archaea without prior isolation by applying quantitative polymerase chain reaction to an enrichment culture. *Environmental Microbiology* 7, 553–565. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00723.x>
- Kendall, M.M., Boone, D.R., 2006. The Order *Methanosarcinales*, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. Springer, New York, NY, pp. 244–256. https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_12
- Khadem, A.F., Azman, S., Plugge, C.M., Zeeman, G., van Lier, J.B., Stams, A.J.M., 2017. Effect of humic acids on the activity of pure and mixed methanogenic cultures. *Biomass and Bioenergy* 99, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.02.012>
- King, G.M., 1984. Metabolism of Trimethylamine, Choline, and Glycine Betaine by Sulfate-Reducing and Methanogenic *Bacteria* in Marine Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 719–725.
- Kirschke, S., Bousquet, P., Ciais, P., Saunois, M., Canadell, J.G., Dlugokencky, E.J., *et al.*, 2013. Three decades of global methane sources and sinks. *Nature Geosci* 6, 813–823. <https://doi.org/10.1038/ngeo1955>
- Knittel, K., Boetius, A., 2009. Anaerobic Oxidation of Methane: Progress with an Unknown Process. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 311–334. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093130>

- Koeth, R.A., Wang, Z., Levison, B.S., Buffa, J.A., Org, E., Sheehy, B.T., *et al.*, 2013. Intestinal microbiota metabolism of l-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature Medicine* 19, 576–585. <https://doi.org/10.1038/nm.3145>
- Koskinen, K., Pausan, M.R., Perras, A.K., Beck, M., Bang, C., Mora, M., *et al.*, 2017. First Insights into the Diverse Human Archaeome: Specific Detection of *Archaea* in the Gastrointestinal Tract, Lung, and Nose and on Skin. *mBio* 8. <https://doi.org/10.1128/mBio.00824-17>
- Kröninger, L., Berger, S., Welte, C., Deppenmeier, U., 2016. Evidence for the involvement of two heterodisulfide reductases in the energy-conserving system of *Methanomassiliicoccus luminyensis*. *FEBS J* 283, 472–483. <https://doi.org/10.1111/febs.13594>
- Kröninger, L., Gottschling, J., Deppenmeier, U., 2017. Growth Characteristics of *Methanomassiliicoccus luminyensis* and Expression of Methyltransferase Encoding Genes. *Archaea*. <https://doi.org/10.1155/2017/2756573>
- Kröninger, L., Steiniger, F., Berger, S., Kraus, S., Welte, C.U., Deppenmeier, U., 2019. Energy conservation in the gut microbe *Methanomassiliicoccus luminyensis* is based on membrane-bound ferredoxin oxidation coupled to heterodisulfide reduction. *FEBS J* 286, 3831–3843. <https://doi.org/10.1111/febs.14948>
- Krzycki, J.A., 2004. Function of genetically encoded pyrrolysine in corrinoid-dependent methylamine methyltransferases. *Current Opinion in Chemical Biology* 8, 484–491. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.08.012>
- Krzycki, J.A., 2013. The path of lysine to pyrrolysine. *Current Opinion in Chemical Biology, Mechanisms • Molecular imaging* 17, 619–625. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.06.023>
- Kurr, M., Huber, R., König, H., Jannasch, H.W., Fricke, H., Trincone, A., *et al.*, 1991. *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C. *Arch. Microbiol.* 156, 239–247. <https://doi.org/10.1007/BF00262992>
- Kurth, J.M., Op den Camp, H.J.M., Welte, C.U., 2020. Several ways one goal—methanogenesis from unconventional substrates. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 6839–6854. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10724-7>

L

- Lang, K., Schuldes, J., Klingl, A., Poehlein, A., Daniel, R., Brune, A., 2015. New Mode of Energy Metabolism in the Seventh Order of Methanogens as Revealed by Comparative Genome Analysis of “*Candidatus Methanoplasma termitum*.” *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1338–1352. <https://doi.org/10.1128/AEM.03389-14>
- Lange, M., Westermann, P., Ahring, B.K., 2005. Archaea in protozoa and metazoa. *Appl Microbiol Biotechnol* 66, 465–474. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1790-4>
- Laso-Pérez, R., Wegener, G., Knittel, K., Widdel, F., Harding, K.J., Krukenberg, V., *et al.*, 2016. Thermophilic archaea activate butane via alkyl-coenzyme M formation. *Nature* 539, 396–401. <https://doi.org/10.1038/nature20152>
- Laso-Pérez, R., Hahn, C., Vliet, D.M. van, Tegetmeyer, H.E., Schubotz, F., Smit, N.T., *et al.*, 2019. Anaerobic Degradation of Non-Methane Alkanes by “*Candidatus Methanoliparia*” in Hydrocarbon Seeps of the Gulf of Mexico. *mBio* 10. <https://doi.org/10.1128/mBio.01814-19>

- Le Mer, J., Roger, P., 2001. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. *European Journal of Soil Biology* 37, 25–50. [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(01\)01067-6](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(01)01067-6)
- Levy, B., Jami, E., 2018. Exploring the Prokaryotic Community Associated With the Rumen Ciliate *Protozoa* Population. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02526>
- Lewis, W.H., Tahon, G., Geesink, P., Sousa, D.Z., Ettema, T.J.G., 2020. Innovations to culturing the uncultured microbial majority. *Nature Reviews Microbiology* 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00458-8>
- L'Haridon, S., Chalopin, M., Colombo, D., Toffin, L., 2014. *Methanococcoides vulcani* sp. nov., a marine methylotrophic methanogen that uses betaine, choline and N,N-dimethylethanolamine for methanogenesis, isolated from a mud volcano, and emended description of the genus *Methanococcoides*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, 1978–1983. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.058289-0>
- Li, W., Guan, W., Chen, H., Liao, B., Hu, J., Peng, C., *et al.*, 2016. Archaeal communities in the sediments of different mangrove stands at Dongzhaigang, China. *J Soils Sediments* 16, 1995–2004. <https://doi.org/10.1007/s11368-016-1427-0>
- Li, Y., Leahy, S.C., Jeyanathan, J., Henderson, G., Cox, F., Altermann, E., *et al.*, 2016. The complete genome sequence of the methanogenic archaeon ISO4-H5 provides insights into the methylotrophic lifestyle of a ruminal representative of the *Methanomassiliicoccales*. *Standards in Genomic Sciences* 11, 59. <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0183-5>
- Liu, Y., Whitman, W.B., 2008. Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic *Archaea*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125, 171–189. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.019>
- Lomans, B.P., Luderer, R., Steenbakkens, P., Pol, A., Drift, C. van der, Vogels, G.D., *et al.*, 2001. Microbial Populations Involved in Cycling of Dimethyl Sulfide and Methanethiol in Freshwater Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1044–1051. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1044-1051.2001>
- Losekann, T., Knittel, K., Nadalig, T., Fuchs, B., Niemann, H., Boetius, A., *et al.*, 2007. Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby mud volcano, Barents Sea. *Applied and environmental microbiology* 73, 3348–3362. <https://doi.org/10.1128/AEM.00016-07>
- Lovley, D.R., 1985. Minimum Threshold for Hydrogen Metabolism in Methanogenic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1530–1531.
- Lovley, D.R., 2017. Syntrophy Goes Electric: Direct Interspecies Electron Transfer. *Annu. Rev. Microbiol.* 71, 643–664. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-030117-020420>
- Luo, Y., Chen, H., Yu, B., He, J., Zheng, P., Mao, X., *et al.*, 2017. Dietary pea fiber increases diversity of colonic methanogens of pigs with a shift from *Methanobrevibacter* to *Methanomassiliicoccus*-like genus and change in numbers of three hydrogenotrophs. *BMC Microbiol* 17, 17. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0919-9>
- Luton, P.E., Wayne, J.M., Sharp, R.J., Riley, P.W., 2002. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology*, 148, 3521–3530. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-11-3521>
- Lyu, Z., Shao, N., Akinyemi, T., Whitman, W.B., 2018. Methanogenesis. *Current Biology* 28, R727–R732. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.021>

M

- Mackay, R.J., McEntyre, C.J., Henderson, C., Lever, M., George, P.M., 2011. Trimethylaminuria: causes and diagnosis of a socially distressing condition. *The Clinical Biochemist. Reviews* 32, 33–43.
- Maeder, D.L., Anderson, I., Brettin, T.S., Bruce, D.C., Gilna, P., Han, C.S., *et al.*, 2006. The *Methanosarcina barkeri* Genome: Comparative Analysis with *Methanosarcina acetivorans* and *Methanosarcina mazei* Reveals Extensive Rearrangement within *Methanosarcinal* Genomes. *Journal of Bacteriology* 188, 7922–7931. <https://doi.org/10.1128/JB.00810-06>
- Mand, T.D., Metcalf, W.W., 2019. Energy Conservation and Hydrogenase Function in Methanogenic *Archaea*, in Particular the Genus *Methanosarcina*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 83. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-19>
- Martins, P.D., Frank, J., Mitchell, H., Markillie, L.M., Wilkins, M.J., 2019. Wetland Sediments Host Diverse Microbial Taxa Capable of Cycling Alcohols. *Appl. Environ. Microbiol.* 85. <https://doi.org/10.1128/AEM.00189-19>
- Maupin-Furlow, J.A., Ferry, J.G., 1996. Analysis of the CO dehydrogenase/acetyl-coenzyme A synthase operon of *Methanosarcina thermophila*. *J Bacteriol* 178, 6849–6856.
- Mayumi, D., Mochimaru, H., Tamaki, H., Yamamoto, K., Yoshioka, H., Suzuki, Y., *et al.*, 2016. Methane production from coal by a single methanogen. *Science* 354, 222–225. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8821>
- McDonald, I.R., Murrell, J.C., 1997. The particulate methane monooxygenase gene *pmoA* and its use as a functional gene probe for methanotrophs. *FEMS Microbiology Letters* 156, 205–210. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12728.x>
- McInerney, M.J., Struchtemeyer, C.G., Sieber, J., Mouttaki, H., Stams, A.J.M., Schink, B., *et al.*, 2008. Physiology, Ecology, Phylogeny, and Genomics of Microorganisms Capable of Syntrophic Metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125, 58–72. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.005>
- Meng, J., Xu, J., Qin, D., He, Y., Xiao, X., Wang, F., 2014. Genetic and functional properties of uncultivated MCG archaea assessed by metagenome and gene expression analyses. *ISME J* 8, 650–659. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.174>
- Michaelis, W., Seifert, R., Nauhaus, K., Treude, T., Thiel, V., Blumenberg, M., *et al.*, 2002. Microbial Reefs in the Black Sea Fueled by Anaerobic Oxidation of Methane. *Science* 297, 1013–1015. <https://doi.org/10.1126/science.1072502>
- Mihajlovski, A., Alric, M., Brugère, J.-F., 2008. A putative new order of methanogenic *Archaea* inhabiting the human gut, as revealed by molecular analyses of the *mcrA* gene. *Research in Microbiology* 159, 516–521. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.06.007>
- Mihajlovski, A., Doré, J., Levenez, F., Alric, M., Brugère, J.-F., 2010. Molecular evaluation of the human gut methanogenic archaeal microbiota reveals an age-associated increase of the diversity. *Environmental Microbiology Reports* 2, 272–280. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00116.x>
- Mitchell, S.C., Zhang, A.Q., Barrett, T., Ayesh, R., Smith, R.L., 1997. Studies on the discontinuous N-oxidation of trimethylamine among Jordanian, Ecuadorian and New Guinean populations. *Pharmacogenetics and Genomics* 7, 45–50. <https://doi.org/10.1097/00008571-199702000-00006>

- Moissl-Eichinger, C., Pausan, M., Taffner, J., Berg, G., Bang, C., Schmitz, R.A., 2018. *Archaea* Are Interactive Components of Complex Microbiomes. *Trends in Microbiology* 26, 70–85. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.004>
- Müller, V., Koziarowski, G., Blaut, M., Gottschalk, G., 1987. Methanogenesis from trimethylamine + H₂ by *Methanosarcina barkeri* is coupled to ATP formation by a chemiosmotic mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 892, 207–212. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(87\)90176-9](https://doi.org/10.1016/0005-2728(87)90176-9)
- Murray, A.E., Freudenstein, J., Gribaldo, S., Hatzenpichler, R., Hugenholtz, P., Kämpfer, P., *et al.*, 2020. Roadmap for naming uncultivated *Archaea* and *Bacteria*. *Nature Microbiology* 5, 987–994. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0733-x>
- Myhre, G., Shindell, D., Pongratz, J., 2014. Anthropogenic and Natural Radiative Forcing, in: Stocker, T. (Ed.), *Climate Change 2013: The Physical Science Basis; Working Group I Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Ludwig-Maximilians-Universität München, Cambridge, pp. 659–740. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.018>

N

- Neue, H.U., Scharpenseel, H.W., 1987. Decomposition pattern of ¹⁴C-labeled rice straw in aerobic and submerged rice soils of the Philippines. *Science of The Total Environment* 62, 431–434. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(87\)90533-X](https://doi.org/10.1016/0048-9697(87)90533-X)
- Nkamga, V.D., Drancourt, M., 2016. *Methanomassiliicoccus*, in: Whitman, W.B., Rainey, F., Kämpfer, P., Trujillo, M., Chun, J., DeVos, P., Hedlund, B., Dedysh, S. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01365>
- Nobu, M.K., Narihiro, T., Kuroda, K., Mei, R., Liu, W.-T., 2016. Chasing the elusive Euryarchaeota class WSA2: genomes reveal a uniquely fastidious methyl-reducing methanogen. *ISME J* 10, 2478–2487. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.33>
- Noel, S.J., Højberg, O., Urich, T., Poulsen, M., 2016. Draft Genome Sequence of “*Candidatus Methanomethylophilus*” sp. 1R26, Enriched from Bovine Rumen, a Methanogenic Archaeon Belonging to the *Methanomassiliicoccales* Order. *Genome Announc.* 4. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01734-15>
- Nozhevnikova, A.N., Russkova, Y.I., Litti, Y.V., Parshina, S.N., Zhuravleva, E.A., Nikitina, A.A., 2020. Syntrophy and Interspecies Electron Transfer in Methanogenic Microbial Communities. *Microbiology* 89, 129–147. <https://doi.org/10.1134/S0026261720020101>

O

- O'Connor, F.M., Boucher, O., Gedney, N., Jones, C.D., Folberth, G.A., Coppel, R., *et al.*, 2010. Possible role of wetlands, permafrost, and methane hydrates in the methane cycle under future climate change: A review. *Reviews of Geophysics* 48. <https://doi.org/10.1029/2010RG000326>
- Oremland, R.S., Marsh, L.M., Polcin, S., 1982. Methane production and simultaneous sulphate reduction in anoxic, salt marsh sediments. *Nature* 296, 143–145. <https://doi.org/10.1038/296143a0>

- Oren, A., Garrity, G.M., 2013. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 3931–3934. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.058222-0>
- Oren, A., 2014. The Family *Methanococcaceae*, in: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Eds.), *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 215–224. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2_410
- Orphan, V.J., House, C.H., Hinrichs, K.-U., McKeegan, K.D., DeLong, E.F., 2001. Methane-Consuming *Archaea* Revealed by Directly Coupled Isotopic and Phylogenetic Analysis. *Science* 293, 484–487. <https://doi.org/10.1126/science.1061338>

P

- Pace, N.R., 1997. A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. *Science* 276, 734–740. <https://doi.org/10.1126/science.276.5313.734>
- Park, J.-H., Kang, H.-J., Park, K.-H., Park, H.-D., 2018. Direct interspecies electron transfer *via* conductive materials: A perspective for anaerobic digestion applications. *Bioresource Technology* 254, 300–311. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.095>
- Parkes, R.J., Wellsbury, P., Mather, I.D., Cobb, S.J., Cragg, B.A., Hornibrook, E.R.C., *et al.*, 2007. Temperature activation of organic matter and minerals during burial has the potential to sustain the deep biosphere over geological timescales. *Organic Geochemistry* 38, 845–852. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2006.12.011>
- Parkes, R.J., 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*, 50th Anniversary Special Issue 352, 409–425. <https://doi.org/10.1016/j.margeo.2014.02.009>
- Paul, K., Nonoh, J.O., Mikulski, L., Brune, A., 2012. “*Methanoplasmatales*,” *Thermoplasmatales*-Related Archaea in Termite Guts and Other Environments, Are the Seventh Order of Methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8245–8253. <https://doi.org/10.1128/AEM.02193-12>
- Petitjean, C., Deschamps, P., López-García, P., Moreira, D., 2015. Rooting the Domain Archaea by Phylogenomic Analysis Supports the Foundation of the New Kingdom *Proteoarchaeota*. *Genome Biol Evol* 7, 191–204. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu274>
- Prather, M.J., Holmes, C.D., Hsu, J., 2012. Reactive greenhouse gas scenarios: Systematic exploration of uncertainties and the role of atmospheric chemistry. *Geophysical Research Letters* 39. <https://doi.org/10.1029/2012GL051440>

R

- Rachel, R., Wyschkony, I., Riehl, S., Huber, H., 2002. The ultrastructure of *Ignicoccus*: Evidence for a novel outer membrane and for intracellular vesicle budding in an archaeon. *Archaea*. <https://doi.org/10.1155/2002/307480>
- Ramezani, A., Nolin, T.D., Barrows, I.R., Serrano, M.G., Buck, G.A., Regunathan-Shenk, R., *et al.*, 2018. Gut Colonization with Methanogenic *Archaea* Lowers Plasma Trimethylamine N-oxide Concentrations in Apolipoprotein e –/– Mice. *Scientific Reports* 8, 14752. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33018-5>

- Raymann, K., Brochier-Armanet, C., Gribaldo, S., 2015. The two-domain tree of life is linked to a new root for the Archaea. *PNAS* 112, 6670–6675. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420858112>
- Raymann, K., Moeller, A.H., Goodman, A.L., Ochman, H., 2017. Unexplored Archaeal Diversity in the Great Ape Gut Microbiome. *mSphere* 2. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00026-17>
- Reeburgh, W.S., 1996. “Soft Spots” in the Global Methane Budget, in: Lidstrom, M.E., Tabita, F.R. (Eds.), *Microbial Growth on C1 Compounds: Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Growth on C1 Compounds, Held in San Diego, U.S.A., 27 August – 1 September 1995*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 334–342. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0213-8_44
- Reeve, J.N., Nölling, J., Morgan, R.M., Smith, D.R., 1997. Methanogenesis: genes, genomes, and who’s on first? *Journal of Bacteriology* 179, 5975–5986. <https://doi.org/10.1128/jb.179.19.5975-5986.1997>
- Reeves, E.P., McDermott, J.M., Seewald, J.S., 2014. The origin of methanethiol in midocean ridge hydrothermal fluids. *PNAS* 111, 5474–5479. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400643111>
- Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N.N., Anderson, I.J., Cheng, J.-F., *et al.*, 2013. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* 499, 431–437. <https://doi.org/10.1038/nature12352>
- Rinke, C., Chuvochina, M., Mussig, A.J., Chaumeil, P.-A., Waite, D.W., Whitman, W.B., *et al.*, 2020. A rank-normalized archaeal taxonomy based on genome phylogeny resolves widespread incomplete and uneven classifications. *bioRxiv* 2020.03.01.972265. <https://doi.org/10.1101/2020.03.01.972265>
- Robertson, C.E., Harris, J.K., Spear, J.R., Pace, N.R., 2005. Phylogenetic diversity and ecology of environmental *Archaea*. *Current Opinion in Microbiology, Growth development / edited by John N Reeve and Ruth A Schmitz* 8, 638–642. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.10.003>
- Rother, M., Krzycki, J.A., 2010. Selenocysteine, Pyrrolysine, and the Unique Energy Metabolism of Methanogenic *Archaea*. *Archaea*. <https://doi.org/10.1155/2010/453642>
- Rovere, C.E., Crisp, P.T., Ellis, J., Bolton, P.D., 1983. Chemical characterization of shale oil from Condor, Australia. *Fuel* 62, 1274–1282. [https://doi.org/10.1016/S0016-2361\(83\)80009-X](https://doi.org/10.1016/S0016-2361(83)80009-X)
- Ruppel, C.D., Kessler, J.D., 2017. The interaction of climate change and methane hydrates. *Reviews of Geophysics* 55, 126–168. <https://doi.org/10.1002/2016RG000534>

S

- Saady, N.M.C., 2013. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy* 38, 13172–13191. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>
- Sakai, S., Conrad, R., Liesack, W., Imachi, H., 2010. *Methanocella arvoryzae* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from rice field soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 2918–2923. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.020883-0>
- Sakai, S., Conrad, R., Imachi, H., 2014. The Family *Methanocellaceae*, in: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Eds.), *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 209–214. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2_318
- Saunio, M., Bousquet, P., Poulter, B., Peregon, A., Ciais, P., Canadell, J.G., *et al.*, 2016. The global methane budget 2000–2012. *Earth System Science Data* 8, 697–751. <https://doi.org/10.5194/essd-8-697-2016>

- Saunois, M., Staverf, A.R., Poulter, B., Bousquet, P., Canadell, J.G., Jackson, R.B., *et al.*, 2020. The Global Methane Budget 2000–2017. *Earth System Science Data* 12, 1561–1623. <https://doi.org/10.5194/essd-12-1561-2020>
- Schäfer, H., Eyice, Ö., 2019. Microbial Cycling of Methanethiol. <https://doi.org/10.21775/cimb.033.173>
- Schink, Zeikus, 1980. Microbial methanol formation: A major end product of pectin metabolism. *Current Microbiology* 4, 387–389. <https://doi.org/10.1007/BF02605383>
- Schink, B., 1989. Mikrobielle Lebensgemeinschaften in Gewässersedimenten. *Naturwissenschaften* 76, 364–372. <https://doi.org/10.1007/BF00366207>
- Schink, 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 262–280.
- Schleper, C., Jurgens, G., Jonuscheit, M., 2005. Genomic studies of uncultivated archaea. *Nature Reviews Microbiology* 3, 479–488. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1159>
- Serrano-silva, N., Sarria-guzmán, Y., Dendooven, L., Luna-guido, M., 2014. Methanogenesis and Methanotrophy in Soil: A Review. *Pedosphere* 24, 291–307. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(14\)60016-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(14)60016-3)
- Shen, L., Zhao, Q., Wu, X., Li, X., Li, Q., Wang, Y., 2016. Interspecies electron transfer in syntrophic methanogenic consortia: From cultures to bioreactors. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 54, 1358–1367. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.102>
- Smith, P.H., Hungate, R.E., 1978. Isolation and characterization of *Methanobacterium ruminantium*. *SP.J* 75, 6.
- Soares, J.A., Zhang, L., Pitsch, R.L., Kleinholz, N.M., Jones, R.B., Wolff, J.J., *et al.*, 2005. The Residue Mass of L-Pyrrolysine in Three Distinct Methylamine Methyltransferases. *J. Biol. Chem.* 280, 36962–36969. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506402200>
- Söllinger, A., Schwab, C., Weinmaier, T., Loy, A., Tveit, A.T., Schleper, C., *et al.*, 2016. Phylogenetic and genomic analysis of *Methanomassiliicoccales* in wetlands and animal intestinal tracts reveals clade-specific habitat preferences. *FEMS Microbiol Ecol* 92. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv149>
- Söllinger, A., Urich, T., 2019. Methylotrophic methanogens everywhere — physiology and ecology of novel players in global methane cycling. *Biochem Soc Trans* 47, 1895–1907. <https://doi.org/10.1042/BST20180565>
- Solomon, S., 2009. *Climate Change 2007 : The Physical Science Basis*, S. Solomon; D. Qin; M. Manning; M. Marquis; K. Averyt; M.M.B. Tignor; H. LeRoy Miller; Jr.; Z. Chen (Eds.) : book review. *South African Geographical Journal = Suid-Afrikaanse Geografiese Tydskrif* 91, 103.
- Sommer, F., Bäckhed, F., 2013. The gut microbiota — masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology* 11, 227–238. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2974>
- Sorokin, D.Y., Makarova, K.S., Abbas, B., Ferrer, M., Golyshin, P.N., Galinski, E.A., *et al.*, 2017. Discovery of extremely halophilic, methyl-reducing euryarchaea provides insights into the evolutionary origin of methanogenesis. *Nat Microbiol* 2, 17081. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.81>
- Sorokin, D.Y., Merkel, A.Y., Abbas, B., Makarova, K.S., Rijpstra, W.I.C., Koenen, M., *et al.*, 2018. *Methanonatronarchaeum thermophilum* gen. nov., sp. nov. and “*Candidatus Methanohalarchaeum thermophilum*”, extremely halo(natrono)philic methyl-reducing methanogens from hypersaline lakes comprising a new euryarchaeal class *Methanonatronarchaeia* classis nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68, 2199–2208. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002810>

- Sowers, K.R., 2019. Methanogenesis, in: Schmidt, T.M. (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology* (Fourth Edition). Academic Press, Oxford, pp. 53–73. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02447-8>
- Speth, D.R., Orphan, V.J., 2018. Metabolic marker gene mining provides insight in global *mcrA* diversity and, coupled with targeted genome reconstruction, sheds further light on metabolic potential of the *Methanomassiliicoccales*. *PeerJ* 6, e5614. <https://doi.org/10.7717/peerj.5614>
- Srinivasan, G., James, C.M., Krzycki, J.A., 2002. Pyrrolysine Encoded by UAG in Archaea: Charging of a UAG-Decoding Specialized tRNA. *Science* 296, 1459–1462. <https://doi.org/10.1126/science.1069588>
- Stams, A.J.M., Teusink, B., Sousa, D.Z., 2019. Ecophysiology of Acetoclastic Methanogens, in: Stams, A.J.M., Sousa, D.Z. (Eds.), *Biogenesis of Hydrocarbons, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 109–121. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78108-2_21
- Sun, J., Mausz, M.A., Chen, Y., Giovannoni, S.J., 2019. Microbial trimethylamine metabolism in marine environments. *Environmental Microbiology* 21, 513–520. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14461>
- Sun, Y., Liu, Y., Pan, J., Wang, F., Li, M., 2020. Perspectives on Cultivation Strategies of *Archaea*. *Microb Ecol* 79, 770–784. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01422-7>
- Suzuki, M.T., Taylor, L.T., DeLong, E.F., 2000. Quantitative Analysis of Small-Subunit rRNA Genes in Mixed Microbial Populations *via* 5'-Nuclease Assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4605–4614. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.4605-4614.2000>

T

- Takai, K., 2019. Limits of Terrestrial Life and Biosphere, in: Yamagishi, A., Kakegawa, T., Usui, T. (Eds.), *Astrobiology: From the Origins of Life to the Search for Extraterrestrial Intelligence*. Springer, Singapore, pp. 323–344. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3639-3_20
- Tallant, T.C., Krzycki, J.A., 1997. Methylthiol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*, an enzyme of methanogenesis from dimethylsulfide and methylmercaptopropionate. *Journal of Bacteriology* 179, 6902–6911. <https://doi.org/10.1128/jb.179.22.6902-6911.1997>
- Tanaka, K., 1994. Anaerobic degradation of tetramethylammonium by a newly isolated marine methanogen. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 78, 386–388. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(94\)90287-9](https://doi.org/10.1016/0922-338X(94)90287-9)
- Thauer, R.K., Kaster, A.-K., Seedorf, H., Buckel, W., Hedderich, R., 2008. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology* 6, 579–591. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1931>
- Ticak, T., Hariraju, D., Arcelay, M.B., Arivett, B.A., Fiester, S.E., Ferguson, D.J., 2015. Isolation and characterization of a tetramethylammonium-degrading *Methanococoides* strain and a novel glycine betaine-utilizing *Methanolobus* strain. *Arch Microbiol* 197, 197–209. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-1043-6>
- Timmers, P.H.A., Welte, C.U., Koehorst, J.J., Plugge, C.M., Jetten, M.S.M., Stams, A.J.M., 2017. Reverse Methanogenesis and Respiration in Methanotrophic *Archaea*. *Archaea*. <https://doi.org/10.1155/2017/1654237>
- Torres, M.E., Wallmann, K., Tréhu, A.M., Bohrmann, G., Borowski, W.S., Tomaru, H., 2004. Gas hydrate growth, methane transport, and chloride enrichment at the southern summit of Hydrate Ridge, Cascadia margin off Oregon. *Earth and Planetary Science Letters* 226, 225–241. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2004.07.029>

V

- van der Maarel, M.J.E.C., Hansen, T.A., 1997. Dimethylsulfoniopropionate in anoxic intertidal sediments: a precursor of methanogenesis *via* dimethyl sulfide, methanethiol, and methiolpropionate. *Marine Geology, Gas in Marine Sediments, Geology/Geochemistry/Microbiology* 137, 5–12. [https://doi.org/10.1016/S0025-3227\(96\)00074-6](https://doi.org/10.1016/S0025-3227(96)00074-6)
- van Huissteden, J., 2020. Permafrost Carbon Quantities and Fluxes, in: van Huissteden, J. (Ed.), *Thawing Permafrost: Permafrost Carbon in a Warming Arctic*. Springer International Publishing, Cham, pp. 179–274. https://doi.org/10.1007/978-3-030-31379-1_4
- Vanderhaeghen, S., Lacroix, C., Schwab, C., 2015. Methanogen communities in stools of humans of different age and health status and co-occurrence with bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 362. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv092>
- Vanwonterghem, I., Evans, P.N., Parks, D.H., Jensen, P.D., Woodcroft, B.J., Hugenholtz, P., *et al.*, 2016. Methylophilic methanogenesis discovered in the archaeal phylum *Verstraetearchaeota*. *Nat Microbiol* 1, 1–9. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.170>
- Venkiteswaran, K., Bocher, B., Maki, J., Zitomer, D., 2016. Relating Anaerobic Digestion Microbial Community and Process Function: Supplementary Issue: Water Microbiology: Microbiology Insights. <https://doi.org/10.4137/MBI.S33593>
- Vepachedu, V.R., Ferry, J.G., 2012. Role of the Fused Corrinoid/Methyl Transfer Protein CmtA during CO-Dependent Growth of *Methanosarcina acetivorans*. *Journal of Bacteriology* 194, 4161–4168. <https://doi.org/10.1128/JB.00593-12>
- Volta, A., 1778. Lettres de Mr. Alexandre Volta, noble patricien de Côme & membre du Grand conseil, professeur royal de physique expérimentale, directeur des écoles publiques de Côme, de la Société physique de Zurich, de l'Académie royale des science de Mantoue, & de l'Académie de Sienne, sur l'air inflammable des marais: auxquelles on a ajouté trois lettres du même auteur tirées du journal de Milan. De l'imprimerie de J.H. Heitz.

W

- Wagner, D., 2020. *Methanosarcina*, in: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. American Cancer Society, pp. 1–23. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00519.pub2>
- Wagner, T., Wegner, C.-E., Kahnt, J., Ermler, U., Shima, S., 2017. Phylogenetic and Structural Comparisons of the Three Types of Methyl Coenzyme M Reductase from *Methanococcales* and *Methanobacteriales*. *Journal of Bacteriology* 199. <https://doi.org/10.1128/JB.00197-17>
- Walter Anthony, K.M., Anthony, P., Grosse, G., Chanton, J., 2012. Geologic methane seeps along boundaries of Arctic permafrost thaw and melting glaciers. *Nature Geoscience* 5, 419–426. <https://doi.org/10.1038/ngeo1480>
- Wang, Y., Wegener, G., Hou, J., Wang, F., Xiao, X., 2019. Expanding anaerobic alkane metabolism in the domain of *Archaea*. *Nature Microbiology* 4, 595–602. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0364-2>
- Watkins, A.J., Roussel, E.G., Webster, G., Parkes, R.J., Sass, H., 2012. Choline and N,N-Dimethylethanolamine as Direct Substrates for Methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8298–8303. <https://doi.org/10.1128/AEM.01941-12>

- Watkins, A.J., Roussel, E.G., Parkes, R.J., Sass, H., 2014. Glycine Betaine as a Direct Substrate for Methanogens (*Methanococoides* spp.). *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 289–293. <https://doi.org/10.1128/AEM.03076-13>
- Weiss, M.C., Sousa, F.L., Mrnjavac, N., Neukirchen, S., Roettger, M., Nelson-Sathi, S., *et al.*, 2016. The physiology and habitat of the last universal common ancestor. *Nature Microbiology* 1, 1–8. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.116>
- Welander, P.V., Metcalf, W.W., 2005. Loss of the *mtr* operon in *Methanosarcina* blocks growth on methanol, but not methanogenesis, and reveals an unknown methanogenic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 10664–10669. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502623102>
- Wellsbury, P., Goodman, K., Barth, T., Cragg, B.A., Barnes, S.P., Parkes, R.J., 1997. Deep marine biosphere fuelled by increasing organic matter availability during burial and heating. *Nature* 388, 573–576. <https://doi.org/10.1038/41544>
- Whitman, W.B., Bowen, T.L., Boone, D.R., 2006. The Methanogenic *Bacteria*, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. Springer, New York, NY, pp. 165–207. https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_9
- Whitman, W.B., Jeanthon, C., 2006. *Methanococcales*, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. Springer, New York, NY, pp. 257–273. https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_13
- Whitman, W.B., Bowen, T.L., Boone, D.R., 2014. The Methanogenic *Bacteria*, in: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Eds.), *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 123–163. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2_407
- Widdel, F., 1986. Growth of Methanogenic Bacteria in Pure Culture with 2-Propanol and Other Alcohols as Hydrogen Donors. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 1056–1062. <https://doi.org/10.1128/AEM.51.5.1056-1062.1986>
- Widdel, F., Bak, F., 1992. Gram-Negative Mesophilic Sulfate-Reducing *Bacteria*, in: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (Eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Springer, New York, NY, pp. 3352–3378. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2191-1_21
- Wilson, M.A., Philp, R.P., Gillam, A.H., Gilbert, T.D., Tate, K.R., 1983. Comparison of the structures of humic substances from aquatic and terrestrial sources by pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 47, 497–502. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(83\)90272-7](https://doi.org/10.1016/0016-7037(83)90272-7)
- Wishnok, S., Blusztajn, K., 1983. Formation of Methylamines from Ingested Choline and Lecithin 225, 5.
- Woese, C.R., Fox, G.E., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, 5088–5090. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>
- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4576–4579.
- Wolfe, R.S., 1993. An Historical Overview of Methanogenesis, in: Ferry, J.G. (Ed.), *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics*, Chapman & Hall Microbiology Series. Springer US, Boston, MA, pp. 1–32. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2391-8_1

Worm, P., Müller, N., Plugge, C.M., Stams, A.J.M., Schink, B., 2010. Syntrophy in Methanogenic Degradation, in: Hackstein, J.H.P. (Ed.), (Endo)Symbiotic Methanogenic Archaea, Microbiology Monographs. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 143–173. https://doi.org/10.1007/978-3-642-13615-3_9

Y

Yakimov, M.M., Cono, V.L., Spada, G.L., Bortoluzzi, G., Messina, E., Smedile, F., *et al.*, 2015. Microbial community of the deep-sea brine Lake Kryos seawater–brine interface is active below the chaotropicity limit of life as revealed by recovery of mRNA. *Environmental Microbiology* 17, 364–382. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12587>

Yamazaki, H., Fujieda, M., Togashi, M., Saito, T., Preti, G., Cashman, J.R., *et al.*, 2004. Effects of the dietary supplements, activated charcoal and copper chlorophyllin, on urinary excretion of trimethylamine in Japanese trimethylaminuria patients. *Life Sciences* 74, 2739–2747. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.10.022>

Yu, Y., Lee, C., Kim, J., Hwang, S., 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering* 89, 670–679. <https://doi.org/10.1002/bit.20347>

Z

Zhang, C.-J., Pan, J., Liu, Y., Duan, C.-H., Li, M., 2020. Genomic and transcriptomic insights into methanogenesis potential of novel methanogens from mangrove sediments. *Microbiome* 8, 94. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00876-z>

Zhou, Z., Chen, J., Cao, H., Han, P., Gu, J.-D., 2015. Analysis of methane-producing and metabolizing archaeal and bacterial communities in sediments of the northern South China Sea and coastal Mai Po Nature Reserve revealed by PCR amplification of *mcrA* and *pmoA* genes. *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00789>

Zhou, Z., Pan, J., Wang, F., Gu, J.-D., Li, M., 2018. Bathyarchaeota: globally distributed metabolic generalists in anoxic environments. *FEMS Microbiology Reviews* 42, 639–655. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy023>

Zinder, S.H., 1993. Physiological Ecology of Methanogens, in: Ferry, J.G. (Ed.), *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics*, Chapman & Hall Microbiology Series. Springer US, Boston, MA, pp. 128–206. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2391-8_4

Titre : *Aspects physiologiques et écologiques des Methanomassiliicoccales dans des environnements terrestres et aquatiques*

Mots clés : Méthane, *Methanomassiliicoccales*, composés méthylés, réseaux de cooccurrence

Résumé : Les *Methanomassiliicoccales* (MX) sont des archées méthanogènes hydrogénéotrophes méthyle-dépendantes (MHMD) réparties en deux clusters phylogénétiques reflétant leurs adaptations aux écosystèmes digestifs (*host-associated*) ou non-digestifs (*free-living*). Nos connaissances les concernant se limitent surtout à des études centrées sur des milieux digestifs. De nombreuses questions demeurent sur le mode de vie et les adaptations des représentants du cluster *free-living* dans des habitats non-digestifs. Cette thèse visait à améliorer nos connaissances sur leur biologie en étudiant leur distribution, leur diversité, leur abondance et potentiels métaboliques et physiologiques dans des habitats non-digestifs. Des analyses de diversité et d'abondance sur un panel d'échantillons de natures et d'origines variées ont permis de mettre en évidence la faible abondance et diversité taxonomique des MX dans les échantillons criblés.

Des approches culturelles ont permis d'obtenir un enrichissement significatif en MX à partir d'un microcosme inoculé avec des sédiments d'eau douce. Une analyse en métagénomique de cet enrichissement a permis la reconstruction d'un metagenome assembled genome (MXMAG1) de grande qualité correspondant à une nouvelle espèce candidate affiliée au cluster *free-living*. Son analyse a révélé la présence des gènes impliqués dans la réponse et la régulation de stress environnementaux (ex : pH, métaux lourds) et ceux impliqués dans la MHMD. Enfin, des analyses en réseaux de cooccurrence basées sur des données de diversité ont révélé la cooccurrence des MX avec des taxa bactériens inféodés aux tractus digestifs et connus pour entretenir des relations syntrophiques avec des archées méthanogènes.

Title : *Physiological and ecological aspects of Methanomassiliicoccales in terrestrial and aquatic environments*

Keywords : Methane, *Methanomassiliicoccales*, methyl-compounds, networks

Abstract : *Methanomassiliicoccales* (MX) belong to the recently discovered methyl-dependent hydrogenotrophic methanogenic (MDHM) archaea. These archaea are divided into two phylogenetic clusters that reflect their adaptations to digestive ('host-associated') or non-digestive ('free-living') environments. So far, our knowledge about them is limited to studies focused on digestive environments. Many questions remain about the lifestyle and adaptations of representatives of the 'free-living' cluster in non-digestive ecosystems. The aim of this thesis was to improve our knowledge of the biology of MX by investigating their distribution, diversity, abundance, as well as their metabolic and physiological potentials in non-digestive habitats. Diversity and abundance analyses were carried out on a panel of samples of various natures and origins revealed a low abundance and a low taxonomic diversity of MX in the investigated environments

Cultural approaches have enabled growth and a significant enrichment of MX from a microcosm incubated with freshwater sediments from which a metagenomic analysis enabled the reconstruction of a high-quality metagenome assembled genome (MXMAG1) corresponding to a new candidate species, belonging to the 'free-living' cluster. The analysis of this MAG showed that this MAG possesses set of genes involved in the response and regulation of various environmental stresses (ex.: pH, heavy metals) and in MDHM. Finally, co-occurrence networks analyses based on diversity data revealed the co-occurrence of MX with bacteria commonly detected in digestive environments and reported to form syntrophic relationships with methanogenic archaea