



HAL
open science

Identification et caractérisation fonctionnelle des communautés microbiennes en interaction avec les minéralisations hydrothermales

Sébastien Le Guellec

► **To cite this version:**

Sébastien Le Guellec. Identification et caractérisation fonctionnelle des communautés microbiennes en interaction avec les minéralisations hydrothermales. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2019. Français. NNT : 2019BRES0026 . tel-03637623

HAL Id: tel-03637623

<https://theses.hal.science/tel-03637623>

Submitted on 11 Apr 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
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

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

Par

Sébastien LE GUELLEC

Identification et caractérisation fonctionnelle des communautés microbiennes en interaction avec les minéralisations hydrothermales

Thèse présentée et soutenue à Plouzané, le 18 mars 2019

Unité de recherche : Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E – UMR6197)

Rapporteurs avant soutenance :

François GUYOT
Professeur, MNHN Paris

Philippe OGER
Directeur de recherche, ENS Lyon

Composition du Jury :

Mohamed JEBBAR (Président du Jury)
Professeur, Université de Bretagne Occidentale

François GUYOT (Rapporteur)
Professeur, MNHN Paris

Philippe OGER (Rapporteur)
Directeur de recherche, ENS Lyon

Aurore GORLAS (Examineur)
Maître de conférences, Université Paris Sud

Anne POSTEC (Examineur)
Maître de conférences, Université Aix-Marseille

Yves FOUQUET (Directeur de thèse)
Directeur de recherche, Ifremer Brest (LGC)

Erwan ROUSSEL (Co-directeur de thèse)
Cadre de recherche, Ifremer Brest (LM2E)



REMERCIEMENT

Cette thèse a été effectuée dans le Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LMEE, UMR6197) au centre Ifremer de Brest, sous la direction d'Yves Fouquet (Laboratoire Cycles Géochimiques et ressources, IFREMER Brest) et d'Erwan Roussel (Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, IFREMER Brest). Ce travail a été financé pour moitié par l'IFREMER et pour moitié a bénéficié d'une aide de l'Etat gérée par l'Agence Nationale de la Recherche au titre du programme « Investissements d'avenir » portant la référence ANR-10-LABX-19, ainsi que d'une aide de la Région Bretagne (allocation de recherche doctorale).

L'écriture des remerciements est l'exercice le plus délicat de la rédaction de ce manuscrit. Bien qu'une thèse soit individuelle, le résultat qui en découle est le fruit d'un travail collectif, de rencontre, de collaboration et de discussions plus ou moins sérieuses avec une grande diversité de personnes.

Mes premiers remerciements sont pour mes deux directeurs de thèses sans qui cette thèse n'aurait pas eu lieu. Merci d'avoir toujours été là...

Je souhaite sincèrement remercier l'ensemble des membres de mon jury, mes deux rapporteurs François Guyot et Philippe Oger ainsi que les trois examinateurs Anne Postec, Aurore Gorlas et Mohamed Jebbar qui ont accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse pour leurs expertises et leurs commentaires constructifs : Georges Barbier, Christian Jeanthon, Christian Mustin, Anne Godfroy et Ewan Pelleter.

Un remerciement particulier à l'ensemble des membres du LMEE, présents et passés. On ne peut rêver de meilleures conditions de travail pour réaliser sa thèse. Je tiens particulièrement à remercier les membres de la team « caillou » aka la meilleure des teams !!

Cette thèse n'aurait pas eu la même saveur sans cette équipe de thésard, des plus anciens (Gaelle, Sandrine, Matthieu), à mes contemporains (Simon, Vincent, Charlène, Mélanie, Cécile, Gwendoline, Coraline, Tiphaine et Damien), en passant par ceux de la même fournée de master voire de licence ! (Caroline, Yang, Florian et Clarisse, j'hésite à y inclure Jordan également dans cette catégorie) et sans oublier les plus jeunes qui doivent encore faire leurs preuves (Pierre, Sarah, Marc, Blandine, Maxime, Jie, Marion, Maurane, David et Elodie).

Et bien sûr, je remercie toutes les personnes, qui à un moment ou un autre ont participé à cette aventure, que ce soit durant la campagne BICOSE 2, dans les congrès ou à l'occasion d'une discussion, ce sont ces rencontres qui donnent à la thèse toute sa saveur.

VALORISATION SCIENTIFIQUE

Ces travaux ont principalement été valorisés sous la forme de participations orales à quatre congrès nationaux et à un congrès international :

- Identification et caractérisation fonctionnelle de précurseurs de colonisation microbienne de sulfure-massif hydrothermal : présenté à CONNECT2 (Brest - mai 2016) et aux Journées de l'AFEM 2016 (Marseille - juin 2016).
- Production hydrogène-dépendante de formate par des *Thermococcales* hyperthermophiles : présenté au VIIIème colloque de l'AFEM 2017 (Camaret - octobre 2017).
- H₂-dependent formate production by hyperthermophilic *Thermococcales* : présenté au GDR Archaea 2017 (Lyon - décembre 2017) et à la Goldschmidt (Boston - aout 2018).

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENT	3
VALORISATION SCIENTIFIQUE	5
TABLE DES MATIÈRES	7
LISTE DES ABRÉVIATIONS	11
LISTE DES FIGURES ET DES TABLES.....	13
INTRODUCTION GÉNÉRALE	15
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	17
1.1. Les systèmes hydrothermaux : Généralités autour des sources hydrothermales profondes ..	
.....	19
1.1.1 Principe de l'hydrothermalisme	19
1.1.2 Historique de la découverte des sources hydrothermales profondes	23
1.1.3 Évolutions technologiques associées	24
1.1.4 Enjeux autour des ressources minérales.....	26
1.1.5 Différents contextes géologiques et géochimiques des fluides sur les dorsales	27
1.1.6 Les cheminées hydrothermales : formation et structure.....	30
1.1.6.1. Cheminées de haute température – fumeurs noirs	32
1.1.6.2. Autres types de diffusion (de basse température).....	33
1.2. Les écosystèmes hydrothermaux : le rôle clé des communautés microbiennes	35
1.2.1 Présentation de la macrofaune	35
1.2.2 Présentation des micro-organismes.....	37
1.2.2.1. Les principales évolutions associées aux approches techniques pour l'étude des écosystèmes microbiens	37
1.2.2.2. Distribution et diversité des micro-organismes associés aux sources hydrothermales marines profondes.....	38
1.2.2.3. La température, facteur clé déterminant la distribution des micro-organismes..	40
1.2.2.4. Diversité des habitats périphériques des zones hydrothermales chaudes.....	41
1.2.2.5. Diversité des habitats thermophiles et hyperthermophiles	42
1.2.2.6. Diversité des habitats devenus inactifs	44
1.2.2.7. L'influence de la pression hydrostatique	44
1.3. Diversité des métabolismes microbiens.....	47
1.3.1 Généralité sur le métabolisme et Principe de base de la thermodynamique.....	47
1.3.1.1. Catabolisme	47
1.3.1.2. Anabolisme	48
1.3.2 Cycle du carbone	50
1.3.2.1. Assimilation du carbone	51
1.3.2.2. Minéralisations du carbone organique	55
1.3.2.3. Utilisation du méthane.....	57
1.3.2.3.a Méthanogenèse.....	57
1.3.2.3.b Méthanotrophie aérobie.....	59
1.3.2.3.c Méthanotrophie anaérobie : AOM.....	60
1.3.3 Cycle du fer	62
1.3.3.1. Oxydation du fer (II)	64

1.3.3.2.	Réduction du fer (III).....	65
1.3.4	Cycle de l'azote.....	67
1.3.5	Cycle du soufre	70
1.4.	Les interactions géosphère-biosphère : une clé pour la compréhension du fonctionnement de l'écosystème hydrothermal ?.....	75
1.4.1	Généralités	75
1.4.2	Présentation des différents types d'interactions connus et de leurs mécanismes	76
1.4.2.1.	Réactions dissimilatrices.....	76
1.4.2.1.a	Quelques exemples de mécanismes de réactions dissimilatrices.....	77
1.4.2.1.b	Les micro-organismes bio-électroactifs	78
1.4.2.2.	Réactions assimilatrices.....	81
1.4.2.3.	Toxicités.....	82
1.4.2.3.a	Le cas de l'H ₂ S.....	82
1.4.2.3.b	Les mécanismes de tolérance et de dégradation	83
1.4.3	La colonisation microbienne en milieu hydrothermal profond	85
1.4.3.1.	Les stratégies de dispersion	85
1.4.3.2.	Colonisateurs <i>in situ</i>	86
1.4.3.2.a	Le « Vent Cap ».....	86
1.4.3.2.b	D'autres exemples d'outils <i>in situ</i>	88
1.5.	Les <i>Thermococcales</i> , acteurs importants des écosystèmes hydrothermaux profonds ?.....	91
1.5.1	Généralités	91
1.5.2	Métabolismes	92
1.5.2.1.	Catabolisme des peptides	92
1.5.2.2.	Catabolisme des sucres	93
1.5.2.3.	Synthèse d'ATP et hydrogénases	96
1.5.2.4.	Effet métabolique du S ⁰	97
1.5.2.5.	Métabolisme du C1	98
1.5.2.6.	Fixation de CO ₂ chez les <i>Thermococcales</i> ?.....	99
1.5.3	Quel rôle écologique pour les <i>Thermococcales</i> ?.....	101
CHAPITRE II : MATÉRIELS & MÉTHODES		103
2.1.	Présentation des champs hydrothermaux étudiés	105
2.1.1	Le champ hydrothermal Trans-Atlantic Geotraverse (TAG).....	106
2.1.2	Le champ hydrothermal de Snake Pit (anciennement MARK)	107
2.1.3	Le champ hydrothermal de Lucky Strike	109
2.2.	Prélèvement et conditionnement des échantillons	110
2.2.1	Échantillons solides	110
2.2.2	Échantillons de fluides (eau de mer ou fluide hydrothermal).....	113
2.3.	Approches culturelles.....	113
2.3.1	Culture en continu en bioréacteur Gas-lift.....	113
2.3.1.1.	Présentation du bioréacteur Gas-lift.....	113
2.3.1.2.	Description du système	114
2.3.1.3.	Mises en œuvre des cultures en continu	116
2.3.1.3.a	Montage et stérilisation du bioréacteur	116
2.3.1.3.b	Conditions des cultures en continu.....	117
2.3.1.4.	Échantillonnage et conditionnement.....	119
2.3.2	Culture en fiole	119
2.3.2.1.	Préparation des milieux.....	119

2.3.2.1.a Milieu Eau de mer anoxique.....	119
2.3.2.1.b Milieu SME	120
2.3.3 Culture sous pression	120
2.4. Dénombrement cellulaire	121
2.4.1 Comptage sur cellule de Thoma.....	121
2.4.2 AODC	121
2.4.3 Dénombrement cellulaire sur sections polies.....	122
2.5. Analyses minéralogiques.....	122
2.5.1 Préparation des sections polies et incubation au sein des bioréacteurs	123
2.5.2 Diffraction des rayons X	124
2.5.2.1. Principe.....	124
2.5.2.2. Protocole	125
2.5.3 MEB-EDS.....	125
2.5.3.1. Métallisation (sputtering) par pulvérisation cathodique d'or.....	125
2.5.3.1.a Principe.....	125
2.5.3.1.b Protocole	126
2.5.3.2. Microscopie Electronique par Balayage	126
2.5.3.2.a Principe.....	126
2.5.3.2.b Protocole	128
2.6. Biologie moléculaire	128
2.6.1 Extraction et purification des acides nucléiques.....	129
2.6.1.1. Extraction d'ADN sur les fluides	129
2.6.1.2. Extraction d'ADN sur les échantillons solides.....	130
2.6.2 Réaction de polymérisation en chaine (PCR)	130
2.6.3 Clonage et séquençage.....	131
2.6.3.1. Banque de clone	132
2.6.3.2. Séquençage haut-débit	132
2.6.4 Traitement bio-informatique	133
2.6.4.1. Données de séquençages Sanger	133
2.6.4.2. Données de séquençages haut-débit	134
2.6.4.3. Arbre phylogénomique des génomes de <i>Thermococcales</i>	136
2.6.5 Analyse statistique	136
2.7. Dosage des anions par chromatographie échangeuse d'anion	136
2.7.1 Présentation de la chromatographie échangeuse d'ions.....	136
2.7.2 Principe de la chromatographie échangeuse d'ions	137
2.8. Mesures d'activités métaboliques par utilisation de radiotraceurs.....	139
2.8.1 Mesure d'incorporation de carbone radiomarqué	139
2.8.2 Utilisation de radiotraceur (¹⁴ C] Bicarbonate) avec collection de fraction	139
2.8.2.1. Principe.....	139
2.8.2.2. Protocole	140
CHAPITRE III : RÉSULTATS.....	141
Etude A. Influence des conditions physico-chimiques sur l'enrichissement de communautés hyperthermophiles de cheminées hydrothermales de la ride médio-Atlantique en cultures en continu	143
A.1. Introduction.....	143
A.2. Mises en œuvre des incubations.....	144
A.3. Résultats & Discussions	146

A.3.1	Diversité des échantillons bruts	146
A.3.2	Évolution de la diversité microbienne au sein des différents bioréacteurs.....	148
A.3.3	Diversité des archées spécifiques à certaines incubations	153
A.3.4	Diversités associées à des surfaces minérales incubées dans les bioréacteurs.....	155
A.3.5	Résilience des communautés microbiennes après un choc oxique et une diminution de la température.....	156
A.4.	Conclusions.....	158
Etude B. H₂-dependant formate production by (hyper)thermophilic <i>Thermococcales</i>	161
B.1.	Abstract	162
B.2.	Introduction.....	163
B.3.	Results & Discussions	163
B.4.	Conclusions.....	172
B.5.	Résultats & discussions complémentaires	173
B.5.1	Création de mutants.....	173
B.5.2	Cinétiques de production de formate	174
B.5.3	Effet de la pression hydrostatique sur la production de formate	176
B.5.4	Effet de la température	178
B.5.5	Production de formate en présence de CO.....	179
B.5.6	Transporteur ou canal de formate ?	180
B.5.7	Coculture et association avec une méthanogène	181
B.5.8	Voie autotrophe d'incorporation de CO ₂ /HCO ₃ ⁻ chez les <i>Thermococcales</i> ?	183
B.6.	Conclusions.....	185
CHAPITRE IV : SYNTHÈSE GÉNÉRALE & PERSPECTIVES	187
4.1.	Rappel des objectifs	189
4.2.	Influence des conditions physico-chimiques sur l'enrichissement de communautés hyperthermophiles de cheminées hydrothermales de la ride médio-Atlantique en cultures en continu.....	190
4.2.1	Enrichissement de communautés hyperthermophiles	190
4.2.2	Colonisation de nouvelles surfaces minérales	192
4.2.3	Résilience des communautés microbiennes après un choc oxique et une diminution de la température d'incubation	193
4.3.	La production de formate comme mécanisme de tolérance à l'H ₂ chez les <i>Thermococcales</i> .	194
4.3.1	Principaux résultats	194
4.3.2	Quel est le sens de la réaction <i>in situ</i> ?	195
4.3.3	Quelle est la réalité écologique ?	198
4.3.4	Quelle est l'histoire évolutive de cet opéron ?	198
4.3.5	Transfert d'électrons abiotique ?	199
4.4.	Conclusions.....	201
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	203
ANNEXE	241
ANNEXE 1 - Liste des génomes utilisés pour l'arbre phylogénomique des <i>Thermococcales</i>	241
ANNEXE 2 - Liste des protéines utilisées pour l'arbre phylogénomique des <i>Thermococcales</i>	242

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AIFM : Autorité Internationale des Fonds Marins
ARN : Acide RiboNucléique
ATP : Adénosine Tri Phosphate
BET : Bromure d'éthidium
EET : Transfert extracellulaire d'électron
EPR : East Pacifique Ridge / Dorsale Est-Pacifique
FHL : Formate Hydrogen-Lyase
GLTS : Glutamate Synthase
MAR : Mid-Atlantic Ridge
MBH : Membrane Bound Hydrogenase
MBX : Membrane Bound oxidoreductase
MEB : Microscopie Electronique à balayage
MGI : Marine Group I
MPa : Mega Pascal
Mpb : Mega Paire de base
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide
OTU : Unité Taxonomique Opérationnelle
NUG : New Unaffiliated Group
PBT : Petite boîte de prélèvement
PCR : Polymerase Chain Reaction
SurR : Sulfur Response Regulator
TAG : Trans-Atlantic Geotraverse
TON : *Thermococcus onnurineus*
ZEE : Zone Economique Exclusive

LISTE DES FIGURES ET DES TABLES

FIGURE 1 : PRINCIPE GENERAL DE LA TECTONIQUE DES PLAQUES.....	19
FIGURE 2 : LOCALISATION DES SITES HYDROTHERMAUX.....	21
FIGURE 3 : PRINCIPE DE LA CIRCULATION HYDROTHERMALE OCEANIQUE	22
FIGURE 4 : PHOTOGRAPHIES EMBLEMATIQUES DE LA DECOUVERTE DES SOURCES HYDROTHERMALES.....	24
FIGURE 5 : PHOTOGRAPHIES DU SOUS-MARIN FRANÇAIS NAUTILE	25
FIGURE 6 : EMBLACEMENT DU PERMIS ATLANTIQUE.....	27
FIGURE 7 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES STRUCTURES MINERALES	31
FIGURE 8 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PRINCIPALES MORPHOLOGIES DES EDIFICES HYDROTHERMAUX.....	31
FIGURE 9 : MODELE DES DIFFERENTES ETAPES DE FORMATION D'UNE CHEMINEE HYDROTHERMALE.....	33
FIGURE 10 : PHOTOGRAPHIES DE DIFFERENTS ORGANISMES IDENTIFIES AU NIVEAU DES SOURCES HYDROTHERMALES	35
FIGURE 11 : MODELISATION DE LA CHAINE TROPHIQUE DANS L'ECOSYSTEME HYDROTHERMAL	36
FIGURE 12 : LOCALISATION DES PRINCIPAUX HABITATS MICROBIENS DES SOURCES HYDROTHERMALES MARINES..	39
FIGURE 13 : PRESENTATION DES MICRO-ORGANISMES SELON LEUR PREFERENDUM DE TEMPERATURE.....	40
FIGURE 14 : EVOLUTION DE LA DENSITE CELLULAIRE EN FONCTION DE LA PRESSION HYDROSTATIQUE DE CULTURE	45
FIGURE 15 : OPTIMA DE PRESSION ET DE TEMPERATURE DE SOUCHES CARACTERISEES.....	46
FIGURE 16 : DIAGRAMME DE PREDOMINANCE DES DIFFERENTES ESPECES DE CO ₂ EN FONCTION DU PH.....	50
FIGURE 17 : CYCLE BIOGEOCHIMIQUE DU CARBONE.....	51
FIGURE 18 : VOIES ALTERNATIVES DE FIXATION AUTOTROPHE DU CO ₂	54
FIGURE 19 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE SIMPLIFIEE DU CATABOLISME ENERGETIQUE AEROBIE	55
FIGURE 20 : VOIES DE LA METHANOGENESE	58
FIGURE 21 : VOIES D'OXYDATION DU CH ₄ EN CO ₂ AVEC ASSIMILATION DU FORMALDEHYDE	59
FIGURE 22 : DIAGRAMME DE POURBAIX DU FER EN SOLUTION AQUEUSE	62
FIGURE 23 : CYCLE BIOGEOCHIMIQUE DU FER.....	63
FIGURE 24 : EXEMPLE DES DIFFERENTS MECANISMES MIS EN PLACE POUR LA REDUCTION DE FER(III)	66
FIGURE 25 : PRINCIPAUX PROCESSUS DU CYCLE DE L'AZOTE	67
FIGURE 26 : CYCLE BIOGEOCHIMIQUE DU SOUFRE.....	71
FIGURE 27 : VOIE SIMPLIFIEE DE LA SULFATO-REDUCTION	72
FIGURE 28 : SCHEMA DES DEUX VOIES D'OXYDATION DU SOUFRE	74
FIGURE 29 : ILLUSTRATION SCHEMATIQUE D'UN DIAGRAMME ENERGETIQUE POUR LES REACTIONS ANODIQUES ET CATHODIQUES REALISEES SUR LES SURFACES D'UNE CHEMINEE	79
FIGURE 30 : DEMONSTRATION DE LA CONDUCTIVITE ELECTRIQUE D'UNE CHEMINEE HYDROTHERMALE	79
FIGURE 31 : SCHEMA DES MECANISMES DE RESISTANCES AUX METAUX IDENTIFIES CHEZ LES MICRO-ORGANISMES	84
FIGURE 32 : SCHEMAS DE DEUX MODULES DE COLONISATIONS MICROBIENNES.....	87
FIGURE 33 : METABOLISME GENERAL DES <i>THERMOCOCCALES</i>	95
FIGURE 34 : REPRESENTATION DU CHANGEMENT D'ETAT REDOX DU REGULATEUR TRANSCRIPTIONNEL SURR	97
FIGURE 35 : CLUSTERS RESPONSABLES DU METABOLISME DU CO CHEZ LES <i>THERMOCOCCALES</i>	98
FIGURE 36 : METABOLISME DES NUCLEOSIDES CHEZ LES <i>THERMOCOCCALES</i>	100
FIGURE 37 : LOCALISATION GEOGRAPHIQUE DES TROIS CHAMPS HYDROTHERMAUX ETUDIES.....	105
FIGURE 38 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MONT ACTIF DU CHAMP HYDROTHERMAL DE TAG.....	107
FIGURE 39 : CARTE GEOLOGIQUE DU CHAMP HYDROTHERMAL DE SNAKE PIT.....	108
FIGURE 40 : LOCALISATION DES SITES HYDROTHERMAUX ETUDIES DEPUIS 2010 SUR LE CHAMP LUCKY STRIKE	110
FIGURE 41 : EXEMPLE DE L'ECHANTILLONNAGE D'UNE CHEMINEE HYDROTHERMALE	111
FIGURE 42 : PHOTOGRAPHIES DE PRELEVEMENT DE FLUIDE HYDROTHERMAL	113
FIGURE 43 : SCHEMA REPRESENTANT LE BIOREACTEUR GAS-LIFT ET SES EQUIPEMENTS.....	116
FIGURE 44 : PHOTOGRAPHIES DES DEUX BIOREACTEURS UTILISES POUR LES DEUX CULTURES EN CONTINU	117
FIGURE 45 : REACTEUR DE PREPARATION DU MILIEU	120
FIGURE 46 : MATERIELS UTILISES POUR LES INCUBATIONS HAUTES PRESSIONS/ HAUTES TEMPERATURES	121
FIGURE 47 : PHOTOGRAPHIE DE L'INCUBATION SNB_2018.....	123
FIGURE 48 : SCHEMA DE LA COMPOSITION D'UN DIFFRACTOMETRE	125
FIGURE 49 : SECTION POLIE PRETE A ETRE METALLISEE DANS LE METALISEUR	126
FIGURE 50 : SCHEMA DE LA COLONNE OPTIQUE D'UN MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE	127
FIGURE 51 : EXEMPLE D'UN SPECTROGRAMME OBTENU AVEC LE LOGICIEL AZTEC	128
FIGURE 52 : SCHEMA SYNTHETIQUE DES DIFFERENTES ETAPES DE L'ANALYSE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	129

FIGURE 53 : PRINCIPE DU SEQUENÇAGE ILLUMINA	133
FIGURE 54 : ORGANIGRAMME DU TRAITEMENT DES DONNEES DE SEQUENÇAGE	135
FIGURE 55 : SCHEMA DES DIFFERENTES ETAPES D'UNE ANALYSE EN CHROMATOGRAPHIE IONIQUE.....	137
FIGURE 56 : MISE AU POINT DE LA COLLECTION DE FORMATE RADIOMARQUES	140
FIGURE 57 : COMPARAISON DES DIVERSITES ARCHEENNES DES ECHANTILLONS BRUTS	147
FIGURE 58 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DE L'ABONDANCE RELATIVE DES 201 OTUS	150
FIGURE 59 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DE LA DIVERSITE ARCHEENNE	152
FIGURE 60 : ANALYSE DU POSITIONNEMENT MULTIDIMENSIONNEL NON METRIQUE DES ECHANTILLONS	157
FIGURE 61 : EFFECTS OF DIFFERENT PARAMETERS ON THE PRODUCTION OF FORMATE IN <i>T. ONNURINEUS</i> NA1	164
FIGURE 62 : PHYLOGENETIC POSITION OF <i>THERMOCOCCALES</i> MAKING H ₂ -DEPENDANT FORMATE PRODUCTION	166
FIGURE 63 : <i>THERMOCOCCALES</i> FORMATE PRODUCERS PRESENT TWO DIFFERENT CLUSTERS.....	167
FIGURE 64 : EFFECT HYDROGEN PARTIAL PRESSURES ON FORMATE CONCENTRATION.	169
FIGURE 65 : CONCENTRATIONS OF FORMATE AND ACETATE IN HYDROTHERMAL FLUID INOCULATED WITH <i>T. ONNURINEUS</i>	171
FIGURE 66 : EFFECTS OF H ₂ ON GROWTH OF TWO STRAINS OF <i>THERMOCOCCUS BAROPHILUS</i> (MP ^T AND CH5).....	172
FIGURE 67 : CINETIQUES DE PRODUCTION DE FORMATE ET D'ACETATE CHEZ PLUSIEURS <i>THERMOCOCCUS</i>	175
FIGURE 68 : EFFET DE LA PRESSION HYDROSTATIQUE SUR LA PRODUCTION DE FORMATE.....	177
FIGURE 69 : EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LA PRODUCTION DE FORMATE.....	178
FIGURE 70 : SCHEMA DU PRINCIPE DE COCULTURE ENTRE DEUX ESPÈCES SANS CONTACT DIRECT.....	182
FIGURE 71 : MESURE D'INCORPORATION DE CARBONE 14 CHEZ LES <i>THERMOCOCCALES</i>	184
FIGURE 72 : COMPARAISON DES DEUX CLUSTERS FDH-MFH-MNH ET FDH-GLT IDENTIFIES CHEZ <i>T. ONNURINEUS</i> NA1	195
FIGURE 73 : COMPARAISON DE CLUSTER DE GENES DE <i>T. ONNURINEUS</i> NA1 ET DE <i>THERMOFILUM PENDENS</i>	199
TABLEAU 1 : COMPOSITION DES FLUIDES HYDROTHERMAUX EN SORTIE D'EVENT	29
TABLEAU 2 : TERMINOLOGIE DES DIFFERENTS TYPES TROPHIQUES DES MICRO-ORGANISMES	49
TABLEAU 3 : REACTIONS REDOX COMMUNEMENT ASSOCIEES AUX ECOSYSTEMES HYDROTHERMAUX	49
TABLEAU 4 : PRINCIPAUX MINERAUX DE FER RETROUVES EN CONTEXTE HYDROTHERMAL	63
TABLEAU 5 : DEGRE D'OXYDATION DU SOUFRE INORGANIQUE.....	70
TABLEAU 6 : DETAILS DU PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS SOLIDES.....	112
TABLEAU 7 : RECAPITULATIF DES DIFFERENTES CULTURES EN CONTINU.....	118
TABLEAU 8 : AMORCES DE PCR CIBLANT LES GENES CODANT POUR L'ARNR16S	131
TABLEAU 9 : RECAPITULATIF DES ECHANTILLONS ANALYSES DANS LE CADRE DE CETTE ETUDE.....	145
TABLEAU 10 : RECAPITULATIF DES 5 INCUBATIONS.....	145
TABLEAU 11 : COMPOSITION MINERALOGIQUE DES ECHANTILLONS BRUTS	146

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'océan profond malgré son importance (80 % du volume de la biosphère marine) reste l'un des environnements les moins bien connus de la planète. La découverte de l'existence d'une biocénose originale associée aux sources hydrothermales profondes en 1979 figure parmi les découvertes scientifiques contemporaines les plus marquantes (Corliss et al., 1979). Elle a changé la vision de l'océan profond (> 1000 m de profondeur) longtemps considéré comme un biotope pauvre et limité en biomasse par ses conditions particulières comme par exemple les faibles températures, les fortes pressions hydrostatiques ou encore l'absence de lumière du soleil.

Depuis cette découverte, près de sept cents champs hydrothermaux ont été détectés le long des dorsales océaniques (où l'activité tectonique et volcanique est importante), des arcs volcaniques et des bassins d'arrière arcs en arrière des zones de subduction (Beaulieu et al., 2015). Ils sont caractérisés par l'émission de fluides hydrothermaux à des températures pouvant dépasser 400 °C. Le refroidissement de ces fluides lors de leur émergence sur le plancher océanique induit une saturation et la précipitation de minéraux lors du mélange des fluides hydrothermaux (surchauffés et réduits) avec l'eau de mer (froide et oxygène) (Hannington et al., 1995; Tivey, 2007). Au fil du temps, les édifices hydrothermaux s'accumulent pour former des amas de sulfures massifs. La précipitation de minéraux dans le panache hydrothermal disperse également les éléments chimiques dans la colonne d'eau sur plusieurs dizaines de km autour des sources hydrothermales. Les sources hydrothermales forment des écosystèmes complexes en abritant souvent une biocénose endémique qui a comme particularité d'avoir à la base de sa chaîne trophique une production primaire chimiotrophe basée sur les éléments chimiques dissous dans les fluides hydrothermaux et assurée par des micro-organismes chimio-synthétiques (Jannasch & Wirsén, 1979). Les dépôts de sulfures massifs actifs sont très hétérogènes et dynamiques caractérisés par des gradients physico-chimiques très marqués à l'échelle du cm au mm (par exemple : pH, température, salinité) et par une diversité d'associations minéralogiques complexes, engendrant une multitude de microenvironnements favorables au développement d'une riche diversité de bactéries et archées possédant des voies métaboliques spécifiques (Amend & Shock, 2001; McCollom & Shock, 1997). Les cheminées hydrothermales sont ainsi des zones d'interactions entre la géosphère comprenant le fluide et les minéraux environnants (partie abiotique) et les micro-organismes de la biosphère (partie biotique) qui permettent par la suite le développement et le maintien de la macrofaune de ces environnements dans des conditions qualifiées d'extrêmes.

L'objectif général de ce travail de thèse est d'identifier et caractériser fonctionnellement les

communautés microbiennes en interaction avec les minéralisations hydrothermales. En effet, bien que la diversité microbienne associée aux édifices hydrothermaux commence à être relativement bien décrite grâce aux approches culturales et moléculaires, l'organisation, le fonctionnement et les interactions de ces communautés avec la géosphère restent mal définis principalement en raison des contraintes expérimentales imposées par ces environnements d'étude complexes et difficiles d'accès. Ainsi, la réalisation de ce projet permettra de répondre spécifiquement aux questions suivantes :

- Quels sont les micro-organismes/communautés impliqués dans les différentes étapes de la colonisation et dans les interactions avec les structures minérales hydrothermales actives ?
- Quelles sont les fonctions métaboliques associées aux micro-organismes/communautés impliqués dans ces interactions micro-organisme/minéral ?
- Quelles est la capacité de résilience de ces communautés microbiennes (hyper)thermophiles dans une niche écologique ayant perdu son activité ?

Pour répondre à ces questions, des approches innovantes de colonisation *ex situ* de substrats naturelles de sulfures massifs ont été privilégiés grâce à des incubations de ces substrats en bioréacteur Gas-lift inoculés à partir d'échantillons de cheminées et de fluides hydrothermaux. L'utilisation de culture en continu permet un contrôle des conditions biotiques et abiotiques des incubations. Dans ce cadre, les travaux se sont principalement concentrés sur l'étude de la diversité et de la structure des communautés présentes dans la fraction liquide et de celles associées aux substrats de sulfures massifs.

Ce mémoire de thèse s'organise en 5 chapitres. Le chapitre premier du manuscrit est consacré à introduire le contexte de l'étude, à travers la présentation dans un premier temps, des différents compartiments de cet écosystème (d'un côté le contexte géologique et de l'autre les micro-organismes et leurs implications dans les grands cycles biogéochimiques) puis une présentation des différentes formes d'interactions géosphère-biosphère. Enfin un focus est fait sur l'ordre des *Thermococcales*, acteur important de ces écosystèmes et modèle de notre étude. La présentation des matériels et méthodes utilisés au cours de ce travail de thèse fera suite à la revue bibliographique dans un deuxième chapitre. Dans le chapitre III, les résultats de l'étude de cultures en continu de communautés microbiennes hyperthermophiles des environnements hydrothermaux seront présentés sous la forme d'un article. Puis le chapitre IV sera consacré à présenter un nouveau mécanisme de tolérance à l'H₂ chez les *Thermococcales*. Ce chapitre sera présenté sous la forme d'un article suivi d'une partie dans laquelle des données complémentaires seront exposées. Enfin, le chapitre V propose une discussion des résultats obtenus au cours de cette thèse ainsi que des perspectives pour la suite de ce projet.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE **BIBLIOGRAPHIQUE**

1.1. Les systèmes hydrothermaux : Généralités autour des sources hydrothermales profondes

1.1.1 Principe de l'hydrothermalisme

Les sources hydrothermales profondes localisées au niveau des dorsales océaniques, c'est-à-dire au niveau des frontières des plaques tectoniques, sont l'une des conséquences visibles d'un phénomène plus global : la tectonique des plaques (FIGURE 1) qui induit une forte activité tectonique et volcanique au niveau des frontières divergentes (dorsales) et convergentes (arcs et bassins arrière-arc).

Pour bien comprendre ce phénomène, il faut avoir une vision élargie à l'échelle planétaire. La Terre se divise en trois grandes parties. Au centre se trouve le noyau constitué d'une partie solide (le noyau interne) et d'une partie liquide (le noyau externe). Le noyau est recouvert par le manteau également divisé en deux parties : le manteau inférieur et le manteau supérieur. La partie superficielle est la croûte terrestre (composée des plaques lithosphériques continentales et océaniques) qui constitue une fine couche recouvrant le manteau (quelques dizaines de km). Depuis le centre de la Terre, la chaleur qui provient principalement de la collision des astéroïdes lors de sa formation mais également de la désintégration radioactive d'éléments chimiques (comme le potassium 40 , l'uranium 238 et le thorium 232), est évacuée vers la périphérie. Pour cela deux mécanismes sont mis en place : la conduction thermique et la convection mantellique. Cette dernière est le moteur de la tectonique des plaques (McKenzie & Parker, 1967).

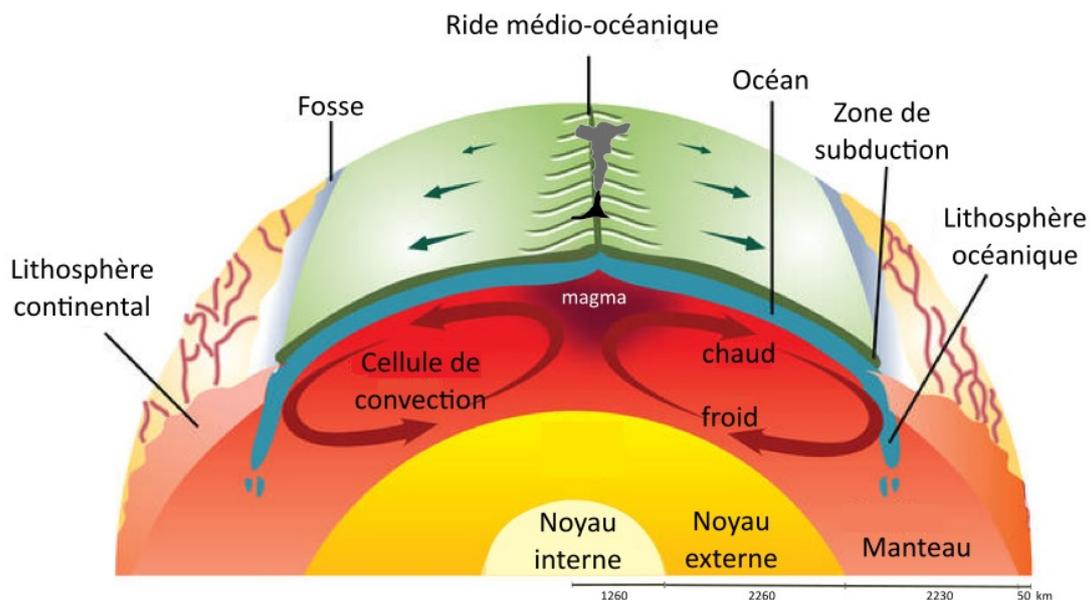


Figure 1 : Principe général de la tectonique des plaques. Modifiée d'après <https://www.ck12.org/>.

Les croûtes continentales et océaniques dérivent à la surface du manteau, elles représentent la partie haute des cellules de convections. Les plaques continentales plus légères restent perpétuellement en mouvement à la surface tandis que les plaques océaniques, qui sont plus denses, se renouvellent selon le modèle de l'expansion océanique proposé par Hess en 1962 (Hess et al., 1962; Vine & Matthews, 1963). Le principe général est le suivant : une nouvelle croûte océanique se forme au niveau des rifts par la remontée et la décompression de roches mantelliques plus chaudes et plus légères. La croûte nouvellement formée migre ensuite de part et d'autre du rift à des vitesses allant de 1 à 18 cm par an. Durant sa migration, la croûte océanique se refroidit et s'approfondit progressivement. Puis lorsqu'elle atteint les zones de subduction (marges actives) elle s'enfonce de nouveau dans le manteau au niveau des branches descendantes des cellules de convection. Le volcanisme sous-marin est le système volcanique le plus important de la planète (73 % de l'activité volcanique totale (Perfit & Davidson, 2000)).

Les dorsales océaniques peuvent être classées en fonction de leurs vitesses d'accrétion, trois modèles sont retrouvés (FIGURE 2) (Fouquet et al., 2013; Macdonald, 1983) :

- Les dorsales rapides et ultrarapides (vitesse d'expansion entre 8 et 14 cm/an et > à 14 cm/an respectivement) caractérisées par une forte activité volcanique permanente et la présence d'une ride volcanique régulière haute de quelques centaines de m et surmontée d'un graben axial inférieur à 1 km de large et 100 m de profondeur (par exemple : la dorsale Est Pacifique, East Pacific Ridge EPR). Elles représentent 25 % des dorsales. Dans les portions les plus rapides la chambre magmatique située à moins de 3 km de profondeur est quasi permanente et continue le long de la ride.
- Les dorsales intermédiaires (environ 5,5 à 8 cm/an) représentent 15 % des dorsales. Leur morphologie est intermédiaire entre celle des dorsales rapides et lentes, avec une vallée axiale peu marquée et peu profonde (Beaulieu et al., 2015).
- Les dorsales lentes et ultra-lentes (taux d'expansion entre 2 et 5,5 cm/an et < 2 cm/an respectivement) sont caractérisées par une activité tectonique importante qui marque la dorsale par de nombreuses segmentations (failles) limitant une vallée axiale profonde de 10 à 20 km de large en moyenne (par exemple : la dorsale Atlantique, MAR). La présence d'une chambre magmatique est épisodique. Elles représentent 60 % des dorsales.

La croûte océanique nouvellement formée se refroidit progressivement au contact de l'eau de mer et se rétracte générant de multiples discontinuités et anfractuosités dans lesquelles l'eau de mer froide et dense s'infiltré (FIGURE 3). Ces failles s'additionnent à celles liées à l'ouverture océanique. La zone dans

laquelle l'eau de mer pénètre la croûte océanique est appelée zone de recharge et s'étend sur plusieurs dizaines de km² (Alt, 1995). Au fur et à mesure de sa descente dans la croûte, l'eau de mer se réchauffe et réagit avec les roches jusqu'à devenir du fluide hydrothermal. C'est au niveau de la zone de « réaction hydrothermale » dans la partie profonde des convections hydrothermales et à proximité des chambres magmatique (1200 °C) que les réactions et les échanges chimiques sont les plus intenses. L'eau de mer va progressivement se décharger en dioxygène puis aux alentours de 150 °C en calcium et en sulfate qui précipitent sous forme d'anhydrite (CaSO₄).

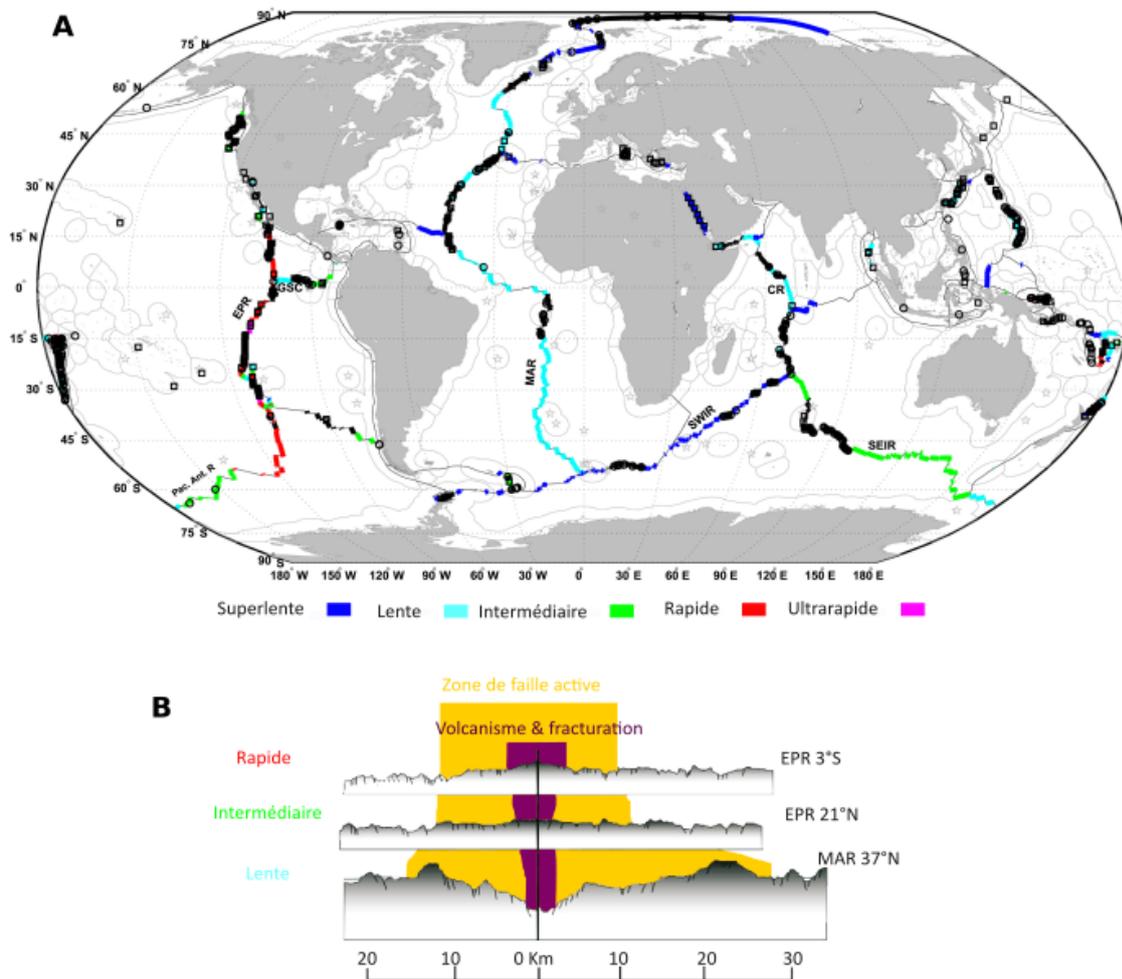


Figure 2 : Localisation des sites hydrothermaux identifiés le long des dorsales océaniques et classée selon la vitesse d'expansion de la dorsale : ultralente (< 20 mm an⁻¹), lente (20-55 mm an⁻¹), intermédiaire (55-80 mm an⁻¹), rapide (80-140 mm an⁻¹) ou ultrarapide (> 140 mm an⁻¹). Les couleurs indiquent les zones encore non explorées. Les Zones Economiques Exclusives sont délimitées par des bordures gris clair. Abréviations: CR, Carlsberg Ridge; EPR, East Pacific Rise; GSC, Galápagos Spreading Center; MAR, Mid-Atlantic Ridge; Pac. Ant. R., Pacific Antarctic Ridge; SEIR, Southeast Indian Ridge; SWIR, Southwest Indian Ridge. Modifiée d'après (Beaulieu et al., 2015). B : Profils transversaux de la zone d'expansion des dorsales océaniques. Modifiée d'après (Kelley et al., 2002; Roussel, 2008).

La faible profondeur des chambres magmatiques (≈ 3 km) induit de forts gradients de températures (plusieurs centaines de $^{\circ}\text{C}$ par km). Les températures élevées combinées aux fortes pressions hydrostatiques, accroissent considérablement le pouvoir de solubilisation de l'eau qui se traduit par un lessivage des roches. Les fluides s'enrichissent en de nombreux éléments chimiques réduits et anoxiques principalement en ions métalliques (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}), en soufre S^{-} et en gaz dissous (CO_2 , CH_4 , H_2 et H_2S) (Charlou et al., 2002; Kelley et al., 2002).

Le résultat des réactions dans les zones profondes est un fluide chaud, réduit, acide et moins dense que l'eau de mer. Ce fluide qui forme la branche ascendante de la cellule de convection, remonte à grande vitesse et de manière adiabatique (sans perte de température) le long des failles et est expulsé sur le plancher océanique au niveau des événements hydrothermaux dans la zone de décharge. L'hydrothermalisme se rapporte ainsi à l'ensemble des réactions chimiques mises en jeu lors de l'interaction entre des roches encaissantes et des fluides circulants de hautes températures. La circulation hydrothermale, est un des moteurs de refroidissement de la croûte océanique et joue un rôle fondamental dans le transfert de masse et d'énergie depuis le manteau jusque dans l'océan (Alt, 1995). Elle influence la composition de l'eau de mer et de la croûte océanique aussi bien en servant de piège pour des éléments comme le magnésium (participation jusqu'à 80 % de la perte de Mg des océans (Elderfield & Schultz, 1996; Mottl & Wheat, 1994) ou de source pour d'autres éléments tels que les métaux ou le calcium (20 % des apports de Ca) (Berner & Berner, 2012; Zhu & Macdougall, 1998).

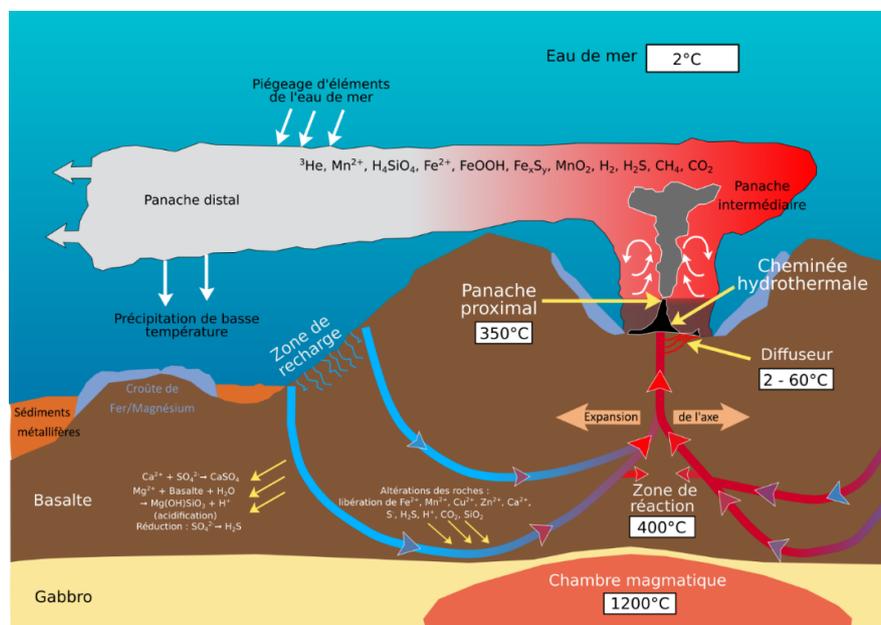


Figure 3 : Principe de la circulation hydrothermale océanique au niveau d'une dorsale et caractéristiques physico-chimiques des fluides produits. Modifiée d'après <https://oceanexplorer.noaa.gov/>.

1.1.2 Historique de la découverte des sources hydrothermales profondes

La découverte en 1979 d'émission de fluide hydrothermal de température supérieure à 300 °C était inattendue. Cependant l'existence d'une circulation hydrothermale dans la croûte océanique au niveau des centres d'expansion avait déjà été supposée quelques années auparavant (Elder, 1965; Lister, 1972). De nombreux éléments venaient renforcer cette hypothèse comme les profils de flux thermiques dans les sédiments à l'approche des dorsales. En particulier la différence entre le flux conductif théorique et les flux de chaleur mesurés à l'approche des dorsales, était expliquée par une forte composante d'extraction de chaleur par des convections hydrothermales (Wolery & Sleep, 1976). L'existence de sédiments métallifères associés à des anomalies de température (70 °C) et de salinité dans une fosse de la mer Rouge (Bruneau et al., 1953) laissaient également présager de l'existence de circulation de fluides de haute température sur les dorsales.

Le projet franco-américain FAMOUS (French American Mid Ocean Undersay Survey) initié en 1971, peut être considéré comme un acte fondateur de l'exploration des dorsales océaniques et de la démonstration de la théorie de la tectonique des plaques. Ce projet avait pour objectif d'explorer une portion bien définie de la dorsale atlantique au sud des Açores par 2800 m de profondeur à l'aide de trois engins d'exploration (Archimède, Cyana (FIGURE 4A) et Alvin). Une des découvertes majeures de cette campagne est celle de l'existence d'activité hydrothermale fossile au niveau d'une dorsale sous la forme de dépôts hydrothermaux de basse température (Ballard et al., 1975; Scott et al., 1974). Cette campagne a montré la nécessité d'une préparation minutieuse préalable avec une étude de haute résolution des fonds marins, suivie d'une observation directe à l'aide d'engins submersibles. Cependant malgré les efforts déployés aucune activité hydrothermale de haute température n'a été détectée sur la ride médio-Atlantique. Il a donc été décidé d'aller explorer une dorsale plus active avec une vitesse d'expansion plus rapide, la dorsale est pacifique (EPR) au large du Mexique. Le projet RITA, du nom des zones de fractures Ribera et Tamayo encadrant la zone explorée, est lancé (Francheteau et al. 1980). En parallèle en 1977, la première source hydrothermale active (avec une température de 15 °C) avec une faune associée est découverte près de Galápagos (Corliss et al., 1979) (FIGURE 4B). La présence d'un écosystème à cet endroit n'avait alors jamais été soupçonnée. Puis au cours de la campagne CYAMEX, les premières cheminées hydrothermales inactives constituées de sulfures métalliques sont découvertes en 1977 (Francheteau et al. 1979) sur la ride Est-pacifique. Ce n'est que l'année suivante en 1978 à proximité du même site que fut observé pour la première fois des fumeurs noirs actifs émettant des fluides de hautes températures (350 °C) (FIGURE 4c) (Macdonald et al., 1980; Spiess et al., 1980).

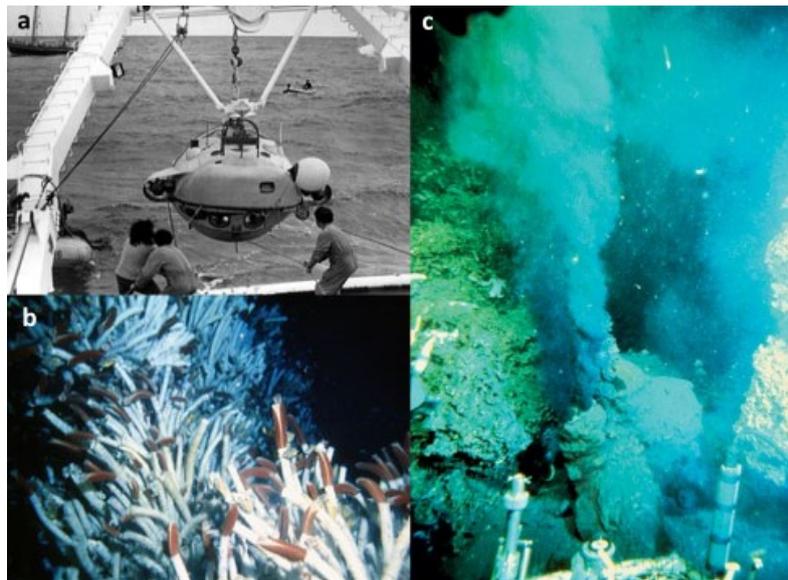


Figure 4 : Photographies emblématiques de la découverte des sources hydrothermales. a : Le submersible français Cyana durant la campagne FAMOUS (©Ifremer) ; b : Photographie d'un champ de *Riftia pachyptilla* au niveau du site « Rose Garden » situé sur la ride des Galápagos en 1979 (©K. Crane, WHOI) ; c : Première photographie d'un fumeur noir actif prise en 1979 sur le site 21°N sur la dorsale EPR (©D. Foster, WHOI).

Les années qui suivirent, permirent de mesurer l'importance de ce phénomène à l'échelle de la planète avec la découverte du premier site hydrothermal actif au niveau d'une dorsale lente (le site de Trans-Atlantic Geotraverse (TAG) sur la ride médio-Atlantique (Rona et al., 1986)), puis au niveau des bassins arrière-arc (Fouquet et al., 1993); en intégrant désormais des biologistes pour l'étude des organismes, acteurs à part entière de ces écosystèmes.

1.1.3 Évolutions technologiques associées

L'exploration des fonds océaniques qui nécessite d'avoir une approche multi-échelle et pluridisciplinaire n'aurait pas été permise sans des évolutions technologiques continues. Parmi celles-ci l'amélioration de la cartographie du positionnement et de l'accessibilité ont été des éléments majeurs. Le besoin de disposer d'une cartographie précise du fond de la mer est apparu avec les premières lignes télégraphiques intercontinentales au milieu du 19^{ème} siècle. C'est dans le cadre de la pose de câble télégraphique que la dorsale médio-Atlantique a été découverte. Le premier système de mesure de profondeur est la ligne de chanvre avec un plomb de sonde. Cette approche est rudimentaire et source de nombreuses erreurs. Il faut attendre l'invention du sondeur bathymétrique électro-acoustique par Fessendel pour obtenir des données plus précises. Il s'agit de déduire la profondeur de la mesure du temps écoulé entre l'émission d'un son en surface jusqu'à sa réception après réflexion sur le fond. La bathymétrie devint un enjeu essentiel de la seconde guerre mondiale ce qui permit une amélioration des systèmes. A partir de 1978 l'utilisation des sondeurs multifaisceaux à des fins scientifiques permet

en plus de la bathymétrie d'avoir une mesure de la réflectivité pour déterminer la nature du fond et donc de préciser les différents types d'habitats.

Le développement des engins sous-marins civils marqua une nouvelle étape et ces derniers devinrent rapidement des outils indispensables aux explorations. Le premier engin notable fut la bathysphère de Otis Barton descendue à l'aide d'un câble qui réalisa une plongée jusqu'à 923 m de profondeur en 1930. Les premiers engins autonomes furent le Bathyscaphe FNRS2 inventé par Auguste Piccard suivi par le FNRS3, le Trieste ou encore l'Archimède. En 1960, le Trieste plongea à 10 916 m dans la fosse des Mariannes ce qui constitua le record de la plongée la plus profonde.

Par la suite, les bathyscaphes furent remplacés par des sous-marins plus opérationnels (manœuvrabilité, outils embarqués, ...) comme le sous-marin américain Alvin (1964) ou le français Cyana (1969) puis son successeur Nautile (1984) (FIGURE 5). Outre ces deux pays pionniers de l'exploration, trois autres pays disposent également d'engins sous-marins habités, la Russie avec Mir 1 (1987), le Japon avec le Shinkai 6500 (1989) et la Chine avec le Jiaolong (2010). Le développement des engins téléopérés a permis l'arrivée de nouveaux acteurs comme l'Allemagne, la Chine, la Corée du Sud ou encore l'Angleterre. Les petits robots sous-marins contrôlés à distance à l'aide d'un câble, les ROVs (Remotely operated vehicle) comme le Victor 6000 apportent de nouvelles possibilités en compléments des engins habités (FIGURE 5). Depuis quelques années les sous-marins autonomes AUV (pour Autonomous Underwater Vehicle) apportent des données essentielles (bathymétrie de très haute résolution) pour l'exploration et la préparation des plongées d'échantillonnage.

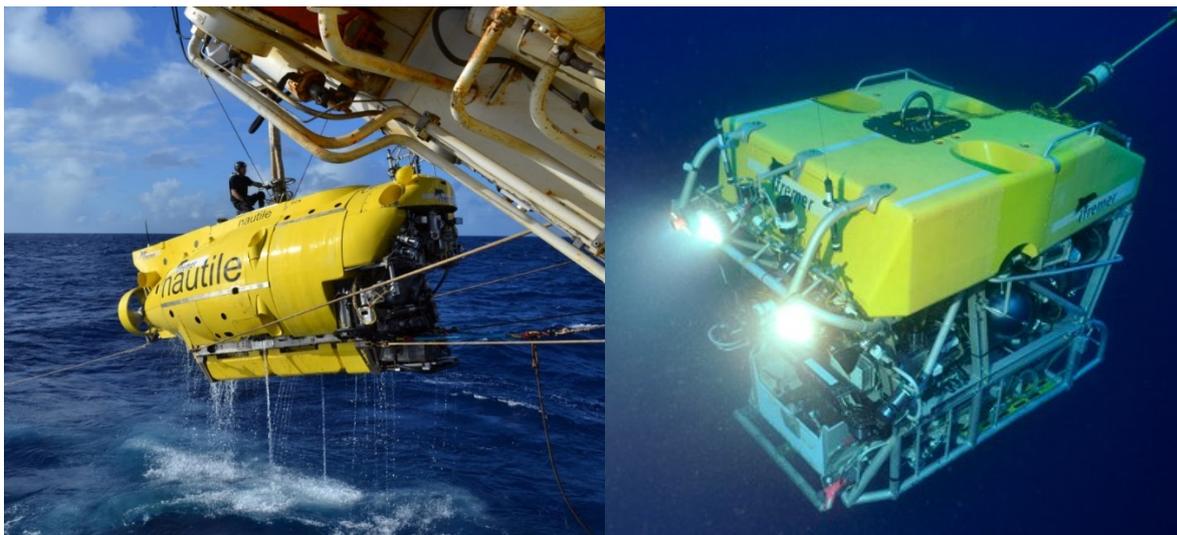


Figure 5 : Photographies du sous-marin français Nautile à gauche (© L. Pasquelins, Ifremer) et du ROV Victor 6000 à droite (©O. Dugornay, Ifremer).

1.1.4 Enjeux autour des ressources minérales

Depuis quelques années, les minéralisations hydrothermales profondes font l'objet de nombreux enjeux économiques et technologiques dans un contexte mondial de fortes tensions sur l'accessibilité et la disponibilité des métaux. Le besoin en ressources minérales ne cesse d'augmenter du fait du développement de l'économie mondiale. L'enjeu économique principal porte sur des ressources minérales associées aux dépôts polymétalliques hydrothermaux inactifs. Ces ressources pourraient permettre de diversifier les sources d'approvisionnement en métaux dans un contexte où les ressources continentales s'amenuisent (appauvrissement de la teneur, tonnage, dépendance de pays à risque ...).

L'enjeu géopolitique est important pour déterminer à qui appartiennent ces ressources. C'est la raison pour laquelle l'Autorité Internationale des Fonds Marins (AIFM) a été créée pour mettre en place un cadre légal autour de toute activité concernant les grands fonds marins, déclarés bien commun de l'humanité par l'Organisation des Nations Unies. Ainsi toute exploration de sulfures polymétalliques dans les eaux internationales par une nation ou une entreprise privée nécessite l'obtention d'un permis délivré par l'AIFM. A ce jour, 7 permis ont été attribués sur les sulfures hydrothermaux (Allemagne, Chine, Corée du Sud, France, Inde, Pologne et Russie) pour une durée de 15 années. La zone du permis sulfures accordée à la France est localisée sur la ride médio-atlantique, elle se compose de 100 blocs regroupés en 6 grappes de 5 à 25 blocs pour une superficie totale de 10 000 km² (FIGURE 6). Les amas sulfurés les plus importants sont localisés au niveau des dorsales lentes. Les nations conservent tout de même un contrôle total au niveau de leurs Zones Economiques Exclusives (ZEE). La France (≈ 11 millions de km²) possède la deuxième superficie la plus importante après les Etats-Unis.

Les enjeux environnementaux liés aux conséquences d'une exploitation des ressources minérales et énergétiques sont considérables. Le fonctionnement des sources hydrothermales et leurs rôles sur les grands cycles biogéochimiques ne sont pas encore bien définis. De plus elles forment un écosystème fragile et encore mal connu malgré les importants moyens déployés depuis leurs découvertes. C'est la raison pour laquelle il est nécessaire de comprendre leur fonctionnement avant de réaliser des études d'impacts de toute exploitation sur la faune et la flore pour assurer un équilibre entre préservation et exploitation. Enfin, l'apport de l'étude des organismes et micro-organismes de ces environnements est remarquable autant sur le plan fondamental (origine de la vie, diversité phylogénétique du vivant, ...) qu'appliqué (recherche de nouvelles molécules d'intérêt médical, ...).

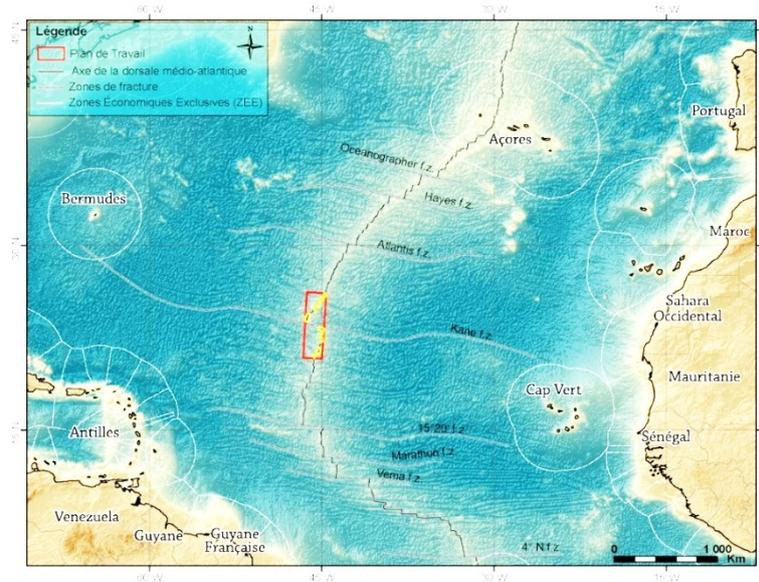


Figure 6 : Emplacement du permis Atlantique accordé par l’autorité internationale des fonds marins à la France, et confié à l’IFREMER, pour explorer les sulfures massifs polymétalliques. Les cases jaunes correspondent aux 100 blocs du permis. (©Ifremer).

1.1.5 Différents contextes géologiques et géochimiques des fluides sur les dorsales

Sur les dorsales lentes, les deux grands types de roches dans lesquelles se font les échanges hydrothermaux sont les laves basaltiques de la croûte océanique et les roches ultrabasiques du manteau. Néanmoins même au sein d’un même site, chaque cheminée hydrothermale peut être originale de par la composition géochimique des fluides émis, de leur degré et mode de mélange avec l’eau de mer et des associations minéralogiques rencontrées (TABLEAU 1). Les principaux paramètres contrôlant la géochimie des fluides sont les valeurs du couple température et pression rencontrées par le fluide au cours de son parcours sous le plancher océanique, de la nature et du degré d’altération des roches traversées et de son niveau de dilution avec l’eau de mer.

- **Basaltiques (mafiques)**

Lorsque le substratum est principalement constitué de croûte océanique volcanique (dont le composant majoritaire est le basalte), le site hydrothermal est qualifié de basaltique. Les laves extrusives (coulées, laves en coussins, lacs de lave) sur le plancher océanique et celles du complexe filonien sous-jacent (mesurant 1 à 2 km d’épaisseur) sont constituées de basalte. Cette couche repose sur une couche de gabbros générés par la cristallisation en profondeur du magma basaltique dans la chambre magmatique.

La limite entre la lithosphère et le manteau supérieur (composé de péridotites) est marquée par une discontinuité sismique appelée discontinuité de Mohorovicic, abrégée *Moho*. L'acidité du fluide provient de la réaction entre le magnésium de l'eau de mer et la silice composant les roches basaltiques qui produisent une chlorite d'altération en libérant une quantité importante d'ion H^+ . Les réactions d'albitisations (piégeage du Na et libération de Ca par remplacements des plagioclases calciques primaires par de l'albite secondaire) conduisent à une perte en sodium et un gain en calcium dans les fluides (Tivey, 2007). Les fluides sont souvent enrichis en métaux dissous comme le Fe, Zn, Mn ainsi qu'en gaz $H_2S/CH_4/CO_2$ (Charlou et al., 2002; Kelley et al., 2002).

- **Ultramaïfiques**

Cependant dans quelques cas, situés sur les dorsales lentes, l'activité hydrothermale repose sur un affleurement de péridotite généré par exhumation des roches du manteau, le site est alors qualifié d'ultramaïfique ou ultrabasique. La composition des fluides des sites ultramaïfiques peut être très différente de celle des sites basaltiques (TABLEAU 1) (Charlou et al., 2002). L'interaction du fluide hydrothermal avec les roches ultramaïfiques libère de fortes concentrations en CH_4 , en CO_2 et en H_2 (Barnes et al., 1967; Charlou et al., 2002; Klein et al., 2013). Dans ces systèmes, la réaction de serpentinisation représente le processus dominant de production d' H_2 . Cette production d' H_2 est alors dépendante de nombreux facteurs comme le couple pression/température, la composition chimique de la roche de départ ou encore le rapport massique eau/roche. Les minéraux magmatiques ferromagnésiens de la péridotite comme l'olivine et le pyroxène lors de leur remontée à la surface s'hydratent progressivement pour former de nouveaux minéraux du groupe des serpentines, engendrant une production d' H_2 . La réaction générale peut être représentée sous la forme :

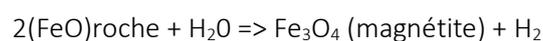


Tableau 1 : Composition des fluides hydrothermaux en sortie d'évent le long de la dorsale médio-Atlantique. (Charlou et al., 2002).

	Eau de mer	Logatchev (14°45'N)	Snake Pit (23°N)	TAG (26°N)	Broken spur (29°N)	Rainbow (36°14'N)	Lucky strike (37°17'N)	Menez Gwen (37°50'N)
Profondeur (m)		3000	3460	3670	3200/3300	2300	1700	850
Temp. (°C)	2	347/352	335/350	321/290	356-364	365	170/364	275/284
pH	7,8	3,3	3,9/3,7	3,1	-	2,8	3,5/3,7	4,2/4,3
Si(OH) ₄ (mM)	< 0,2	8,2	18,2/18,3	22	-	6,9	11,5/16,3	7,7/11,6
Cl (mM)	546	515	559/559	659	469	750	422/533	357/381
Br (mM)	838	818	847	880/1045	749/765	1178	735/924	666/710
SO ₄ (mM)	28,2	0	0	0	0	0	0	0
Na (mM)	464	430	510/509	584	419/422	553	347/446	312/319
Li (mM)	26	245	843/849	411	1006/1033	340	278/357	238/274
K (mM)	9,8	21,9	23,6/23,9	18	18,1/19,6	20,4	21,1/26,7	22,1/23,8
Rb (mM)	1,3	27,7	10,5/10,8	10	13,0/13,6	36,9	22,7/39,1	20,3/29,4
Cs (mM)	2,3	385	177/181	110	139/146	333	200/280	330
Mg (mM)	53	0	0	0	0	0	0	0
Ca (mM)	10,2	27,3	9,9/10,5	26	11,8/12,8	66,6	31,1/38,2	29,7/33,1
Sr (mM)	87	138	50/51	99	42,9/48	200	67/119	100/111
Ba (mM)	0,14	> 4,5	> 4,3	> 19	> 12,9/> 21,3	> 67	10/52	> 12
Fe (mM)	< 0,001	2500	2180/1832	1640	1684/2156	24050	30/863	< 2/18
Mn (mM)	< 0,001	330	491/493	1000	250/260	2250	84/446	59/71
Cu (mM)	0,007	15/50	17/10	150	28,3/69,6	121/162	4/26	0,6/3
Zn (mM)	0,01	25/30	50/47	46	28,3/69,6	115/185	5/57	2,4/4,3
Gaz								
H ₂ S (mM)	0	0,5/0,8	5,9/5,9	6,7	8,5/11,0	1,2	2,5/3,0	< 1,5
CO ₂ (mM)	2,3	10,1	5,2/6,7	2,9/3,4	6,0/7,1	16	13/28	17/20
CH ₄ (mM)	0,0003	2,1	0,023/0,062	0,124/0,147	0,065/0,13	2,5	0,50/0,97	1,35/2,63
CO (nM)	0,3	-	-	-	-	5000	-	-
Ar (μM)	16	12	17/35	20/40	-	-	11/30	11/38
N ₂ (mM)	0,59	3	1,20/3,37	0,90/0,89	-	1,8	0,61/0,97	0,60/1,90
H ₂ (mM)	0,0004	12	0,19/0,48	0,15/0,37	0,43/1,03	16	0,02/0,73	0,024/0,048

Référence : Logatchev (14°45'N): (Charlou et al., 1998; Douville et al., 1999), MARK (23°N): (Campbell et al., 1988; Jean-Baptiste et al., 1991), TAG (26°N): (Campbell et al., 1988; Charlou et al., 1996), Broken Spur: (James et al., 1995; Lein et al., 2000), Rainbow (36°14'N): (Charlou et al., 1998; Douville et al., 1999), Lucky Strike (37°17'N): (Charlou et al., 2000; Von Damm et al., 1998), Menez-Gwen (37°50'N): (Charlou et al., 2000)

Il existe deux types de champs hydrothermaux installés sur un substratum de serpentinite :

- dans le premier cas, le fluide présente des températures très élevées jusqu'à 375 °C et des pH très acides (< 2). Ils sont principalement localisés au niveau des dorsales océaniques à expansion lente comme la dorsale médio-Atlantique, comme par exemple les sites de Rainbow (Fouquet, 1997) ou de Logatchev (Batuev, 1994).

- dans le deuxième cas le fluide est alcalin (pH > 8), de température modérée (40-90 °C) et riche en SO_4^{2-} et Mg^{2+} . A ce jour il n'existe que très peu de sites actifs de ce type : celui de Lost City le premier découvert en 2000 au niveau de la ride médio-Atlantique et situé à 800 m de profondeur (Kelley et al., 2001), celui de Old City découvert en 2016 au niveau de la ride sud-ouest Indienne (Campagne ROVSMOOTH, Pourquoi pas ?, chef de mission : Cannat Mathilde, DOI : 10.17600/16002000) ou encore les sources sous-marines de la Baie de Prony au sud de la Nouvelle-Calédonie situées à moins de 50 m de profondeur. Des sites similaires en perte d'activité avec des fluides diffus n'excédant pas 10 °C ont également été découverts comme Menez Hom ou encore Saldanha au niveau de la ride médio-Atlantique (Barriga et al., 1998; Fouquet & Party, 2001).

1.1.6 Les cheminées hydrothermales : formation et structure

Les zones d'émissions de fluide hydrothermal sont caractérisées par la formation d'édifices hydrothermaux présentant des associations minéralogiques complexes et diverses, résultat de l'interaction entre le fluide chaud et réducteur et l'eau de mer froide et oxydante. En fonction du contexte géologique et de la composition géochimique du fluide, et de la vitesse de sortie des fluides, différentes morphologies sont ainsi retrouvées : les fumeurs noirs, les fumeurs blancs, les diffuseurs et les fumeurs carbonatés. Il est ainsi possible de rencontrer sur un même champ hydrothermal ces différentes morphologies avec par exemple des fumeurs noirs dans l'axe de la sortie principale du fluide et dans sa périphérie des structures en forme de ruches (fumeurs blancs) (FIGURE 7).

Dans le cas des cheminées, du fait d'un conduit central relativement étanche, le mélange avec l'eau de mer se fait principalement au-dessus du fumeur. Dans le cas des structures en ruches, il n'y a pas de conduit central et le fluide est émis de manière diffuse par toute la surface de la structure bien plus poreuse qu'une cheminée (FIGURE 8). Le mélange avec l'eau de mer se fait au sein de la structure. Dans le cas des flanges, l'eau hydrothermale est piégée sous des excroissances horizontales des cheminées et le mélange avec l'eau de mer est relativement restreint. Ces différentes structures présentent des forts gradients physico-chimiques qui génèrent des micro-habitats pour les micro-organismes et dans lesquels les paramètres physiques, chimiques et minéralogiques peuvent être extrêmement variés et variables sur quelques mm.

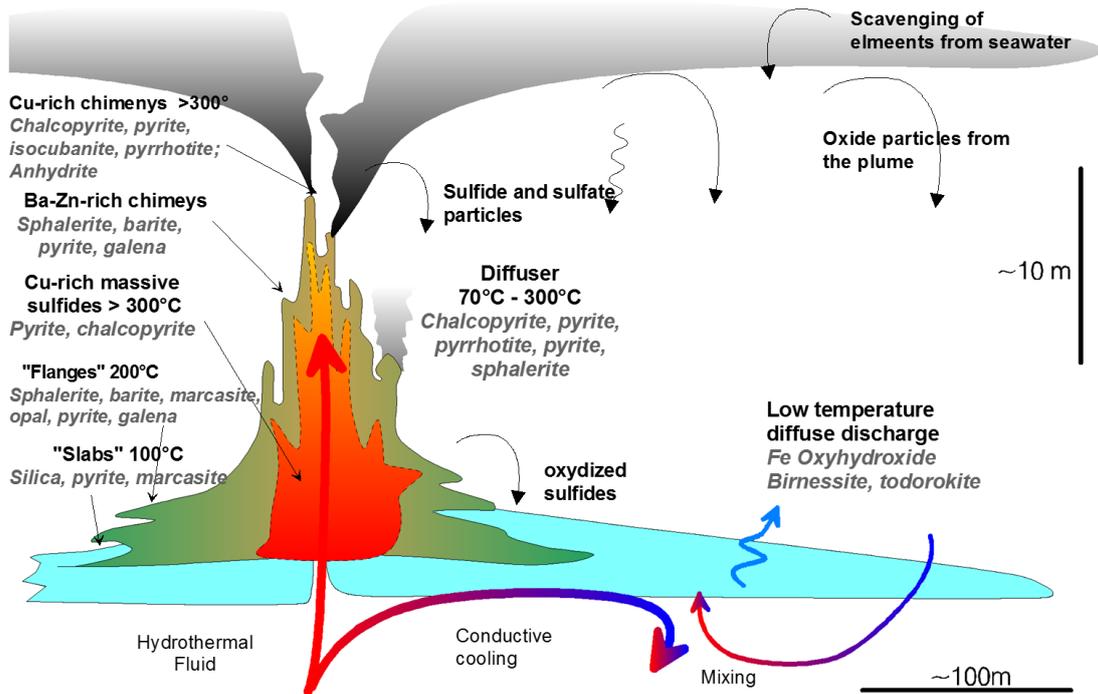


Figure 7 : Représentation schématique des différentes structures minérales retrouvées au niveau d'un même champ hydrothermal. Communication personnelle d'Y. Fouquet.

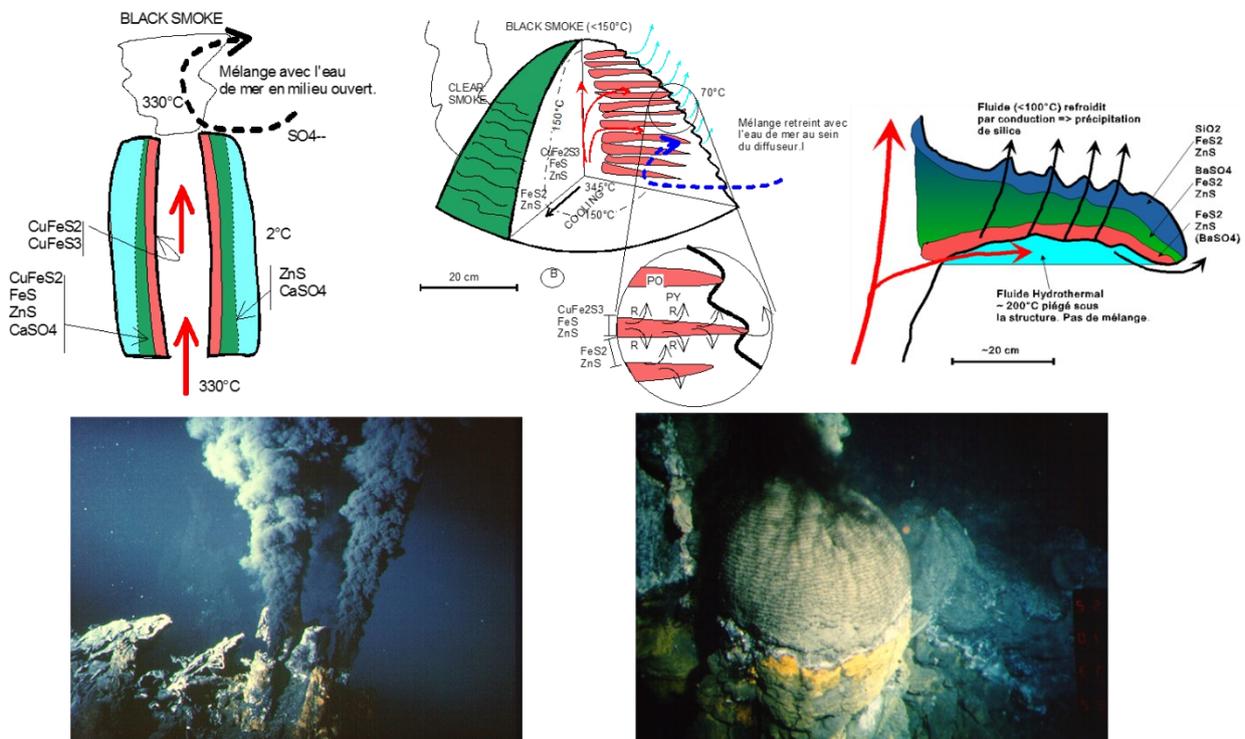


Figure 8 : Représentation schématique des principales morphologies des édifices hydrothermaux avec des coupes transversales d'une cheminée, d'une structure en nid d'abeille et d'une structure de type « flange ». Les flèches indiquent le sens de circulation du fluide hydrothermal. Communication personnelle d'Y. Fouquet.

Un minéral est un solide naturel, homogène, avec une composition chimique définie et une structure atomique ordonnée. La paragenèse désigne l'association minérale résultant d'un processus géologique donné. Les paragenèses minérales dans les cheminées hydrothermales sont nombreuses et variées. Elles sont principalement constituées de sulfures de fer, de cuivre et de zinc ainsi que de sulfates de calcium et de baryum et de silice amorphe (opale). La nature des associations est dépendante des conditions physico-chimiques (température, pH, Eh) rencontrées par le fluide, de la composition chimique des roches lessivées et du mode de mélange du fluide hydrothermal et de l'eau de mer. En fonction de leurs abondances, les minéraux sont qualifiés de majeur ou de mineur. Les minéraux majeurs retrouvés sont souvent les mêmes. Les paragenèses de haute température (> 300 °C) sont principalement formées par des sulfures de fer, pyrite (FeS_2) et pyrrhotite (Fe_{1-x}S), et par des sulfures de cuivre, isocubanite (CuFe_2S_3) et chalcopyrite (CuFeS_2) (Fouquet et al., 2013). Les paragenèses de température inférieure (100-250 °C) sont constituées de sulfures de zinc (sphalérite $(\text{Zn,Fe})\text{S}$), pyrite et barytine (BaSO_4). Les associations de basse température (< 100 °C) sont plutôt constituées de marcasite (un polymorphe de la pyrite), d'opale, et de sulfures secondaires résultant de l'altération des sulfures de cuivre primaires (chalcopyrite, isocubanite) par l'eau de mer à différentes températures (bornite, covellite, digénite, chalcocite, ...) et d'oxyhydroxydes de fer). Pour les minéraux en trace leur présence est dépendante de la teneur de certains éléments dans les roches altérées et dans les fluides comme par exemple en Pb, Co, Ni, Ag, As, Bi ou en Au. Les enrichissements en éléments et minéraux mineurs dépendent du contexte géodynamique et de la nature des roches lessivées.

1.1.6.1. Cheminées de haute température – fumeurs noirs

Les structures minérales hydrothermales les plus courantes sont les cheminées associées aux fumeurs noirs. Un modèle général du processus de formation des cheminées est accepté (FIGURE 9) (Fouquet et al., 1993; Graham et al., 1988; Hannington et al., 1995; Haymon, 1983; Haymon & Kastner, 1981; Koski et al., 1994; Tivey, 1998).

La première étape de la construction d'une cheminée est l'expulsion du fluide hydrothermal qui réagit avec l'eau de mer environnante. Pour des températures supérieures à 160 °C, les ions calciums (présents dans le fluide et dans l'eau de mer) précipitent avec les ions sulfates de l'eau de mer pour former de l'anhydrite (sulfate de calcium (CaSO_4)) constituant la première matrice de la future cheminée. Celle-ci se révèle instable et poreuse. D'autres ions peuvent également précipiter avec les sulfates comme le baryum formant alors de la barytine (BaSO_4). Cette première couche se forme rapidement, plusieurs observations ont noté des vitesses de croissance de l'ordre de 1 à 10 cm par jour (Tivey, 1995).

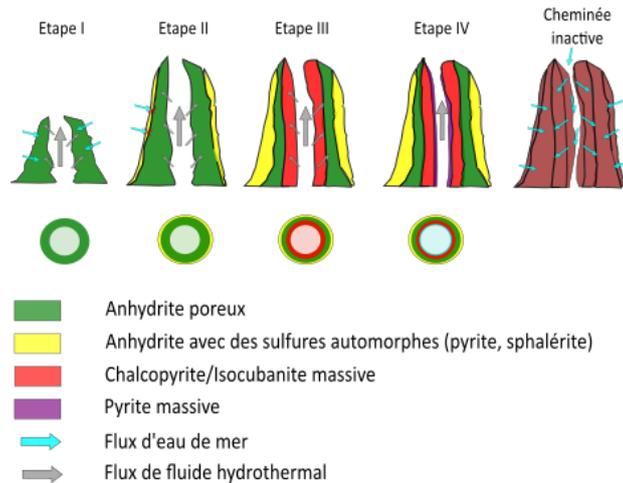


Figure 9 : Modèle des différentes étapes de formation d'une cheminée hydrothermale. Modifiée d'après (Meng et al., 2019).

Lors de la deuxième étape, la cheminée croît verticalement par précipitation des sulfures comme la chalcopyrite (CuFeS_2), la pyrrhotite (Fe_{1-x}S) à haute température au cœur de la cheminée, puis par la pyrite (FeS_2) et sphalérite ($(\text{Zn,Fe})\text{S}$) à moyenne température dans les zones intermédiaires et externes. Une partie de ces minéraux remplace l'anhydrite instable dans les conditions réductrices du fluide hydrothermal au cœur de la cheminée. Lors de la poursuite de la précipitation des sulfures, la porosité de l'intérieur de la structure diminue conduisant à une séparation franche entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer. La température au sein de la cheminée augmente peu à peu jusqu'à atteindre celle du fluide hydrothermal pur. Des sulfures de cuivre et de fer (chalcopyrite et isocubanite) précipitent et se déposent sur la paroi interne de l'édifice formant un conduit central. L'anhydrite est un minéral particulier puisqu'il est plus soluble à basse température qu'à haute température (Blounot & Dickson, 1969) et possède une solubilité rétrograde. Ainsi lors de la croissance latérale de la cheminée, la température des compartiments externes isolés du conduit principal par les sulfures diminuera progressivement entraînant la dissolution de l'anhydrite initiale et son remplacement par des sulfures stables à plus basse température (pyrite, marcassite, sphalérite). Un gradient de température se met en place au sein de la cheminée dans laquelle les minéraux s'organisent de manière plus ou moins concentrique, stabilisant ainsi la structure de la cheminée.

1.1.6.2. Autres types de diffusion (de basse température)

Les flanges et les diffuseurs (ou ruches) représentent les autres édifices hydrothermaux retrouvés. Au contraire des sorties verticales (cheminées), le fluide se diffuse sur l'ensemble de la structure qui se présente sous forme de nid d'abeille (ruche) du fait de la lente précipitation des minéraux et en raison

d'un plus faible débit d'émission. Il n'y a pas de conduit central contrairement aux cheminées et la porosité est plus élevée que celle des cheminées diminue progressivement vers l'intérieur. Les édifices sont caractérisés par l'alternance de couche horizontale de pyrite-sphalérite et de pyrrhotite-sphalérite-isocubanite. La seconde couche est formée après ou en remplacement de la couche de pyrite. Les édifices sont dépourvus en anhydrite du fait des conditions réductrices et du positionnement de l'isotherme 160 °C dans l'édifice (FIGURE 8). La mesure des températures de fluide au cœur de l'édifice (345 °C) et en sortie à la surface (70 °C) indique un refroidissement à l'intérieur du diffuseur par mélange avec l'eau de mer (Fouquet et al., 1993).

Les cheminées carbonatées sont caractéristiques des sites ultramafiques avec des fluides alcalins de basses températures dont l'exemple le plus marquant est celui du site de Lost City. Elles sont constituées de carbonate de calcium (calcite ou aragonite (CaCO_3) et d'hydroxyde de magnésium (brucite (MgOH_2)) (Kelley et al., 2005).

La majorité des précipités de sulfures (de zinc, fer, cuivre) et d'oxydes (de manganèse, de fer, ...) forment des microparticules qui se dispersent dans le panache hydrothermal (FIGURE 7). Avant mélange avec l'eau de mer le fluide chaud (> 300 °C) est moins dense que l'eau de mer et monte verticalement à plusieurs centaines de m du fond par contraste de densité. Le refroidissement par mélange équilibre les densités et à environ trois cent mètres au-dessus du fond, le panache s'étale horizontalement et se disperse sur plusieurs dizaines de km au gré des courants participant à la dispersion planétaire de nombreux composés (Dick et al., 2013; Feely et al., 1987). Le panache hydrothermal se divise en trois fractions selon sa localisation et son degré de dilution à l'eau de mer : le panache proximal qui correspond à la zone immédiate d'émission du fluide, le panache intermédiaire qui se situe dans la zone de remontée verticale et axiale à la zone d'émission et enfin le panache distal correspondant à la dispersion latérale du panache en fonction des courants marins.

1.2. Les écosystèmes hydrothermaux : le rôle clé des communautés microbiennes

1.2.1 Présentation de la macrofaune

Les écosystèmes associés aux sources hydrothermales océaniques profondes présentent un biotope dynamique marqué par des gradients physico-chimiques très marqués à l'échelle du mm abritant une biocénose riche et variée. L'une des caractéristiques la plus visible de cette biocénose est l'assemblage de très denses communautés animales contrastant avec celles des plaines abyssales environnantes qui sont très dispersées (Desbruyères et al., 2000; Tunnicliffe, 1991). Cette importante biomasse est répartie sur des aires limitées et distribuée de manière concentrique autour des points d'émission des fluides hydrothermaux. De plus, une grande majorité (97 %) des espèces sont endémiques et sont associées à des micro-organismes symbiotiques. Il existerait plusieurs provinces biogéographiques à l'échelle planétaire avec des assemblages faunistiques différents, à savoir l'océan Indien, la ride médio-Atlantique, le Pacifique occidental, la dorsale est-Pacifique et le Pacifique nord (Bachraty et al., 2009; Moalic et al., 2012). Le développement, la composition taxonomique et la distribution de la faune sont contrôlés par différents paramètres physico-chimiques comme la géochimie du fluide, la nature du substrat, la température ou encore la profondeur (Bates et al., 2005; Podowski et al., 2010; Sarrazin & Juniper, 1999; Shank et al., 1998). Généralement, un site hydrothermal est dominé par une espèce qualifiée d'ingénieure qui va modifier profondément son habitat en modulant directement ou indirectement la disponibilité des ressources pour les autres organismes (Cuvelier et al., 2009; Govenar et al., 2005; Jones et al., 1994). Ces espèces ingénieures appartiennent principalement aux familles de vers tubicoles, d'annélides *Alvinellidae* et *Siboglinidae* (FIGURE 10A), de mollusques *Vesicomysidae* et *Mytilidae* (FIGURE 10B), ainsi que certains arthropodes comme des *Alvinocarididae* (FIGURE 10C). Elles contribuent donc à augmenter la diversité locale en offrant une plus grande diversité d'habitats (Sarrazin et al., 1997). En plus de ces espèces ingénieures, les sources hydrothermales abritent également des communautés de macrofaune (par exemple de crustacés) et de méiofaune (nématodes, copépodes, ...) (Zeppilli et al., 2018).



Figure 10 : Photographies de différents organismes identifiés au niveau des sources hydrothermales profondes. A : des vers tubicoles *Riftia pachyptila*. B : des moules *Bathymodiolus azoricus*, c : des crevettes *Rimicaris exoculata*. (©Ifremer).

Les écosystèmes hydrothermaux ont comme particularité d’avoir à la base de leurs chaînes trophiques une production primaire chimiotrophe assurée par des micro-organismes chimio-synthétiques (par exemple : (Jannasch & Wirsén, 1979; Rau & Hedges, 1979)) (FIGURE 11). Les consommateurs primaires se nourrissant principalement de cette production peuvent l’utiliser via les associations symbiotiques ou par ingestion dont trois types sont distingués (Tunnicliffe, 1991) : les brouteurs qui se nourrissent des tapis microbiens, les filtreurs qui se nourrissent de bactéries libres ou de matière particulaire émise par les fluides et les détritivores qui se nourrissent des matières détritiques. Il existe une multitude d’association symbiotique entre l’hôte et ses symbiotes selon la spécificité de l’association, la durée, le caractère obligatoire ou facultatif, la localisation des symbiotes (à l’extérieur des tissus dans les cas des « ectosymbiose » ou à l’intérieur de leurs hôtes pour les « endosymbiose ») ou encore le mode de transmission. Par exemple chez la crevette *Rimicaris exoculata*, les bactéries forment des colonies filamenteuses à l’intérieur de sa cavité branchiale (des *Gammaproteobacteria*, des *Epsilonproteobacteria* ou encore des *Zetaproteobacteria* (Jan et al., 2014)). Alors que chez les polychètes *Riftia pachyptila*, les bactéries sont présentes dans un organe spécialisé appelé le trophosome (Cavanaugh et al., 1981; Girguis & Childress, 2006). Toute une diversité de prédateurs (crustacés, poissons, ...) gravite autour de ces écosystèmes et profitent de la densité de ces communautés. En périphérie des sources, des communautés d’animaux filtreurs (anémones, éponges, ...) s’alimentent avec les particules du panache hydrothermal.

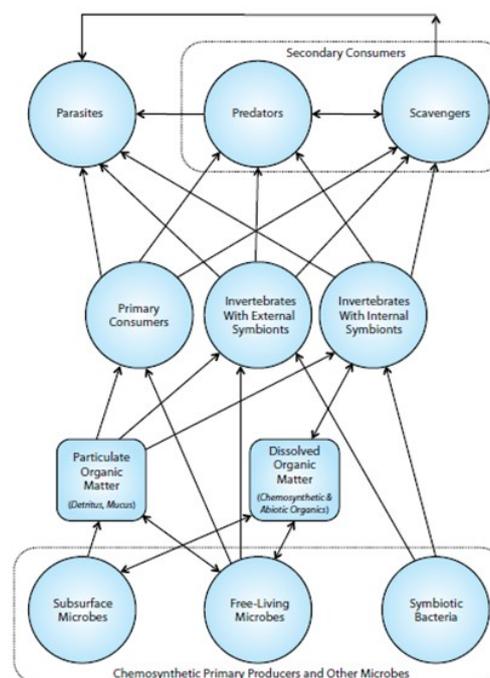


Figure 11 : Modélisation de la chaîne trophique dans l’écosystème hydrothermal. (Govenar et al., 2005).

1.2.2 Présentation des micro-organismes

1.2.2.1. Les principales évolutions associées aux approches techniques pour l'étude des écosystèmes microbiens

La recherche d'une vie microbienne à haute température et haute pression a été influencée par les travaux notables de Thomas Brock qui dès la fin des années 1960 a isolé les deux premières souches hyperthermophiles *Thermus aquaticus* (Topt : 78 °C) puis *Sulfolobus acidocaldarius* (Topt : 85 °C) ainsi que ceux de Claude Zobell, d'Holger Jannasch et d'Aristide Yayanos avec le développement de la technologie associée et l'isolement du premier micro-organisme piézophile obligatoire (Yayanos et al., 1981; ZoBell & Johnson, 1949). *Thermus aquaticus* est également connue pour sa Taq polymérase thermostable qui a remplacé le fragment de Klenow et a permis de faciliter et d'améliorer les PCR (Réaction de polymérisation en chaîne) (Innis et al., 1988; Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988). Au début des années 1980, l'étude des micro-organismes de ces environnements fut initiée par des approches culturales avec l'isolement et la caractérisation de nombreuses souches du genre *Thiomicrospira* dont T. SL12 (Ruby et al., 1981). Dès 1983, soit 5 années après la découverte des premières cheminées actives, la première *Archaea* hyperthermophile (*Methanocaldococcus jannaschii*) fut isolée d'un fumeur blanc d'un champ hydrothermal de l'Est Pacifique (Jones et al., 1983) suivie de *Pyrococcus furiosus* (Fiala & Stetter, 1986) et de *Staphylothermus marinus* (Fiala et al., 1986). Cette période est également marquée par les études utilisant des radio-isotopes (¹⁴C et ³H) pour l'incorporation du C¹⁴ et des mesures d'activités (Jannasch & Mottl, 1985; Winn et al., 1986; Wirsen et al., 1986) permettant de mettre en évidence le rôle des micro-organismes chimiosynthétiques dans ces écosystèmes.

Il convient également de rappeler l'importance des travaux de l'équipe de Carl Woese en 1977 sur la phylogénie moléculaire du vivant avec l'utilisation de séquences de gènes codant pour des ARN ribosomiaux (ARNr 16S) comme marqueur phylogénétique moléculaire (Woese & Fox, 1977). Le développement des outils génétiques dès le début des années 1990 (PCR, banque de clones, l'hybridation *in situ* en fluorescence (Giovannoni et al., 1988)) a permis d'accroître très rapidement nos connaissances sur ces environnements qui étaient limitées jusqu'alors par les approches culturales (culture d'enrichissement et mesures d'activité). Les techniques de Séquençage Nouvelle Génération dites NGS (Roche/454, Illumina, Nanopore) ont ensuite permis un nouveau bond en avant des connaissances en permettant d'accéder à la diversité de la biosphère rare (c'est-à-dire de l'ensemble des taxons retrouvés à faibles abondances (> 1 % de la communauté totale) d'un échantillon (Huber et al., 2007; Sogin et al., 2006)) jusqu'alors inaccessible par les approches culturales traditionnelles (micro-organismes en faibles quantités, métabolismes lents, syntrophie, ...) (Jeanthon, 2000; Takai & Horikoshi,

1999). En effet il est admis que la part de micro-organismes cultivables est de moins de 0,1 % des espèces microbiennes totales (Pace, 1997).

Les approches de métagénomiques ont augmenté le nombre de phyla du domaine des archées qui historiquement a longtemps été divisé en deux phyla principaux, les *Euryarchaeota* et les *Crenarchaeota* (Woese et al., 1990). Cependant la quasi-totalité de ces nouveaux phylums ne possède pas encore de représentants cultivés comme par exemple les *Lokiarchaeota* (Spang et al., 2015), les *Thorarchaeota* (Seitz et al., 2016), ou encore les *Bathyarchaeota*. Un nouveau niveau de classification est apparu avec les super-phylum comme celui des DPANN (regroupant les *Diapherotrites*, *Parvarchaeota*, *Aenigmarchaeota*, *Nanoarchaeota* et *Nanohaloarchaeota*) (Rinke et al., 2013), des TACK (pour *Thaumarchaeota*, *Aigarchaeota*, *Crenarchaeota* and *Korarchaeota*) (Guy & Ettema, 2011), ou encore plus récemment des Asgards (Zaremba-Niedzwiedzka et al., 2017). La phylogénie des bactéries est également modifiée avec la découverte du Candidate Phyla Radiation (Brown et al., 2015). L'accumulation de ces nouvelles données a bouleversé notre vision de l'évolution, de la taxonomie instaurée pour les micro-organismes cultivés ainsi que des rôles écologiques des organismes (Adam et al., 2017; Castelle & Banfield, 2018). Ces technologies viennent en compléments de l'approche culturale qui reste indispensable pour décrire la physiologie et le métabolisme des micro-organismes et permettre de comprendre leurs liens avec l'environnement. Les études actuelles combinent les données de diversité microbienne avec les données biogéochimiques pour essayer de modéliser le fonctionnement de ces écosystèmes en intégrant le lien entre les communautés microbiennes et leur environnement (Amend & Shock, 2001; Flores et al., 2011; McCollom & Shock, 1997; Roussel et al., 2011; Takai & Nakamura, 2010).

1.2.2.2. Distribution et diversité des micro-organismes associés aux sources hydrothermales marines profondes

Les biotopes que constituent les sources hydrothermales profondes sont très hétérogènes, dynamiques et caractérisés par des gradients physico-chimiques très marqués à l'échelle du micron (par exemple : pH, température, salinité) et par une diversité minéralogique complexe, engendrant une multitude de microenvironnements favorables au développement de micro-organisme. Ces derniers colonisent les différents habitats écologiques constitués autour des zones d'émission du fluide hydrothermal, utilisant la variété des donneurs et des accepteurs et des pour leur métabolisme et participent ainsi aux cycles biogéochimiques. Il est possible de distinguer plusieurs types d'habitats microbiens dans ces écosystèmes (FIGURE 12) (Karl, 1995) :

- Le fluide hydrothermal associé à des micro-organismes sous forme libres ou attachées à des particules, qui pourraient être issus d'une biosphère profonde localisée en profondeur des champs hydrothermaux (Deming & Baross, 1993; Gold, 1992).
- Le panache hydrothermal qui résulte du mélange de l'eau de mer et du fluide à avec différents degrés de dilution (mélange proximal, intermédiaire et distal). Les micro-organismes sont sous formes libres ou attachés à des particules (Dick et al., 2013; Winn et al., 1986).
- Les édifices hydrothermaux qui peuvent être de différentes natures.
- La faune hydrothermale à laquelle sont associées des communautés symbiotiques (endo, ecto, epi).
- Les surfaces des différentes structures (édifices minéraux, sédiments, animaux, ...) qui sont présentes dans la zone d'influence du fluide et qui constituent une surface de développement de micro-organismes libres ou sous forme de tapis microbiens.
- Les sédiments hydrothermaux impactés par l'activité hydrothermale par percolation du fluide hydrothermal ou par retombée des particules du panache (Dhillon et al., 2003; Teske & Sørensen, 2008).

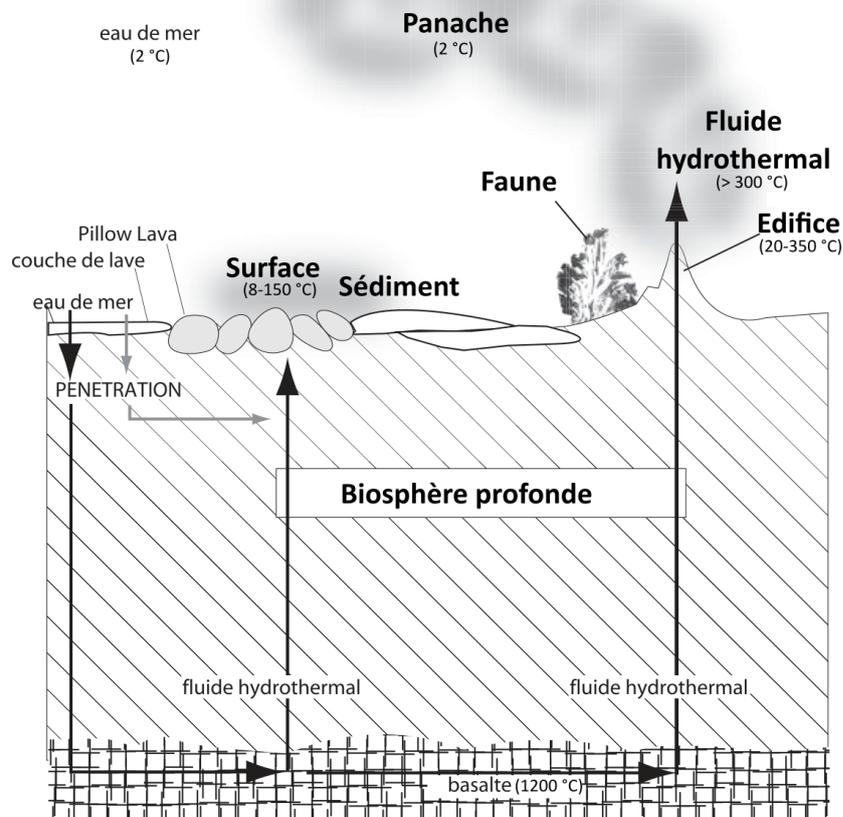


Figure 12 : Localisation des principaux habitats microbiens des sources hydrothermales marines. Modifiée d'après (Karl, 1995; Nercessian, 2003).

1.2.2.3. La température, facteur clé déterminant la distribution des micro-organismes.

Les études microbiologiques ont mis en évidence une grande diversité métabolique et phylogénétique des communautés microbiennes. Les gradients thermiques et chimiques sont considérés comme les principaux paramètres déterminant la composition des communautés microbiennes (Flores et al., 2011; Luther et al., 2001; McCollom & Shock, 1997; Schrenk et al., 2003). La température exerce un premier contrôle sur les populations microbiennes étant donné que la physiologie cellulaire et la biochimie sont adaptées pour des gradients de températures précis (de 2 à 121 °C, température au-delà de laquelle aucune croissance n'a été démontrée de manière concluante (Kashefi et al., 2003)). Il est possible de classer les micro-organismes en 4 catégories selon leur préférendum de température (FIGURE 13) :

- Les psychrophiles qui ont une température optimale de croissance inférieure à 15 °C. Ils vivent dans les parties les plus froides c'est-à-dire dans l'eau de mer et les zones de mélanges très dissous en fluide hydrothermal ou encore au niveau des structures hydrothermales inactives.
- Les mésophiles qui présentent une température optimale autour de 40 °C avec une température maximale inférieure à 45 °C. Ils constituent une fraction importante des communautés présentes dans les panaches hydrothermaux, dans les tapis microbiens ou encore en association symbiotique.
- Les thermophiles qui ont des températures optimales de croissances comprise entre 45 et 70 °C. Elles sont principalement présentes dans les édifices hydrothermaux.
- Les hyperthermophiles avec des températures optimales supérieures à 80 °C qui sont principalement présentes à l'intérieur des édifices hydrothermaux et dans les fluides (Prieur et al., 1995; Schönheit & Schäfer, 1995).

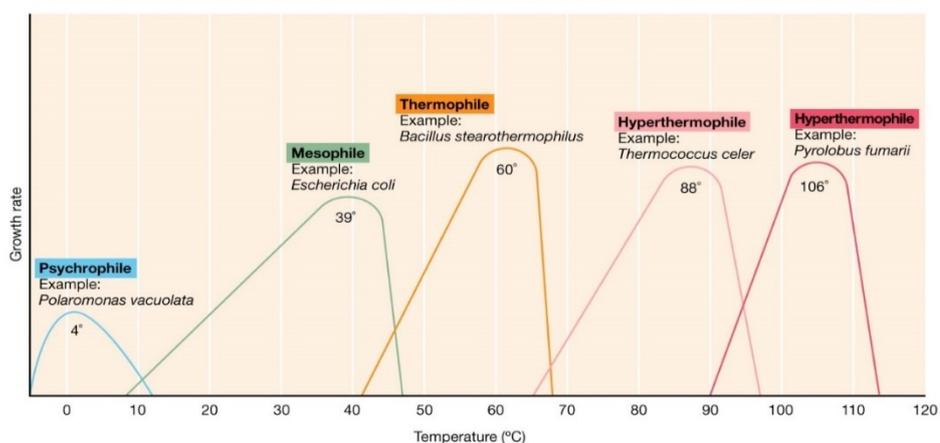


Figure 13 : Présentation des différentes catégories de micro-organismes selon leur préférendum de température. (Brock et al., 2003)

Ainsi sur les parois externes les communautés mésophiles sont détectées en abondance (dominées par

les bactéries) (Crépeau et al., 2011; Kormas et al., 2006; Schrenk et al., 2003) puis en se rapprochant des zones « chaudes » de l'édifice une diminution de la biomasse accompagnée d'un changement de la diversité est observée avec le développement de communautés thermophiles et hyperthermophiles (principalement des archées) (Harmsen et al., 1997; Hedrick et al., 1992; Schrenk et al., 2003; Takai et al., 2001).

Adaptation aux hautes températures : Les organismes (hyper)thermophiles présentent une multitude d'adaptations physiologiques mineures qui additionnées leur permettent de vivre à haute température (Robb & Clark, 1999; Stetter, 1999). Tout d'abord les membranes cytoplasmiques sont plus stables avec notamment chez les bactéries plus d'acides gras saturés. Ensuite leurs protéines sont plus thermostables que celles des mésophiles. Il suffit de quelques changements d'acides aminés dans la séquence protéique pour la rendre plus thermostable sans modifier sa fonction enzymatique. Elles présentent ainsi un nombre plus important de liaisons ioniques et moins de cavités internes (Vetriani et al., 1998). La production en grande quantité de solutés comme le di-glycerol phosphate pourrait aider contre la dégradation thermique de certaines protéines. Les hyperthermophiles possèdent également une reverse gyrase qui permet d'introduire des surenroulements positifs dans l'ADN et qui le stabilise à haute température (Forster, 2002).

1.2.2.4. Diversité des habitats périphériques des zones hydrothermales chaudes

Les parties au contact de l'eau de mer froide oxygénée, c'est-à-dire les zones tièdes périphériques aux cheminées (sédiments, panache hydrothermal, tapis microbien, en symbiose avec la faune endémique, parois externes des cheminées) sont dominées par des communautés mésophiles principalement constituées de sulfo- ou ferro- oxydants et de méthanotrophes. Ce sont surtout les *ε-Proteobacteria* qui sont identifiés dans les études de diversité dans des habitats variés : les zones de mélange entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer, les sédiments hydrothermaux et les tapis microbiens ou en association symbiotiques (Corre et al., 2001; Huber et al., 2002; Moyer et al., 1998; Nakagawa et al., 2005; Reysenbach et al., 2000; Teske et al., 2002; Vetriani et al., 2014). Elles présentent une versatilité métabolique assez importante mais sont généralement autotrophes hydro ou sulfo-oxydantes avec réduction de l'oxygène ou du nitrate. Elles jouent un rôle essentiel dans la production primaire (Hügler & Sievert, 2010).

Les *Gammaproteobacteria* sont également identifiées que ce soit en association symbiotique ou bien à la surface des structures (tapis microbiens) (Cho & Giovannoni, 2004; Distel et al., 1995; Jannasch & Mottl, 1985; Taylor et al., 1999; Yamamoto & Takai, 2011). Des représentants d'autres phyla y ont été

détectés telles que les *Deltaproteobacteria*, les *Firmicutes*, les CFB (*Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroidetes*), les *Acidobacteria*, les *Verrucomicrobia* ou encore les *Planctomycetes* (Flores et al., 2011; Orcutt et al., 2011; Sylvan et al., 2012; Teske et al., 2002). Les parties froides et riches en Fer sont dominées par des *Zetaproteobacteria* (Emerson et al., 2007; Kato et al., 2010).

Les communautés pélagiques sont distinctes de celles des cheminées, sédiments et de sub-surface mais présentent des liens taxonomiques et physiologiques (Takai, Oida, et al., 2004). Ce sont principalement des phylotypes affiliés aux MGI (Marine Group I) du phylum des *Thaumarchaeota* (anciennement Crenarchaeota mésophiles) (Brochier-Armanet et al., 2008; DeLong, 1992). Ces archées mésophiles aérobies modérées qui oxydent l'ammonium forment le groupe le plus abondant dans la colonne d'eau (Francis et al., 2005; Wuchter et al., 2006). Les communautés du panache sont différentes que celles de l'eau de mer (Dick et al., 2013; Takai, Oida, et al., 2004). Ainsi en plus des MGI (qui y sont moins abondants que dans l'eau de mer), des *Gammaproteobacteria* (dont des méthanotrophes) (Dick & Tebo, 2010; Elsaied et al., 2004; German et al., 2010; Lam et al., 2008; Sunamura et al., 2004), des *Epsilonproteobacteria* (German et al., 2010; Nakagawa et al., 2005; Sunamura et al., 2004) et des *Betaproteobacteria* ammonium oxydante (Lam et al., 2008) y sont détectées. Les MGI sont également présents dans les sédiments hydrothermaux (Roussel et al., 2011; Wu et al., 2014) dans lesquels d'autres phylotypes archéens y sont détectés comme ceux des Marine Benthic group E (MBGE), des Deep-sea hydrothermal vent Euryarchaeota group 5 (DHVE5) (Wu et al., 2014) et des DHVEG-6 (Nunoura et al., 2009; Takai & Horikoshi, 1999; Teske & Sørensen, 2008).

1.2.2.5. Diversité des habitats thermophiles et hyperthermophiles

Les communautés qui habitent les parties les plus chaudes au contact des fluides hydrothermaux sont constituées de thermophiles et d'hyperthermophiles. Les différentes analyses quantitatives mettent en évidence une dominance des Archées au sein de ces communautés. Cette tendance est confortée par le nombre plus important d'archées hyperthermophiles isolées (principalement des *Euryarchaeota*) que de bactéries. Les principaux groupes d'archées hyperthermophiles présents au niveau des sources hydrothermales profondes sont ceux des *Thermococcales* (Zillig et al., 1983), DHVE (Takai & Horikoshi, 1999), *Archaeoglobales*, des méthanogènes (*Methanococcales* (Balch et al., 1979) et *Methanopyrales* (Kurr et al., 1991)), et de *Desulfurococcales*. La plupart des temps de génération sont inférieurs à une heure, ce qui indique qu'elles sont bien adaptées aux températures *in situ* (Prieur et al., 1995).

Les *Thermococcales* (chimioorganotrophes) sont parmi les archées les plus communément identifiées dans les études de diversité microbienne dans tous les habitats chauds (cheminées, fluide, sédiments, surface). Elles figurent parmi les organismes les plus étudiés. Les DHVEG sont aussi détectés dans la

plupart des inventaires moléculaires (Flores et al., 2011; Hoek et al., 2003; Takai & Horikoshi, 1999). Le seul représentant cultivé des DHVE-2 est la souche thermo-acidophile Candidatus *Aciduliprofundum boonei*, isolée de bassin de Lau, qui peut représenter jusqu'à 15 % des séquences d'archées de certains échantillons (Reysenbach et al., 2006; Takai & Horikoshi, 1999). Les *Archaeoglobales* sont réparties en trois genres connus, *Archaeoglobus* (Stetter, 1988), *Geoglobus* (Kashefi et al., 2002) et *Ferroglobus* (Hafenbradl et al., 1996). Le genre *Archaeoglobus* est l'un des trois genres à réaliser la réduction des SO_4^{2-} au sein des Archées (en plus de *Thermocodium* et *Caldivirga* du phylum des *Crenarchaeota*). Ils sont principalement hydrogénotrophes mais certains peuvent également utiliser des acides organiques (lactate, acétate et pyruvate) comme donneurs d'électrons. Le genre contient six espèces décrites dont deux isolées de sources hydrothermales profondes : *A. profundus* (Burggraf et al., 1990) et *A. veneficus* (Huber et al., 1997) (les quatre autres sont *A. fulgidus*, *infectus*, *sulfaticallidus* et *lithotrophicus*). Il existe deux espèces de *Geoglobus* décrites à ce jour : *G. ahangari* (Kashefi et al., 2002) et *G. acetivorans* (Slobodkina et al., 2009). Elles sont hyperthermophiles anaérobies, capables de croître en lithoautotrophie ou en organohétérotrophie avec le fer III comme accepteur d'électrons. *Ferroglobus placidus* (Hafenbradl et al., 1996) est le seul représentant de ce genre. Il est également capable de croître en autotrophie en couplant l'oxydation du Fe^{2+} avec la réduction du nitrate ou oxydant l' H_2 et en réduisant le $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$.

Des archées méthanogènes sont très communément retrouvées au niveau des sources hydrothermales océaniques profondes, notamment au niveau des sites ultramafiques. Les méthanogènes hyperthermophiles appartiennent, pour la plupart, à l'ordre des *Methanococcales* (Balch et al., 1979) qui comporte quatre genres hydrogénotrophes : les *Methanococcus*, *Methanocaldococcus*, *Methanothermococcus* et *Methanotorris*. Il a été mis en évidence une corrélation entre la concentration en H_2 des fluides hydrothermaux et le nombre de méthanogènes hydrogénotrophes cultivables (Takai & Nakamura, 2010).

Les *Crenarchaeota*, principalement de l'ordre des *Desulfurococcales*, sont souvent identifiées en abondance au niveau des cheminées hydrothermales. Les quelques *Crenarchaeota* isolées présentent une grande diversité métabolique telles que : *Aeropyrum camini*, la seule hyperthermophile chimioorganotrophe aérobie stricte identifiée (Nakagawa et al., 2004), *Staphylothermus marinus* une anaérobie chimioorganotrophe (Fiala & Stetter, 1986) et *Ignicoccus pacificus* (Huber et al., 2000) une chimiolithotrophe stricte. Cette dernière a comme singularité de vivre en association avec une autre archée, *Nanoarchaeum equitans*. Alors que l'hôte *Ignicoccus hospitalis* n'a pas besoin de *N. equitans* pour se développer et ne semble pas tirer d'avantages de sa symbiose, *N. equitans*, qui a un génome de petite taille 490 kb et dans lequel il manque de nombreux gènes de biosynthèse, a besoin de cette association (Podar et al., 2008; Waters et al., 2003).

Un grand nombre de bactéries thermophiles et hyperthermophiles présentes dans les parties les plus chaudes de ces environnements, ont également été isolées : des lithoautotrophes des genres *Persophonella* (Götz et al., 2002; Nakagawa et al., 2003) et *Desulfurobacterium* (l'Haridon et al., 1998) de l'ordre des *Aquifex*, des chimioorganotrophes de l'ordre des *Thermotogales* des genres *Thermotoga*, *Thermosipho*, *Marinitoga* (Antoine et al., 1997; Wery et al., 2001) et de l'ordre des *Deinococci* (Sako et al., 2003).

1.2.2.6. Diversité des habitats devenus inactifs

Contrairement aux édifices actifs, très peu d'études ont été consacrées à la diversité microbienne des édifices inactifs malgré leurs impacts potentiels sur l'écologie de ces environnements qui pourrait être important du fait des volumes et surfaces qu'ils représentent (Erickson et al., 2009; Kato et al., 2010; Suzuki et al., 2004; Sylvan et al., 2012). La cheminée inactive va conserver des éléments réduits qui pourront être utilisés comme source d'énergie par les micro-organismes jusqu'à l'oxydation complète de tous les éléments (Edwards et al., 2003; Kato et al., 2015; McCollom, 2000). Les communautés microbiennes des cheminées inactives sont distinctes de celles des cheminées actives et présentent des biomasses, des diversités et des métabolismes plus importants (Kato et al., 2015; Kato et al., 2010; Reeves et al., 2014; Suzuki et al., 2004; Sylvan et al., 2012; Toner et al., 2013). Les communautés des cheminées inactives incluent des *Proteobacteria* (*Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* et *Delta-*), *Bacteroidetes* et *Planctomycetes*. Les communautés colonisant des pyrrhotites incubées *in situ* dans des eaux peu profondes des Iles Catalina sont similaires à celles détectées dans les édifices inactifs des sources hydrothermales profondes (Barco et al., 2017). Il est également suggéré que les communautés bactériennes qui colonisent des dépôts inactifs de sulfures hydrothermaux géographiquement distants sont similaires entre elles et différentes de celles des communautés environnantes (eau de mer, cheminée active, basalte, ...) (Toner et al., 2013).

1.2.2.7. L'influence de la pression hydrostatique

La pression hydrostatique (c'est-à-dire la force exercée par l'eau sur une surface donnée) constitue le deuxième facteur physique contrôlant la distribution des micro-organismes dans les milieux océaniques profonds (Somero, 1990; Yayanos, 1986). En effet, dans les océans la pression hydrostatique augmente de 1 MPa tous les 100 m (pour rappel la pression atmosphérique est de 0,1 MPa). Les micro-organismes peuvent ainsi être classés en quatre catégories selon leurs optima de pression optimale de croissance (FIGURE 14) :

- Les piézosensibles qui supportent une augmentation de pression faible jusqu'à 20 MPa, mais avec une diminution rapide de leur taux de croissance lorsque la pression augmente, comme *Pyrococcus furiosus*.
- Les piézotolérants qui se développent jusqu'à 40 MPa, avec un taux de croissance constant comme *Thermococcus kodakarensis* KOD1^T (Vannier et al., 2015).
- Les piézophiles dont l'optimum de croissance se trouve à une pression supérieure à la pression atmosphérique (0,1 MPa) comme *Thermococcus piezophilus* CDGS^T qui possède la plus large gamme de pression de croissance (de la pression atmosphérique jusqu'à moins de 120 MPa avec un optimum à 50 MPa) (Dalmasso et al., 2016).
- Les piézophiles obligatoires, qui requièrent une pression hydrostatique minimale pour vivre, sont incapables de se croître sous de faibles pressions. Par exemple, *Pyrococcus yayanossii* Ch1^T se développe dans la gamme de pression de 20 à 120 MPa (Birrien et al., 2011).

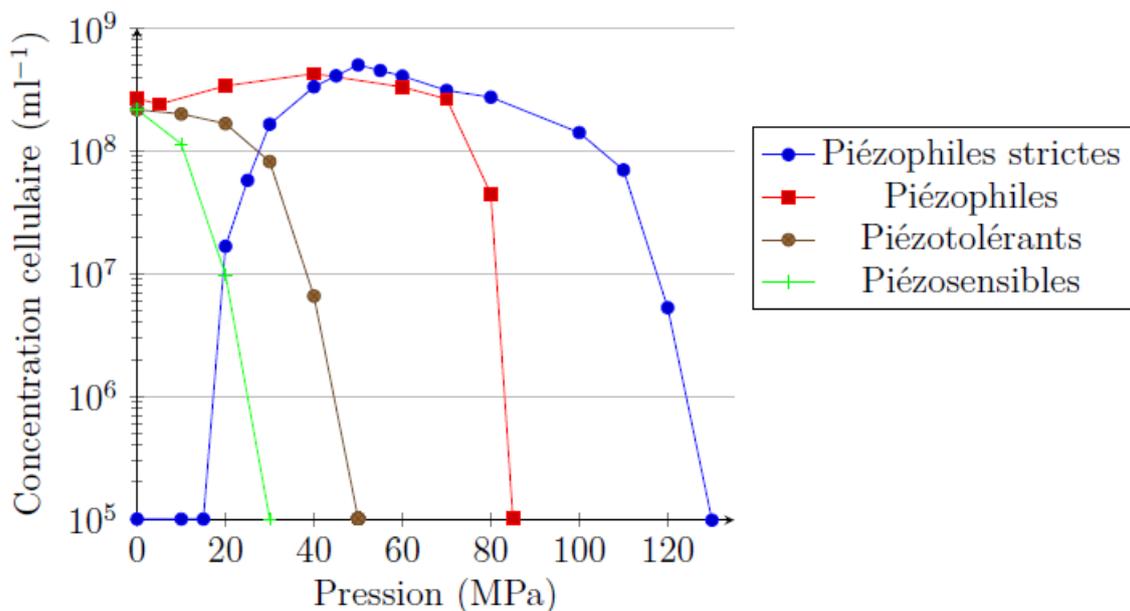


Figure 14 : Evolution de la densité cellulaire des micro-organismes en fonction de la pression hydrostatique de culture. (Birrien, 2018) modifiée d'après (Zeng et al., 2009).

Les hautes pressions hydrostatiques impactent la fluidité membranaire, la mobilité cellulaire, la structure des protéines et des ADN ainsi que les processus de traduction (Bartlett, 2002; Oger & Jebbar, 2010). Trois mécanismes permettant aux micro-organismes de s'adapter aux variations de pressions hydrostatiques ont été proposés : l'ajustement des gènes exprimés pour compenser la perte de l'activité biologique (Campanaro et al., 2005), l'expression de gènes spécifiques (Michoud & Jebbar, 2016;

Vannier et al., 2015) ainsi que l'adaptation structurale des biomolécules afin de les rendre plus piézorésistantes (Kato & Hayashi, 1999). A ce jour une cinquantaine d'organismes piézophiles ou piézotolérants ont été isolés (49 en début 2018 avec 33 bactéries et 16 archées) (Birien, 2018). La principale raison est la difficulté technique pour les isoler et les caractériser. Cependant au regard de la diversité des optima de croissance de température et de pression hydrostatique des souches caractérisées (FIGURE 15), la diversité de micro-organismes piézophiles pourrait être importante.

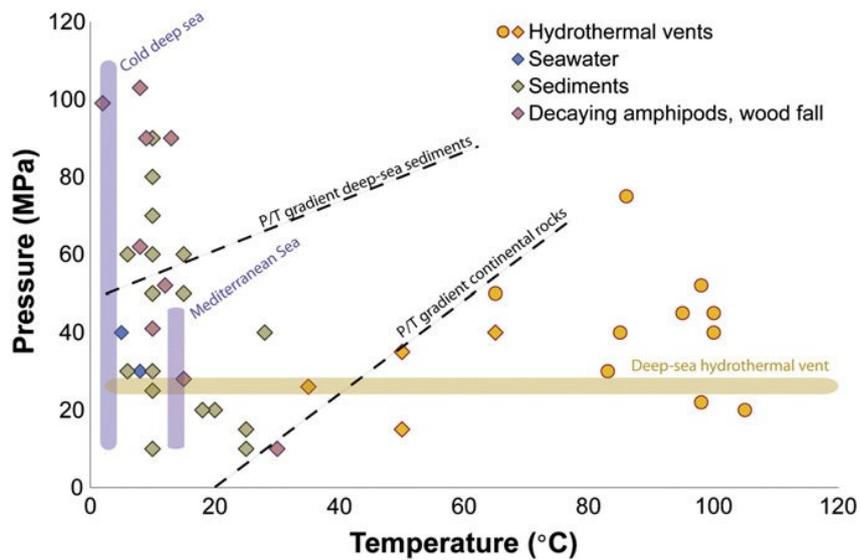


Figure 15 : Optima de pression et de température de souches caractérisées. La couleur indique l'origine des bactéries (triangles) et des archées (cercles) isolées de source hydrothermale (jaune), d'eau de mer (bleu), de sédiment (gris) ou de matière organique en déposition (rose). (Picard & Daniel, 2013).

1.3. Diversité des métabolismes microbiens

1.3.1 Généralité sur le métabolisme et Principe de base de la thermodynamique

Les cellules constituent un système ouvert qui est caractérisé par des entrées et sorties continues de matière et d'énergie depuis l'environnement proche dont la finalité est la conservation et reproduction cellulaire. Elles sont dotées de systèmes particuliers qui transforment l'énergie chimique ou physique en énergie biologiquement utile pour effectuer un travail. Le métabolisme correspond à l'ensemble des réactions biochimiques se déroulant dans une cellule. Il comprend les processus du catabolisme (générateurs d'énergie, souvent de dégradation) et de l'anabolisme (synthèse de molécules organiques complexes, consommateurs d'énergie).

1.3.1.1. Catabolisme

Une réaction chimique peut se définir comme la transformation d'espèces chimiques, appelées les réactifs, en produits. Toute réaction chimique s'accompagne d'un changement énergétique. Alors qu'une partie est dissipée en chaleur, l'autre partie nommée « enthalpie libre » ou ΔG (ou encore énergie de Gibbs) est disponible pour un travail. Une réaction avec un $\Delta G < 0$ libère de l'énergie et est qualifiée d'exergonique au contraire d'une réaction avec un $\Delta G > 0$ qui en nécessite et qui est qualifiée d'endergonique. Il est possible de calculer le ΔG° d'une réaction de plusieurs manières. La première manière consiste à utiliser l'énergie libre de formation de chacun des réactifs et des produits (G_f°), c'est-à-dire de l'énergie mise en jeu lors de la formation d'une molécule à partir des éléments chimiques la constituant.

$$\Delta G^\circ = \sum G_f^\circ (\text{Produits}) - \sum G_f^\circ (\text{Réactifs})$$

La plupart des réactions du métabolisme sont des réactions d'oxydoréduction impliquant un transfert d'électrons. Le composé donneur d'électron (qui s'oxyde) cède un ou plusieurs électrons au composé accepteur d'électrons (qui se réduit). Le potentiel de réduction d'un couple E° (exprimé en Volt) exprime l'aptitude du donneur d'électrons à céder ces électrons. Plus le E° est négatif, plus le donneur est capable de fournir des électrons. La seconde manière de calculer le ΔG° d'une réaction est d'utiliser les potentiels redox (E°) des couples engagés. Plus la différence entre le potentiel de réduction du couple du donneur d'électron et de celui du couple de l'accepteur sera importante, plus l'énergie disponible le sera aussi.

$$\Delta G^\circ = -nF\Delta E^\circ$$

Avec n le nombre d'électrons transférés au cours de la réaction ; F la constante de Faraday ($96,552 \text{ kJ V}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) et ΔE° la différence entre les potentiels redox des deux couples impliqués (en V).

Le ΔG° est calculé pour des conditions standards à savoir pour une température de 25 °C (soit 298,15 K), un pH de 7, à pression atmosphérique et pour des concentrations molaires des réactifs et des produits de 1M. Il est possible de prendre en considération les conditions réelles de la réaction en calculant le ΔG selon la formule :

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln Q_r$$

Avec R la constante universelle des gaz parfaits = 8,314 J mol⁻¹ K⁻¹ ; T la température à laquelle la réaction s'effectue (en Kelvin), la concentration des produits et réactifs en mole L⁻¹ et Q_r le quotient de réaction.

L'énergie libérée par les réactions d'oxydation du catabolisme n'est pas directement utilisée par les réactions de réduction de l'anabolisme mais est transférée par des chaînes de transport d'électrons (NADH, FADH, Ferrédoxine, ...). De cette manière, il est possible de transférer de l'énergie entre des processus spatialement séparés. La conservation d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (molécule universelle de conservation de l'énergie) est possible par un mécanisme chimiosmotique qui implique la génération d'un gradient ionique électrochimique (H⁺, Na⁺) au travers de la membrane cytoplasmique et qui conduit à la production d'ATP par une ATP synthase (Mayer & Müller, 2014; Thauer et al., 1977). L'ATP synthase est une enzyme membranaire universelle qui synthétise de l'ATP à partir du gradient électrochimique ionique, d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique selon la réaction de la phosphorylation de l'ADP en ATP : ADP + Pi ↔ ATP + H₂O ($\Delta G^\circ = +31,8$ kJ mol⁻¹). Les micro-organismes ont différentes stratégies de synthèses d'ATP (phosphorylation oxydative, fermentation, glycolyse, ...) avec une grande variété d'enzymes membranaires qui couple des réactions exergoniques à la translocation d'ions.

1.3.1.2. Anabolisme

Il est possible de déterminer le type trophique d'un micro-organisme à partir de son métabolisme (catabolisme : la source d'énergie et nature du donneur d'électron ; et de son anabolisme : source de carbone) (TABLEAU 2). Il existe deux sources d'énergies exploitées par les êtres vivants : l'énergie lumineuse (par les organismes dit phototrophes qui utilise l'énergie des photons grâce à des pigments photosynthétiques) et l'énergie chimique qui provient de réaction d'oxydoréduction de composés chimiques par les chimiotrophes. Le réseau trophique de l'écosystème hydrothermal profond (zone aphotique) repose sur la chimiosynthèse microbienne contrairement aux écosystèmes présents à la surface qui reposent sur la photosynthèse. Il est à noter que des pigments photosynthétiques ont été découverts chez *Citromicrobium bathyomarinum* une bactérie isolée du panache d'un fumeur noir faisant suggérer une utilisation des radiations électromagnétique comme source d'énergie (Beatty et al., 2005; Yurkov et al., 1999).

Les chimiotrophes peuvent être différenciés selon la nature de leur donneur d'électrons. Lorsqu'il s'agit d'un composé minéral/inorganique (dépourvu de carbone réduit comme l' H_2 , $Fe(II)$, NH_4^+), ils sont qualifiés de chimiolithotrophes et lorsqu'il s'agit de composé organique (formé principalement de carbone réduit comme le glucose et l'acétate) de chimioorganotrophes. Lorsque la source de carbone est minérale (principalement CO_2), le type trophique est autotrophe. Lorsque la source de carbone est organique alors le type de trophique est hétérotrophe. Certains micro-organismes sont mixotrophes c'est-à-dire qu'en fonction des conditions ils peuvent être autotrophes ou hétérotrophes ce qui leur procure un avantage sélectif par rapport aux auto/hétéro-trophe obligatoires. Il existe également des mixotrophes par rapport à leurs sources d'énergies qui sont à la fois litho/organo-trophe.

Les potentiels donneurs (H_2 , H_2S , S , $S_2O_3^{2-}$, $S_4O_6^{2-}$, CH_4 , Fe^{2+} , ...) et accepteurs d'électrons (O_2 , Fe^{3+} , CO_2 , CO , NO_3^{2-} , NO_2^- , SO_4^{2-} , SO_3^{2-} , ...) disponibles au sein des sources hydrothermales profondes sont très variés (TABLEAU 3) Les calculs thermodynamiques des réactions redox permettent de prédire le rendement énergétique selon l'abondance et la disponibilité de ces substrats qui dépendent principalement de la géochimie du fluide ainsi que de son degré de dilution avec l'eau de mer (Amend & Shock, 2001; McCollom & Shock, 1997). Ainsi à faible température, les métabolismes oxydatifs (oxydation du fer, soufre, méthane, ...) sont les plus exergoniques tandis qu'à hautes températures ce sont les métabolismes de réduction (du SO_4^{2-} , méthanogenèse, du S , ...) qui ont les plus hauts potentiels énergétiques.

Tableau 2 : Terminologie des différents types trophiques des micro-organismes.

Source d'énergie	Donneur d'électron	Source de carbone
Lumière : <i>photo-</i>	Inorganique : <i>litho-</i>	CO_2 : <i>auto-trophe</i>
Chimique : <i>chimio-</i>	Organique : <i>organo-</i>	C organique : <i>hétéro-trophe</i>

Tableau 3 : Réactions redox communément associées aux écosystèmes hydrothermaux. (Orcutt et al., 2011).

Pathway	Reaction	ΔG° (kJ/mol) ^a
Oxic respiration	$CH_2O + O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O$	-770
Denitrification	$CH_2O + 4/5NO_3^- \rightarrow 1/5CO_2 + 2/5N_2 + 4/5HCO_3^- + 3/5H_2O$	-463
MnO_2 reduction	$CH_2O + 3CO_2 + H_2O + 2MnO_2 \rightarrow 2Mn^{2+} + 4HCO_3^-$	-557
$Fe(III)$ oxide reduction	$CH_2O + 7CO_2 + 4Fe(OH)_3 \rightarrow 4Fe^{3+} + 8HCO_3^- + 3H_2O$	-697
Sulfate reduction	$CH_2O + 1/2SO_4^{2-} \rightarrow HCO_3^- + 1/2H_2S$	-98
Sulfate reduction (from methane)	$CH_4 + SO_4^{2-} \rightarrow HCO_3^- + HS^- + H_2O$	-33
Methanogenesis (from acetate)	$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$	-24
Methanogenesis (from H_2/CO_2)	$H_2 + 1/4HCO_3^- + 1/4H^+ \rightarrow 1/4CH_4 + 3/4H_2O$	-57
Fermentation (from ethanol)	$CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3COOH + 2H_2$	-181
Fermentation (from lactate)	$CH_3CH_2COO^- + 3H_2O \rightarrow CH_3COOH + HCO_3^- + 3H_2$	-1,075
Acetogenesis	$H_2 + 1/2CO_3^{2-} + 1/4H^+ \rightarrow 1/4CH_3COO^- + H_2O$	-90
Hydrogen oxidation	$H_2 + 1/2O_2 \rightarrow H_2O$	-263
Methane oxidation	$CH_4 + 2O_2 \rightarrow CO_2 + 2H_2O$	-859
Sulfide oxidation	$H_2S + 2O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+$	-750
	$H_2S + 8/5NO_3^- \rightarrow SO_4^{2-} + 4/5N_2 + 4/5H_2O + 2/5H^+$	-714
$Fe(II)$ oxidation	$Fe^{2+} + 1/4O_2 + H^+ \rightarrow Fe^{3+} + 1/2H_2O$	-48
	$Fe^{2+} + 1/5NO_3^- + 6/5H^+ \rightarrow Fe^{3+} + 3/5H_2O + 1/10N_2$	-44
	$Fe^{2+} + MnO_2 + 2H^+ \rightarrow Fe^{3+} + MnO + H_2O$	ND
$Mn(II)$ oxidation	$Mn^{2+} + O_2 \rightarrow MnO_2$	-149
	$Mn^{2+} + 2/5NO_3^- + 4/5H_2O \rightarrow MnO_2 + 1/5N_2 + 8/5H^+$	-79
Nitrification	$NH_4^+ + 2O_2 \rightarrow NO_3^- + 2H^+ + H_2O$	-302
Anammox	$NH_4^+ + NO_2^- \rightarrow N_2 + 2H_2O$	-345

1.3.2 Cycle du carbone

Le cycle du carbone est à la base de toute vie (Nelson et al., 2008). En effet, la chimie du vivant est organisée autour de l'atome du carbone en raison principalement de sa capacité à former quatre liaisons covalentes (partage entre deux atomes de deux électrons) avec n'importe quel autre élément chimique. En se liant les uns aux autres, les carbones forment un squelette de carbone (linéaire ou cyclique) sur lequel s'ajoutent des groupes fonctionnels donnant alors une grande diversité de molécule (protéines, sucres, acides nucléiques, lipides, ...). Le carbone est principalement présent dans l'atmosphère sous forme de CO_2 qui constitue donc la molécule centrale du cycle biogéochimique du carbone. Il est facilement soluble sous trois formes en équilibre dépendamment du pH (FIGURE 16) selon l'équation :

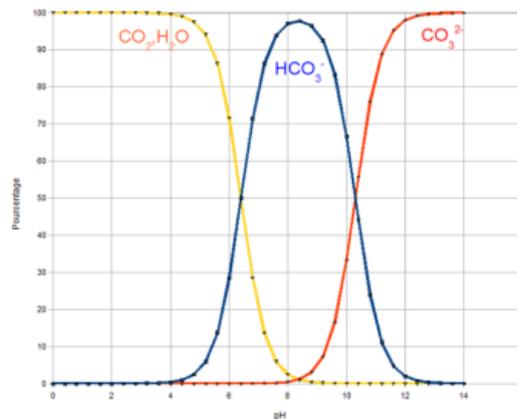
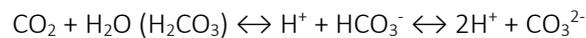


Figure 16 : Diagramme de prédominance des différentes espèces de CO_2 en fonction du pH. Libre en CO_2 hydraté ou liés sous forme d'ion bicarbonate HCO_3^- ou carbonate CO_3^{2-} . Source : <http://www.ac-grenoble.fr>.

Il s'agit de la principale source de carbone des autotrophes qui vont le transformer en carbone organique (matière organique sous forme particulaire et dissous ou également en méthane) (FIGURE 17). Les molécules organiques sont aussi bien assimilées par les hétérotrophes avec les réactions anaboliques qu'utilisées par les organotrophes dans des réactions cataboliques dans lesquels il peut être « reminéralisé » en carbone inorganique ($(\text{CH}_2\text{O})_n = \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$). Le méthane est produit par les méthanogènes et est dégradé par les méthanotrophes.

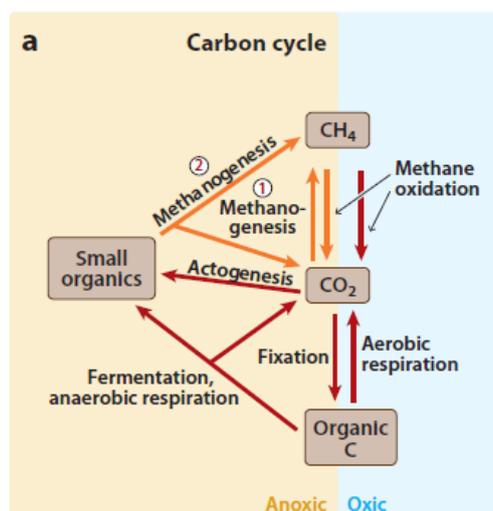


Figure 17 : Cycle biogéochimique du carbone. (Offre et al., 2013).

1.3.2.1. Assimilation du carbone

L'assimilation du carbone inorganique par les micro-organismes chimiolithoautotrophes est à la base de la chaîne trophique des sources hydrothermales profondes (Dang & Chen, 2017; Falkowski et al., 2008; Nakagawa & Takai, 2008; Polz et al., 1998; Wirsén et al., 1993). Les fluides hydrothermaux peuvent être enrichis en CO₂, alors que la concentration moyenne de l'eau de mer est 2.3 mM celle-ci peut atteindre 28mM dans un fluide du champ hydrothermal Lucky Strike (Charlou et al., 2002).

Il est parfois suggéré que la majorité de la production primaire est réalisée par les micro-organismes symbiotiques (Jeanthon, 2000; Polz & Cavanaugh, 1995) mais certaines études suggèrent que la contribution des organismes de la subsurface (McNichol et al., 2018) et du panache pourrait également être importante (Maruyama et al., 1998).

Plusieurs voies d'assimilation du carbone ont été identifiées chez les micro-organismes vivant au niveau des sources hydrothermales (FIGURE 18) (Hügler & Sievert, 2010; Nakagawa & Takai, 2008) : le cycle de Calvin-Benson-Bassham (CBB), le cycle inverse de l'acide citrique ou reductive tricarboxylic acid (rTCA), la voie reductive acetyl coenzyme A ou voie de Wood Ljungdhal (WL), le cycle du 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate (3-HP/4-HB) et le cycle du dicarboxylate/4-Hydroxybutyrate (DC/4-HB).

Cette diversité permet aux micro-organismes d'occuper différentes niches écologiques. En effet, chacune de ces voies va présenter des rendements et des cinétiques contrôlés par les conditions physico-chimiques de l'environnement où se trouve le micro-organisme. Ainsi, certaines voies d'assimilation seront plus efficaces dans certains habitats. Par exemple, les micro-organismes colonisant les niches aérobies fixent le carbone en utilisant des voies qui ne possèdent pas d'enzymes sensibles à

l'oxygène comme les cycles de CBB, du 3-HP et du 3-HP/4-HB. Les anaérobies strictes et micro-aérobies quant à elles utilisent les cycles du rTCA et du DC/4-HB. Elles requièrent d'ailleurs moins d'énergie pour fixer une molécule de CO₂ (Une molécule d'ATP consommée par molécule de CO₂ fixée pour le cycle du rTCA voire aucune pour la voie de WL, pour trois molécules pour celui du CBB).

Le cycle de Calvin ou encore cycle réducteur des pentoses phosphates est le plus important des écosystèmes continentaux ainsi que des zones euphotiques et n'est retrouvé que chez les mésophiles des zones périphériques des sources hydrothermales (principalement des *Gammaproteobacteria* et *Zetaproteobacteria*). L'instabilité thermique de certains de ces intermédiaires qui se transforment en composés toxiques (comme le glyceraldehyde-3-phosphate qui devient du methylglyoxal) pourrait expliquer l'absence de ces cycles dans les zones de hautes températures (Berg, 2011; Imanaka et al., 2002; Phillips & Thornalley, 1993). L'enzyme clé de ce cycle, la RuBisCO dont 4 formes de ont été décrites (Tabita et al., 2008) : les formes I et II présentes chez les plantes, les algues et chez certaines bactéries opérant le CBB, et les formes II/III et III principalement retrouvées chez les archées qui ne réalisent pas le cycle de CBB. Les analyses génomiques ont montré que la forme III est largement distribuée au sein des archées, présentes chez toutes les *Thermococcales*, *Archaeoglobales*, *Methanomicrobiales* et *Methanosarcinales*, ainsi que chez certaines *Methanococcales*, *Desulfurococcales* et *Thermoproteales* (Aono et al., 2012). La fonction de la RuBisCo serait d'assimiler des ribonucléotides chez les hétérotrophes (Aono et al., 2015; Erb & Zarzycki, 2018; Sato et al., 2007) et dans la voie réductrice hexulose-phosphate chez les méthanogènes (Kono et al., 2017).

Le cycle inverse de l'acide citrique ou cycle rTCA (Evans et al., 1966) est selon de nombreuses études le cycle dominant des sources hydrothermales profondes (Campbell & Cary, 2004). Il s'agit essentiellement de la réversion du cycle de Krebs par lequel la plupart des hétérotrophes aérobies oxydent la matière organique. Les micro-organismes fixant le carbone de cette manière occupent des zones plus réduites que celles utilisant le cycle de CBB, et cela est potentiellement dû à la sensibilité à l'oxygène de certaines de ces enzymes comme la 2-oxoglutarate:ferrodoxin oxydoréductase (Oor) ou encore la pyruvate synthase (Berg et al., 2010; Nakagawa et al., 2005). Les trois enzymes clé de ce cycle sont la fumarate réductase (Frd), la Oor et l'ATP dépendante citrate lyase (Acl). Ce cycle est utilisé par les bactéries symbiotiques sulfo-oxydantes de la famille des *Epsilonproteobacteria* (*Sulfurimonas*, *Hydrogenimonas*, *Caminibacter*, *Nautilia*, *Nitratifractor*, *Nitratiruptor*, *Sulfurovum*, *Thioreductor*, *Arcobacter*) (Campbell et al., 2006), les bactéries colonisant les cheminées du phylum des *Aquificales* (des genres *Persephonella*, *Aquifex*, *Balnearium*, *Desulfurobacterium*, *Thermovibrio* (Hügler et al., 2007) et certaines *Deltaproteobacteria* sulfato-réductrice comme *Desulfurobacter hydrogenophilus* (Hügler et al., 2005; Nakagawa & Takai, 2008; Takai et al., 2005).

A ce jour, aucune souche utilisant le cycle du 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate (3-HP/4-HB) n'a été isolée des sources hydrothermales profondes. Il a initialement été caractérisé chez la *Sulfolobale* thermoacidophile (pH optimal de 2) *Metallosphaera sedula* retrouvée au niveau des sources chaudes et acides terrestres (Berg et al., 2007). Son enzyme clé, la 4-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase, a été identifiée dans le génome de la *Crenarchaeota* marine group I *Cenarchaeum symbiosum* (Hallam et al., 2006) symbionte de l'éponge *Axinella mexicana* (Preston et al., 1996).

Le cycle dicarboxylate/4-hydroxybutyrate DC/4-HB implique plusieurs enzymes du cycle du rTCA (les enzymes impliquées dans les étapes convertissant l'oxaloacétate au succinyl-CoA) et du cycle 3HP-4HB (les enzymes impliquées dans les étapes convertissant le succinyl-CoA en acétyl-CoA (Huber et al., 2008; Jahn et al., 2007). Il ne possède pas d'enzymes spécifiques ce qui complique sa détection (Hügler & Sievert, 2010). Cette voie initialement décrite chez la *Crenarchaeota* *Ignicoccus hospitalis* de l'ordre des *Desulfurococcales* (Huber et al., 2008), et a également été détecté chez des membres de l'ordre des *Thermoproteales* comme *Pyrobaculum fumarii* ou encore *Pyrobaculum islandicum* (Ramos-Vera et al., 2009). Ces organismes hyperthermophiles sont principalement détectés au niveau des cheminées hydrothermales.

Le cycle du 3-hydroxypropionate (3-HP ou cycle du malyl-CoA) a été identifié uniquement chez des bactéries phototrophes membres des *Chloroflexaceae* comme *Chloroflexus aurantiacus* (STRAUSS & FUCHS, 1993; Zarzycki et al., 2009). Les enzymes clés de ce cycle sont l'acétyl-CoA/propionyl-CoA carboxylase, la malonyl-CoA réductase et la propionyl-CoA synthase. Elles ne sont jamais toutes détectées dans les métagénomés d'échantillons de cheminées (Xie et al., 2011). Il n'y a aucune donnée supportant la réalisation de ce cycle au niveau des sources hydrothermales profondes (Berg, 2011). Enfin la voie réductrice de l'acétyl-CoA (ou WL) (Ljungdahl, 2009; Ragsdale & Pierce, 2008) est la voie de fixation du CO₂ la plus énergétiquement favorable avec une réduction directe du CO₂ par l'H₂ sans nécessiter d'adénosine-5'-triphosphate (ATP). Elle se décompose en deux branches : la branche carbonyl avec une réduction d'une molécule de CO₂ en CO et la branche méthyl avec une réduction d'une molécule de CO₂ à un résidu méthyl d'un cofacteur conduisant à la synthèse d'acétyl-CoA. Cette voie est principalement retrouvée chez des organismes anaérobiques comme les bactéries acétogènes ou chez les archées méthanogènes des classes de *Methanococcales* (par exemple : genre des *Methanocaldococcus* et *Methanoterris*) et de *Methanopyrales* qui constituent un des groupes métaboliques les plus ubiquistes des environnements hydrothermaux. Elle est retrouvée chez les bactéries acétogènes mais à ce jour aucune souche homoacétogène n'a été isolée des sources hydrothermales profondes. La demande en métal, en cofacteur, de conditions anaérobies strictes, et de substrats avec faible potentiel redox comme l'H₂ ou CO₂ limite la réaction aux niches anoxiques.

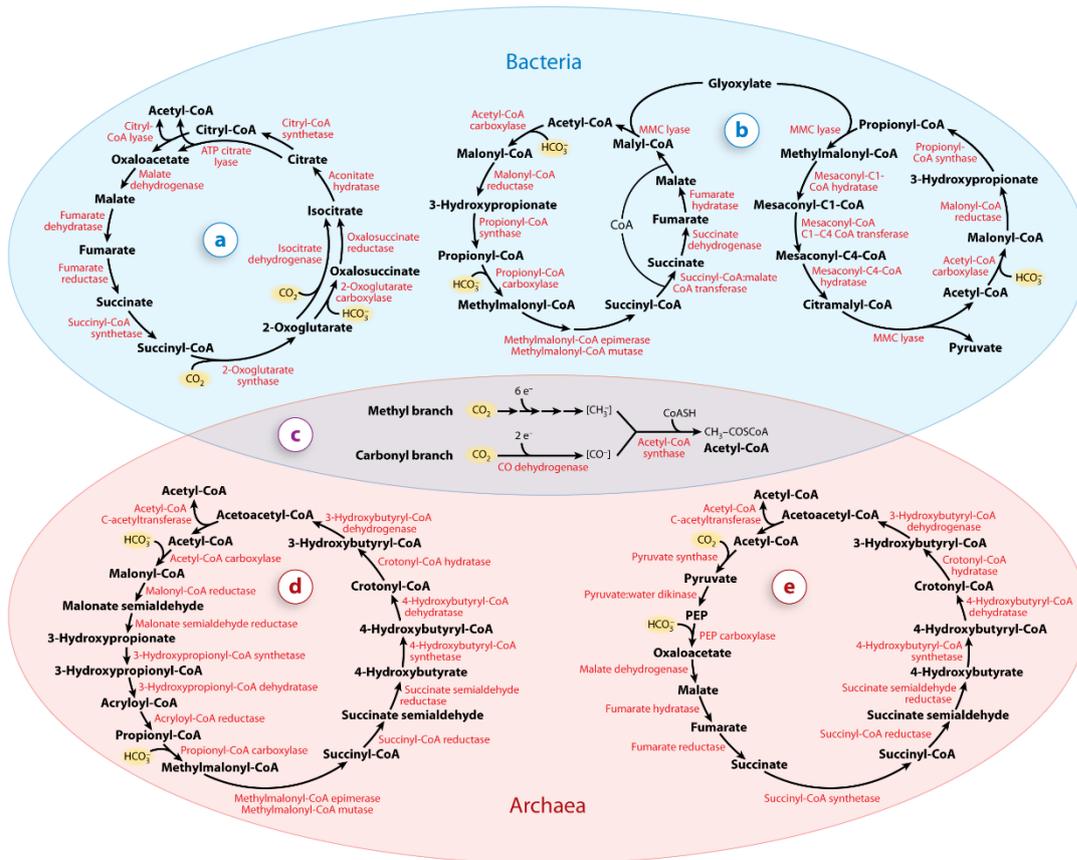


Figure 18 : Voies alternatives de fixation autotrophe du CO₂ : (a) cycle inverse de l'acide citrique, (b) cycle du 3-hydroxypropionate, (c) la voie réductrice de l'acétyl-CoA, (d) le cycle du 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate, (e) cycle dicarboxylate/4-hydroxybutyrate. Les enzymes sont indiquées en rouge. (Hügler & Sievert, 2010).

Certains micro-organismes possèdent les enzymes de plusieurs voies de fixations. Par exemple, *Archaeoglobus lithotrophicus*, autotrophe facultative, utilise uniquement la voie de WL mais possède également des gènes codant pour certaines enzymes clés d'autres voies de fixations comme celui du DC/4-HB ou de CBB (Estelmann et al., 2011). C'est également le cas de la *Gammaproteobacteria* Candidatus *Endoriftia persephone*, endosymbionte de *Riftia pachyptila* qui possède des enzymes du cycle du rTCA et celles d'une partie du cycle de CBB (Markert et al., 2007; Robidart et al., 2008). La coexistence de différentes voies de fixation de carbone permet ainsi de pouvoir s'adapter aux conditions environnementales, ainsi le CBB serait utilisé lorsque l'énergie devient limitée et celui du rTCA lorsque les conditions deviennent plus favorables.

1.3.2.2. Minéralisations du carbone organique

Il existe différents mécanismes de conservation de l'énergie à partir de la dégradation de composés organiques par les chimioorganotrophes selon la nature de l'accepteur d'électrons. Lorsque celui-ci provient d'un composé organique dérivé du donneur d'électron, il s'agit de fermentation. Lorsque l'accepteur est exogène alors il s'agit de respiration, qui peut être aérobie (O_2 comme accepteur terminal) ou alors anaérobie (tout autre accepteur que l' O_2 comme le nitrate, le S^0 , le fer, ...) (Amend & Shock, 2001).

La matière organique simple ou complexe peut être de différentes formes (de sucres, de lipides, de protéines, ...). La première étape consiste en l'hydrolyse des molécules complexes pour obtenir des molécules plus simples utilisables : les protéines en acides aminés, les polysaccharides en monosaccharides et les lipides en glycérol et en acides gras. Ensuite ils sont convertis en intermédiaires simples tels que l'acétyl-CoA ou encore en pyruvate. Enfin ces derniers vont être oxydés et convertis en CO_2 au cours du cycle de Krebs (ou cycle des acides tricarboxyliques) (FIGURE 19).

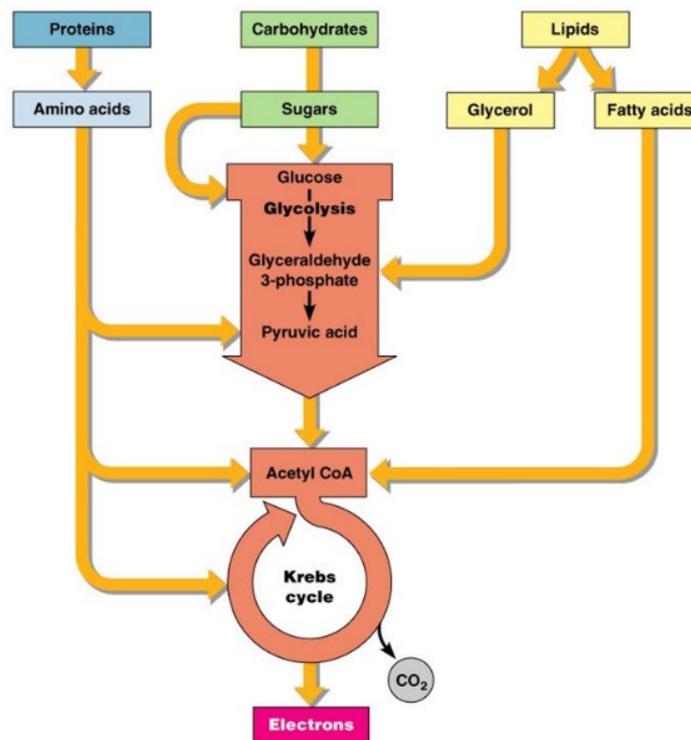


Figure 19 : Représentation schématique simplifiée du catabolisme énergétique aérobie. (Brock et al., 2003).

La majorité des souches hyperthermophiles hétérotrophes utilisent les protéines comme substrat pour leur catabolisme (Schönheit & Schäfer, 1995) qui sont soit oxydés en CO_2 soit fermentés en acétate ou autre produit. Cependant quelques-unes ont également la capacité d'utiliser des voies saccharolytiques

(Kengen & Stams, 1994). Il existe 3 voies métaboliques principales d'oxydation du glucose que sont la voie d'Embden Meyerhof (EM ou voie de la glycolyse), la voie des pentoses phosphates et la voie d'Entner-Doudoroff. Alors que les bactéries comme les *Thermotogales* utilisent la voie « classique » d'EM, les archées utilisent une voie modifiée (Sakuraba & Ohshima, 2002). Certaines archées du genre *Thermococcales* possèdent en plus de la voie d'EM, une voie des pentoses phosphates (Xavier et al., 2000).

Dans ces écosystèmes, de nombreuses espèces hétérotrophes ont été isolées. Les archées hétérotrophes de ces environnements sont principalement représentées par les hyperthermophiles anaérobies de l'ordre des *Thermococcales* (Euryarchaeota) et des membres du phylum Crenarchaeota appartenant aux genres *Pyrodictium* (Pley et al., 1991) et *Staphylothermus* (Fiala & Stetter, 1986). Une archée hyperthermophile micro-aérophile stricte a également été décrite, *Aeropyrum camini* (Nakagawa et al., 2004). Ce sont des organotrophes fermentaires utilisant comme substrat principalement des peptides avec production d'acides organiques (acétate, propionate, isobutyrate, isovalérate), de CO₂ et de l'H₂. Des micro-organismes lithoautotrophes comme *Geoglobus ahangari* peuvent, en plus d'utiliser l'H₂ comme donneur d'électrons, oxyder de nombreux substrats organiques comme le pyruvate ou l'acétate (Kashefi et al., 2002). De nombreuses espèces de Bactéries organotrophes (hyper)-thermophiles ont également été isolées parmi l'ordre des *Thermotogales* (des genres des *Thermosipho*, *Thermotoga*, *Marinitoga* (Takai & Horikoshi, 2000; Wery et al., 2001) avec croissance préférentielle sur polysaccharides. C'est également le cas de certaines Firmicutes (*Caminicella*) (Alain et al., 2002). Bien que de nombreuses espèces d'hétérotrophes aient été isolées de ces écosystèmes, leur rôle écologique a été peu étudié (Meier, 2016).

Il est proposé que les micro-organismes chimioolithoautotrophes constituent la base de la chaîne trophique de ces écosystèmes en fixant le carbone et le transférant aux organismes hétérotrophes (Jannasch & Mottl, 1985; Polz et al., 1998). Cependant comme le suggère Middelburg, la chimioautotrophie des écosystèmes hydrothermaux pourrait être principalement basée sur le recyclage de ce CO₂ issue de processus chimioorganotrophe et non sur le carbone d'origine abiotique (interaction eau-roche) (Middelburg, 2011). De plus de nombreux fluides hydrothermaux contiennent des molécules organiques de faible poids moléculaire comme des acides aminés (Lang et al., 2013), des méthane-thiols (Reeves et al., 2014) et du formate (McDermott et al., 2015) ainsi que des molécules plus complexes comme des hydrocarbures ou des composés polycycliques (Brault et al., 1988; Konn et al., 2009; Longnecker et al., 2018). Ces molécules peuvent avoir été générées par l'altération thermal de la biomasse microbienne ou de la matière organique dissoute mais également de manière abiotique au cours de la circulation hydrothermale (Lang et al., 2010; McDermott et al., 2015; Proskurowski et

al., 2008). Les organismes organotrophes pourraient ainsi utiliser directement les substrats organiques présents dans les fluides hydrothermaux.

1.3.2.3. Utilisation du méthane

Le méthane (CH₄) est le composé organique le plus simple avec un atome de carbone pour quatre atomes d'hydrogène. Le CH₄ peut être produit de manière abiogénique et de manière biogénique. La production de CH₄ abiogénique est principalement réalisée lors de dégradation thermique de la matière organique sous l'action de la pression et de la température ou par réaction de type Fischer Tropsch au cours de processus de serpentinisation. Ces réactions sont souvent présentes au niveau des systèmes hydrothermaux ultramafiques caractérisés par un affleurement du manteau terrestre. Ainsi de nombreux fluides hydrothermaux sont enrichis en CH₄ (Charlou et al., 1998; Jean-Baptiste et al., 1991; Welhan, 1988). Cependant plus de 75 % de la production de CH₄ est biogénique, réalisée à partir de la réduction du CO₂ ou de composés organiques de bas poids moléculaires comme l'acétate, le formate ou encore le méthanol sous l'action des archées méthanogènes (Whitman et al., 2006).

1.3.2.3.a Méthanogenèse

La méthanogenèse est la production de CH₄ réalisée par les archées méthanogènes, qui sont phylogénétiquement diverses et réparties en 8 classes parmi les *Euryarchaeota* : *Methanobacteriales*, *Methanocellales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanopyrales*, les *Methanomassiliicoccales* et les *Methanonatronarchaeia*. Une nouvelle possible classe d'*Euryarchaeota*, *Methanofastidiosa* a également été proposée (Nobu et al., 2016). Des études récentes basées sur des données de métagénomiques suggèrent que la méthanogenèse pourrait également être réalisée par des archées d'autres phyla comme ceux des *Bathyarchaeota* (Evans et al., 2015), des *Verstraetearchaeota* (Vanwonterghem et al., 2016), ou encore des *Crenarchaeota* (Wang et al., 2018). Les méthanogènes sont classées en trois groupes en fonction des types de substrats utilisés : les hydrogénotrophes réduisent des molécules de type CO₂ (CO₂, formate, ...) en présence d'H₂, les acétotrophes utilisent l'acétate et enfin les méthylotrophes utilisent des substrats comprenant des groupements méthylés (-CH₃) comme le méthanol ou encore la triméthylamine (FIGURE 20). Certaines comme *Methanosarcina acetivorans* peuvent utiliser les trois types de substrats (H₂/CO₂, acétate, méthylamine) (Galagan et al., 2002). Les mécanismes de conservation de l'énergie présentent des différences assez marquées comme par exemple l'utilisation de cytochromes (Thauer et al., 2008). Elles sont toutes anaérobies strictes et sensibles à de faibles concentrations en oxygène (Ferry, 2012).

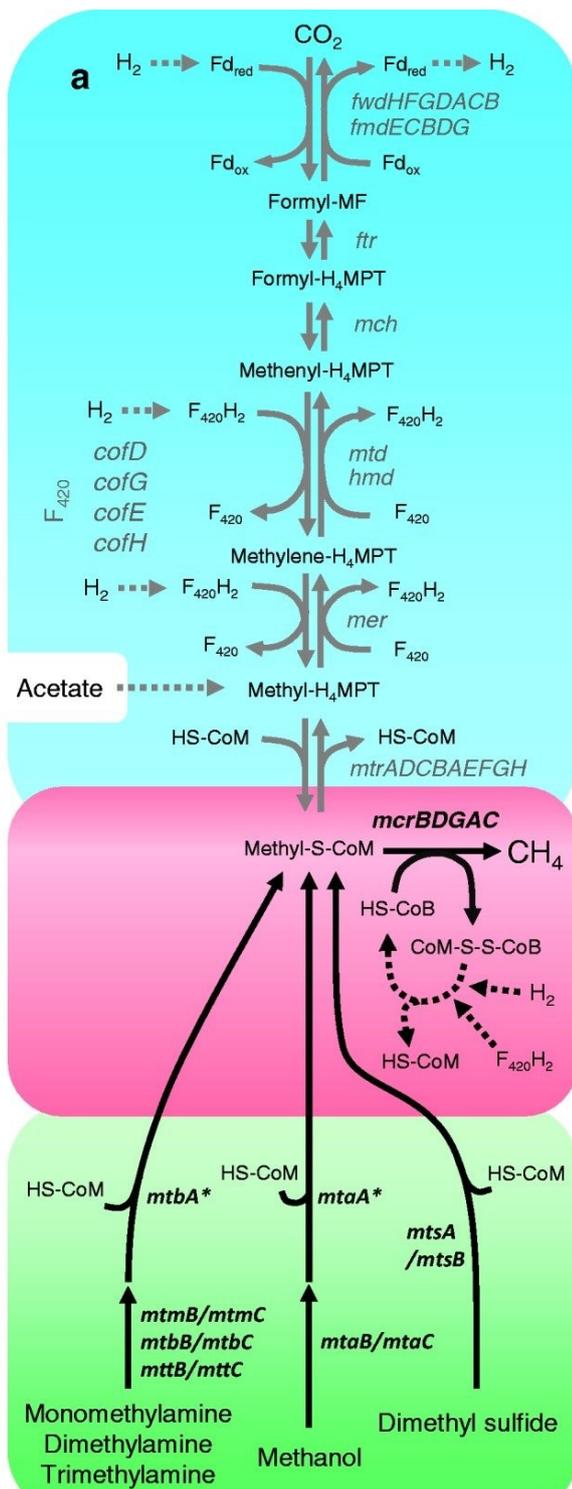


Figure 20 : Voies de la méthanogénèse. (Borrel et al., 2013).

Les méthanogènes sont en compétition avec d'autres micro-organismes pour l'utilisation d'H₂ ou encore d'acétate comme donneurs d'électrons, ainsi la méthanogénèse, thermodynamiquement moins favorable que la respiration de nombreux composés (par exemple : NO₃⁻, Mn(IV), Fe(III) et de SO₄²⁻). Ainsi les méthanogènes hydrogénotrophes et acétotrophes ne sont détectées que dans certaines zones d'un habitat où les métabolismes en compétitions sont limités par les trop faibles concentrations de donneurs d'électrons. Les méthanogènes présentes au niveau des cheminées hydrothermales appartiennent pour la plupart à l'ordre des *Methanococcales* (Balch et al., 1979) qui comporte 4 genres hydrogénotrophes : *Methanococcus*, *Methanocaldococcus*, *Methanothermococcus* et *Methanotorris*. Elles sont principalement détectées au niveau des sites ultramafiques où la teneur en H₂ des fluides est plus importante (résultat du processus de serpentinisation) (Flores et al., 2011; McCollom, 2007).

Ainsi de nombreuses méthanogènes hyperthermophiles ont été isolées de sources hydrothermales profondes comme *Methanococcus jannaschii*, isolée d'une cheminée de fumeur blanc, qui présente une température optimale de croissance de 85 °C (première souche isolée de ces environnements (Jones et al., 1983)) ou encore *Methanopyrus kandleri*, isolée d'une cheminée hydrothermale du bassin de Guaymas qui semble être capable de pousser à 122 °C et à 40 MPa de pression hydrostatique (Kurr et al., 1991;

Takai et al., 2008). Les méthanogènes des cheminées hydrothermales appartiennent pour la plupart à l'ordre des *Methanococcales* (Balch et al., 1979). Elles sont principalement retrouvées au niveau des sites ultramafiques où la teneur en H₂ des fluides est plus importante (résultat du processus de serpentinisation) (Flores et al., 2011; McCollom, 2007).

Ainsi de nombreuses méthanogènes hyperthermophiles ont été isolées de sources hydrothermales profondes comme *Methanococcus jannaschii*, d'une cheminée de fumeur blanc avec une température optimale de croissance de 85 °C (première souche isolée de ces environnements (Jones et al., 1983)) ou encore *Methanopyrus kandleri* isolée d'une cheminée hydrothermale du bassin de Guaymas qui semble être capable de pousser à 122 °C et à 40 MPa de pression hydrostatique (Kurr et al., 1991; Takai et al., 2008).

L'un des marqueurs phylogénétiques utilisé pour étudier les méthanogènes est le gène *mcrA* codant pour la sous-unité α de la Méthyl coenzyme M réductase (Friedrich, 2005). La MCR catalyse la réaction terminale de la méthanogénèse chez toutes les archées en libérant le CH_4 fixé sur la méthyl-coenzyme M (Reeve et al., 1997). En plus des méthanogènes, les ANME possèdent également le gène *mcrA* (Friedrich, 2005; Hallam et al., 2003). De nombreuses études ont ainsi mis en évidence la présence de méthanogènes dans de nombreux échantillons de sédiments et de cheminées issus de sources hydrothermales profondes (Dhillon et al., 2005; Kelley et al., 2005; Lever & Teske, 2015; Nercessian et al., 2005; Nunoura et al., 2010; Roussel et al., 2011).

1.3.2.3.b Méthanotrophie aérobie

La méthanotrophie aérobie, *i.e.* l'oxydation du CH_4 en CO_2 en aérobose, est réalisée par les méthanotrophes qui l'utilisent alors comme seule source de carbone et d'énergie. Ce groupe fonctionnel comprend uniquement des bactéries aérobies strictes divisées en trois classes : des *Gammaproteobacteria* de type I et X et des *Alphaproteobacteria* de type II (Trotsenko & Murrell, 2008). Les bactéries de type I et X utilisent la voie du ribulose monophosphate pour assimiler le carbone tandis que celle du type II utilisent la voie de la sérine (FIGURE 21).

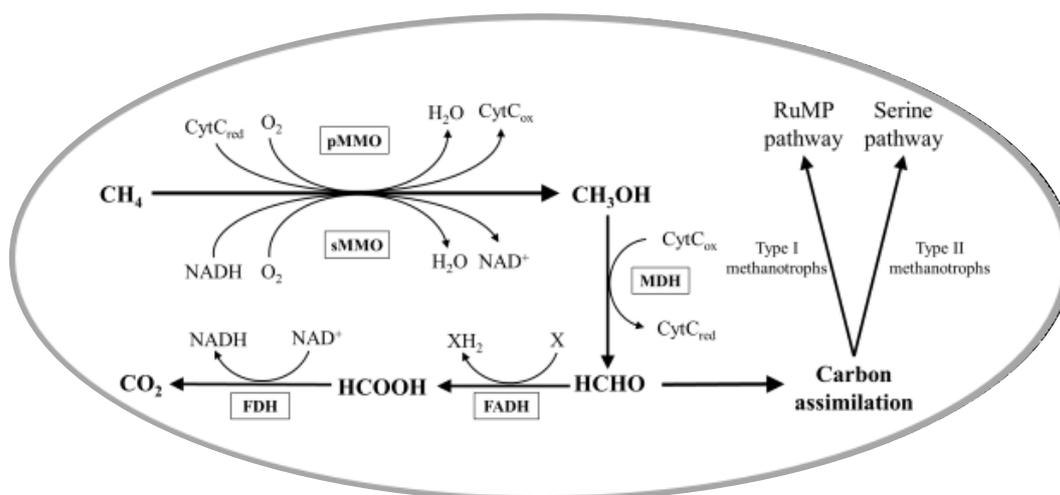


Figure 21 : Voies d'oxydation du CH_4 en CO_2 avec assimilation du formaldéhyde. (Bjorck et al., 2018) modifiée d'après (Hanson & Hanson, 1996).

Des mesures d'activité d'oxydation du CH₄ dans le panache du site Endeavour Segment (Juan de Fuca) (de Angelis et al., 1991) et dans des panaches et sédiments du site de Rainbow (Pimenov et al., 2000) ont permis de mettre en évidence la réalisation de ce processus dans ces écosystèmes. Il est réalisé aux interfaces oxiqne/anoxiqne lorsque l'oxygène et le CH₄ sont présents simultanément dans les zones superficielles des sédiments ou des édifices hydrothermaux ainsi que dans les panaches hydrothermaux. L'enzyme clé du processus est la méthane mono-oxygénase qui catalyse la conversion du CH₄ en méthanol. Deux formes de cette enzyme existent, la forme soluble (sMMO) et la forme membranaire particulaire (pMMO). Le gène *pmoA* codant pour la sous-unité β de la forme membranaire (McDonald & Murrell, 1997) est le marqueur moléculaire le plus utilisé, présent chez la très grande majorité de méthanotrophes à quelques rares exceptions comme les membres de la famille des *Beijerinckiaceae* (Hanson & Hanson, 1996; Knief, 2015). Ainsi des séquences de *pmoA* ont été détectées dans de nombreux et divers habitats : que ce soit au sein de cheminées et de sédiments du site de Rainbow (Nercessian et al., 2005; Roussel et al., 2011), de cheminées de carbonate de Lost city (Brazelton et al., 2006; Roussel et al., 2011), de cheminées et de fluides hydrothermaux d'Ashadze (Roussel et al., 2011), de tapis microbiens de Lucky Strike (Crépeau et al., 2011), de cheminées et de panache du site de TAG (Elsaied et al., 2004), de panache hydrothermal du bassin de Guaymas (Lesniewski et al., 2012), ou en association endosymbiotique chez les bivalves *Bathymodiolus* dans les tissus branchiaux à l'intérieur de bactériocytes en association ou non avec des thiotrophes (Cary et al., 1988; Distel et al., 1995; Duperron et al., 2006; Fujiwara et al., 2000; Pond et al., 1998) ou encore en association épisymbiotique de la crevette *Rimicaris exoculata* (Guri et al., 2012; Zbinden et al., 2001) ou du crabe *Shinkania crosnieri* (Watsuji et al., 2014). Bien que quelques souches dont *Methylothermobacter caldicurii* aient été isolées de sources hydrothermales côtières (45-50 °C de température optimale de croissance), aucune méthanotrophe thermophile n'a été isolée de sources hydrothermales profondes (Hirayama et al., 2014).

1.3.2.3.c Méthanotrophie anaérobie : AOM

L'oxydation anaérobie du méthane (AOM) est un processus réalisé par certaines *Euryarchaeota* appelées ANME (Anaerobic methanotrophic archaea). L'AOM couplée à la réduction des SO₄²⁻ est un des processus majeurs des sédiments marins anoxiques riches en CH₄ et en SO₄²⁻ au niveau des zones de transition méthane-sulfate (SMTZ) (Boetius et al., 2000; Holler et al., 2011; Vigneron et al., 2013). Les ANMEs réalisent ce processus en syntrophie non obligatoire avec des bactéries sulfato-réductrices (Milucka et al., 2012). Elles appartiennent à trois clusters phylogénétiquement distincts : les ANME-1, les ANME-2 et les ANME-3 (Knittel & Boetius, 2009). Les archées des groupes 2 et 3 sont

phylogénétiquement affiliées à l'ordre des *Methanosarcinales* tandis que ceux du premier groupe appartiennent à un nouvel ordre, distinct de ceux des *Methanosarcinales* et des *Methanomicrobiales*. Leurs partenaires bactériens appartiennent quant à elles aux genres *Desulfosarcina*, *Desulfococcus* et *Desulfobulbus* du groupe des *Deltaproteobacteria* (Lösekann et al., 2007; Schreiber et al., 2010). Il a également été identifié des *Betaproteobacteria* (non sulfato-réductrices) en association avec une faible partie d'un consortium de ANME-2 (Pernthaler et al., 2008). L'AOM peut avoir lieu sur une grande échelle de température (Biddle et al., 2012), en effet les ANME-1 ont été identifiées dans des environnements présentant un gradient de température important, entre 15 et 90 °C (Holler et al., 2011; Kallmeyer & Boetius, 2004; Vigneron et al., 2013). Cependant les ANME-2 et ANME-3 sont principalement détectées dans les environnements avec un gradient de température plus restreint < à 20 °C (Marlow et al., 2014; Orphan et al., 2001). Le mécanisme précis de ce processus n'est pas encore connu. Cependant l'une des hypothèses avancées est que l'oxydation du CH₄ est couplée à la respiration du SO₄²⁻ en S⁰ par les ANMEs, suivi par la dismutation du S⁰ en H₂S et en SO₄²⁻ par des partenaires microbiens. Elles permettent ainsi de garder une concentration faible de S⁰, rendant exergonique la réaction AOM des archées (Milucka et al., 2012). L'AOM pourrait également être couplée à la réduction de métaux comme le fer et le manganèse ou encore avec celle du Nitrate avec de meilleurs ΔG° (Beal et al., 2009; Haroon et al., 2013; Welte et al., 2016).

1.3.3 Cycle du fer

Le fer est un des éléments chimiques essentiels à la vie, principalement en raison son rôle biologique en tant qu'oligo-nutriment (Kappler et al., 2015). De par sa capacité à se charger et se décharger facilement, le fer est un des composés essentiels de certaines protéines (par exemple : cytochromes et ferrédoxines) impliquées dans le transfert d'électron des chaînes respiratoires. Le fer présente différents états oxydatifs, les deux principales formes étant le fer ferreux (Fe^{2+} ou Fe (II)) et le fer ferrique (Fe^{3+} ou Fe (III)). Sa solubilité est contrôlée par le pH et la présence d' O_2 ou encore de sulfures (FIGURE 22).

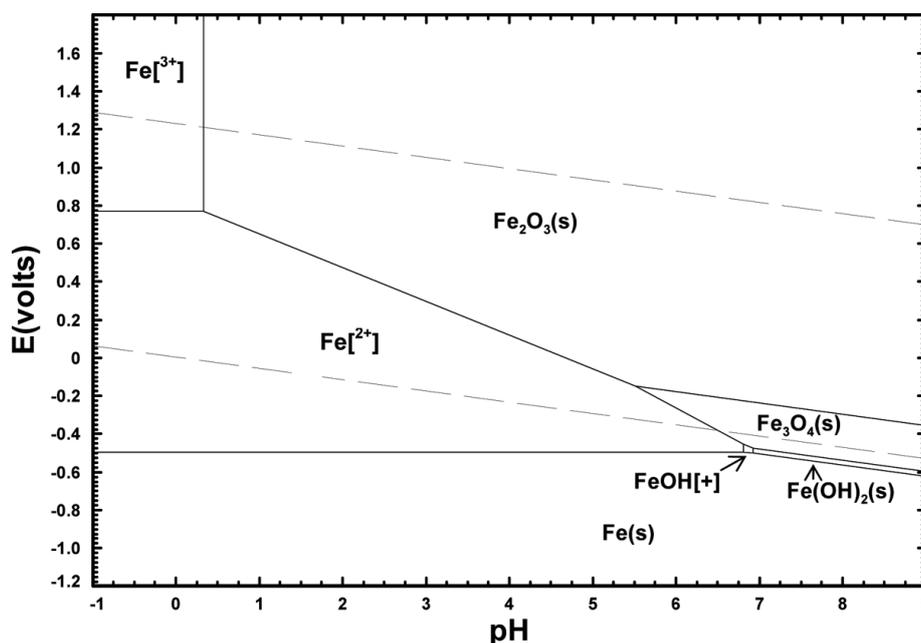


Figure 22 : Diagramme de Pourbaix du fer en solution aqueuse représentant en fonction du pH et de E ses différentes formes (ions, complexe, précipité,...) pour une température de 25 °C. (Eisele & Gabby, 2014).

En effet à pH neutre ou basique, il est principalement sous forme de minéral insoluble. La solubilité du fer (II) et du fer (III) augmente avec la diminution de pH (Stumm & Morgan, 1996). Le fer réagit avec l' O_2 pour former des oxyhydroxydes peu solubles et avec des sulfures, produisant des sulfures de fer (Hsu-Kim et al., 2008; Luther et al., 2003) (TABLEAU 4). Bien que le fer soit le quatrième élément le plus abondant de la croûte terrestre (après le O, le Si et le Al), sa concentration moyenne reste très faible dans les océans ($\approx 0,7 \text{ nmol.L}^{-1}$ de fer dissous) (Johnson et al., 1997). Cependant il est abondant au niveau des sources hydrothermales avec des fluides acides et chauds enrichis en fer (II) dissous qui peuvent présenter des concentrations élevées comme 24 mmol.L^{-1} sur le site de Rainbow (Charlou et al., 2002). Les fluides hydrothermaux constituent donc une source importante d'apport de fer pour l'écosystème océanique (Saito et al., 2013; Tagliabue et al., 2010).

Tableau 4 : Principaux minéraux de fer retrouvés en contexte hydrothermal. Modifié d’après (Kappler et al., 2015).

Minéral de Fe(II)	Minéral de Fe(III)	Minéral mix de Fe(II) / Fe(III)
Sidérite (FeCO_3)	Goethite ($\alpha\text{-FeO(OH)}$)	Magnétite (Fe_3O_4)
Vivianite ($\text{Fe}_2(\text{PO}_4)_3$)	Limonite ($\text{FeO(OH)} \cdot n\text{H}_2\text{O}$)	Greigite (Fe_3S_4)
Sulfure de fer (FeS)	Hématite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$)	
Pyrite, marcasite (FeS_2)	Maghémite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$)	
	Lépidocrocite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)	
	Akaganeite ($\beta\text{-FeO(OH,Cl)}$)	
	Ferrihydrite (Fe(OH)_3)	

Le fer (II) réduit émis au niveau des systèmes hydrothermaux est oxydé au contact de l’eau de mer en Fe (III) très insoluble, qui précipite sous forme d’importants dépôts d’oxydes de fer (Herzig & Hannington, 1995). Il peut être stabilisé au contact de matière organique le rendant biodisponible plus longtemps (Bennett et al., 2008; Toner et al., 2009). L’oxydation du fer ferreux Fe II et la réduction du fer ferrique Fe III constituent les deux réactions principales du cycle du fer (FIGURE 23).

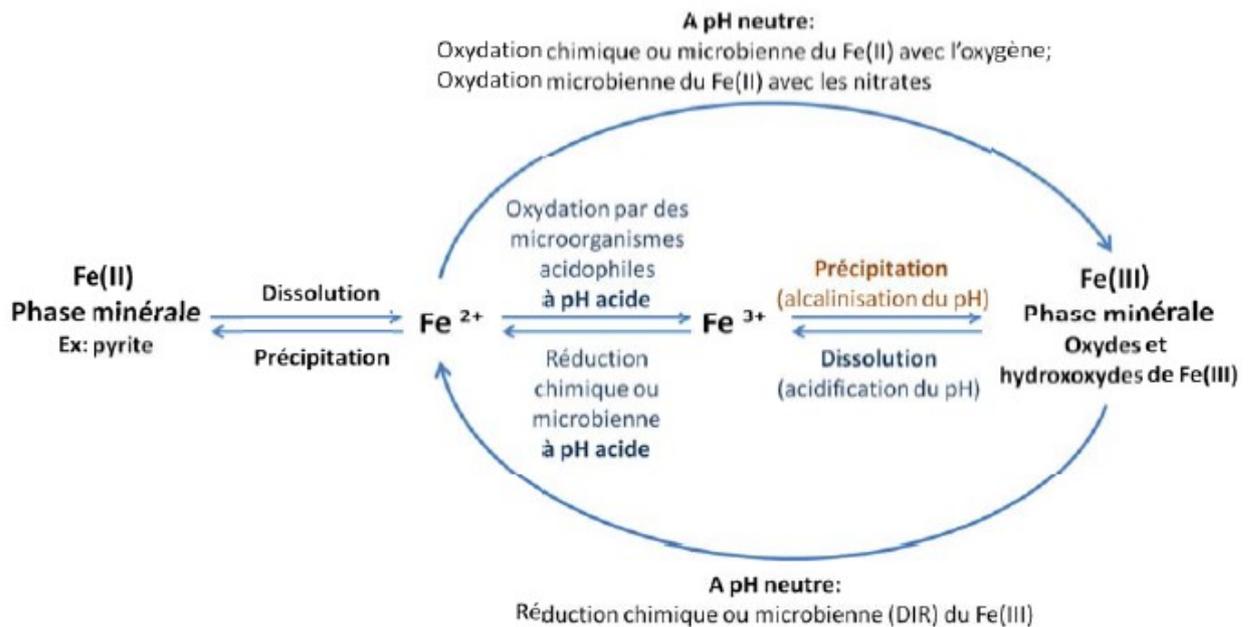


Figure 23 : Cycle biogéochimique du fer. DIR : Réduction dissimilative du fer (III) (dissimilatory iron reduction). (Callac et al., 2013) modifiée d’après (Kappler & Straub, 2005; Taylor & Konhauser, 2011).

1.3.3.1. Oxydation du fer (II)

Le fer ferreux (Fe (II)) est utilisé comme donneur d'électrons par les micro-organismes ferroxydants. Ce processus métabolique a longtemps été négligé du fait que la vitesse de réaction soit lente au contraire de la réaction abiotique, qu'elle nécessite l'oxydation d'une grande quantité de fer pour tirer assez d'énergie et de la précipitation instantanée du fer(III) produit en oxyhydroxyde de fer solide (King et al., 1995) qui oblige la cellule à réaliser la réaction à l'extérieur de sa membrane (Emerson et al., 2010). Les micro-organismes ferroxydants sont principalement présents dans les environnements microaérophiles de basse température, zones dans lesquelles le fer est sous sa forme la plus disponible pour les cellules (Luther III et al., 2001; Roden et al., 2004). L'oxydation du fer peut également être réalisée en anaérobiose couplé à la dénitrification (Edwards et al., 2003). La contribution de cette réaction dans la production primaire associée aux panaches hydrothermaux est considérée comme négligeable dans les modèles malgré la présence de particules de FeS (McCollom, 2000; Saito et al., 2013; Yücel et al., 2011).

Au niveau des sources hydrothermales profondes, ce processus est principalement réalisé par des *Zetaproteobacteria*, microorganismes mésophiles neutrophiles vivant principalement sous forme de tapis microbiens (Edwards et al., 2011; Forget et al., 2010; Hager et al., 2017; Scott et al., 2015). Elles commencent à être considérées comme des espèces ingénieuses des sites hydrothermaux de par leur capacité de modifier leur environnement (Emerson et al., 2010; Hager et al., 2017). En effet les tapis microbiens (mélanges d'oxyhydroxydes de fer, d'exopolysaccharides et de cellules) influencent la diffusion des fluides, modifient la chimie locale et fournissent de nouvelles surfaces de colonisation pour d'autres communautés microbiennes. Par exemple, les tapis microbiens dominés par les *Zetaproteobacteria* présentent une plus grande diversité microbienne que les tapis où elles sont minoritaires (Hager et al., 2017). *Mariprofundus ferrooxydans* a été la première *Zetaproteobacteria* isolée (d'un tapis microbien riche en fer au niveau du site de Loihi Seamount) (Emerson et al., 2007). C'est une micro-aérophile, mésophile (30 °C comme température optimale de croissance) qui peut utiliser différentes variétés de fer II, produisant des filaments d'oxyhydroxyde de fer. Seules deux autres espèces ont été isolées de source hydrothermale, *Mariprofundus micogutta* (Makita et al., 2017) et *Ghiorsea bivora* (Mori et al., 2017). Des *Zetaproteobacteria* actives ont été détectées dans la chambre branchiale de la crevette *Rimicaris exoculata*, et pourraient participer à la formation de dépôt d'oxyhydroxyde de fer (Jan et al., 2014). Certaines *Gammaproteobacteria* (par exemple le genre *Thiomicrospira*) ou *Epsilonproteobacteria* sont également des ferroxydantes mais aucune souche oxydant le fer n'a encore été isolée de sources hydrothermales à ce jour (Barco et al., 2017; Edwards et al., 2003).

Bien que le fluide soit riche en fer (II) dissout, il n'y a qu'une seule souche d'hyperthermophile ferroxydante isolée, à savoir *Ferroglobus placidus* (température optimale de croissance de 85 °C) (Hafenbradl et al., 1996). Elle provient d'échantillons d'eau et de sédiment du site côtier de Vulcano en Italie prélevés à 1m de profondeur. Elle est strictement lithotrophe, réduisant le fer mais également l'H₂ et les sulfures et utilisant le NO₃⁻ comme accepteur d'électron (réaction de dénitrification). Elle peut aussi oxyder des composés aromatiques (benzoate, phénol, phénylalanine, ...) avec réduction du fer (III). Il est à signaler que *Palaeococcus ferrophilus*, isolée d'une cheminée hydrothermale dans le bassin arrière arc de Bonin, requiert du Fer (II) pour sa croissance mais ne semble pas l'utiliser comme accepteur ou donneur d'électrons (Takai et al., 2000). Le rôle du Fe (II) dans le métabolisme de cette espèce reste encore à être identifier.

1.3.3.2. Réduction du fer (III)

Le fer ferrique (Fe(III)) est utilisé comme accepteur terminal d'électrons dans des conditions d'anoxie par les micro-organismes ferro-réducteurs. Le potentiel redox du Fer (III) est situé entre celui de l'oxygène et du nitrate (Lovley & Phillips, 1986). Par conséquent l'utilisation de cet accepteur d'électrons est énergétiquement favorable dans les habitats dépourvus d'oxygène. Dans les écosystèmes hydrothermaux, la production de Fe(III) est probablement due à l'oxydation du Fe (II) par l'eau de mer froide et oxygénée ou à la réduction des SO₄²⁻ de l'eau de mer couplée à l'oxydation des Fe(II) à des températures supérieures à 300 °C (Jannasch & Mottl, 1985). La ferrihydrite est la forme d'oxyde de fer(III) la plus utilisée par les ferro-réducteurs (Lovley, 1991; Straub et al., 2001). Le processus de réduction de fer pourrait être important puisque de nombreux micro-organismes (*Bacteria* et *Archaea*) issues de ces écosystèmes ont été isolées et présentent des physiologies différentes (thermophiles, acidophiles et alcalinophiles (Kashefi et al., 2003; Kashefi et al., 2002; Lovley et al., 2004; Slobodkin et al., 2001; Slobodkina et al., 2009)).

Ils sont associés aux structures de sulfures de fer (où l'oxydation abiotique des sulfures de fer leur apporte des substrats). Beaucoup sont hétérotrophes et également nitrato ou sulfato-réducteurs (Lovley et al., 2004). Plusieurs *Archaea* hyperthermophiles réduisant le fer (II) ont été isolées de sources hydrothermales profondes comme *Aciduliprofundum boonei* (Reysenbach et al., 2006), *Geoglobus ahangari* (Kashefi et al., 2002), *Geoglobus acetivorans* (Slobodkina et al., 2009), *Pyrodictium abyssi* (Pley et al., 1991) et *Pyrodictium delaneyi* (Lin et al., 2016). De nombreux autres micro-organismes hyperthermophiles l'ont été de sources côtières ou terrestres comme *Ferroglobus placidus*, des espèces du genre *Pyrobaculum* (par exemple : *P. islandicum* (Huber et al., 1987)) ou encore *Thermotoga maritima* (Vargas et al., 1998). La souche *Geogemma barossii* 121 présente d'ailleurs une croissance à 122 °C avec un temps de demi-vie de 24 h ce qui constitue un record dans le monde du vivant (Kashefi

et al., 2003). La ferro-réduction est suggérée chez les *Thermococcales* dans plusieurs études, dont *Pyrococcus furiosus* pour laquelle une activité de réduction de Fe(III) a été détectée dans des suspensions cellulaires (Vargas et al., 1998) ou encore chez *Thermococcus* sp. SN531 (Slobodkin et al., 2001), mais pour cette dernière cela n'a pas été formellement démontré en culture pure. Des études des mécanismes physiologiques impliqués dans la réduction du fer ont été réalisées sur des bactéries mésophiles des genres *Geobacter* et *Shewanella*. Trois mécanismes ont été décrit dans le cadre de la réduction du fer(III) : par contact direct ou bien indirectement soit par l'excrétion de sidérophores ou d'autres ligands (in/-organique) chélateurs qui permettent de solubiliser le composé chimique, soit par sécrétion d'un « shuttle » d'électron qui permet de transférer les électrons entre la cellule et le composé insoluble (FIGURE 24) (Gorby et al., 1988; Reguera et al., 2005). Les mécanismes de réduction du Fe(III) chez les hyperthermophiles ne sont pas encore identifiés mais ils semblent différer de ceux présents chez les mésophiles *Shewanella* et *Geobacter* (qui impliquent des cytochromes de type c ou des flavines) (Weber et al., 2006).

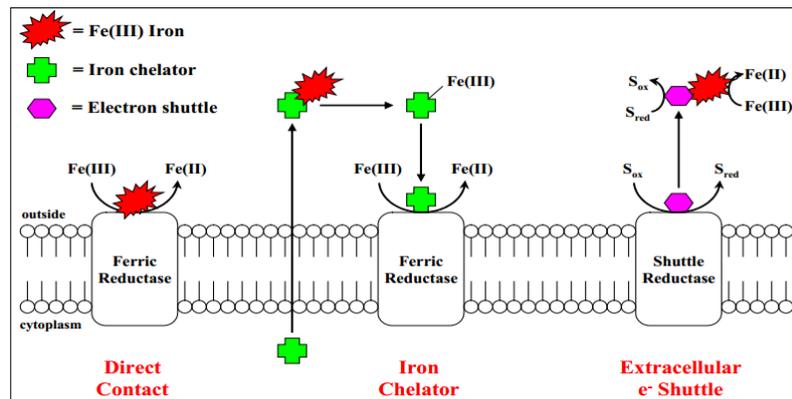


Figure 24 : Exemple des différents mécanismes mis en place pour la réduction de fer(III). (Lin et al., 2014).

1.3.4 Cycle de l'azote

L'azote (N) est l'un des principaux composants des protéines et des acides nucléiques (Kuypers et al., 2018). Il peut exister sous différents états d'oxydation : du nitrate NO_3^- (+5) à l'ammoniac NH_4^+ (-3). Dans les zones aphotiques de l'océan, il est principalement présent sous forme de N_2 ($\approx 575\text{-}590 \mu\text{M}$), de nitrate NO_3^- ($\approx 31\text{-}40 \mu\text{M}$) et d'azote organique dissous ($\approx 4 \mu\text{M}$) (Capone et al., 2008; Charlou et al., 2002). Sa forme la plus réduite l'ammonium NH_4^+ , impliquée dans de nombreux processus comme donneurs d'électron, n'est présente qu'en de très faibles concentrations inférieures à $1 \mu\text{M}$ dans l'eau de mer et beaucoup de fluides hydrothermaux de hautes températures (Bourbonnais et al., 2012; Capone et al., 2008). Cependant certains fluides de systèmes sédimentés comme dans le bassin de Guaymas ou sur la rive de Juan de Fuca présentent des concentrations en ammoniums importantes jusqu'à 1mM , résultat de la dégradation thermogénique de composés organiques des sédiments (Bourbonnais et al., 2012; Lilley et al., 1993; Von Damm et al., 1985). Les fluides hydrothermaux peuvent également être enrichis en N_2 (jusqu'à $3400 \mu\text{M}$) tandis que les concentrations de nitrate des fluides sont généralement inférieures à celles de l'eau de mer ($< 20 \mu\text{M}$) (Bourbonnais et al., 2012; Charlou et al., 2002; Nishizawa et al., 2014).

Le cycle de l'azote reste encore mal connu en contexte hydrothermale malgré des découvertes récentes importantes. Sa biodisponibilité est contrôlée par les réactions microbiennes qui modifient son degré d'oxydation. Le cycle de l'azote se décompose principalement en 7 processus distincts : la fixation du N_2 ($\text{N}_2 \rightarrow \text{NH}_3$), la nitrification ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$), la dénitrification ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$), l'oxydation anaérobie de l'ammonium ou Anammox ($\text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+ \Rightarrow \text{N}_2$), la réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium (DNRA) ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_3$) et l'assimilation de l'azote organique et sa dégradation ou ammonification (Composé organique azoté $\leftrightarrow \text{NH}_3$) (FIGURE 25).

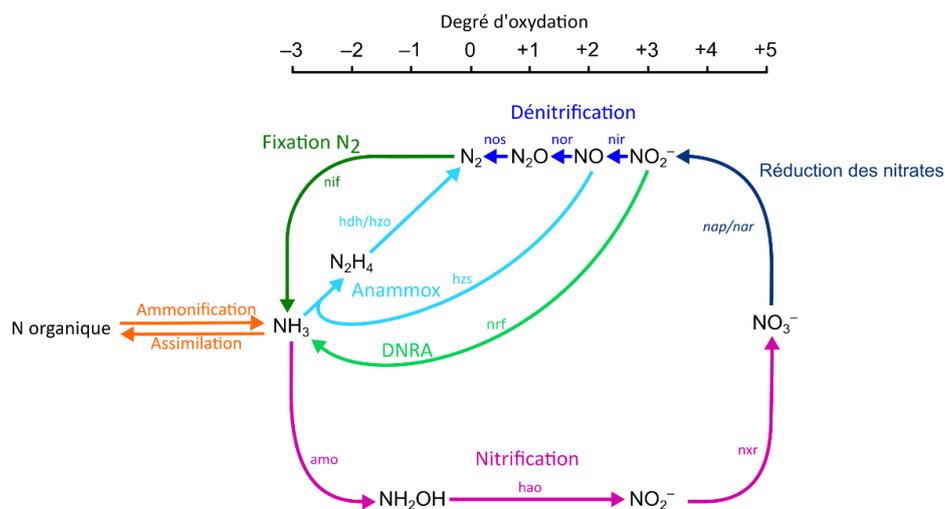


Figure 25 : Principaux processus du cycle de l'Azote.

La fixation du N_2 catalysée par le complexe enzymatique de la nitrogénase est un des processus métaboliques les plus énergétiquement coûteux (Simpson & Burris, 1984). C'est une des raisons pour laquelle les bactéries capables de fixer le N_2 sont rares mais néanmoins phylogénétiquement diverses avec plusieurs phyla bactériens comme ceux des *Firmicutes*, des *Cyanobacteria* ou encore des *Proteobacteria* telle l'espèce *Arcobacter sulfidicus* (Wirsen et al., 2002). Tandis que chez les archées sembleraient limitées à quelques méthanogènes parmi les *Euryarchaeota* et ANMEs (Leigh, 2000; Miyazaki et al., 2009; Nishizawa et al., 2014). Le complexe de la nitrogénase est codé par l'opéron *nif* (Raymond et al., 2004) dont la détection du gène *nifH* (codant pour une sous-unité du complexe) dans des échantillons de fluides diffus de la ride de Juan de Fuca suggère la présence de micro-organismes fixateurs de N_2 (Mehta et al., 2003). La méthanogène *Methanocaldococcus sp.* FS406-2, également isolée de ces fluides hydrothermaux, est capable de fixer le N_2 en NH_4^+ à une température de 92 °C, ce qui démontre la capacité de fixation de N_2 dans les parties les plus chaudes (Mehta & Baross, 2006). Cependant il n'existe aucune donnée sur l'activité *in situ* du complexe de la nitrogénase.

La nitrification correspond à l'oxydation aérobie du NH_3/NH_4^+ en NO_3^- et est catalysée par les micro-organismes nitrifiants. Différents groupes microbiens peuvent être impliqués dont certaines bactéries (« ammonia-oxidizing *Bacteria* ») affiliées aux *Beta* et *Gamma-proteobacteria* ainsi que des archées (« ammonia-oxidizing *Archaea* ») affiliées au groupe MG-I des *Thaumarchaeota* comme *Nitrosopumilus maritimus* (Könneke et al., 2005; Spang et al., 2010). C'est un processus en deux étapes réalisé par des micro-organismes différents (Herbert, 1999). La première étape est l'oxydation de l'ammonium en nitrite par les micro-organismes « nitrosants » puis ce dernier est oxydé en nitrate par les micro-organismes « nitratants » parmi lesquels notamment des espèces du genre *Nitrobacter* (Lees & Simpson, 1957). L'oxydation aérobie de l'ammonium en contexte hydrothermal a été démontrée par l'isolement dans des conditions aérobies à 65 °C de bactéries hétérotrophes nitrifiantes thermophiles (des genres *Thermus* et *Bacillus*) à partir d'échantillons de cheminées hydrothermales de Snake Pit (Mével & Prieur, 1998). Les micro-organismes qui réalisent l'oxydation de l'ammoniaque en nitrate peuvent également être détectés grâce au gènes *amoA* codant pour la sous-unité α de l'ammoniaque monooxygénase (AMO) (Purkhold et al., 2000). Des séquences de gènes *amoA* ont été détectées dans des morceaux de parois externes de cheminées de champs hydrothermaux des rides de Juan de Fuca (F. Wang et al., 2009) et du sud de l'Atlantique (Xu et al., 2014). De plus les bactéries oxydant l'ammonium constituent jusqu'à 51 % des communautés associées aux particules du panache hydrothermal du site Main Endeavour (Juan de Fuca) (Lam et al., 2004). Deux autres études mettent également en évidence l'importante activité des archées oxydant l'ammonium au sein des panaches hydrothermaux du bassin de Guaymas (Baker et al., 2012; Lesniewski et al., 2012).

La dénitrification correspond à la réduction des nitrates (NO_3^-) ou nitrite (NO_2^-) en N_2O et N_2 . La réduction des nitrates est l'une des réactions les plus favorables du métabolisme énergétique chez les micro-organismes (Amend & Shock, 2001). La première étape est catalysée par la nitrate réductase (Argandona et al., 2006). Deux types de nitrate réductase ont été décrites chez les bactéries, en association avec la membrane (nar) ou libre dans le périplasme (nap) (Grove et al., 1996; Moreno-Vivián et al., 1999). Une étude de la diversité de l'enzyme Nar a mis en évidence une modification de la structure des communautés nitrifiantes au niveau hydrothermal : d'une communauté composée d'*Alpha* et de *Gamma-proteobacteria* dans les parties mésophiles à une communauté d'*Epsilonproteobacteria* vers les parties plus chaudes et réduites (Pérez-Rodríguez et al., 2013). Le cluster de gènes qui code pour le complexe périplasmique de la nitrate réductase (nap) est très conservé chez les *Epsilonproteobacteria* qui représentent une grande fraction des producteurs primaires de ces environnements (Campbell et al., 2006; Vetriani et al., 2014). De nombreuses bactéries nitrifiantes ont été isolées de sources hydrothermales profondes. La plupart sont des chimiolithotrophes mais quelques hétérotrophes comme *Caldithrix abyssi* ont été détectées (Miroshnichenko et al., 2003). Très peu d'archées ont été isolées comme *Pyrolobus fumarii* (Blöchl et al., 1997) qui détient le record de température pour la dénitrification (106 °C). *F. placidus* est capable de réduire le NO_3^- en NO_2^- et dispose même d'une N_2O -reductase dans son génome suggérant sa capacité de réaliser une dénitrification complète jusqu'au N_2 (Anderson et al., 2011; Vorholt et al., 1997). D'autres peuvent réaliser la réduction dissimilatrice du NO_3^- en ammonium (DNRA) généralement couplée à l'oxydation anaérobie du S^0 (Slobodkina, Mardanov, et al., 2017). Cependant contrairement à la dénitrification le produit final est l'ammonium, permettant ainsi à l'azote de rester biodisponible.

La réaction d'Anammox (Anaeorobic ammonium oxidation) est un processus océanique important qui contribue pour moitié à la sortie de l'azote fixé. Les micro-organismes qui réalisent ce processus appartiennent à un groupe distinct du phylum bactérien des *Planctomycètes*. Il existe plusieurs manières de le détecter. Tout d'abord les bactéries anammox sont les seules capables de production d'hydrazine; le gène *HzsA* qui code la sous-unité α de l'hydrazine synthase constitue donc un marqueur moléculaire intéressant (Harhangi et al., 2012). Elles possèdent un organite cellulaire spécifique, l'anammoxosome dont la membrane possède un acide gras particulier de type ladderane (Damsté et al., 2002). Enfin il peut être détecté par des mesures d'activité avec l'utilisation des isotopes de l'azote. Il a été ainsi détecté dans des panaches du site Main Endeavour (Lam et al., 2004) ainsi que sur des parties froides (associé à des invertébrés et à des tapis microbiens) et chaudes de sites Atlantique (Byrne et al., 2009) ou encore de sédiments du bassin de Guaymas (Russ et al., 2013).

1.3.5 Cycle du soufre

Les écosystèmes hydrothermaux sont très riches en soufre que ce soit à l'état minéral sous forme de minéraux sulfatés (tels que l'anhydrite (CaSO_4) ou la barytine (BaSO_4)) ou sulfurés (comme la pyrite (FeS_2)) ainsi que sous forme dissoute dans l'eau de mer (la concentration en SO_4^{2-} est de 28,2 mM (Charlou et al., 2002)) et dans les fluides (principalement en hydrogène sulfuré dissous (HS^-)). Dans la zone de mélange eau de mer/fluide, le S^0 est produit par oxydation spontanée de l' H_2S avec l'eau de mer oxygénée (Jannasch et al., 1988).

Le soufre possède plusieurs degrés d'oxydation, de +6 sous la forme la plus oxydée (SO_4^{2-}) à -2 sous la forme la plus réduite (H_2S) permettant son utilisation comme donneur ou accepteur d'électrons (TABLEAU 5).

Tableau 5 : Degré d'oxydation du soufre inorganique. (Callac, 2013).

Composés	Formule	Etat d'oxydation
Sulfate	SO_4^{2-}	+6
Sulfite	SO_3^{2-}	+4
Dioxyde de soufre	SO_2	+4
Tétrathionate	$\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$	+2,5 (0 pour les sulfures "internes" et +5 pour les deux sulfures "externes")
Thiosulfate	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	+2
Soufre élémentaire	S^0, S_8	0
Polysulfure	$-\text{S}-\text{S}_{(n)}-\text{S}-$	0 pour les sulfures "internes" et -1 pour les deux sulfures "externes"
Pyrite	FeS_2	-1
Monosulfure de fer	FeS	-2
Sulfure d'hydrogène	H_2S	-2

Le soufre est principalement assimilé dans les cellules sous forme de groupement sulfhydryle S-H présents dans les acides aminés sulfurés (cystéine et méthionine), éléments constitutifs des protéines. La cystéine joue ainsi un rôle important dans la stabilisation des structures de certaines protéines par la formation de pont disulfures. De plus certaines protéines possédant des clusters Fe-S tels que les ferrédoxines ou les hydrogénases, lesquelles sont des maillons essentiels dans les transferts d'électrons et les réactions d'oxydoréductions. Le cycle biogéochimique du soufre au niveau des sources hydrothermales inclut des micro-organismes aérobies et anaérobies tel que les thiotrophes ou les sulfato réducteurs (FIGURE 26).

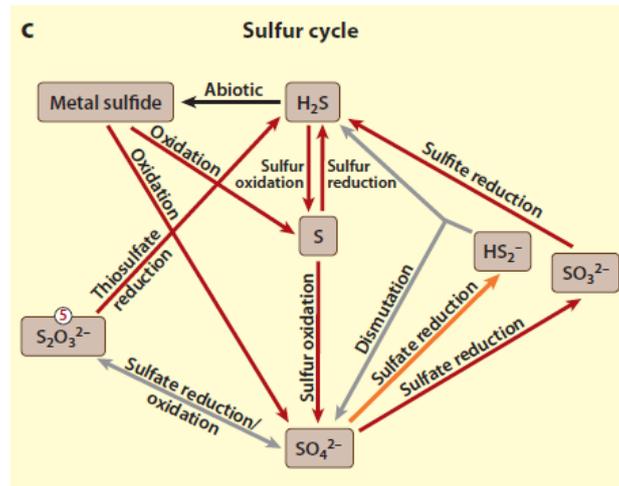


Figure 26 : Cycle biogéochimique du soufre. (Offre et al., 2013).

- **Réduction des sulfates**

Les micro-organismes sulfato-réducteurs (MSR) occupent de nombreux habitats terrestres et aquatiques et jouent un rôle majeur dans la minéralisation de la matière organique dans les habitats anoxiques (jusqu'à 50 % dans les sédiments des marges océaniques) (Jørgensen, 1977; Widdel & Bak, 1992). Le sulfate (SO_4^{2-}) est présent en abondance dans l'eau de mer (28,2 mM) (Charlou et al., 2002) mais il est absent du fluide, puisqu'il précipite en anhydrite pour des températures supérieures à 150 °C. La sulfato-réduction est l'un des processus métaboliques les plus thermodynamiquement favorables dans les zones avec une température supérieure à 40 °C (McCollom & Shock, 1997). Les MSR utilisent le SO_4^{2-} comme accepteur terminal d'électron avec différents donneurs d'électrons comme l' H_2 ou une grande variété de molécules organiques incluant des sucres, des acides aminés, des acides organiques (pyruvate, lactate, formate ...) ou encore des alcools (méthanol, ...) (Muyzer & Stams, 2008; Parkes et al., 1989; Widdel & Bak, 1992). L' H_2S qui est le produit final de la réduction, est rejeté tel quel ou bien assimilé par la cellule (Rabus et al., 2006).

L'enzyme la plus utilisée comme marqueur fonctionnel est la réductase dissimilatrice du sulfite (*dissimilatory sulfite reductase*, DSR) qui catalyse l'étape clé dans la conservation d'énergie à savoir la réduction du (bi)sulfite en sulfure d'hydrogène (FIGURE 27). Cette enzyme composée de deux polypeptides est codée par deux gènes, *dsrA* et *dsrB*, qui sont présents chez toutes les MSR (Wagner et al., 1998). Cependant cette enzyme est également détectée chez quelques micro-organismes non sulfatoréducteurs respirant le sulfite comme *Pyrobaculum islandicum* (Klein et al., 2001; Molitor et al., 1998). L'utilisation d'un deuxième gène marqueur comme *apsA* codant pour la réductase de l'adénosine-5'-phosphosulfate (APS), uniquement présent chez les MRS, permet d'améliorer la résolution des études (Frank et al., 2013; Friedrich, 2002).

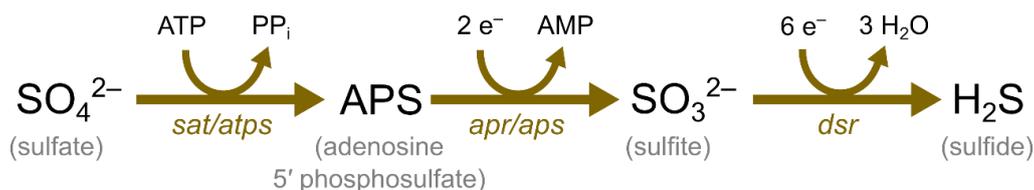


Figure 27 : Voie simplifiée de la sulfato-réduction. Enzymes : sat (sulfate adényltransferase), atps (ATP sulfurylase), apr (adénosine-5'-phosphosulfate reductase) et dsr (dissimilatory (bi)sulfite reductase)

Les différentes études (basées sur l'analyse du 16S, des gènes fonctionnels, de la composition lipidique des membranes) indiquent qu'il existe une grande diversité parmi les micro-organismes sulfato-réducteurs présents dans les différents habitats des sources hydrothermales que ce soit au niveau de sédiments, de cheminées ou associés à la faune (Cottrell & Cary, 1999; Dhillon et al., 2003; Elsgaard et al., 1995; Frank et al., 2013; Frank et al., 2015; Nercessian et al., 2005). Elles montrent également que de nombreux MSR n'ont pas encore de représentants cultivés malgré les efforts réalisés qui ont permis d'isoler des sources hydrothermales profondes quelques souches appartenant aux phyla bactériens des *Deltaproteobacteria* et des *Thermodesulfobacteria* et au phylum archéen des *Euryarchaeota*. Il existe peu de données sur l'activité sulfato-réductrice en milieu hydrothermal comparé aux milieux côtiers. Cependant les quelques études de mesures d'activités menées sur des sédiments hydrothermaux du bassin de Guaymas (Elsgaard et al., 1995; Jørgensen et al., 1992; Kallmeyer & Boetius, 2004; Weber & Jørgensen, 2002) et sur des cheminées hydrothermales de la ride médio-Atlantique (Bonch-Osmolovskaya et al., 2011) et de la ride Juan de Fuca (Frank et al., 2013; Frank et al., 2015) indiquent une forte activité sur un large panel de température allant jusqu'à 110 °C (Jørgensen et al., 1992).

- **Réduction du S⁰ et autres composés soufrés**

En plus de la sulfato-réduction, certains micro-organismes présents au niveau des sources hydrothermales sont capables de respirer le S⁰ (sulfo-réduction) et d'autres composés soufrés tel que le thiosulfate (S₂O₃²⁻) en utilisant de nombreux composés comme donneur d'électrons (H₂, formate, acétate, ...) (Amend et al., 2004; Rogers & Amend, 2006). Contrairement aux sulfato-réducteurs, les micro-organismes réalisant la réduction du S⁰ et autres composés soufrés isolés des sources hydrothermales profondes sont phylogénétiquement plus diversifiés incluant de nombreux phyla bactériens (*Deltaproteobacteria*, *Thermodesulfobacteria*, *Aquificae*, *Epsilonproteobacteria*, *Acidobacteria*) ainsi que deux d'archées, les *Crenarchaeota* et des *Euryarchaeota*. Des organismes organotrophes fermentaires utilisent le S⁰ comme accepteur terminal d'électrons et le réduisent en H₂S comme les *Thermococcales* (Fiala & Stetter, 1986) ou encore les *Thermotogales*. C'est également le cas d'organismes lithotrophes parmi lesquels *Ignicoccus pacificus* (Huber et al., 2000), *Pyrolobus fumarii*

(Blöchl et al., 1997), *Archaeoglobus veneficus* (Huber et al., 1997) ou encore *A. sulfaticallidus* (Steinsbu et al., 2010).

- **La sulfo-oxydation**

L'environnement hydrothermal est riche en composés soufrés réduits (HS^- , S_2^- , S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$) et autres sulfures polymétalliques comme la pyrite (FeS_2), la chalcopyrite (CuS) ou encore la sphalérite (ZnS). Les processus abiotiques d'oxydation du soufre sont plus lents que les processus biotiques ce qui les rend biodisponibles comme donneur d'électrons pour les micro-organismes sulfo-oxydants. Les modélisations thermodynamiques suggèrent que l'oxydation de l' HS^- (forme dissoute du gaz H_2S), du S^0 et du thiosulfate représenteraient la source majeure d'énergie disponible pour la production primaire dans les zones de mélange eau de mer/fluide (riche en H_2S) de basses températures (< 40 °C) (McCollom & Shock, 1997). Les accepteurs d'électron sont généralement l' O_2 , le nitrate (NO_3^-) et des oxydes métalliques (i.e. Fe(III) et Mn(IV)) (Sievert et al., 2008). Les surfaces minérales de sulfures polymétalliques peuvent également être utilisées comme donneur d'électrons cependant les réactions sont moins exergoniques comme l'a démontré l'incubation à basse température (12 à 35 °C) de substrats minéraux naturels ou synthétiques sulfurés pour lesquels les taux de fixation de CO_2 sont largement inférieurs par rapport à l'utilisation de thiosulfate dissous (1 à 10 % en fonction du minéral) (Eberhard et al., 1995).

Les micro-organismes sulfo-oxydant sont généralement retrouvés en associations symbiotiques ou à la surface des différentes structures sous forme de tapis microbiens (Alain et al., 2002; Taylor et al., 1999). Ils appartiennent principalement aux phyla des *Gammaproteobacteria* et *Epsilonproteobacteria* dans les habitats de températures modérées (20-60 °C) et aux *Aquificae* dans habitat plus chauds (60–80 °C) (Campbell et al., 2006; Hügler & Sievert, 2010; Nakagawa et al., 2007; Ruby et al., 1981). Certaines *Alphaproteobacteria* peuvent également oxyder les sulfures bien que peu de représentants cultivés aient été isolés des sources hydrothermales. Aucune archée sulfo-oxydante n'a été isolée des environnements hydrothermaux profonds à ce jour, néanmoins plusieurs archées hyperthermophiles du phylum *Crenarchaeota* (des genres *Sulfolobus*, *Thermoplasma*) sont connus, isolées de sources terrestres ou de drainage acide minier (Dopson & Johnson, 2012).

Il existe deux voies principales d'oxydation du soufre, la voie de l'adénosine phosphosulfate réductase (APS) et la voie de la sulfite-oxydase (Sox). Pour le premier cas, il s'agit du processus inverse de réduction du SO_4^{2-} ; les enzymes clés sont donc les mêmes à savoir la réductase dissimilatrice du sulfite et la réductase de l'adénosine-5'-phosphosulfate (FIGURE 28). La voie Sox est quand elle catalysée par le complexe multienzymatique constitué de quatre composants (SoxYZ, SoxXA, SoxB, and SoxCD)

(Friedrich et al., 2001). Ces gènes sont utilisés comme marqueur pour étudier les acteurs de ce processus (Hügler & Sievert, 2010; Petri et al., 2001; Yamamoto & Takai, 2011).

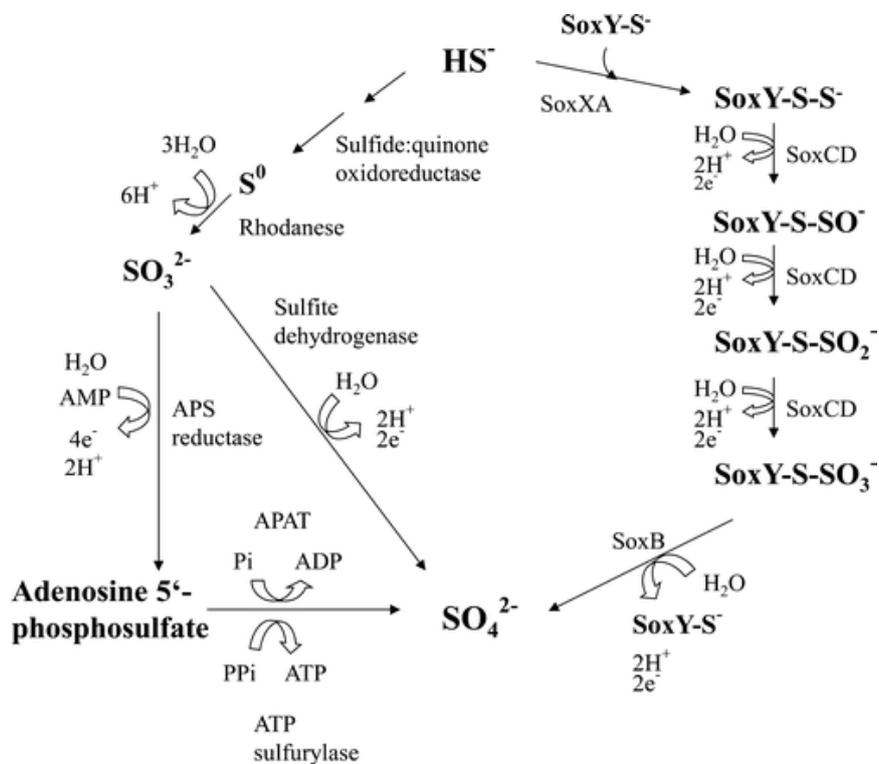


Figure 28 : Schéma des deux voies d'oxydation du soufre. (Poser et al., 2014).

- Dismutation du soufre, du thiosulfate et des sulfites

Certaines souches thermophiles et hyperthermophiles sont également capables de réaliser la disproportionation du S^0 , du thiosulfate et du sulfite en sulfate (SO_4^{2-} , forme la plus oxydée) et en sulfure (H_2S , forme la plus réduite) (Bak & Cypionka, 1987). A ce jour trois souches bactériennes réalisant la dismutation de composés sulfurés ont été isolées de cheminées hydrothermales à savoir *Thermosulfurimonas dismutans* et *Thermosulfuriphilus ammonigenes* du phylum *Thermodesulfobacteria* (Slobodkin et al., 2012; Slobodkina, Reysenbach, et al., 2017) et *Dissulfuribacter thermophilus* du phylum *Deltaproteobacteria* (Slobodkin et al., 2013). D'autres espèces phylogénétiquement proches ont également été isolées de sources chaudes terrestres comme *Dissulfurimicrobium hydrothermale* (Slobodkin et al., 2016), *Caldimicrobium thiodismutans* (Kojima et al., 2016) et côtières comme *Thermosulfurimonas marina* (Frolova et al., 2018) et *Dissulfurirhabdus thermomarina* (Slobodkina et al., 2016). Cependant les voies métaboliques de la disproportionation du S^0 n'étant pas encore caractérisées (Mardanov et al., 2016), il n'existe pas de marqueurs moléculaires pour faciliter leur détection. Ainsi cette voie métabolique qui a été peu étudiée en contexte hydrothermal pourrait représenter une voie de production primaire importante dans ces écosystèmes riches en S^0 (Mardanov et al., 2016).

1.4. Les interactions géosphère-biosphère : une clé pour la compréhension du fonctionnement de l'écosystème hydrothermal ?

1.4.1 Généralités

Les systèmes hydrothermaux abritent des écosystèmes très dynamiques de la biosphère. Ces écosystèmes reposent sur de fortes interactions entre la géosphère (qui comprend la partie lithosphérique et la partie hydrosphérique) et les organismes vivants (la biosphère) qui interagissent entre eux et avec leur environnement. Les environnements hydrothermaux des grands fonds océaniques sont les biotopes de la planète pour lesquels les concentrations en métaux et en certains gaz sont les plus élevées. En effet, les fluides chauds (> 350 °C) générés par les convections hydrothermales dans les roches, transportent et émettent de nombreux métaux (Fe, Mn, Zn, Cu, Pb) et gaz dissous (TABLEAU 1) (Charlou et al., 2002).

Selon les environnements, de nombreux métaux traces peuvent être également concentrés dans les fluides ou les minéraux (Co, Ni, Ge, As, Mo, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, Au, Ag, Bi). Outre les métaux, ces fluides sont enrichis en S, Si, Ba et d'autres éléments mineurs tels que le Se. Ces éléments se combinent pour former des minéraux et des roches dont l'accumulation édifie les cheminées et les dépôts hydrothermaux qui constituent un vaste réservoir d'éléments chimiques essentiels pour le fonctionnement de ces écosystèmes (Amend & Shock, 2001).

Les interactions entre la biosphère et la géosphère contribuent de manière importante aux cycles biogéochimiques globaux (Dong, 2010; Gadd, 2010). Au-dessus de 120 °C, la formation des édifices hydrothermaux est principalement associée à des processus abiotiques. Cependant en dessous de 120 °C le rôle et la contribution des micro-organismes sur la composition des associations minéralogiques, la précipitation ou la dissolution des minéraux reste encore à déterminer (McCollom, 2007).

La nature des interactions entre fluides, minéraux et micro-organismes influence la colonisation de toutes les niches écologiques (que ce soit à l'intérieur des édifices, à leurs surfaces, en association symbiotique avec la faune ou dans le panache hydrothermal) par des micro-organismes et détermine le maintien de la diversité microbienne associée (Edwards et al., 2005).

Outre ces considérations biologiques, ces interactions induisent des changements de leur environnement en modifiant la spéciation chimique d'un élément, en formant de nouvelles associations minérales par biominéralisation ou encore par dissolution favorisant leur concentration ou au contraire leur dispersion (Edwards et al., 2005; Holden & Adams, 2003).

Il est ainsi important de continuer les efforts de caractérisations des interactions mises en œuvre pour comprendre leur nature, les contraintes exercées *in situ*, d'identifier les acteurs microbiens et d'estimer les transformations engendrées, et d'estimer l'importance des processus biotiques par rapport aux processus abiotiques.

1.4.2 Présentation des différents types d'interactions connus et de leurs mécanismes

Le type d'interaction dépend du métal/minéral, du micro-organisme et des conditions physico-chimiques. Les interactions peuvent être classées en trois catégories (Holden & Adams, 2003) :

- la forme dissimilatrice où l'élément est utilisé sans incorporation
- la forme assimilatrice où l'élément est incorporé dans la cellule
- la forme toxique où la présence est délétère pour la cellule et engendre une réponse

1.4.2.1. Réactions dissimilatrices

Au niveau des sources hydrothermales, de nombreux éléments chimiques inorganiques peuvent être utilisés comme donneur ou accepteur d'électrons en plus du fer, du soufre ou de l'azote (Partie 1.2) (Lovley, 1993; Wirsen et al., 1993). Certains micro-organismes hyperthermophiles comme *P. furiosus*, *G. ahangari* ou encore *Thermotoga maritima* sont également capables de réduire Au(III) en Au(0) en présence d'H₂ comme donneur d'électron (Kashefi et al., 2001). Au(III) est la forme soluble alors que sous sa forme réduite Au(0) est insoluble (Mossman et al., 1999). Il y a alors la formation de précipité d'or colloïdal sur la surface externe des cellules. Ce processus pourrait être responsable du piégeage et de l'enrichissement en or dans certaines minéralisations hydrothermales de basse température. Des bactéries isolées du ver tubicole *Ridgeia piscesae*, une des espèces les plus abondantes présente sur les sites hydrothermaux de la ride de Juan de Fuca, sont capables quant à elle de respirer du tellurate mais également du sélénite, ou encore du vanadate (Csotonyi et al., 2006; Maltman et al., 2016). *Pyrobaculum islandicum* isolée d'une source hydrothermale d'Islande peut également respirer de nombreux métaux à 100 °C en présence d'H₂ comme donneur d'électron comme le Fe(III), U(VI), Tc (VII), Cr (VI), Co(III) et le Mn (IV) (Kashefi & Lovley, 2000). Une autre espèce du genre, *P. arsenaticum*, utilise l'arsenate ou le sélénate comme accepteur terminal d'électron en présence d'H₂ comme donneur d'électron à 95 °C (Huber et al., 2000). Ces exemples parmi tant d'autres illustrent la diversité des possibilités métaboliques utilisés par les micro-organismes. Cependant, il est important de rappeler qu'il s'agit de résultats obtenus en culture pure en présence de concentrations très supérieures à celles retrouvées *in situ* et par conséquent la réalité écologique de ces réactions doit encore être démontrée. Par exemple dans le cas de *P. arsenaticum*, les concentrations en culture pure variaient de 5 à 30 mM

(Huber et al., 2000) alors que la concentration moyenne d'As dans les eaux profondes d'Atlantique Nord ne sont que de 18,3 à 20,3 nM (Middelburg, 2011).

1.4.2.1.a Quelques exemples de mécanismes de réactions dissimilatrices

Pour rendre les composés métalliques biodisponibles, les micro-organismes mettent en œuvre des mécanismes physiologiques uniques (Ehrlich, 1999) comme par exemple dans le cadre de la réduction du fer(III). Les micro-organismes sont ainsi impliqués dans des processus de biominéralisation (Jannasch & Wirsén, 1981; Toner et al., 2009) ou d'altération (Eberhard et al., 1995; Edwards et al., 2003). Par définition la biominéralisation renvoie à l'ensemble des processus par lesquels les organismes forment ou modifient les minéraux (altération, lixiviation, précipitation, dissolution). Ces minéraux peuvent être le résultat d'une oxydation ou d'une réduction de molécules, ou de l'excrétion d'un métabolite. Dans certaines conditions, ils peuvent constituer une signature chimique témoin d'une activité biologique spécifique.

L'un des premiers exemples de biominéralisation recensé au niveau des sources hydrothermales fut la découverte d'un tapis microbiens de 5 à 10 μM associés à des dépôts de métaux (Mn-Fe) et de cellules sur des surfaces exposées aux fluides hydrothermaux riche en H_2S (Jannasch & Wirsén, 1981). Ces tapis peuvent être constitués de soufre issus de l'oxydation de composés soufrés (Juniper & Fouquet, 1988). De nombreuses études se sont intéressées à la fabrication de ces filaments que ce soit chez les *Gammaproteobacteria* du genre *Beggiatoa* (Jacq et al., 1989; Nelson et al., 1989) ou les *Epsilonproteobacteria* du genre *Arcobacter* (Sievert et al., 2007; Taylor et al., 1999; Wirsén et al., 2002). Ces bactéries augmentent le taux d'oxydation du fer (II) en fournissant avec leurs membranes cellulaires une surface réactive de nucléation pour la croissance minérale participant ainsi à la formation des dépôts d'oxydes de fer et de manganèse (Fortin et al., 1998; Kennedy et al., 2003; Verati et al., 1999). Ces surfaces réactives à la surface des cellules sont constituées de polymères avec des groupes fonctionnels (comme des groupes carboxyle, phosphate et hydroxyle) qui sont très réactifs et qui facilitent la sorption d'espèce ionique incluant les métaux dissous (Beveridge, 1981; Beveridge & Murray, 1980; Fortin et al., 1998). L'attachement de ces éléments chimiques à la surface des cellules est la première étape de biominéralisation. Cette étape est d'autant facilitée dans ces écosystèmes par l'apport continu du fluide qui permet d'avoir des concentrations élevées de métaux dépassant le degré de sursaturation exigé pour l'initiation de la nucléation minérale (Beveridge & Murray, 1980). Récemment une étude a montré la formation de nanocristaux de pyrite autour de cellule de *Thermococcales*. Ils se forment par la précipitation de fer(II) au contact de vésicules de soufre à la surface des cellules dans une matrice extracellulaire de polymère. La présence de Fe (III) empêche la précipitation de pyrite et favorise la formation de greigite (Fe_3S_4) (Gorlas et al., 2018).

De plus les micro-organismes participent également aux minéralisations associés aux macro-organismes (Juniper et al., 1992; Tunncliffe & Fontaine, 1987). Par exemple chez les vers tubicoles *Ridgeia piscesae*, ou *Alvinella pompejana* il a été montré que les micro-organismes participent activement aux processus de minéralisations de leurs hôtes (Maginn et al., 2002; Peng et al., 2008). Chez *A. pompejana* trois types de minéralisations sont présentes : les particules de sphalérite et de pyrite de la face interne de leur tube, les couches internes majoritairement composées de pyrite et de marcasite et dans des concentrations plus faibles de sphalérite, de barytine ou encore de silice, et enfin les couches externes de pyrite et de marcasite (Georgieva et al., 2015; Maginn et al., 2002). La présence de vers tubicoles à la surface des cheminées pourrait participer à la maturation de celles-ci. Au cours de la croissance de la cheminée, les tubes migrent vers de nouvelles surfaces créant un front mobile de biominéralisation sous la forme d'une croûte de marcasite-pyrite (Paradis et al., 1988). Cette croûte pourrait agir comme isolant thermique entre l'eau de mer et l'intérieur de la cheminée augmentant ainsi la température interne du conduit et accélérer la transition entre la matrice sulfatée et la matrice sulfurée (Juniper et al., 1992). Les minéralisations associées aux macroorganismes pourraient ainsi représenter une signature de l'activité biologique passée des anciens sites hydrothermaux (Little et al., 1998; Zbinden et al., 2001).

Bien que les processus d'altération (de dissolution et d'oxydation) des surfaces minérales soient principalement abiotiques, les micro-organismes peuvent également participer à ces processus (Fallon et al., 2017). Ils peuvent augmenter les taux de dissolution comme cela a été observé chez des *Thiobacillus*, qui par leur présence augmentent la libération de métaux (Fe, Cu, Zn) de minéraux (pyrite, chalcopryrite, sphalérite) de plus de 44 % dans certains cas (Lizama & Suzuki, 1989). En condition réductrice, les sulfures sont stables avec une faible solubilité. C'est en condition oxydante (en présence d'O₂ ou de fer (III)) qu'ils sont moins stables et qu'ils s'oxydent. L'oxydation abiotique du fer (II) est très rapide en condition oxygène et à pH neutre. Les micro-organismes microaérophiles arrivent malgré tout à oxyder les minéraux en profitant des aspérités des surfaces (présences de microfissures, de pores, ...) (Edwards et al., 2003).

1.4.2.1.b Les micro-organismes bio-électroactifs

Les échanges d'électrons constituent un autre type de réaction dissimilatrice. Les cheminées hydrothermales sont constituées de matériaux conducteurs qui permettent le passage d'un courant au travers de la cheminée sur de faible (2 mm) mais également longue distance (> 10 cm) en couplant la réduction de composé de l'eau de mer environnante avec l'oxydation de composés du fluide hydrothermal (FIGURE 29) (Yamamoto et al., 2017).

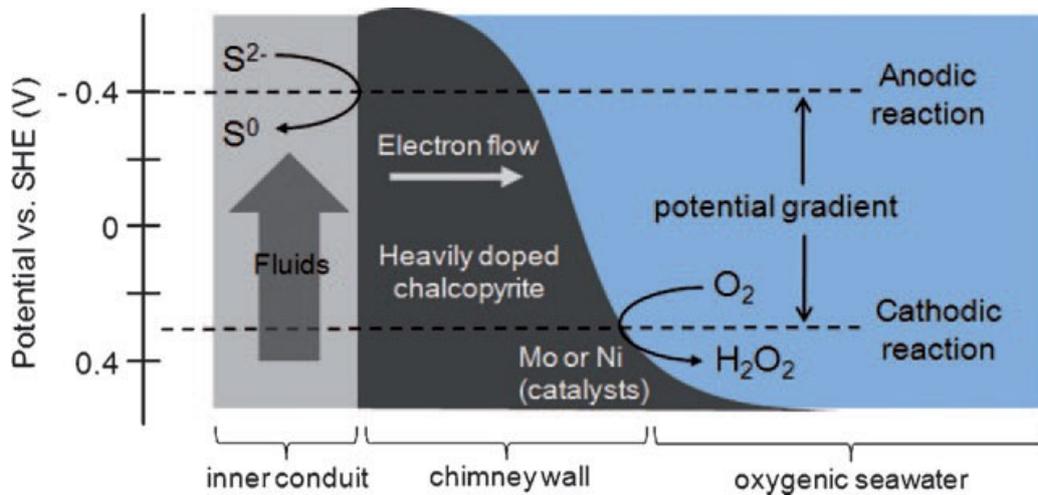


Figure 29 : Illustration schématique d'un diagramme énergétique pour les réactions anodiques et cathodiques réalisées sur les surfaces internes et externes d'une cheminée. Le gradient de potentiel sert comme force conductrice pour la génération d'un courant électrique. (Nakamura et al., 2010)

Les cristaux massifs de chalcopyrite et de pyrite sont considérés comme faiblement conducteurs mais l'organisation des micro/nano-cristaux et de la maille élémentaire, ainsi que la présence de lacunes conductrices facilite le passage des électrons (FIGURE 30) (Nakamura et al., 2010; Yamamoto et al., 2017).

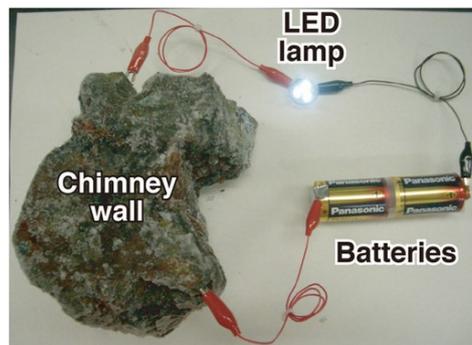


Figure 30 : Démonstration de la conductivité électrique d'une cheminée hydrothermale. Le morceau a été collecté sur le site Mariner dans le bassin de Lau. Les cheminées agissent comme conducteur de courant avec une résistance minimale (le voltage est de 2.8 V). (Yamamoto et al., 2017).

L'étude des propriétés thermoélectriques de chalcopyrite issue d'une cheminée hydrothermale a permis de démontrer que les minéraux naturels fonctionnent comme des matériaux thermoélectriques qui convertissent un gradient de température en gradient électronique (Ang et al., 2015). Ainsi la différence de potentiel redox et de chaleur entre l'intérieur (fluide) et l'extérieur (l'eau de mer) d'une cheminée génère également un courant au travers des minéraux.

Une partie de la communauté de micro-organismes lithotrophes pourrait utiliser directement les électrons transportés depuis le fluide hydrothermal au travers du réseau de cristaux de sulfures comme source d'énergie pour la fixation du carbone mais sans l'utilisation des composés chimiques réduits (Nakamura et al., 2010; Nielsen et al., 2010). C'est le cas des micro-organismes comme *Acidithiobacillus ferrooxidans* qui sont alors considérés comme électro-litho-autotrophe (Ishii et al., 2015).

Les micro-organismes bio-électroactifs sont capables de transférer des électrons entre cellules ou vers/ depuis des supports solides insolubles. Moins d'une centaine de micro-organismes ont été identifiés comme étant électro-actifs et capables d'interagir avec une électrode via un transfert extracellulaire d'électron (EET) (Koch & Harnisch, 2016; Lovley & Phillips, 1988). Deux processus biogéochimiques spatialement distants peuvent ainsi être couplés par la création d'un courant transmis par l'utilisation de « nanowires », de cytochrome ou d'autre transporteur d'électrons comme cela a été démontré *ex-situ* sur des sédiments côtiers du Danemark avec une consommation d'oxygène en surface couplée à l'oxydation d'H₂S et de carbone organique en profondeur (Nielsen et al., 2010). Il n'existe que très peu de données sur la diversité microbienne extrémophile électro-active des sources hydrothermales profondes alors que les minéraux des cheminées hydrothermales très riches en métaux présentent un contexte favorable aux échanges électroniques (Barge et al., 2018; Girguis & Holden, 2012; Nakamura et al., 2010).

Récemment, une culture d'enrichissement réalisée à partir d'une cheminée hydrothermale du site Rainbow (MAR) a mis en évidence un enrichissement spécifique d'archées des genres *Thermococcus*, *Geoglobus* et *Ferroglobus* (Pillot et al., 2018). *Ferroglobus placidus* et *Geoglobus ahangari* ont précédemment été identifiés comme étant des exo-électrogènes capables de produire un courant électrique lorsqu'ils sont placés à 80 °C dans des cellules microbiennes d'électrolyse (Yilmazel et al., 2018). Une autre étude sur *Pyrococcus furiosus* a montré que certaines *Thermococcales* peuvent être capable de transfert extracellulaire d'électrons et de générer de l'électricité, cependant les mécanismes impliqués n'ont pas encore été identifiés (Sekar et al., 2017). Les processus de minéralisations sont également affectés puisque l'application d'un potentiel électrique dans un système bioélectrique inoculé avec des morceaux de cheminées hydrothermales augmente la formation de minéraux et de la diversité microbienne associée à 30 et 75 °C (Gartman et al., 2017).

Les micro-organismes électro-actifs pourraient ainsi constituer un vaste réseau microbien interconnecté électriquement entre eux et avec la matrice minérale intervenant dans le développement de l'ensemble des populations microbiennes de ces environnements. De plus, il a également été démontré que la génération d'un courant électrique modifie les processus biogéochimiques et le développement des communautés microbiennes (Ishii et al., 2013). Par exemple, *Geobacter sulfurreducens* possède

deux voies de transfert électronique extracellulaire. Elle utilise les minéraux (semi)conducteur pour les transferts électroniques en créant un réseau composé de particules minérales (d'oxyde de fer comme l'hématite, la magnétite ou encore le citrate de fer(II)) et de cellules. En leur absence elle produit un biofilm riche en polymère extracellulaire (Kato et al., 2013).

1.4.2.2. Réactions assimilatrices

Par définition, un processus assimilatif est l'incorporation d'un l'élément chimique dans la cellule. Tous les micro-organismes ont besoin d'incorporer des éléments chimiques constitutifs, les plus courants étant le C, N, O, H, S, Fe mais également des éléments traces essentiels comme certains métaux (Zn, Ni, W, Cu, Co, Mo) (Cameron et al., 2012). En effet de nombreuses protéines impliquées dans les processus métaboliques, les réactions d'oxydoréductions ou encore les transferts d'électrons contiennent un cofacteur métallique. Par exemple les protéines Dps (« DNA binding Protein from nutrient Starved *Escherichia coli* ») de la famille des ferritines carboxylates des micro-organismes comme *Pyrococcus furiosus* ou *Sulfolobus solfataricus* sont impliquées dans la résistance au stress oxydatif en capturant du fer (II) et en l'utilisant pour réduire l'H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène) en H₂O. Le fer (II) est alors oxydé en fer(III) à l'intérieur de la cage protéique (Ramsay et al., 2006; Wiedenheft et al., 2005). L'ensemble des protéines comprenant ou nécessitant un cofacteur métallique est appelé métallome et constitue une biosignature (Cameron et al., 2012). Il est intéressant de noter que les archées possèdent en moyenne un métallome plus important (environ 7 % de métalloprotéine) que les bactéries et les eucaryotes (4 et 1 % respectivement) (Andreini et al., 2009). L'un des exemples de biominéralisation dites « assimilative » le plus connu est celui des bactéries magnétotactiques. Elles forment un groupe fonctionnel sans relation taxonomique, de bactéries synthétisant des structures intracellulaires appelé magnétosomes (Balkwill et al., 1980; Blakemore, 1975). Les magnétosomes se composent de cristaux magnétiques (principalement de magnétite (Fe₃O₄) ou de greigite (Fe₃S₄) entourés d'une membrane lipidique de 3 à 4 nm d'épaisseur (Gorby et al., 1988). Ils sont assemblés sous forme de chaîne à l'intérieur de la cellule et permettent aux bactéries de se déplacer sur le champ magnétique et selon le gradient d'oxygène (magnéto-aérotaxie) (Frankel et al., 1997). Bien que les mécanismes moléculaires ne soient pas encore décrits, le processus général de formation des magnétosomes comporte 4 étapes : la biogénèse de la membrane, le recrutement des protéines, la formation de la chaîne et la biominéralisation (capture du fer, initiation et maturation de la cristallisation) (Komeili, 2012). La magnétite (Fe₃O₄) peut également être produite de manière abiotique. Il est possible de déterminer son origine par analyse chimique. En effet les magnétites abiogéniques contiennent plus d'éléments traces comme le strontium (jusqu'à 4 ordres de magnitude) (Amor et al., 2015). Quelques souches provenant

de sources hydrothermales capables de production de magnétite ont été identifiées : *Geothermobacter ehrlichii* (Kashefi et al., 2003), *Geoglobus acetivorans* qui produit des précipités noirs magnétiques riches en Fe (II) (Slobodkina et al., 2009) ou encore deux hyperthermophiles ferro-réductrice *Hyperthermus* sp. Ro04 et *Pyrodictium* sp. Su06 qui produisent des nanophases (< 12 nm) de magnétite à partir de ferrihydrite [Fe₁₀O₁₄(OH)₂] (Lin et al., 2014).

1.4.2.3. Toxicités

1.4.2.3.a Le cas de l'H₂S

Au niveau des sources hydrothermales profondes, certains composés sont toxiques pour les micro-organismes lorsque leurs concentrations atteignent un certain seuil comme l'H₂S ou certains métaux (comme le Cu, Co, As, Zn) (Gadd & Griffiths, 1977; Vismann, 1991). L'H₂S est l'un des gaz les plus présents dans les fluides hydrothermaux (Charlou et al., 2002; Von Damm, 1995) principalement produit par réduction du SO₄²⁻ et d'autres molécules soufrées lors du lessivage des roches encaissantes au cours de la circulation hydrothermale (Hannington et al., 1995). Il est utilisé dans le catabolisme microbien et peut aussi jouer un rôle physiologique important dans la signalisation cellulaire à faible concentration (Lloyd, 2006; Tobler et al., 2016). Cependant cette molécule est extrêmement toxique pour les formes de vies aérobies du fait de sa capacité à réagir avec de nombreux composants cellulaires (groupes sulfhydriles, des protéines, cations, ...) de par son pouvoir réducteur élevé (Minic et al., 2006). Ainsi les organismes vivants dans ces environnements utilisent différents mécanismes de protection et de tolérances aux effets toxiques de l'H₂S présent en quantité importante (Powell & Somero, 1986; Vismann, 1991) : par imperméabilité et exclusion des sulfures (par exemple par production de mucus, co-précipitation avec du fer ou encore par l'action de bactéries ectosymbiotiques), par l'utilisation de protéines insensibles à l'H₂S, par recours à un métabolisme anaérobie, ou par détoxification directe au sein des tissus par fixation réversible à d'autres composés ou indirecte par l'action de bactéries sulfoxydantes endosymbiotiques. L'un des organismes modèles d'études des mécanismes de tolérances à l'H₂S est le vestimentifère *Riftia pachyptila* (Jones, 1981). Il possède un système de 6 hémoglobines (trois extracellulaires, deux dissoutes dans le sang vasculaire et une dans le fluide coelomique) capables de lier réversiblement sur deux sites différents l'O₂ et l'H₂S (Arp et al., 1987; Powell & Somero, 1983; Zal et al., 1998). Il permet ainsi d'alimenter les bactéries chimioautotrophes endosymbiotiques présentes dans les trophosomes en donneur d'électrons tout en conservant une concentration d'H₂S dans les tissus en deçà du seuil de toxicité. Ces hémoglobines présentent également une plus forte affinité avec l'H₂S que la cytochrome c oxydase (enzyme clé de la chaîne respiratoire mitochondriale) qui est une des enzymes les plus sensibles à l'H₂S chez *Riftia* (Powell & Somero, 1983). La production de vésicules de S⁰ pourrait également être un mécanisme de détoxification du soufre comme par

exemple chez les endosymbiontes localisés dans le trophosome de *Riftia pachyptila* (Cavanaugh et al., 1981; Pflugfelder et al., 2005) ou de *Sclerolimum contortum* (Eichinger et al., 2014) ou chez certaines hyperthermophiles de l'ordre des *Thermococcales* (Gorlas et al., 2015).

Cependant la présence d'H₂S peut être bénéfique pour certains micro-organismes en diminuant la toxicité des métaux en les rendant moins biodisponibles par formation de sulfures métalliques (Edgcomb et al., 2004). En effet les fluides hydrothermaux transportent également des métaux lourds (Von Damm, 1995). Du fait du mélange avec l'eau de mer oxygénée, les métaux passent d'une forme associée aux sulfures (peu biodisponible et faiblement toxique) à une forme oxydée plus soluble qui augmente leur biodisponibilité et leur toxicité pour les cellules (Luther et al., 2001; Nies, 1999). Les métaux lourds peuvent avoir différents effets délétères sur les fonctions cellulaires, ils peuvent se lier à des anions et bloquer les groupes fonctionnels des enzymes, remplacer les métaux fonctionnels des sites catalytiques ou encore perturber l'intégrité membranaire (Gadd & Griffiths, 1977; Nies, 1999).

1.4.2.3.b Les mécanismes de tolérance et de dégradation

La tolérance à de nombreux métaux a été étudiée chez les micro-organismes (Crepo-Medina et al., 2009; Jannasch et al., 1992; Jeanthon & Prieur, 1990; Klevenz et al., 2012; Llanos et al., 2000; Rathgeber et al., 2002), sur la méiofaune (Atkins et al., 2002) et sur la macrofaune (Cosson et al., 2008; Kádár et al., 2005; Minic et al., 2006) qui colonisent ces environnements. Il est apparu qu'ils sont capables de tolérer des quantités plus importantes que celles présentes dans l'environnement avec des concentrations minimales inhibitrices supérieures aux concentrations environnementales (Lloyd et al., 2005). Cinq types de mécanismes de résistance/tolérance aux métaux afin de les rendre moins toxique/biodisponible ont été identifiés : l'expulsion du composé de la cellule, la conversion enzymatique, la séquestration intra ou extra cellulaire, l'imperméabilité et la réduction de la sensibilité des cibles cellulaires (Dopson et al., 2003) (FIGURE 31).

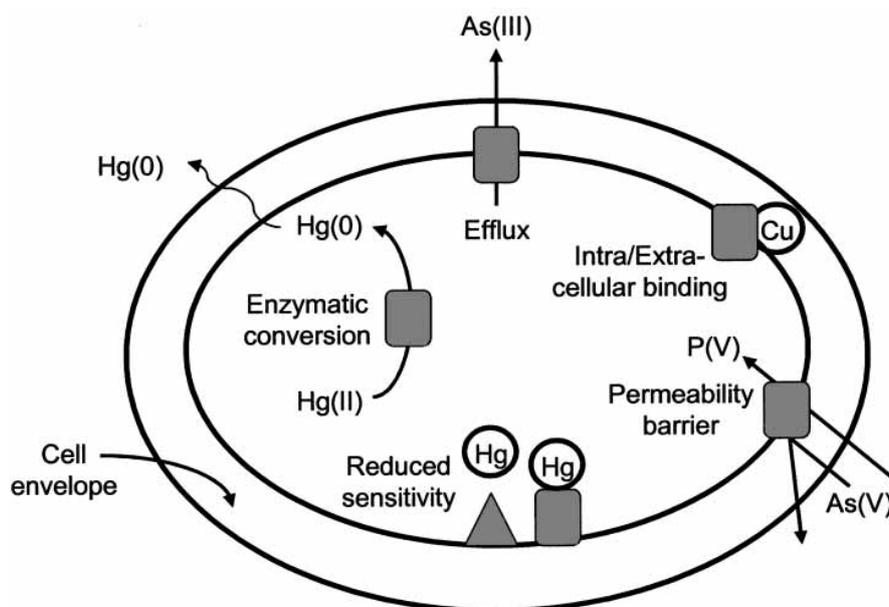


Figure 31 : Schéma des mécanismes de résistances aux métaux identifiés chez les micro-organismes. Les mécanismes de tolérances sont : L'expulsion du composé de la cellule, la conversion enzymatique sous une forme moins toxique, la séquestration intra ou extra cellulaire, l'imperméabilité et la réduction de la sensibilité des cibles cellulaires. (Dopson et al., 2003).

Les cellules peuvent aussi transformer un composé toxique afin de le rendre inoffensif. Ainsi certaines bactéries isolées de fluides du site 9°N situé sur l'EPR sont résistantes au mercure. Elles possèdent l'opéron mer qui code notamment pour une Mercure(II) réductase qui réduit les ions Hg (II) en mercure élémentaire Hg (0) (Vetriani et al., 2005). *Pseudomonas aeruginosa* CW961 isolée près d'un site hydrothermal de Juan de Fuca (Wang et al., 1997) tolère jusqu'à 5 mM de Cd²⁺ en le précipitant en sulfure de cadmium en présence de thiosulfate (Wang et al., 2002). C'est également le cas de certaines *Alphaproteobacteria* et *Gammaproteobacteria* qui produisent des ligands organiques capables de fixer le cuivre réduisant la concentration de Cu²⁺ du milieu et donc sa biodisponibilité (Klevenz et al., 2012; Sander et al., 2007). De nombreuses bactéries isolées au niveau des sources hydrothermales profondes produisent des exopolysaccharides (Guezennec et al., 1994; Vincent et al., 1994) qui présentent de fortes affinités pour chélater certains métaux lourds (plomb, cadmium, zinc ou encore le mercure) (Cruz et al., 2017; Loaëc et al., 1997) et diminuer l'exposition des cellules à ces métaux. Certaines ont été isolées d'animaux comme le polychète *Alvinella pompejana* (Rougeaux et al., 1999; Vincent et al., 1994) ou encore la crevette *Rimicaris exoculata* (Raguénès et al., 2003). La production de mucus serait également un mécanisme de détoxification utilisé par *Alvinella* pour certains métaux (Fe, Zn, Cu) mais également du soufre (Alain et al., 2002; Juniper et al., 1986). Les mucus sont également riches en métallothionéines, des protéines ayant la capacité de complexer les métaux (Kägi, 1991). L'utilisation de ces protéines est un autre mécanisme de protection opéré par les animaux, par exemple chez la

crevette *Rimicaris exoculata* (Geret et al., 2002), le vestimentifère *Riftia pachyptila* (Cosson, 1996) ou encore la moule *Bathymodiolus azoricus* (Cosson et al., 2008). La réponse est spécifique puisque seule l'exposition à certains métaux (Ag, Cu, Cd, Hg, Zn) induit la synthèse de métallothionéines chez *Bathymodiolus thermophilus* (Hardivillier et al., 2006). Il existe peu d'études de toxicologie des minéraux sur la croissance des micro-organismes. Cependant il est intéressant de constater que l'ajout de 0,25 % de pyrite (FeS_2), de chalcocite (Cu_2S) ou de wurtzite (Zn,FeS) inhibe la croissance de deux micro-organismes *P. furiosus* et *Methanocaldococcus villosus* en culture pure. En réduisant la concentration de la chalcocite et de la pyrite à 0,05 %, l'inhibition de la croissance est levée (Wirth et al., 2018).

1.4.3 La colonisation microbienne en milieu hydrothermal profond

1.4.3.1. Les stratégies de dispersion

Le fonctionnement et les interactions des communautés microbiennes avec la géosphère restent mal définis, principalement en raison des contraintes expérimentales imposées par ces environnements complexes et difficiles d'accès. Les édifices hydrothermaux nouvellement formés du fait des très hautes températures des fluides sont initialement stériles (Wirth et al., 2018) mais sont rapidement colonisés lorsque les conditions deviennent compatibles avec la vie. Les processus de colonisations initiant l'arrivée et le maintien des communautés microbiennes ne sont pas encore compris. Deux hypothèses sont possibles : la colonisation des fumeurs noirs par les hyperthermophiles pourrait se faire à partir des micro-organismes présents dans l'eau de mer froide environnante (issue du même site ou d'un autre site) (Holden et al., 1998) ou pourrait être réalisée par les micro-organismes présents en profondeur dans le plancher océanique (Deming & Baross, 1993; Gold, 1992). Il a été démontré que de nombreux micro-organismes hyperthermophiles peuvent survivre une longue période à basse température et réagir rapidement à une augmentation de température (Huber et al., 1990; Lesongeur et al., 2014; Summit & Baross, 1998). Wirth et al. ont émis l'hypothèse qu'ils pourraient être transférés sur l'extérieur des édifices par les courants marins et adhérer à leur surface via leurs flagelles (Wirth, 2017; Wirth et al., 2018). Les micro-organismes hyperthermophiles sont très mobiles, exhibant deux modes de mobilité (un mode linéaire très rapide permettant de parcourir des distances de l'ordre du mm en quelques secondes, et un mode en zigzag 10 % plus lent) et sont capables d'adhérer à de nombreuses surfaces biotiques et abiotiques (Herzog & Wirth, 2012; Wirth, 2017). La colonisation préférentielle de certaines matrices minérales pourrait être liée à leurs besoins nutritionnel et énergétique (Edwards et al., 2000). Ainsi Edward et al. ont mis en évidence que la bactérie *Thiobacillus caldus* (sulfo-oxydante) sélectionne son site en réponse à un gradient de sulfure (Edwards et al., 2000).

La texture de la surface est également importante, *P. furiosus* s'attache par l'insertion d'au moins un flagelle de $< 1 \mu\text{m}$ dans les fissures du minéral (Wirth et al., 2018). Cette liaison est assez solide pour résister à un lavage. Les interactions peuvent également être passives, les minéraux servent alors uniquement de surface d'attachement.

1.4.3.2. Colonisateurs *in situ*

Un certain nombre d'études sont consacrées au processus de colonisation dans ces environnements. De nombreux modules de colonisation ont été développés pour étudier les processus de colonisation des cheminées (Karl et al., 1988; Nercessian et al., 2003; Reysenbach et al., 2000; Schrenk et al., 2003; Takai et al., 2003) mais également des sédiments (Callac et al., 2013), des fluides (Huber et al., 2002) ou des tapis microbiens (Crépeau et al., 2011).

1.4.3.2.a Le « Vent Cap »

Par exemple pour étudier la colonisation des cheminées hydrothermales, le « Vent Cap » développé par Norman Pace (Karl et al., 1988) est constitué d'un cône en titane placé au point d'émission d'une cheminée active. Le fluide passant continuellement au travers de la chambre permet la colonisation des surfaces placées à l'intérieur en apportant des nutriments pour la croissance des micro-organismes (FIGURE 32). Le premier déploiement a été réalisé dans le Bassin de Guaymas (Karl et al., 1988) sur deux cheminées pendant deux jours. Différents substrats de colonisations (silicone, pyrex, titane, pyrite (FeS_2) et marcasite (FeS_2)) ont été déposés à l'intérieur de la chambre d'incubation mais également attachés sur les parois externes. Aucune colonisation microbienne n'a été observée lors du premier déploiement (température comprise entre 150 et 180 °C). Un autre module, le « Smoker poker » (FIGURE 32) a également été déployé lors de la même expérience : les nombreuses cellules observées et enrichies étaient également présentes dans les enrichissements réalisés à partir de l'eau de mer environnante suggérant que les micro-organismes mésophiles et thermophiles observés dans le panache hydrothermal provenaient probablement des habitats périphériques.

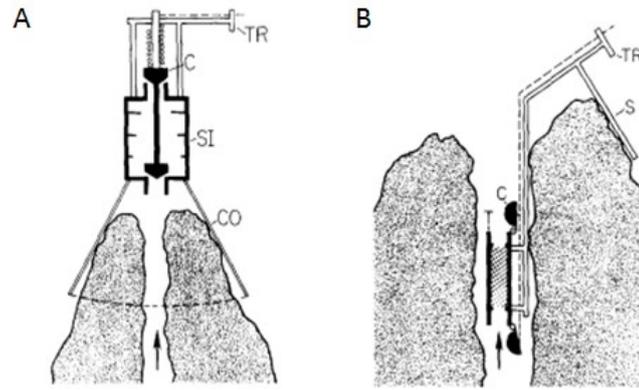


Figure 32 : Schémas de deux modules de colonisations microbiennes. A : cap vent ; B : Smoker Poker. (Karl et al., 1988).

Le deuxième déploiement référencé du module « Vent cap » a eu lieu sur deux cheminées du site Snake Pit à 3500 m (Les Ruches et Chi) situés sur la ride médio-atlantique (MAR) pendant 5 jours durant la campagne MICROSMOKE (1995). Il a permis le suivi de la colonisation sur deux points d'émissions différents (Corre et al., 2001; Reysenbach et al., 2000) d'un même site. Pour le site « Les ruches », la diminution de la température à l'intérieur du module, de 70 à 20 °C au 5^{ième} jour, n'a pas permis d'étudier la colonisation par des communautés hyperthermophiles et un basculement d'une communauté hyperthermophile à mésophile a été observé. Elle met en évidence une diversité plus importante que celle obtenues par les techniques de cultures d'enrichissement classiques. Les bactéries sont plus abondantes que les archées. Les séquences archéennes appartiennent majoritairement à deux groupes, les *Thermococcales* (71 %) et les *Archaeoglobales* (22 %). Trois singletons ont également été obtenus appartenant au *Thermoplasmales* (thermoacidophile), une *Crenarchaeota* (Marine Group II) et une *Euryarchaeota* Marine Group IV. Les séquences bactériennes sont affiliées au ϵ -*Proteobacteria* (43 %), au genre *Desulfurobacterium* (25 %) et les *Aquificales* (18 %). Ces dernières représentent 10 % des cellules totales observées en FISH. Les morphologies sont très variées avec des coques, des bacilles et des filaments de tailles et de diamètres différents. Sur le site Chi, contrairement aux bactéries, les archées n'ont pas été détectées. La température à l'intérieur de la chambre d'incubation était plus basse que sur le premier site avec une température variant entre 13 et 30 °C (moyenne de 20 °C). Sur les 87 clones obtenus, 99 % appartenaient aux ϵ -*Proteobacteria*, dont 33 % à un nouvel ordre et 1 % aux *Aquificales* (Corre et al., 2001).

Reysenbach et al., émettent l'hypothèse que les chimiolithoautotrophes colonisent les surfaces et qu'à la suite de l'accumulation du carbone organique, apparaissent les hétérotrophes thermophiles (Reysenbach et al., 2000). Cependant des résultats contraires ont été observés par Nercessian *et al* qui ont également utilisé le « Vent Cap » pour étudier la diversité microbienne sur trois cheminées actives

de la dorsale du Pacifique oriental (13° N) à 2600 m de profondeur (Nercessian et al., 2003). Les séquences des banques de clones étaient majoritairement affiliées aux *Thermococcales* (hyperthermophiles chimioorganotrophes) dont les proportions dans les banques de clones diminuent avec le temps, de 77 % au 7^{ième} jours à 49 % au 11^{ième} jour sur le site PulsarPP55 et de 97 % à 40,7 % sur le site Grandbonum du 4^{ième} au 5^{ième} jour. Pour chaque site lors du deuxième temps des séquences appartenant aux ordres *Methanopyrales*, *Methanococcales*, *Archaeoglobales* et *Desulfurococcales* (chimioolithoautotrophe) ont été détectées. Ils ont d'ailleurs pu estimer par hybridation *in situ* la proportion de cellules archéennes entre 14 et 33 % du nombre total de cellules des échantillons.

Cependant les résultats d'autres études, utilisant des modules de colonisations différents, viennent appuyer l'hypothèse de Reysenbach et al (McCliment et al., 2006; Pagé et al., 2008). Le déploiement d'un module couplé à un système mesurant la température *in situ* pendant 72 jours dans le bassin de Guaymas a permis l'étude de la diversité dans le temps (4 et 72 jours) ainsi que l'influence de la température (Pagé et al., 2008). Les auteurs suggèrent une transition temporelle de la source primaire de carbone utilisée par les communautés archéennes, les méthanogènes utilisant le CO₂ et H₂ (*Methanocaldococcus* et *Methanococcaceae*) sont remplacées progressivement par des chimioorganotrophes (*Korarchaeota*, *Aciduliprofundales*). McCliment et al. observent que les premiers colonisateurs de leurs modules sont des *Ignococcus* (hydrogène-oxydant anaérobies) et leur symbionte *Nanoarchaeum* (McCliment et al., 2006). Ils obtiennent également des séquences de *Thermococcales* dans leurs banques de clones (13 %). Il semblerait donc que la colonisation soit rapidement initiée par des archées chimioolithoautotrophes (McCliment et al., 2006; Pagé et al., 2008; Reysenbach et al., 2000). L'accumulation de carbone organique et l'évolution minéralogique de la structure (d'une cheminée jeune et poreuse composée d'anhydrite à un stade avancé composé de wurtzite et de sphalérite) pourrait favoriser l'apparition des chimioorganotrophes et par conséquent l'augmentation de la diversité et la densité des communautés (F. Wang et al., 2009).

1.4.3.2.b D'autres exemples d'outils *in situ*

Une autre stratégie que le déploiement d'un module de colonisation à la sortie d'une cheminée déjà existante est de créer un événement artificiel par forage. Quatre « vent cathéter » ont été déployés sur le site Suiyo Seamount au niveau de l'Arc Izu-Bonin à 1380 m de profondeur pendant 3 à 10 jours (températures comprises entre 89 et 310 °C) La diversité bactérienne obtenue est importante avec majoritairement des ϵ -*Proteobacteria* (39 %). Des α -*Protéobactéria* (14 %) et des γ -*Protéobactéria* (8 %) ont également été détectées. Les banques de clones archéens (29 clones) sont dominées à 90 % par le phylotype SSSV-AE1 pour "Suiyo Seamount sub-vent origin, Archaea domain, Euryarchaeota, group 1".

Ce phylotype forme un clade monophylétique associé au *Methanococcales* (82 %) et au DHVE Group II (79 %). Deux séquences d'*Archaeoglobales* et une de *Thermococcales* complètent la banque de clone (Higashi et al., 2004).

Un autre module de colonisation (ISCD) avait été précédemment déployé en 2005 sur ce même site pendant 2 jours. La température entrante était de l'ordre de 230 °C alors que celle sortante était de 25 °C. Les cultures d'enrichissements réalisées à partir des substrats de colonisations ont permis d'isoler des *Thermosipho* (*T. globiformans*), des *Deferribacter* mais également des *Thermococcales* (Kuwabara et al., 2007). Cette stratégie avait déjà été utilisée avec succès lors du déploiement de plusieurs modules ISCS (in situ colonization systems (Takai et al., 2003)) avec la remise en culture de *Thermococcales*, de *Methanococcales*, d'*Aquificales* et d'*Epsilonproteobacteria* à partir des substrats de colonisations (Takai, Gamo, et al., 2004).

La diversité associée à des substrats placés au niveau de diffuseurs de température plus basses grâce à l'utilisation du module AISICS contenant des basaltes dans les sédiments percolés par du fluide hydrothermal dans le bassin de Guaymas (Callac et al., 2013) ou des basaltes déployés sur des zones de diffusion sur l'EPR (Gulmann et al., 2015) ; est différente de celle des cheminées hydrothermales avec une prépondérance majeure de bactéries principalement des *Epsilonproteobacteria* dans un premier temps suivi par une augmentation de la diversité phylogénétique et métabolique (Callac et al., 2013; Gulmann et al., 2015). Les colonisations sont très rapides de l'ordre de quelques jours. Par exemple, différents substrats artificiels (plastiques et métaux) ont été placés au contact d'un fluide diffus (5-20 °C) pendant 12 jours (Guezennec et al., 1998). Tous les substrats ont été rapidement colonisés par des bactéries filamenteuses (dans les 4 jours) avec cependant une plus grande biomasse pour les substrats inertes en titane ou en acier inoxydable. Les contrôles expérimentaux placés à l'extérieur de la zone d'influence du fluide hydrothermal n'ont pas été colonisés. Leveillé et al. ont également observé que l'importance de la colonisation de sulfures diminue en s'éloignant de la zone d'influence du fluide hydrothermal (Leveillé & Juniper, 2002). Les sulfures ont été colonisées au bout de 12 mois et présentaient des traces d'altérations marquées (oxydation significative des minéraux sulfurés, et à la formation d'une couche d'oxyde de fer sur les cristaux de pyrite). Le module TRAC (Titanium Ring for Alvinella Colonization) contenant des échantillons de cheminées hydrothermales placé sur un diffuseur (20-40 °C) pendant 10 jours (Taylor et al., 1999) a été colonisé en 2 jours par un tapis de bactéries filamenteuses puis au 10^{ième} jour par des juvéniles d'*Alvinella*. Des résultats similaires ont été obtenus lors du déploiement d'un collecteur *in situ* dans du fluide diffus (11-45 °C, probablement 20 °C) colonisé en 5 jours par un tapis microbien de filaments blancs composé majoritairement d'*Epsilonproteobacteria* (*Arcobacter*) et des juvéniles d'*Alvinella* (Moussard et al., 2006). Le déploiement de substrats avec le module TAMS (Temporal Autonomous Multi-disciplinary Substrates) a également mis en évidence

l'influence du fluide hydrothermal sur la diversité microbienne et la colonisation de la mégafaune. Dans une zone proche du flux hydrothermal (1,6-25,2 °C et $[H_2S] = 67,3 \mu m$), le module est colonisé par un biofilm d'*Epsilonproteobacteria* avec la présence de Siboniglinidé. Tandis que le module localisé dans une zone éloignée du flux (1,2-5,2 °C et $[H_2S] = 0,3-2,9 \mu M$) le module est uniquement colonisé par des *Gammaproteobacteria* (O'Brien et al., 2015).

Ces différentes méthodes permettent d'identifier des candidats potentiels de colonisation mais il reste difficile de conclure sur les processus de colonisation. Les conditions de déploiement des modules sont différentes : temps d'incubations variables sur des sites différents avec des données physico-chimique manquantes (température, pH, ...) et utilisant des substrats différents (naturels ou artificiels). Les approches *in-situ* ne permettent pas de caractériser les interactions existantes entre les cellules colonisatrices et le substrat de colonisation. Les diversités obtenues lors du déploiement de module de colonisation sont en accord avec les diversités microbiennes des échantillons bruts. Les zones externes sont majoritairement colonisées par des bactéries principalement des ϵ -*Proteobacteria* mésophiles alors que les zones internes des édifices sont majoritairement colonisées par des archées (notamment par les chimioorganotrophes *Thermococcales*) (Orcutt et al., 2011). Les résultats préliminaires d'une étude originale menée au laboratoire vont également dans le même sens. Une cheminée active du site Tour Eiffel, située sur le champ hydrothermal Lucky Strike a été échantillonnée à plusieurs reprises depuis 2005. L'étude de la diversité microbienne met en évidence que la structure et la diversité des communautés microbiennes évolue avec la complexification de la minéralogie (avec une majorité de *Thermococcales* et d'*Epsilonproteobacteria*) (Communication personnelle d'A. Godfroy).

1.5. Les *Thermococcales*, acteurs importants des écosystèmes hydrothermaux profonds ?

1.5.1 Généralités

L'ordre des *Thermococcales* (Zillig et al., 1983), du phylum des *Euryarchaeota* et divisé en trois genres (*Pyrococcus* (Fiala & Stetter, 1986), *Thermococcus* (Zillig et al., 1983), et *Palaeococcus* (Takai et al., 2000)), est l'un des ordres les plus souvent décrit au niveau des sources hydrothermales profondes. Ses représentants sont quasiment détectés sur tous les sites hydrothermaux côtiers et profonds de la planète (Prieur et al., 1995; Schut et al., 2014). C'est l'un des ordres d'*Archaea* les plus étudiés, que ce soit du point de vue physiologique, métabolique et génétique, avec un grand nombre d'isolat dont *T. celer* qui fut l'une des premières espèces d'hyperthermophiles isolées. Certaines d'entre elles sont des modèles d'études de références comme *P. abyssi* et *T. kodakarensis* KOD1^T (Leigh et al., 2011). Elles sont toutes chimioorganohétérotrophes, anaérobies stricts et assimilent les substrats peptidiques et oligo-saccharidiques couplés à la réduction du S⁰ ou des protons. Certaines souches présentent des capacités métaboliques singulières comme la réduction du fer (III) (Slobodkin et al., 2001) ou encore l'utilisation du CO (Sokolova et al., 2004) comme source d'énergie. Malgré les connaissances déjà acquises il reste de très nombreuses interrogations concernant leurs diversité et capacités métaboliques *in situ*.

A ce jour, 42 espèces de *Thermococcales* ont été caractérisées (33 *Thermococcus*, 6 *Pyrococcus* and 3 *Palaeococcus*) (Parte, 2018) et 31 génomes sont disponibles dans les bases de données (24 *Thermococcus*, 5 *Pyrococcus*, 2 *Palaeococcus*). La majorité des espèces de cet ordre a été isolée de sources hydrothermales marines côtières et profondes (Prieur et al., 1995; Schut et al., 2014). Elles ont la capacité de se disperser dans tous les océans puisqu'elles ont été isolées de toutes les zones du globe et y sont détectées dans les inventaires moléculaires (Rutherford, 2014). Quelques souches ont également été isolées de source chaudes terrestres comme *T. zilligii* (Ronimus et al., 1997) et *T. waiotapuensis* (González et al., 1999) de Nouvelle-Zélande, ou d'Algérie comme *Pyrococcus* sp.HT3 (Kecha et al., 2007) ou de puit de pétrole comme *T. sibiricus* (réservoir pétrolier de Sibérie de l'Ouest) (Miroshnichenko et al., 2001).

Elles sont capables de croissance sur de larges gammes de conditions physico-chimiques. La température minimale de croissance est de 40 °C pour *T. sibiricus* et la température maximale est de 108°C pour *P. endeavori* (Holden & Baross, 1993), mais la plupart des *Thermococcales* présentent des températures optimales de croissances autour de 80 °C pour les *Thermococcus* et *Palaeococcus* et de 95 °C pour les *Pyrococcus*. Elles ont généralement des pH optimums de croissance proche de la neutralité (entre 6,5 et 7,5), certaines espèces sont des alcalinophiles modérés (*T. acidaminovorans* pH

9 et *T. alcaliphilus* pH 9 et *T. onnurineus* NA1 pH 8,5). Elles peuvent généralement supporter une large gamme de pH ; par exemple *T. hydrothermalis* AL662^T présente une croissance pour des pH compris entre 4 et 9,5. Certaines d'entre elles sont strictement ou facultativement piézophiles (Birrien et al., 2011; Marteinsson et al., 1999), par exemple *T. piezophilus* CDGS^T, isolée de la fosse des Caïmans à une profondeur de 4964 m, est capable de se développer à des pressions allant de la pression atmosphérique à 130 MPa (P° optimale : 50 MPa) (Dalmaso et al., 2016). Le record de pression optimale de croissance est de 52 MPa chez *P. yayanossii* Ch1^T (Birrien et al., 2011).

Par ailleurs, le nombre de génomes disponibles concernant les *Thermococcales* est important et constitue un jeu de donnée unique avec 33 génomes disponibles dans les bases de données publiques. Les *Thermococcales* ont un seul chromosome dont la taille moyenne est autour de 2 000 000 de paires de bases pour environ 2 000 gènes. *T. barophilus* Ch5 possède le plus grand génome (2,39 Mbp) et *T. sp. P6* le plus petit (1,52 Mbp). Les chromosomes des *Thermococcales* ont un degré remarquable d'ordre, maintenu dans leur *core-genome* (gènes communs à toutes les souches), malgré un niveau élevé de réarrangements (notamment d'inversions) (Cossu, 2017). Ils possèdent des éléments génétique mobiles comme des virus et des plasmides dont une dizaine ont déjà été décrits (Gorlas et al., 2013; Lossouarn et al., 2015; Prieur et al., 2004). D'après une récente comparaison génomique réalisée sur des pan-génomes (l'ensemble des gènes), il semblerait que la phylogénie des *Thermococcales* soit amenée à évoluer, le genre *Thermococcus* ne constituerait pas un groupe monophylogénétique (Courtine, 2017).

1.5.2 Métabolismes

1.5.2.1. Catabolisme des peptides

Toutes les *Thermococcales* peuvent utiliser des complexes peptidiques comme source de carbone (Schut et al., 2014) (FIGURE 33A). De nombreuses protéases extracellulaires qui permettent la conversion des protéines en di/oligo-peptides ont été caractérisées (Dib et al., 1998; Kannan et al., 2001; Morikawa et al., 1994). La cellule importe ensuite les peptides par des systèmes de transport di/oligo-peptidique de type ABC ou de la famille des transporteurs OPT (Albers et al., 2004). Les peptides sont ensuite clivés par des peptidases (par exemple : des aminopeptidases ou des carboxypeptidases) pour former des acides aminés. La suite du processus se déroule en 3 étapes : la transamination entre un 2-cétoglutarate et un acide aminé qui engendre la formation d'un 2-cétoacide, la décarboxylation oxydative de ce dernier en dérivé acyl-CoA correspondant, puis la production d'un acide organique avec une étape de phosphorylation (Schut et al., 2001). Au cours de la transamination, le 2-cétoglutarate sert d'accepteur du groupe amine ce qui entraîne la formation de glutamate. La glutamate déhydrogénase (GDH), (Robb

et al., 1992) catalyse la déamination oxydative du glutamate pour régénérer le stock de 2-cétoglutarate en utilisant le NADP⁺ comme accepteur d'électrons. Cette enzyme est très conservée au sein des *Thermococcales*. Ce processus est réversible et permet l'assimilation d'ammonium pour fournir du glutamate pour la biosynthèse. Actuellement 4 enzymes (les 2-cétoacide oxydoréductase KORs) sont connues pour catalyser la décarboxylation oxydative de 2-cétoacides spécifiques : KGOR (2-cétoglutarate (Mai & Adams, 1996)), IOR (2-cétoacide aromatique comme l'Indolepyruvate, (Mai & Adams, 1994)), VOR (2-cétoacide ramifié (Heider et al., 1996)) et POR (Pyruvate, (Kletzin & Adams, 1996)). Elles permettent l'oxydation du 2-cétoacide en présence du CoASH en acyl-CoA et en CO₂ en utilisant la ferrédoxine comme accepteur d'électrons. Enfin la dernière étape est la transformation des dérivés acyl-CoA en acides organiques correspondant par deux acétyl-CoA synthases avec formation d'un ATP (Mai & Adams, 1996).

Il existe également une voie alternative d'assimilation des acides aminées, en effet il a été supposé que selon la balance redox de la cellule, les 2-cétoacides peuvent être décarboxylés en aldéhydes puis oxydés pour former un acide carboxylique par une aldéhyde ferredoxine oxydoreductase (AOR (Mukund & Adams, 1991)). En l'absence d'accepteur terminal d'électron S⁰, les enzymes alcool déshydrogénase (ADH) pourraient être responsables de la réduction des aldéhydes en alcool couplé à l'oxydation du NADPH en NADP⁺ (Ma et al., 1997).

1.5.2.2. Catabolisme des sucres

Certaines *Thermococcales* présentent des croissances hétérotrophes sur une variété d'oligosaccharides avec plusieurs degrés de polymérisations différents (par exemple : le glucose (Schäfer et al., 1994), le glycogène (Callac et al., 2016), l'amidon (Lee et al., 2006), la chitine (Horiuchi et al., 2016) ou encore la cellulose (Gavrilov et al., 2016)). Ils sont transportés à l'intérieur de la cellule pour y être hydrolysés en glucose. De nombreux transporteurs ont été décrits comme le système de type ABC (ATP Binding cassette) Mal-I chez *T. litoralis* NS-C^T pour le transport du maltose et du tréhalose (Xavier et al., 1996) ou encore chez *P. furiosus* Mal-II pour le transport du cellobiose et de la plupart des β-glucosides (Koning et al., 2001).

Toutes les *Thermococcales* possèdent une version modifiée de la voie d'Embden-Meyerhof (EM) pour réaliser la glycolyse même celles qui ne peuvent pas utiliser les oligosaccharides comme source de carbone (Verhees et al., 2003) (FIGURE 33D). Ceci pourrait être expliqué par le fait que le glycogène (polymère du glucose) soit utilisé comme composé de stockage d'énergie (König et al., 1982). Les modifications de la voie d'EM chez les *Thermococcales* sont l'utilisation d'enzymes ADP-dépendantes (et non ATP-dépendantes) au niveau de l'hexose kinase et de la phosphofructokinase (Kengen & Stams,

1994; Kengen et al., 1995) ainsi que le remplacement de deux enzymes dans la voie « classique » à savoir la GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogénase) et la PGK (Phosphoglycérate kinase) par une seule enzyme, la GAPOR (Glyceraldéhyde-3-phosphate:ferredoxin oxydoréductase) (Mukund & Adams, 1995; van der Oost et al., 1998).

Alors que la voie traditionnelle entraîne la formation d'énergie sous forme d'ATP et de NADH (Glucose + 2ADP + 2P_i + 2NAD⁺ → 2 pyruvates + 2ATP + 2NADH + 2H⁺), la version modifiée présente chez les *Thermococcales* n'entraîne pas la formation d'ATP mais conduit à la formation d'ion H⁺ et fait intervenir une ferrédoxine comme accepteur d'électron (Glucose + 4fd_{ox} → 2 pyruvates + 4fd_{red} + 4H⁺). Le pyruvate produit est alors oxydé en acétyl-CoA avec réduction d'une ferrédoxine par une pyruvate ferrédoxine:oxydoréductase (POR) (Blamey & Adams, 1993) (FIGURE 33C). Puis l'acétyl-CoA est converti en acétate par une ADP-dépendante acétyl-CoA synthase avec production d'ATP. La ferrédoxine est donc la seule protéine transporteuse d'électron au cours du métabolisme des sucres.

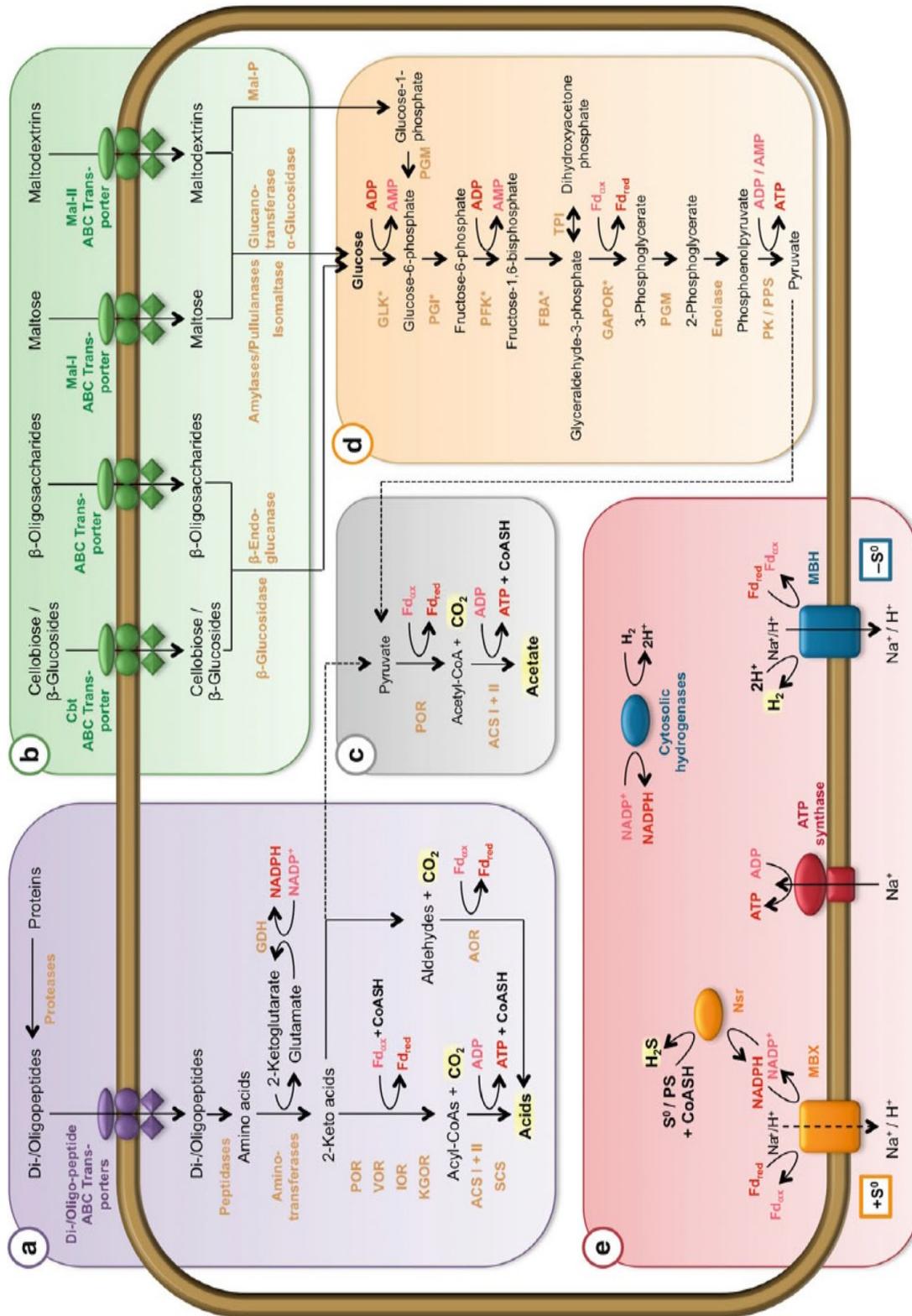


Figure 33 : Métabolisme général des *Thermococcales*. (a) Transport et utilisation des sucres. (b) Métabolisme des peptides. (c) Métabolisme des sucres. (d) Dégradation du pyruvate. (e) Métabolisme du soufre et de l'H₂. (Schut et al., 2014).

1.5.2.3. Synthèse d'ATP et hydrogénases

Il n'y a pas de gain net d'ATP au cours de la glycolyse chez les *Thermococcales*. Elles conservent l'énergie grâce à deux types d'hydrogénases (de type [NiFe]) qui sont couplées à la réduction soit de S^0 en H_2S soit de proton H^+ en H_2 (FIGURE 33E).

La Mbh (Membrane-Bound Hydrogenase complex) génère de l' H_2 par réduction d'un proton avec la ferrédoxine comme donneur d'électron. Elle fonctionne également comme pompe à proton ce qui crée une force proto-motrice (Na^+/H^+) au travers de la membrane qui est utilisée par une ATP synthase pour la synthèse d'ATP (Pisa et al., 2007; Sapro et al., 2003). Ce complexe, découvert chez *P. furiosus* (Sapro et al., 2000), est codé par un opéron de 14 gènes (PF1423-1436, MbhA-N) et se compose de deux sous-unités : le système antiport Na^+/H^+ (MbhA-H) et l'hydrogénase (MbhI-N). Ce processus représente l'une des formes de respiration cellulaire la plus simple puisque c'est le proton lui-même l'accepteur terminal. Des mutations ciblées sur le complexe Mbh de *T. kodakarensis* KOD1^T et de *P. furiosus* montrent qu'il est essentiel pour la croissance en absence de S^0 (Kanai et al., 2011; Schut et al., 2012) démontrant ainsi que c'est la seule enzyme qui puisse éliminer du pouvoir réducteur (ferrédoxines réduites).

Les *Thermococcales* possèdent également un complexe homologue à l'hydrogénase Mbh, le complexe Mbx (Silva et al., 2000) qui ne fonctionne qu'en présence de S^0 (Schut et al., 2007). Ce n'est pas une hydrogénase *stricto sensu* mais sa fonction est analogue à celle de la Mbh, c'est-à-dire de recycler la ferrédoxine réduite avec création d'un gradient ionique (Bridger et al., 2011; Silva et al., 2000). Toutefois son fonctionnement est différent. L'oxydation de la ferrédoxine est couplée à la réduction de NADPH, puis ce dernier est ensuite utilisé par une CoASH-dépendant Mbx S^0 réductase (NSR) pour réduire le S^0 en H_2S (Schut et al., 2007). La délétion de la sous-unité catalytique (MbxL) du complexe Mbx entraîne une forte diminution de la croissance (70 % de perte par rapport à la souche sauvage) (Bridger et al., 2011).

Elles peuvent également posséder deux autres NiFe-hydrogénase cytosoliques SHI et SHII (SH pour Sulfhydrogenase car elles catalysent la réduction du S^0 en H_2S) également dénommées Hyh-I/Hyh-II (Bryant & Adams, 1989; Ma & Adams, 2001; Ma et al., 1993) dont la délétion chez *P. furiosus* et *T. kodakarensis* KOD1^T n'entraînent pas d'effets majeurs sur la croissance (Kanai et al., 2011; Santangelo et al., 2011; Schut et al., 2012). Leurs rôles physiologiques exacts ne sont pas connus mais il a été proposé qu'elles permettraient de (ré)générer du NADPH pour la biosynthèse en utilisant l' H_2 (externe ou endogène) comme donneur d'électron (Kanai et al., 2011; Ma & Adams, 2001). En effet la délétion du gène codant l'unité HyH entraîne une augmentation de la production d' H_2 par rapport à la souche non mutée.

1.5.2.4. Effet métabolique du S^0

La présence ou l'absence de S^0 conditionne la façon dont le pouvoir réducteur va être évacué de la cellule (production d' H_2 par Mbh ou production d' H_2S par Mbx/Nsr). Les *Thermococcales* possèdent un régulateur transcriptionnel spécifique SurR (Sulfur Response Regulator) (Lipscomb et al., 2009; Yang et al., 2010) qui peut se lier à l'ADN lorsqu'il est sous sa forme réduite et qui ne le peut plus lorsqu'il est sous sa forme oxydée (FIGURE 34).

Sous sa forme réduite, SurR active la transcription des gènes qui codent les hydrogénases et réprime l'expression de ceux impliqués dans la réduction du S^0 (par exemple : les gènes codant les protéines NSR, MBX et PDO). En présence de S^0 , le motif CxxC de SurR devient oxydé, et rend la protéine incapable de se lier à l'ADN, ce qui cause la dérégulation des gènes. La cellule s'adapte ainsi très rapidement (de l'ordre de la dizaine de min) à la présence de S^0 dans le milieu (Jäger et al., 2014; Schut et al., 2007). Une modification métabolique est engendrée par la présence de S^0 au niveau de l'élimination du pouvoir réducteur, la réduction des protons en H_2 est remplacée par la réduction du S^0 en H_2S . L'accumulation d' H_2 empêche le pool de ferrédoxine de se renouveler ne permettant plus au pouvoir réducteur d'être évacué, c'est le principal effet inhibiteur de l' H_2 .

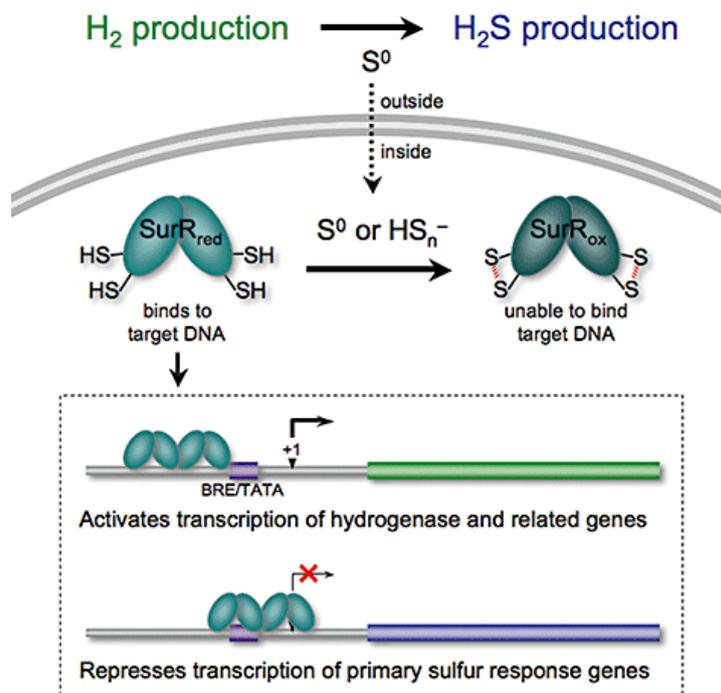


Figure 34 : Représentation des implications du changement d'état redox du régulateur transcriptionnel SurR. (Yang et al., 2010).

1.5.2.5. Métabolisme du C1

Certaines *Thermococcales* peuvent utiliser des composés à 1 carbone comme source d'énergie tel que le CO et le formate (Kim et al., 2010; Sokolova et al., 2004). Cependant, lors de la croissance carboxydrotrophe, les *Thermococcales* ont malgré tout besoin d'un minimum de substrat organique pour assurer leur croissance (Bae et al., 2012; Sokolova et al., 2004). La capacité de croissance sur ces deux composés est liée à la présence de cluster de gènes codant pour une déhydrogénase spécifique (CO ou formate déhydrogénase) associée à un complexe de type Mbh : *codh-mch-mrp* (FIGURE 35) et *fdh-mnh-mrp*. La réduction d'un proton en H₂ par une [Ni-Fe]-hydrogénase membranaire est ainsi couplée à la génération d'un gradient Na⁺/H⁺ par un système antiport qui est utilisé pour synthétiser de l'ATP à l'aide d'une ATP synthase sodium dépendante.

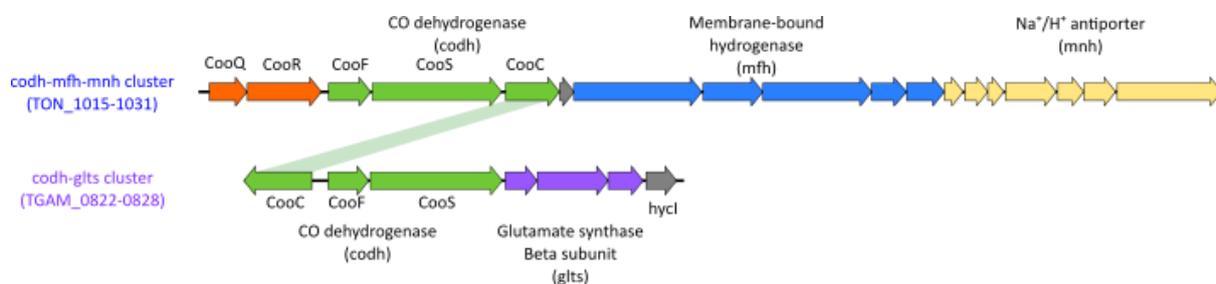


Figure 35 : Clusters responsables du métabolisme du CO chez les *Thermococcales*. Ces deux clusters possèdent 1 gène commun (*codh*) codant pour déhydrogénase divisée en 3 sous-unités de (*CooC*, *CooF* et *CooS*).

Le cluster *codh-mch-mrp* a été identifié dans les génomes de *T. barophilus* MP^T, *T. barophilus* Ch5, *T. sp.* AM4, *T. onnurineus* NA1, *T. paralvinellae* ES1^T et *T. guaymasensis* TYS^T. Il est possible de transférer ce cluster chez une autre espèce de *Thermococcales* pour la rendre carboxydrotrophe comme cela a été démontré chez *P. furiosus* complémenté avec le cluster de *T. onnurineus* NA1 (TON_1016-1031) (Schut et al., 2016). La transcription de l'opéron *codh-mch-mrp* est sous le contrôle de deux protéines CorQ/CorR codées par deux gènes *corr* et *corq* situés en amont de l'opéron (Kim et al., 2015). La protéine CorQ pourrait agir comme un senseur redox tandis que CorR est un activateur transcriptionnel. La délétion de ces gènes diminue très fortement la croissance sur CO. Une étude récente suggère l'implication d'autres systèmes de régulation dans le contrôle de son expression (Lee et al., 2017). En présence de S⁰, la transcription du gène codant la *CooS* (sous-unité catalytique de la CO déhydrogénase) est fortement réduite chez *T. onnurineus* NA1 (Lee et al., 2008). *T. barophilus* Ch5 présente également une meilleure croissance sur CO en l'absence de S⁰ (Kozhevnikova et al., 2016). Le mécanisme à l'origine de la réduction du S⁰ en H₂S n'est toujours pas compris. Il a également été mis en évidence que l'opéron *codh-mch-mrp* est surexprimé chez *T. barophilus* MP^T pour des pressions hydrostatiques importantes de 40 MPa (sa pression optimale de croissance) et de 70 MPa (condition supra-optimale) par rapport à

la pression atmosphérique (Vannier, 2012). A pression atmosphérique (0.1 MPa), la croissance de *T. barophilus* MP^T n'est pas impactée par la délétion de gènes codant pour l'hydrogénase du cluster (TERMP_01150-46) alors que pour des pressions hydrostatiques importantes de 40 MPa (sa pression optimale de croissance) et de 70 MPa (condition supra-optimale), la croissance du mutant est sévèrement impactée (Birien, 2018).

Il existe un deuxième cluster impliqué dans l'oxydation du CO : le cluster *codh-glt*. Il a été identifié dans les génomes de *T. gammatolerans* EJ3^T, *T. profundus* DT5432^T, *T. radiotolerans* EJ2, *T. sp.* AM4, *T. siculi* RG-20^T et *T. barossii* SHCK-94^T. L'oxydation du CO est alors couplée à la réduction du S⁰ en H₂S. Aucune étude n'a été réalisée sur le fonctionnement de ce complexe. Un des mécanismes possibles serait que l'unité « glutamate synthase » serve d'oxydoréductase NADP-dépendante pour transférer, en utilisant le couple NADP/NADPH, les électrons vers une enzyme sulfo-réductrice comme la protéine NSR (Schut et al., 2007).

Certaines espèces de *Thermococcales* sont capables d'oxyder le formate avec production d'H₂ pour croître (Kim et al., 2010). Cette croissance est dépendante du complexe membranaire *fdh-mnh-mrp* composé d'une formate dehydrogénase, d'un transporteur de formate, d'une hydrogénase et d'un système antiport Na⁺/H⁺.

1.5.2.6. Fixation de CO₂ chez les *Thermococcales* ?

Il a été proposé mais jamais démontré que les *Thermococcales* puissent fixer du CO₂ (Aono et al., 2012; Moon et al., 2012). La voie principale serait celle du métabolisme de l'adénosine monophosphate (AMP) (FIGURE 36) qui aurait trois fonctions au sein de la cellule : 1- dans le métabolisme des acides nucléiques en assurant l'homéostasie du pool de nucléosides 5'-monophosphate (NMP), 2- en dirigeant la fraction ribose des nucléosides en excès vers la glycolyse et 3- dans la fixation du CO₂ (Aono et al., 2015). Trois enzymes composent cette voie métabolique (Sato et al., 2007). La première enzyme est une AMP phosphorylase (AMPase) qui catalyse la réaction de phosphorylation d'un ribonucléotide au détriment de sa base (AMP, CMP, UMP et dCMP) pour générer du Ribose-1,5-Phosphate (R15P). Ce dernier est alors transformé en Ribulose-1,5-Phosphate (RuBP) par une ribose-1,5-biphosphate isomérase. Ces deux réactions sont réversibles et permettent de réguler la concentration intracellulaire des ribonucléotides. La troisième réaction est la conversion d'une molécule de RuBP, d'une de CO₂ et d'une d'H₂O en 2 molécules de 3 phosphoglycérate (3PGA) par une ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase de type III (RuBisCo) (Ezaki et al., 1999).

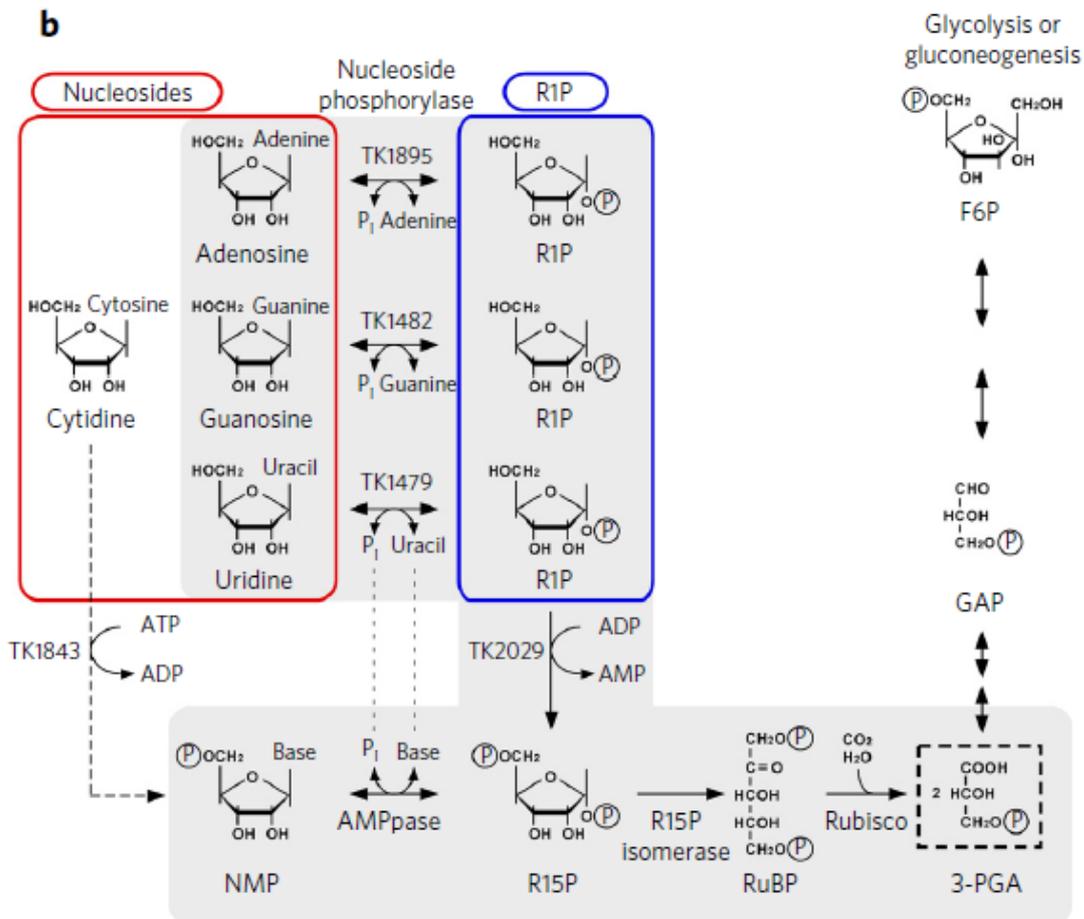


Figure 36 : Métabolisme des nucléosides chez les *Thermococcales*. (Aono et al., 2015).

Cette voie est principalement régulée par la concentration en AMP, en effet une diminution de celle-ci entraîne une réduction de l'activité de la R15 isomérase. C'est une sécurité pour la cellule pour éviter la dégradation excessive des NMP. De plus les activités de la R15 isomérase et de la RuBisCo sont stimulées par ajout de nucléosides dans le milieu (Aono et al., 2012). L'incorporation du CO_2 se fait dans la dernière étape au travers du 3PGA qui est un intermédiaire de la glycolyse. Les analyses génomiques montrent qu'elles sont présentes dans tous les génomes des *Thermococcales* ainsi qu'au sein de nombreuses autres archées (Sato et al., 2007; Wrighton et al., 2016) et que chez *T. gammatolerans* EJ3^T elles sont abondantes dans la cellule (Zivanovic et al., 2009). Cependant l'inactivation du gène de la RuBisCo chez *T. kodakarensis* KOD1^T montre qu'il n'était pas essentiel pour la croissance, malgré une diminution de la concentration cellulaire (Sato et al., 2007). Une voie alternative possible est la voie des Pentoses Biphosphate qui consiste en la génération de R15P à partir de Ribose-1-Phosphate par une carbohydrate kinase (Aono et al., 2015). La capacité d'intégrer du CO_2 pourrait apporter un avantage aux *Thermococcales* lorsque celle-ci se retrouvent en condition oligotrophe.

1.5.3 Quel rôle écologique pour les *Thermococcales* ?

Les *Thermococcales* présentent une grande diversité physiologique et métabolique qui leur permet de supporter l'importante variété de conditions physico-chimiques des écosystèmes hydrothermaux. Elles sont ubiquistes des environnements hydrothermaux océaniques et sont parmi les premières colonisatrices de nouvelles surfaces minérales dans ces environnements. Elles sont connues pour tolérer de longues périodes de conservation à basse température même en condition oxygène (Erauso et al., 1993; Huber et al., 1990; Jannasch et al., 1992; Lesongeur et al., 2014) ce qui leur confère la capacité de se disperser dans tous les océans.

Elles sont toutes chimioorganohétérotrophes mais certaines sont lithotrophes capable d'utiliser le CO₂ comme source d'énergie. De plus il a également été démontré qu'elles peuvent réaliser des transferts électroniques avec des électrodes en tissu de carbone lorsqu'elles sont incubées en électro-bioréacteur (Pillot et al., 2018) et il a été suggéré qu'elles puissent réduire le fer(III) (Slobodkin et al., 2001).

Elles ont également été détectées dans les inventaires moléculaires de sédiments profonds (jusqu'à des profondeurs de 1626 m) (Ciobanu et al., 2014; Inagaki et al., 2001; Kormas et al., 2003; Roussel et al., 2008). Leurs détections sont interprétées comme des reliquats de leur présence dans la colonne d'eau conservés au cours de la sédimentation (Kormas et al., 2003). L'isolement de *T. sibiricus* MM739^T d'un réservoir pétrolier de Sibérie de l'Ouest est original puisque ce site se situe loin des zones aires océaniques et volcaniques. Une hypothèse est qu'elles aient pu survivre dans le temps en métabolisant la matière organique (Mardanov et al., 2009; Miroshnichenko et al., 2001). Il est donc tout à fait possible que certains représentants des *Thermococcales* puissent être des acteurs de la biosphère chaude de subsurface (Gold, 1992; Nealson et al., 2005; Roussel et al., 2008; Takai, Gamo, et al., 2004).

CHAPITRE II : MATÉRIELS **& MÉTHODES**

2.1. Présentation des champs hydrothermaux étudiés

Des échantillons de trois champs hydrothermaux de la ride médio-Atlantique (Snake Pit, TAG et Lucky Strike) ont été utilisés dans le cadre de cette étude (FIGURE 37). La ride médio-Atlantique est une dorsale lente (vitesse d'expansion de 24,1 mm/an (Fouquet et al., 1993)) sur laquelle une quinzaine de champs hydrothermaux actifs confirmés sont connus aussi bien en contexte basaltique (TAG, Snake Pit, Lucky Strike) qu'ultramafique (par exemple : Rainbow). La diversité des associations minérales est plus importante au niveau des dorsales lentes que celle des dorsales rapides (Fouquet et al., 2013).

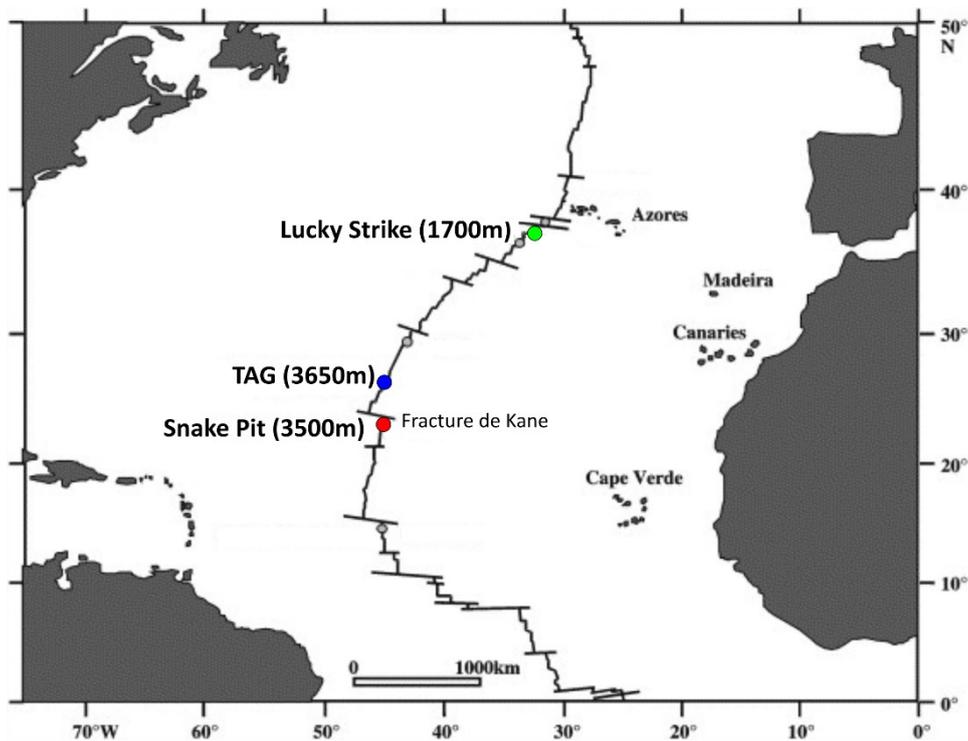


Figure 37 : Localisation géographique le long de la ride médio-Atlantique des trois champs hydrothermaux étudiés. Modifiée d'après (Desbruyères et al., 2001).

Ces trois champs hydrothermaux constituent des zones dites « ateliers ». Le champ Lucky Strike est l'un des champs hydrothermaux les plus étudiés du monde depuis le lancement en 1998 du programme international de suivi multidisciplinaire MoMAR (*Monitoring the Mid Atlantic Ridge*). Il a pour objectif de comprendre l'ensemble des processus associés à cet écosystème : de la circulation hydrothermale en profondeur, à la dynamique et la chimie des océans ou encore à la biodiversité de ces environnements. Pour cela il combine plusieurs disciplines (de la géophysique à l'écologie) pour un suivi temporel de la dynamique des écosystèmes hydrothermaux de plusieurs champs hydrothermaux localisés au Sud de l'archipel des Açores à des profondeurs différentes, et dans des contextes

géologiques distincts (basaltique comme Lucky Strike ou ultramafique comme Rainbow). Depuis 2010, le projet fait partie du réseau européen EMSO (*European Multidisciplinary Seafloor and water column Observatory*) avec l'installation sur le champ Lucky Strike de l'observatoire grand-fond « EMSO-Açores » qui consiste en un ensemble d'équipements branchés sur deux plateformes (les nœuds SEAMON ouest et SEAMON est). En surface, la bouée BOREL (BOuée RELiée) permet de transmettre par satellite une partie de données récoltées par l'ensemble des capteurs. C'est dans ce cadre qu'a lieu chaque année depuis 2010 les campagnes Momarsat.

Les champs hydrothermaux TAG et Snake Pit sont situés dans la zone du permis d'exploration minière sulfures polymétalliques français délivré par l'AIFM en 2012. C'est dans le cadre de ce programme d'exploration qu'ont eu lieu les campagnes océanographiques BICOSE 1 et 2 (Biodiversité, Interactions, COnnectivité et Symbioses en milieux Extrêmes) et HERMINE (Hydrothermal Exploration and Research for Mineralisation In New Environments). Ces campagnes multidisciplinaires étaient focalisées sur les sites hydrothermaux TAG et Snake Pit avec pour HERMINE l'exploration de la zone entre 21 et 26°N (chefs des missions : pour les deux BICOSE M. Cambon-Bonavita et pour HERMINE Y. Fouquet). Ces deux sites du fait de leurs positionnements d'une part et l'autre de la fracture de Kane représentent une zone idéale afin d'étudier la connectivité biologique des sites hydrothermaux Atlantique nord. Les recherches intègrent une partie géologique (caractérisation du contexte géologique et géochimique des deux sites et de leur zone périphérique avec cartographie fine des sites) mais également biologique (description des habitats et de la diversité et des structures des communautés associées).

2.1.1 Le champ hydrothermal Trans-Atlantic Geotraverse (TAG)

Le champ hydrothermal de Trans-Atlantic Geotraverse ou TAG (26°08'N) est le premier champ hydrothermal actif découvert le long de la ride médio-Atlantique (Rona et al., 1986). Il doit son nom au projet Trans Atlantic Geotraverse de la NOAA (*National Oceanic and Atmospheric Administration, USA*) qui a permis la détection d'une activité hydrothermale de basse température en 1972-1973 dans cette zone. Le système est situé à 2,4 km à l'est de l'axe volcanique actuel (Thompson et al., 1988) sur une faille de détachement entre les failles Atlantis (30°10'N) et de Kane (24°N) au sud, et à une profondeur d'environ 3650 m. L'ensemble du champ hydrothermal couvre une surface d'environ 25 km² et repose sur une croûte basaltique très ancienne (100 000 années). Le mont actif circulaire de 200 m de diamètre montre deux plateformes entourées par des sédiments carbonatés et métallifères. Il serait âgé de 40 000 années. Plusieurs autres monts de dimensions similaires mais plus anciens et inactifs (au Nord et Nord-Est) sont également présents. Un groupe de fumeurs noirs ayant des fluides jusqu'à 363 °C est localisé sur la zone sommitale au NE du mont (FIGURE 38). L'ensemble forme un cône de 15 m de hauteur pour 30 m de diamètre. Les minéralisations dans la partie sommitale active sont constituées d'anhydrite

et de sulfure de cuivre tandis que les zones de plus basse température sur les flancs du mont, sont enrichies en zinc. L'intérieur du mont est essentiellement constitué de brèche de quartz et de pyrite associés à de l'anhydrite et à du sulfure de cuivre (Humphris et al., 1995). Les fluides hydrothermaux dont la température a été mesurée jusqu'à 366 °C (Edmond et al., 1995) contiennent peu de CO₂, d'H₂ et de CH₄ mais sont riches en H₂S. La partie sommitale est dominée par des agrégations dense de crevettes *Rimicaris exoculata* (Copley et al., 2007; Creasey et al., 1996) tandis que les périphéries sont dominées par des anémones (*Maractis rimicarivora*) et des polychètes chaetopteridés (Galkin & Moskalev, 1990; Van Dover, 1995).

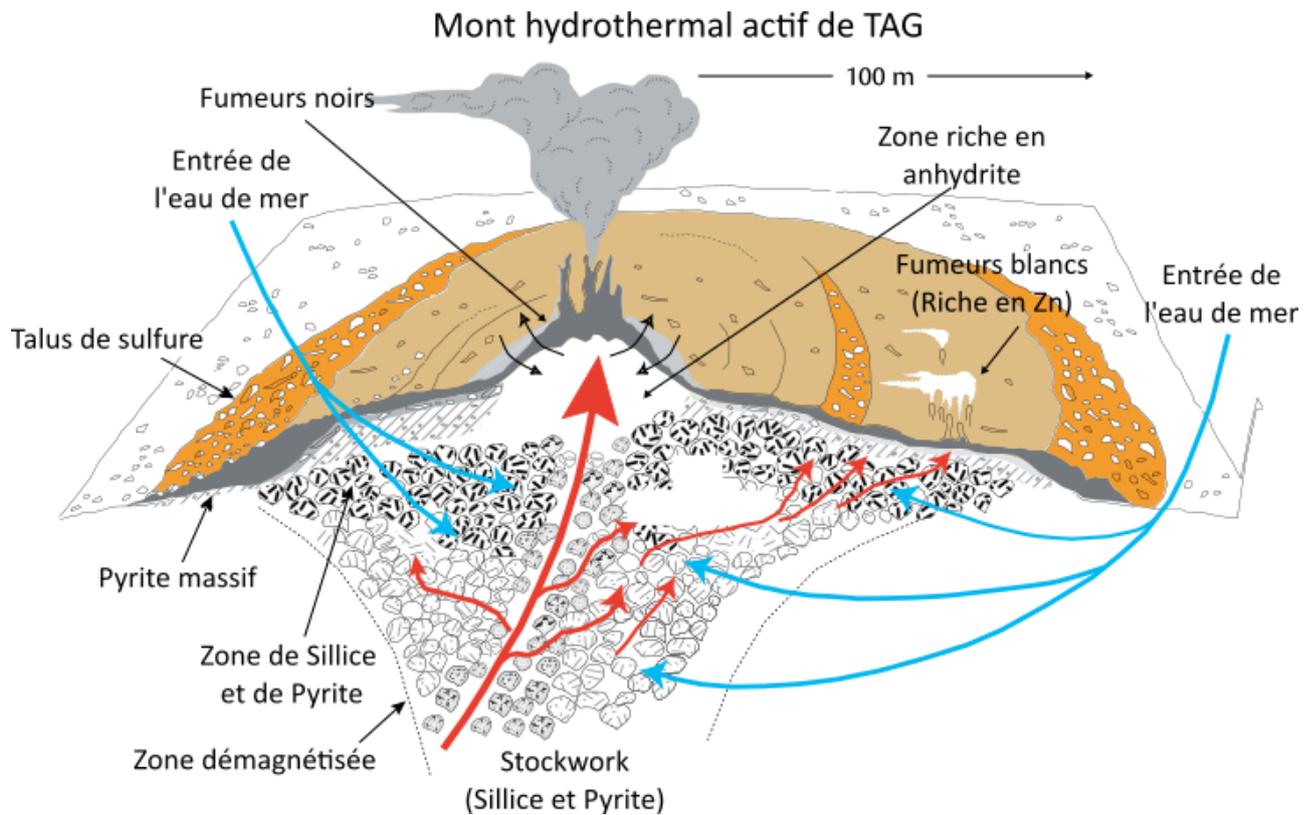


Figure 38 : Représentation schématique du mont actif du champ hydrothermal de TAG. Modifiée d'après (Tivey, 2007).

2.1.2 Le champ hydrothermal de Snake Pit (anciennement MARK)

Le champ hydrothermal Snake Pit est situé à ≈ 30 km au sud de la zone de fracture de Kane au niveau de la ride médio-Atlantique (23°22,09'N, 44°57,12'W) à une profondeur de 3500 m. Il se situe au sommet de la ride volcanique basaltique marquant l'axe actif de la dorsale. Il s'agit du deuxième champ hydrothermal découvert au niveau d'une dorsale lente après celui de TAG situé à 307 km au nord de Snake Pit. Le site initialement nommé MARK « *Mid-Atlantic Ridge south of Kane* » fut renommé Snake Pit à la suite de l'observation de nombreux poissons évoquant un nid de serpent. La macrofaune de Snake Pit est dominée principalement par deux espèces : des modioles proches de ceux retrouvés sur

les sites Pacifiques, et des crevettes *Rimicaris exoculata* qui forment des essaims très denses (1500 individus/m²) au niveau des cheminées hydrothermales (Segonzac et al., 1993). Le champ hydrothermal s'étend sur une superficie de 300 par 50 m et se compose de cheminées actives et inactives réparties au sommet de trois monts constitués de sulfures alors que de part et d'autre de la ride volcanique, la vallée axiale (graben) a une profondeur moyenne de 3800 m et s'étend sur une largeur d'environ 15 km (Fouquet et al., 1993) (FIGURE 39).

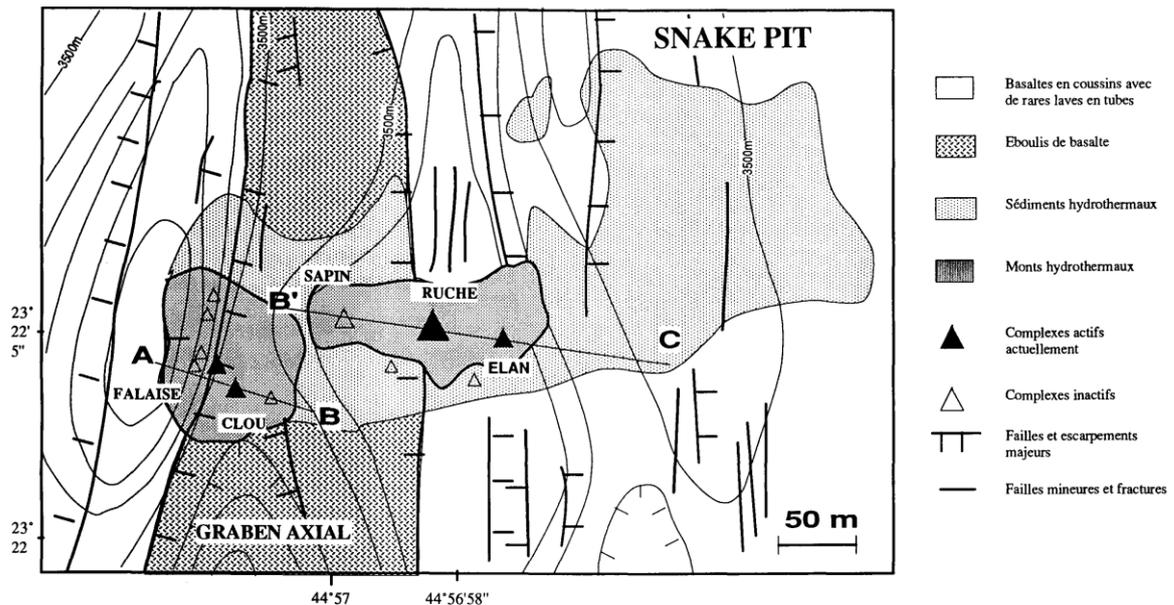


Figure 39 : Carte géologique du sommet de la ride néo-volcanique sur laquelle se situe le champ hydrothermal de Snake Pit. Réalisée à partir de la carte bathymétrique et des observations des enregistrements des plongées par le Nautilé. (Wafik, 1992).

L'âge géologique des sulfures du site Snake Pit n'excèdent pas 4000 années, ce qui en fait un site relativement jeune par rapport à TAG (40 000 années pour le site actif) (Lalou et al., 1993). L'activité hydrothermale principale est localisée sur le côté oriental dans la zone nommée les Ruches (*Beehive*). Les cheminées présentes au sommet du mont, peuvent atteindre 20 m de hauteur pour 1 à 2 m de diamètre, et sur leurs flancs sont trouvés de larges diffuseurs (ou ruches). La température des fluides peut atteindre 330 °C. A l'Est des ruches, se trouve le site de l'Elan (*Moose*) de plus faible activité. Il se compose également de cheminées à conduits verticaux (6 m de hauteur pour 15 cm de diamètre) et de diffuseurs. Dans la partie centrale du graben, est situé un ancien site actif nommé Le Sapin (*The Firtree*) de 22 m de hauteur dont l'activité se résume à la diffusion d'eaux moirées de faible température (17 °C) à travers les éboulis de sulfures. Enfin sur la partie occidentale, la faille N-S de 15 m constituant le bord ouest du graben, contrôle deux anciens sites éboulés à l'intérieur du graben. Sur la partie supérieure

culmine le site Falaise (*Cliff*) composé d'une cheminée de 11 m de hauteur encore active en 1995 avec un fluide de 300-330 °C mais qui en 2014 ne présentait plus que de faibles diffusions. La faille laisse apparaître le « stockwork » (zone profonde du mont hydrothermal) témoin de la première activité hydrothermale. A la base de La Falaise est retrouvé le site Le Clou (*Nail*) qui consiste en une cheminée en nid d'abeille retrouvée inactive en 2014 (en 1995, la température des fluides était de 70 °C). Ce champ présente une richesse minéralogique assez importante (Fouquet et al., 1993). Les principaux éléments majeurs sont le fer (36 %), le soufre (37 %), le cuivre (12 %) et le zinc (6,7 %). Pour les principaux minéraux la pyrite (FeS) est présente dans 90 % des échantillons, abondantes dans les sulfures massifs de fer (teneur de 40 à 50 %). La marcasite (FeS₂), la sphalérite (ZnS), l'isocubanite (CuFe₂S₃), la pyrrotite (FeS) (50 % des échantillons) et la chalcoppyrite (CuFeS₂) sont également trouvées en abondances. D'autres minéraux sont également présents en plus faibles concentrations comme à titre d'exemple : la bornite Cu₅FeS₄, le galène PbS, le wurtzite ZnS, la covellite CuS et l'or natif.

2.1.3 Le champ hydrothermal de Lucky Strike

Le champ hydrothermal de Lucky Strike est situé à 600 km au Sud-Ouest des Açores (37° 18' N, 32° 16' O) au sommet d'un complexe volcanique axial à environ 1700 m de profondeur. La présence d'une activité hydrothermale a été suspectée au cours de la campagne FAZAR en 1992 par un dragage qui a permis par la récupération d'un morceau de sulfure sur lequel étaient accrochées des moules vivantes. Mais ce n'est que l'année suivante que cette activité a été confirmée par observation directe avec le sous-marin Alvin (Langmuir et al., 1993). Le champ hydrothermal s'étend sur environ 2 km² et compte environ 30 zones hydrothermales principalement localisées dans une dépression entourée par trois cônes volcaniques dénommés Nord-Ouest, Nord-Est et Sud (FIGURE 40). Les fluides présentent des températures entre 170 et 325 °C et sont moins concentrés en H₂ et moins réduits que ceux de la plupart des champs de la MAR (Charlou et al., 2000; Charlou et al., 2002). La circulation hydrothermale n'est pas homogène sur l'ensemble du site, en effet les fumeurs situés dans la partie Nord ont des températures plus faibles avec des chlorinités plus élevées et des concentrations de gaz plus faibles alors que ceux situés dans la partie Sud ont des températures plus importantes et des chlorinités plus faibles (Barreyre et al., 2012; Charlou et al., 2000). Une grande variété d'édifices hydrothermaux est observée : diffuseurs, flanges et cheminées. La minéralogie des cheminées est classique avec principalement des sulfures de fer (pyrite, marcasite) et de cuivre (chalcoppyrite) et de l'anhydrite associée aux fluides de haute température. Les zones de moyennes températures se caractérisent par la présence de barytine (BaSO₄) et de sphalérite (ZnFeS). Les sites sont marqués par la présence de *Bathymodiolus azoricus* mais également d'arthropodes (*Mirocaris fortunata*), de gastropodes et de polychètes (Cuvelier et al., 2011). Les échantillons utilisés pour notre étude ont été prélevés sur deux sites du champ de Lucky Strike à savoir le site Tour Eiffel et Capelinhos. L'édifice Tour Eiffel, est un dépôt

massif de sulfures s'étendant sur 20 m situé dans la zone Sud-Est. Le fluide pur a une température moyenne de 324 °C, un pH acide de 3.7 et est riche en sulfures (2,1 mM). Le site de Capelinhos, découvert lors de la campagne Momarsat 2013, présente des fluides dont la composition diffère de ceux des autres sites avec une très faible chlorinité et une forte teneur en Fe et en Mn (Chavagnac et al., 2018).

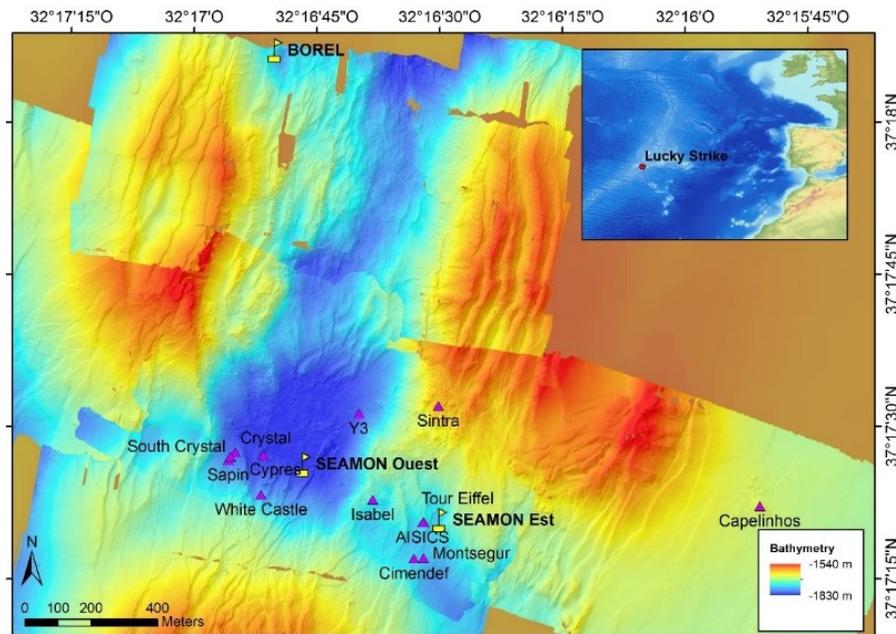


Figure 40 : Localisation des sites hydrothermaux étudiés depuis 2010 sur le champ Lucky Strike. Compte-rendu opérationnel de la campagne MoMARSAT 2017.

2.2. Prélèvement et conditionnement des échantillons

2.2.1 Échantillons solides

Six structures hydrothermales actives ont été échantillonnées au cours de 5 campagnes. Les outils de prélèvements sont les mêmes quel que soit l'engin opérationnel utilisé, à savoir le sous-marin Nautilie (BICOSE 2 et HERMINE) et le ROV Victor 6000 (BICOSE 1, MOMAR 17 et MOMAR18) (TABLEAU 6).

Les échantillons solides sont récupérés à l'aide de la pince à godet dans des petites boîtes de prélèvement étanches et isothermes (PBT) (dimension 35*28*33 cm avec un volume utile de 8 L). Elles sont hermétiquement fermées (préalablement décontaminées et remplies à bord avec de l'eau douce filtrée à 0,22 µm) au cours de la plongée puis de la remontée. Tandis qu'un bras de l'engin tient la boîte,

le second bras prélève puis transfère les échantillons (soit en le tenant dans sa pince, soit en le poussant) dans la PBT (FIGURE 41).

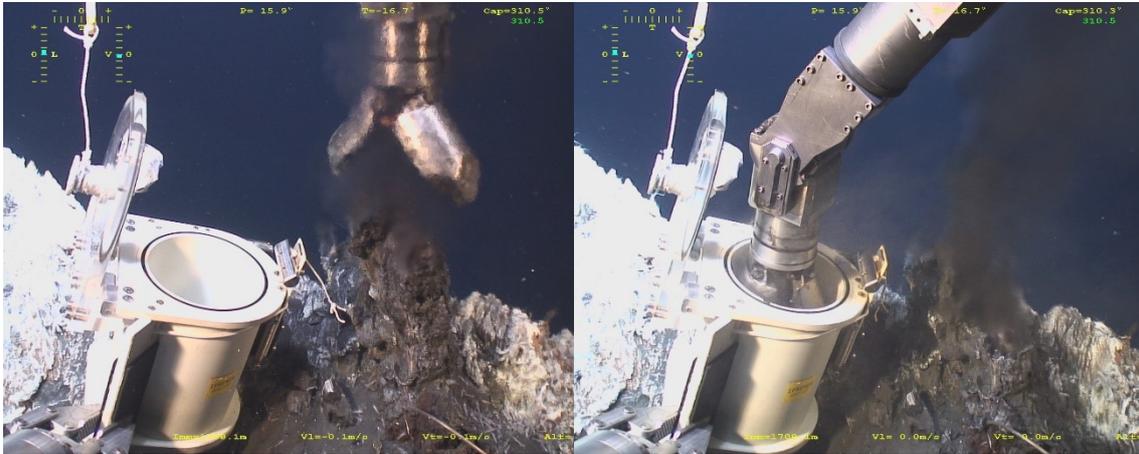
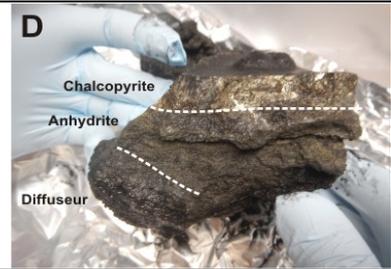
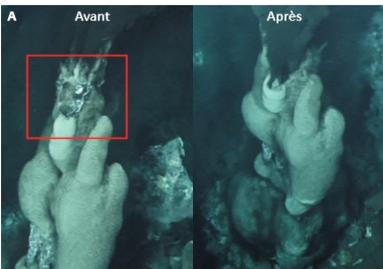
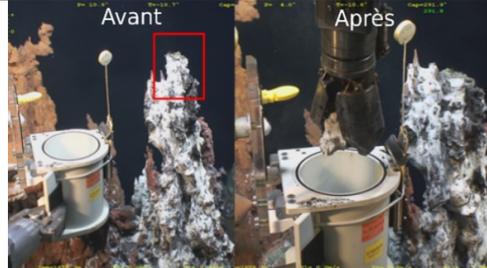


Figure 41 : Exemple de l'échantillonnage d'une cheminée hydrothermale (MOM17-White Castle (PL673 PBT3)) à l'aide du bras VICTOR et de son transfert dans une PBT. (Images n°603153/603170, Campagne MOMARSAT2017, Pourquoi Pas ?).

A bord, les échantillons solides sont transférés le plus rapidement possible dans une enceinte anaérobie (atmosphère $N_2/H_2/CO_2$). Ils sont placés dans des mortiers stériles pour être broyer en plusieurs morceaux à l'aide de pilon puis conditionnés de la façon suivante :

- Pour les analyses de diversité moléculaire : une partie du broyat a été conservé directement à -80 °C dans des Falcon® de 50 mL.
- Pour les cultures : le mélange broyat et liquide du fond a été transféré en fioles pénicillines stériles fermées par des bouchons et serties ou en flacons Schott stériles fermés par des bouchons caoutchouc puis conservés à 4 °C sous une atmosphère N_2/CO_2 (80:20; v/v; 200 kPa). Dans le cas de la culture en continu, il est directement transféré dans le bioréacteur préalablement préparé (cf Partie suivante).
- Pour les dénombrements cellulaires : un volume de 1 mL de broyat est transféré dans une fiole AODC contenant 9 mL de solution d'eau de mer à 2 % de formaldéhyde. Le transfert peut se faire à l'aide d'une seringue de 10 mL avec le bout coupé ou à la spatule. La fiole AODC est préalablement pesée afin de déterminer précisément la masse d'échantillon insérée.

Tableau 6 : Détails du prélèvement des échantillons solides utilisés pour la réalisation de culture en continu en bioréacteur Gas-lift au cours de cette étude.

Champ hydrothermal - Campagne - Engin	Site (Coordonnées) - Code échantillon	Photographie sur site	Photographie de l'échantillon avant broyage
Snake Pit - HERMINE (2017) - Nautilie (1877-02)	Les Ruches (cheminée Cliff Tower) HER-PLO2-PBT2		
Lucky Strike - MOM17 (2017) - Victor (668-2)	Tour Eiffel (Cheminée Aisics) (N37°17.33 W32°16.53) MOM17 Aisics2 PBT4		/
TAG - BICOSE 2 (2018) - Nautilie (1907-01)	Zone des nurseries (N26°08.211 W044°49.542) BIC2-PLO1-PBT4		
Snake Pit - BICOSE 2 (2018) - Nautilie (1919-13)	Les Ruches (N23°22.114 W044°57.111) BIC2-PL1919_13_PBT_01		
Lucky Strike - MOM18 (2018) - Victor (698-3)	Capelinhos (N37°17.3651 W032°15.8390) MOM18-CAP-2		/

2.2.2 Échantillons de fluides (eau de mer ou fluide hydrothermal)

Les fluides sont prélevés à l'aide de l'instrument PEPITO (FIGURE 42). L'aspiration du fluide se fait au moyen de la canule de prélèvement en titane du Nautilie maniée par le bras de l'engin par pompage en utilisant une pompe péristaltique. Les échantillons sont ensuite dirigés à l'aide de vannes solénoïdes vers une série de poches stériles.



Figure 42 : Photographies de prélèvement de fluide hydrothermal. A gauche l'outil PEPITO opéré avec le VICTOR (Image n°611589, MOMARSAT2017, MOM17-PEPITO-Poche A1). A droite, photographie du derrière de PEPITO avec les poches stériles (©Momareto 2006, Ifremer).

L'eau de mer de la PBT contenant les échantillons solides, est transférée dans deux poches stériles pour faciliter la récupération des échantillons solides. Une fois cette étape terminée, elle est de retour transférée à l'intérieur de la boîte pour remettre en suspension les particules minérales restées au fond (certaines cheminées sont friables). Puis après homogénéisation l'eau de mer chargée de particules minérales est récupérée en poches stériles et conservées à 4 °C. Ces poches serviront d'inoculum et de base minérale aux cultures en continu. Cette opération permet de conserver efficacement cette eau de mer puisque même après quelques jours les poches ne présentent pas d'oxydation.

2.3. Approches culturelles

2.3.1 Culture en continu en bioréacteur Gas-lift

2.3.1.1. Présentation du bioréacteur Gas-lift

Le bioréacteur Gas-lift a été développé par l'équipe de Neil Raven (UK) pour la culture en continu de micro-organismes hyperthermophiles anaérobiques (Raven et al., 1992). Ce système a initialement

permis d'obtenir des biomasses importantes de *P. furiosus* sans ajout de S^0 en empêchant l'accumulation d' H_2 (produit du métabolisme inhibant la croissance (Fiala & Stetter, 1986) par balayage gazeux de N_2 (Raven et al., 1992). Cette technologie a ensuite été transférée et développée au laboratoire de l'Ifremer par Anne Godfroy (Godfroy et al., 2006). Elle a été utilisée dans le cadre d'étude de physiologie microbienne (optimisation des conditions de culture de *Pyrococcus abyssi* GE5 (Godfroy et al., 2000) puis de *Thermococcus hydrothermalis* AL662^T (Postec et al., 2005)), d'écologie microbienne (développement de culture de communautés d'échantillons hydrothermaux de différentes natures comme d'édifices minéraux (Byrne et al., 2009; Callac et al., 2015; Landreau, 2016; Postec et al., 2007; Postec et al., 2005) ou de tapis microbiens (Crépeau, 2010)) ou encore de biochimie (production de biomasse afin de purifier de grandes quantités de protéines (Pluchon et al., 2013) ou de ribonucléotide (Lemor et al., 2018)). Les intérêts de ce système sont nombreux. Le contrôle des conditions physico-chimique de culture permet de reproduire certains des paramètres physico-chimiques retrouvés *in situ*. Le renouvellement du milieu, assuré par un apport continu du milieu couplé à un soutirage de volume équivalent, permet de se placer dans des conditions non limitantes. Le balayage gazeux qui assure l'homogénéisation du milieu permet avec le renouvellement continu l'élimination des produits finaux des métabolismes microbiens prévenant ainsi leurs accumulations potentiellement toxiques pour les micro-organismes. Le maintien de ces équilibre physico-chimique, permet de contrôler et/ou d'enrichir des communautés microbiennes plus facilement qu'en culture en batch.

2.3.1.2. Description du système

Le bioréacteur Gas-lift se compose de plusieurs éléments (FIGURE 43) :

- D'une cuve en colonne en verre borosilicaté d'un volume utile de 2 L et présentant une double enveloppe afin de contrôler la température *via* la circulation d'une eau à température voulue à partir d'un bain thermostaté (Julabo). Un cylindre en verre (draft-tube) est placé à l'intérieur de la cuve pour canaliser le courant de convection à partir du bullage gazeux dans le but d'homogénéiser le milieu. Des billes en verre stériles sont placées en fond de cuve afin d'éviter la formation d'un dépôt solide par accréation des particules minérales au niveau de l'arrivée de gaz.
- D'un balayage gazeux qui maintient les conditions d'anaérobiose de la culture tout en éliminant les produits de fermentations volatils comme l' H_2S et H_2 . Un diffuseur en verre frité (spargeur) positionné au fond de la cuve assure la diffusion du gaz au sein de la cuve. Un débitmètre placé en amont permet de contrôler le débit d'émission. Un condenseur en verre est placé en haut de la cuve pour récupérer les effluents gazeux. Il est relié à un bain réfrigéré contenant de l'eau refroidie à 6-8 °C et d'un antigel dont la circulation en continu permet la condensation des vapeurs d'eau de

l'effluent gazeux. La sortie du condenseur est reliée à un flacon Schott en polypropylène de 1 L contenant une solution de soude à 10N (pour piéger l' H_2S) lui-même relié à un autre flacon vide afin de recueillir le surplus de liquide.

- D'une platine porte-instrument en PTFE fixée sur le dessus de la cuve grâce à un collier en inox et d'un joint torique. La platine est percée de 11 ports pour permettre les entrées suivantes :
 - o Une entrée centrale de 12 mm destinée à l'électrode de pH.
 - o Deux entrées de 8 mm destinées à la sonde de température et à la sortie de l'effluent gazeux *via* un condenseur en verre).
 - o Huit entrées de 5 mm destinées à des tubes en verres pour l'addition d'acide ou de base, l'ajout de milieu, le soutirage de la culture et les prélèvements.
 - o Les entrées non utilisées sont condamnées par des aiguilles en verres pleines et peuvent être utilisé au besoin.

- D'un système de régulation :
 - o Une sonde de température PT100 recouverte de Téflon PTFE. C'est une sonde RTD (*Resistance Temperature Detector*) c'est-à-dire que la mesure de la température est réalisée par mesure de la tension de la résistance électrique d'une résistance en platine qui est proportionnelle à la température. Elle est reliée au bain thermostaté qui assure la circulation de l'eau dans la double enveloppe de la cuve.
 - o D'une sonde pH (une électrode stérilisable à gel) combinée à un jeu de pompe acide/base. Les solutions d'acide (HCl à 1 N) et de base (NaOH à 1 N) sont stériles (filtration à 0,22 μm) et stockées dans des flacons Schott de 1 L.
 - o Du système analogique de contrôle Infors V5 (Bottmingen, Suisse) relié à un ordinateur portable avec le logiciel Iris qui permet la commande des différents modules, l'acquisition, la collecte et le stockage des mesures.

- D'un système de renouvellement et de prélèvement du milieu
 - o L'entrée et la sortie de milieu/fluide hydrothermal depuis et vers des poches stériles sont conservées dans un bac de refroidissement relié au cryostat du condenseur, sont contrôlées par un jeu de pompes péristaltiques Infors autoclavables.

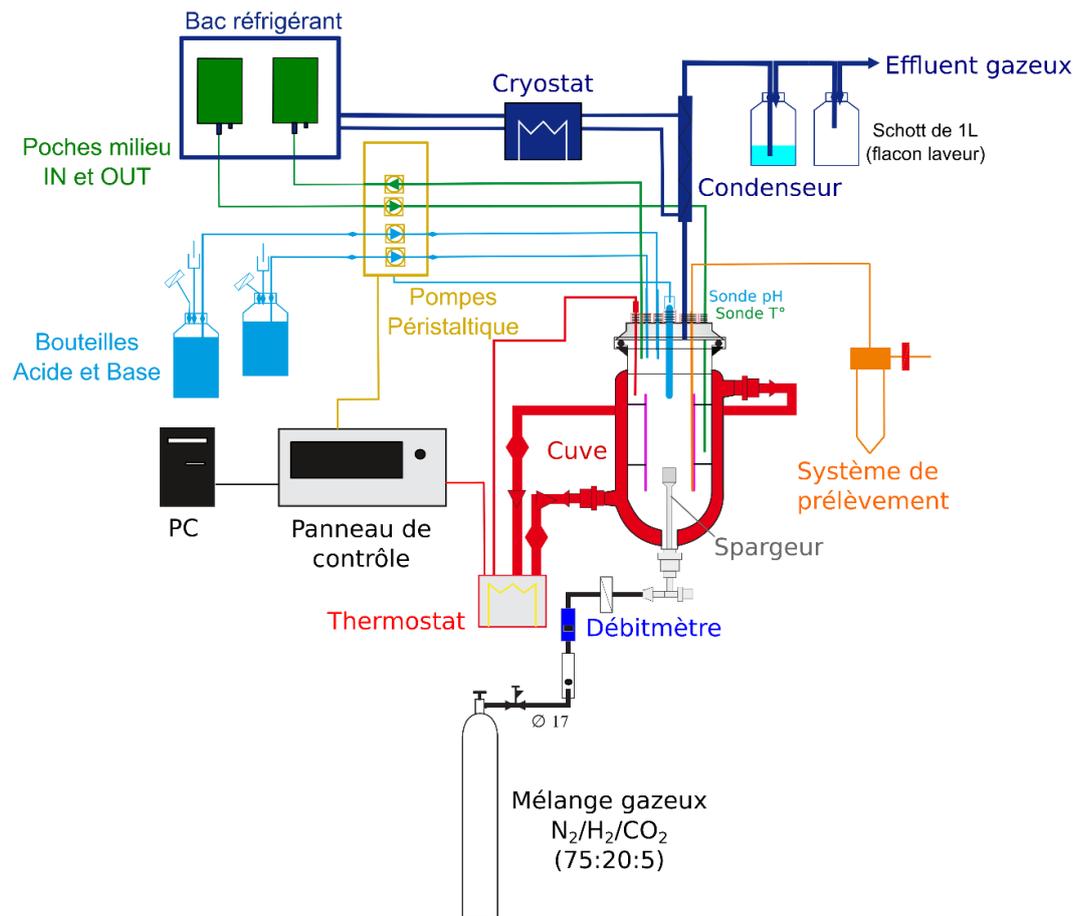


Figure 43 : Schéma représentant le bioréacteur Gas-lift et ses équipements. Modifiée de Leroy et Roussel d'après (Godfroy et al., 2006)

2.3.1.3. Mises en œuvre des cultures en continu

2.3.1.3.a Montage et stérilisation du bioréacteur

Le montage du bioréacteur se déroule comme suit : montage de la cuve sur son support, insertion du bulleur et sa connexion à l'arrivée du gaz, rajout des billes en verre au fond de la cuve, introduction du draft-tube dans la cuve, montage des connexions des fluides caloporteur (thermostat et cryostat) puis montage de la platine porte instrument sur la cuve. Ensuite, 2 L d'une solution à 35 g L⁻¹ de NaCl est transférée dans la cuve. La sonde température PT100 puis la sonde pH (après calibration avec des solutions étalons à pH de 4,01 et de 7,01) sont introduites dans la cuve. Les ports libres de la platine sont fermés par l'ajout d'aiguilles en verre. Le montage est ensuite placé une première fois à 95 °C pendant 24 h. Ensuite, les différentes entrées/sorties sont insérées sur la platine dans l'ordre suivant et à la flamme : condenseur, système de régulation acide et base, système d'apport de milieu (IN) et de sortie de culture (OUT), canules de vidange puis de prélèvement. Le cryostat est allumé avant de lancer

le montage à 95 °C pendant 24 h en balayage à l'air (ce qui facilite l'élimination de contaminants anaérobies). Après stabilisation du milieu sous $N_2/CO_2/H_2$ (75:5:20), le montage est prêt pour lancer une culture en continu. Une fois les échantillons récupérés à bord et conditionnés pour être transférés à l'intérieur de la cuve, le maximum de la solution de NaCl est vidangé pour être immédiatement remplacé par fluide non filtré. Après stabilisation de la température et du pH (pendant environ une heure), la platine est délicatement soulevée pour introduire les morceaux de cheminées broyées avant d'être remis à sa place. Après une heure de stabilisation, les pompes IN et OUT sont allumées.

2.3.1.3.b Conditions des cultures en continu

Les six cultures en continu ont été effectuées dans les mêmes conditions à 80 °C, pH 6.5, sous un faible balayage gazeux de $N_2/H_2/CO_2$ (75:20:5) et à un renouvellement continu faible de 20 mL h^{-1} de la phase liquide (TABLEAU 7). La phase liquide utilisée est du fluide non filtré. Les cultures ont également été réalisées dans l'obscurité afin d'éviter la photolyse ou photo-réduction des composés dont le fer ferrique (FIGURE 44).

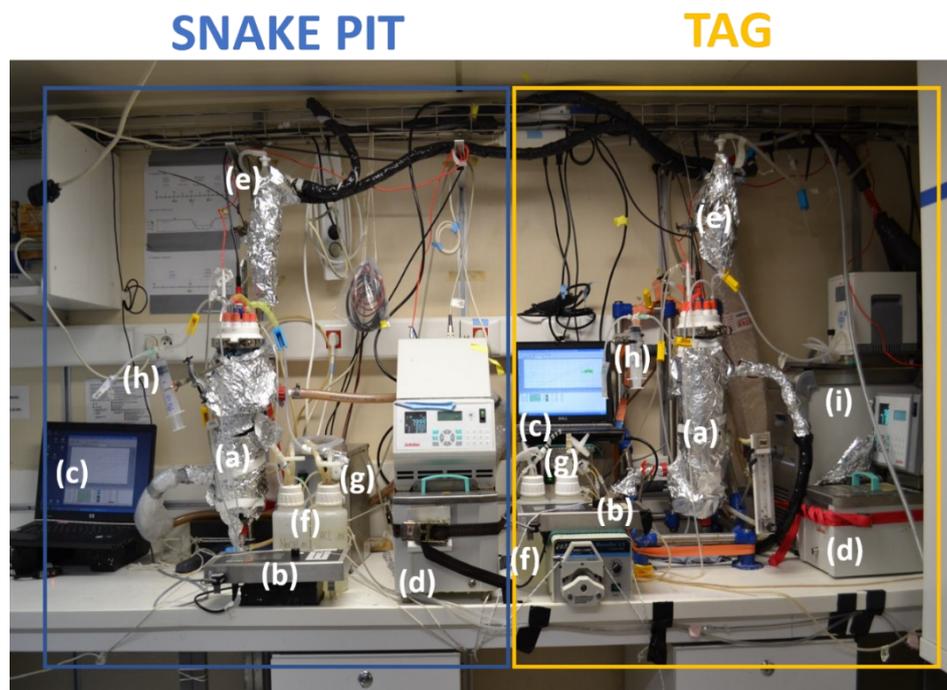


Figure 44 : Photographies des deux bioréacteurs utilisés pour les deux cultures en continu réalisées à bord du Pourquoi Pas ? au cours de la campagne BICOSE 2. A gauche, le montage pour la culture de Snake Pit (SNb_2018) et à droite le montage pour celle de TAG (TAGn_2018) : (a) cuve du bioréacteur, (b) panneau de contrôle, (c) ordinateur portable avec le logiciel IRIS, (d) thermostat, (e) condenseur, (f) réservoirs d'acide et de base, (g) pompes péristaltiques d'ajout d'acide ou de base ainsi que d'ajout (IN) et soutirage (OUT) du milieu, (h) système de prélèvement discret. Le cryostat (i) et le bac réfrigérant (derrière le cryostat) qui contient les poches IN et OUT sont communs aux deux incubations.

Tableau 7 : Récapitulatif des différentes cultures en continu réalisées au cours de cette étude

Campagne	Site hydrothermal	Ref. Plongée	Inoculum			Fluide	Opérateurs - Durée incubation	Incubations de sections de sections polies
			Code	Vol (mL)	Description			
BICOSE 1 (2014)	Snake Pit - Les Ruches - Cheminée Bénitier	Victor (PL565-1)	BIC1-PBT2-rucheCheminée A (150mL)	150	Mélange 3 blocs de la cheminée : zone basse en anhydrite, diffuseur, et cœur chaud enrichi en sulfure de Cu. Fluide 360 °C, pH 4,8.	BIC1-PEP-rucheCheminée A 105 °C, 6,5	E. Roussel / A. Godfroy (14 jours)	Oui
HERMINE (2016)	Snake Pit - Les Ruches - Cheminée Cliff Tower	Nautile (1877-02)	HER-PLO2-PBT2	180	Couche intermédiaire et de diffuseur	HERM-PLO2-PEPITO-E2 (3,5 L) /HERM-PLO2-PEPITO-E1 (5,0 L) / HERM-PLO2-PBT2-Eau de la PBT2 (5,0 L) / HERM-PLO2-PBT2-Eau de la PBT2 (600m L)	E. Roussel (24 jours)	Non
MOMAR17 (2017)	Lucky Strike - Tour Eiffel - Cheminée Aisics	Victor (668-2)	MOM17 Aisics2 PBT4	150	Cheminée active de la partie basse de la cheminée Aisics	Panache de la cheminée Aisics à une température comprise entre 80 et 120 °C (Echantillons MOM17-A1 PL668-2 et MOM17-E1 PL669-3)	A. Godfroy / F. Lesongeur	Oui
BICOSE 2 (2018)	TAG - Zone des nurseries	Nautile (1907-01)	BIC2-PLO1-PBT4	150	Broyat de cheminée (mélange des différentes parties)	BIC2-PL01-PBT4-A, prélevé sur la zone de la Nurserie	S. Le Guellec / E. Roussel (32 jours)	Oui
		Nautile (1919-13)	BIC2-PL1919-13_PBT_01	150	Broyat de cheminée (mélange des différentes parties)	BIC2-PL13-1919-PBT1	S. Le Guellec / E. Roussel (13 jours)	Oui
MOMAR18 (2018)	Lucky Strike - Capelinhos	Victor (698-3)	MOM18 cap-2	120	Cheminée active de la partie basse de la cheminée Capelinhos	Echantillons PL698-MOM18 Cap PEITO E1, MOM18 CAP1PBT, PL701-6 MOM18-PEPITO C1 puis PL706-11MOM18 PEPITO B2	A. Godfroy / D. Francois (12 jours)	Non

2.3.1.4. Échantillonnage et conditionnement

Des échantillons des cultures en continu ont été prélevés sur toute la durée et conditionnés en fonction de leur utilisation :

- Extraction d'ADN : 50 mL dans des Falcons conservés à -80 °C
- Chromatographie ionique : 1 mL dans un chromacol conservé à -20 °C
- Comptage : 1 mL dans une fiole AODC contenant 9 mL de solution d'eau de mer à 2 % de formaldéhyde.
- Culture : 50 mL dans des fioles pénicillines de 120 mL sous atmosphère N₂ conservé à 4 °C.
- Sortie de milieu en continu : Le milieu a été récupéré en poches stériles de 600 mL (modèle Teruflex® Transfert Bag 600 mL (Terumo, Tokyo, Japon)) qui sont quotidiennement conditionnés soit à 4 °C (pour de la culture) soit à -20 °C (analyse moléculaire).

Les sections polies de sulfures massifs ont été conditionnés pour :

- Extraction d'ADN : dans un tube Falcon conservé à -80 °C.
- Minéralogie : dans une fiole pénicilline (ou un Schott de 20 mL) sous atmosphère N₂ conservé à -80 °C.
- Comptage : conditionnée dans un Falcon à -20 °C

2.3.2 Culture en fiole

2.3.2.1. Préparation des milieux

2.3.2.1.a *Milieu Eau de mer anoxique*

Le milieu a été préparé dans un réacteur en verre de 5 L (FIGURE 45) avec de l'eau désionisée selon un protocole modifié de Widdel (Widdel & Bak, 1992) et de H. Sass (Parkes et al., 2010). La base minérale est constituée de (en g L⁻¹) : NaCl (27,2), MgCl₂.6H₂O (10), CaCl₂. H₂O (1.5), KCl (0.66), KBr (0.1), H₃BO₃ (0,025), SrCl₂.6H₂O (0,04) NH₄Cl (0,021), KH₂PO₄ (0,0054), NaF (0,003), 1 mL d'éléments traces (Widdel, 1981) et 0,2 mL de solution SeW Le milieu et la solution de bicarbonate NaHCO₃ (30 mM final) ont été autoclavés pendant 60 min à 121 °C. La solution de NaHCO₃ ainsi que 1.2 mL de Na₂S à 1 M (1.2 mM final) ont été rajoutés en champ stérile à la base minérale autoclavée. La phase gazeuse du réacteur a été balayée avec du N₂/CO₂ (80:20; v/v; 6 kPa) pendant le refroidissement du milieu. Le pH du milieu était de 6,5/6,7 et a été ajusté avec de l'HCl à 1 M stérile. Le milieu a ensuite été distribué dans des fioles de 120 mL avec un volume de 50 mL de milieu par fiole. Les fioles sont scellées avec un bouchon de butyle et flushées avec du N₂/CO₂ (80:20; v/v; 150 kPa) pendant 30 secondes. De l'extrait de levure (0,2 g L⁻¹ final) peut être rajouté avant distribution.

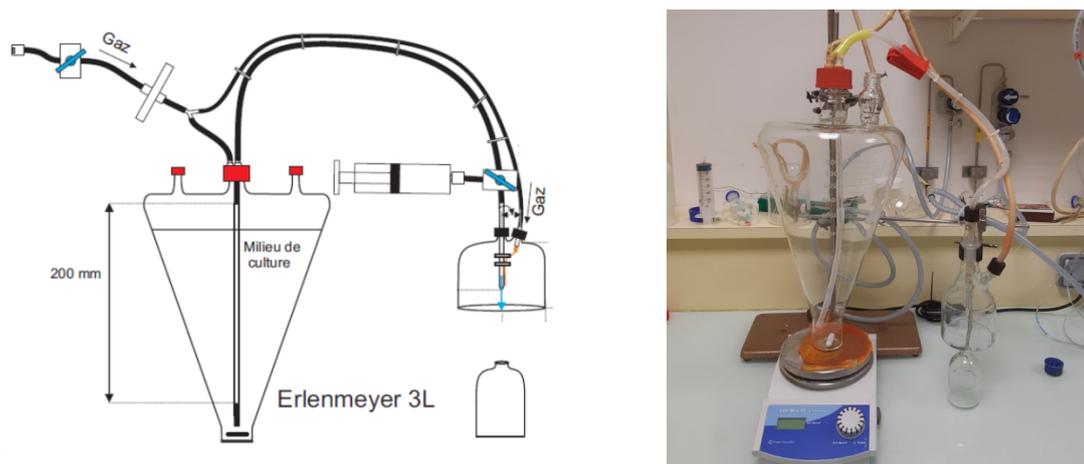


Figure 45 : Réacteur de préparation du milieu. Schéma du système de dégazage et de distribution du réacteur Widdel. Roussel modifiée de (Widdel & Bak, 1992). A droite, photographie du système utilisé au laboratoire.

2.3.2.1.b Milieu SME

La base minérale du milieu SME (Stetter et al., 1983) a été modifiée selon (Godfroy et al., 2006) et est constituée de (en g L⁻¹) : NaCl (28), extrait de levure (1), peptone (2), PIPES (6,05), soufre (10) et de (en mL L⁻¹) : solution de magnésium (10), Solution A (1), Solution B (1), Solution C (1), Solution D (1). Avec comme composition des différentes solutions, Solution de magnésium (en g L⁻¹) : MgSO₄.7H₂O (180) ; MgCl₂.6H₂O (140). Solution A (en g L⁻¹) : MnSO₄.4H₂O (9) ; ZnSO₄.7H₂O (2,5) ; NiCl₂.6H₂O (2,5) ; AlK(SO₄)₂.12 H₂O (0,3) ; CoCl₂.6H₂O (0,3) ; CuSO₄.5H₂O (0,15). Solution B (en g L⁻¹) : CaCl₂.2H₂O (56) ; NaBr (25) ; KCl (16) ; KI (10) ; SrCl₂.6H₂O (4). Solution C (en g L⁻¹) : K₂HPO₄ (50) ; H₃BO₃ (7,5) ; Na₂WO₄.2H₂O (3,3) ; Na₂MoO₄.2H₂O (0,15) ; Na₂SeO₃ (0,005). Solution D (en g L⁻¹ dans de l'acide HCl à 1 M : FeCl₂.4H₂O (10). Avant autoclavage, le pH a été ajusté à 6,5. Le milieu est tyndalisé 2 fois 30 min à 100 °C avec un refroidissement complet d'une nuit entre les deux tyndallisations. Avant distribution, du Na₂S à 2,5 % est rajouté (20 mL L⁻¹) et une solution de vitamine (0,5 mL L⁻¹).

2.3.3 Culture sous pression

Les cultures sous pressions hydrostatiques ont été effectuées dans des incubateurs hautes pressions hyperbares en acier inoxydable entourées d'une étuve à haute température (Top Industrie, Vaux le Pénil, France) (FIGURE 46). La température est contrôlée automatiquement par un système de contrôle électronique tandis que la pression est contrôlée manuellement à l'aide d'une valve de sortie (Marteinsson et al., 1997).

Les cultures sont réalisées dans des fioles pénicilline de 20 mL totalement remplies de culture et fermées à l'aide de bouchon bleu en butyl (FIGURE 46). Il ne doit rester aucune phase gazeuse à l'intérieur. Les fioles sont placées dans un incubateur (4 fioles maximum par incubateur) rempli d'eau

qui est ensuite fermé hermétiquement (joint et fermeture à 6 écrous). La pression est alors progressivement augmentée à l'aide d'une pompe hydraulique manuelle.



Figure 46 : Matériels utilisés pour les incubations hautes pressions/ hautes températures. À gauche, Incubateurs haute pression/haute température. À droite, des fioles Pénicillines dans lesquelles les cultures sous pression ont été réalisées.

1.1. Origine des souches de *Thermococcales* utilisées

Les cultures ont été réalisées sur un milieu eau de mer anoxique synthétique minimal à une température de 80 °C et une pression de 1,3 bar. Différentes phases gazeuses en N₂/H₂/CO₂ ont été testées. Chaque mesure a été réalisée en triplicata. 0,5 mL de pré-culture de 24 h sur SME ont servi comme inoculum. Différentes souches de *Thermococcus* ont été utilisées provenant des collections de l'UBO, de l'Ifremer et de la DSMZ.

2.4. Dénombrement cellulaire

2.4.1 Comptage sur cellule de Thoma

Les comptages cellulaires ont été réalisés à l'aide d'une cellule de comptage de Thoma à un grossissement de 400 (objectif x40 et oculaire x10) sur un microscope optique Olympus BH2 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Les comptages sont réalisés en dénombrant les plus petits carreaux tracés sur le fond de la cellule. La formule appliquée pour déterminer la concentration cellulaire est la suivante : Concentration cellulaire = (Moyenne du nombre de cellule / Petit carré) x 2.10⁷.

Un petit carré de la cellule de comptage représente un volume de 5.10⁻⁵ mm³ (0,05 x 0,05 mm (côté) x 0,02 mm (profondeur)) soit 5.10⁻⁸ mL. Donc pour une cellule par petit carré la concentration cellulaire est de 2.10⁷ cellules mL⁻¹.

2.4.2 AODC

La fiole AODC de l'échantillon est vortexée pendant 2 min afin de remettre toutes les cellules en suspension. 100 µL de l'échantillon sont prélevés et transférés dans un flacon stérile jetable contenant

10 mL de solution de formaldéhyde 2 % préalablement filtré (Millex-GS, 0,22 µm, esters de cellulose, 33 mm, stérilisé à l'oxyde d'éthylène). La suite des manipulations se réalise à l'abri de la lumière. 10 µL de Sybr Gold sont ajoutés à la préparation qui est vortexée pendant 2 min puis laisser reposer 3 min. La totalité de la préparation est ensuite filtrée (filtres polycarbonate Whatman® Nuclepore Track-Etched Membranes 25 mm de diamètre, 0,25 µm de porosité). Le filtre est déposé sur une lame sur laquelle une légère goutte d'huile à immersion Citifluor a été préalablement déposée. Puis une autre goutte d'huile est déposée au centre du filtre avant d'y appliquer une lamelle. L'ensemble est compressé avec la paume de la main.

Les comptages ont été réalisées en utilisant un microscope Axio Imager Z2 Apotome équipé d'un système COLIBRI (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Allemagne) et avec un oculaire x10 et un objectif x100 Plan-Achromatique. La prise d'image est opérée avec le logiciel Zen. Le nombre de champ est jusqu'à validation statistique (CL 95 %) (Cragg & Parkes, 2014).

2.4.3 Dénombrement cellulaire sur sections polies

Immédiatement après avoir été prélevées dans le bioréacteur Gas-Lift, les sections polies sont placées 2 h dans du formaldéhyde (3 %) pour fixer les cellules, puis elles ont été rincées dans une solution de PSB 1X/Ethanol 100 1:1 pendant 1 h et conservées à -20 °C dans un tube Falcon.

Le comptage de cellule sur la surface de la section polie est réalisé par marquage des cellules aux Sybr Gold. Tout d'abord elles sont sorties de leur conditionnement (-20 °C) et laissées à température ambiante pendant 5 min. A l'aide d'une lame de scalpel et d'une pince, l'entourage de Téflon qui entoure les sections est retiré sous hotte à sous hotte PSM2 à flux laminaire Biocyt 120 (FluFrance, Wissous, France). La suite des manipulations se réalise à l'abri de la lumière. Un bain dans une solution de Sybr 0,5 X a été effectuée pendant 15 min, suivi de deux bains de 5 min d'eau désionisée puis d'éthanol 80°. Les sections polies ont été observées en utilisant une loupe binoculaire Axio Zoom.V16 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Allemagne) équipée d'un objectif Plan-Neofluar Z2.3X et d'un filtre à épifluorescence 38 (HE GFP (Excitation 489 nm / Emission 509 nm)). La prise d'image est opérée avec le logiciel Zen (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany).

2.5. Analyses minéralogiques

Des échantillons de cheminées ont été polis pour permettre la détermination minéralogique des minéraux au microscope métallographique (microscopie par réflexion optique) et par diffraction X. Les sections polies ont également été analysées grâce à l'utilisation d'un microscope électronique à

balayage ce qui a permis de réaliser une cartographie élémentaire de certaines zones par spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie.

2.5.1 Préparation des sections polies et incubation au sein des bioréacteurs

Les sections proviennent de blocs de sulfures issus de précédentes campagnes et conservés au centre Ifremer de Brest. L'étape de découpe et de polissage (sans inclusion dans une résine) a été réalisée par P. Fernagu (Laboratoire Cycles Géochimiques et ressources), puis elles ont été fixées à un fil de Teflon. Avant et après assemblage dans le ruban Teflon, elles ont été nettoyées par sonication (Modèle AL04-04 d'Advantage-Lab) par immersion dans de l'eau désionisée stérile (30 mn) puis séchées (1 h) sous hotte PSM2 à flux laminaire Biocyt 120 (FluFrance, Wissous, France). Elles sont conservées en condition stérile dans une boîte de Pétri.

Elles sont insérées dans la cuve du bioréacteur après l'inoculation avec les morceaux de cheminées. Chaque fil de Teflon contient les sections polies d'un seul point de prélèvement afin d'optimiser et de perturber au minimum l'incubation au moment du prélèvement (FIGURE 47). Il est nécessaire de soulever la platine du haut de la cuve afin de les prélever.

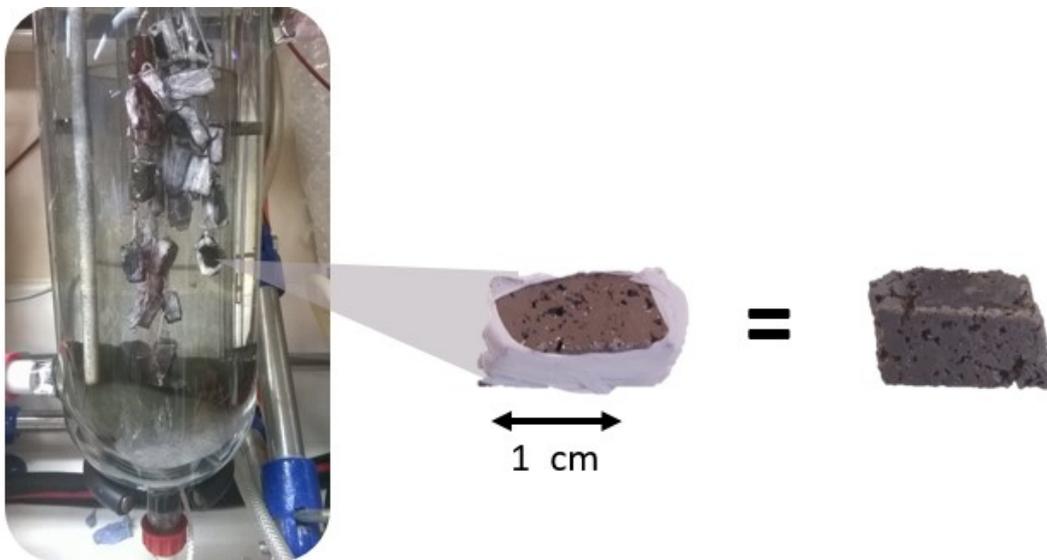


Figure 47 : Photographie de l'incubation SNb_2018 réalisée pendant la campagne BICOSE 2 avec les sections polies incubées et maintenues à l'aide de ruban Teflon à l'intérieur de la cuve.

2.5.2 Diffraction des rayons X

2.5.2.1. Principe

La diffraction des rayons X (ou XRD *X Ray Diffraction*) est une technique permettant d'identifier qualitativement et quantitativement les phases minérales d'échantillons. Le principe est d'émettre, avec un certain angle d'incidence, des rayons X sur l'échantillon. Les rayons X sont des rayonnements électromagnétiques constitué de photons dont la longueur d'onde est comprise entre 10^{-8} et 10^{-12} m. Les rayons X incidents de longueur d'onde connue vont être diffractés, sans changement de longueur d'onde, selon les dimensions et l'orientation du réseau cristallin. Chaque composé cristallisé a son propre spectre (position angulaire et intensité des pics) caractéristique des différents plans cristallins diffractant les rayons X selon la loi de Bragg : $2 \cdot d_{hkl} \cdot \sin \theta = n \lambda$ (avec : d la distance inter-réticulaire séparant 2 plans de la même famille (c'est à dire la distance entre les plans atomiques imaginaires parallèles), θ (thêta) l'angle d'incidence du rayonnement sur l'échantillon émis (demi angle de déviation entre le faisceau incident et la direction du détecteur), n l'ordre de diffraction et λ la longueur d'onde du rayonnement incident). Le diffractomètre utilisé est un D8 ADVANCE (Brucker-AXS Inc, Madison, WI, USA) et est constitué (FIGURE 48) :

- D'un générateur de rayon X : l'intérieur de l'enceinte mise sous un vide poussé comporte deux électrodes, une cathode (un filament de Tungstène) et une anticathode (souvent du Cuivre qui est un très bon conducteur). Un courant est appliqué sur la cathode émettant alors des électrons qui viennent frapper l'anticathode. Des rayonnements X sont alors émis. Le faisceau de rayons X n'est pas totalement monochromatique mais possède deux longueurs d'ondes voisines (doublet du cuivre $K_{\alpha 1}$ [1.540562 Å] et $K_{\alpha 2}$ [1.544390 Å]) qui seront éliminées lors du traitement des données.
- De la partie diffractomètre qui permet de mesurer la diffraction des rayonnements X. Il se compose d'un goniomètre motorisé qui permet de déterminer les angles de travail, d'un système de fente et enfin d'un détecteur qui enregistre l'intensité des rayons X réémis dans un certain angle et la convertit en signal électrique sous la forme d'un diffractogramme (intensité de la diffusion en fonction de la déviation angulaire du faisceau (FIGURE 48).
- Le diffractomètre est dans un montage de Bragg-Brentano « Θ - 2Θ » c'est-à-dire que le générateur de rayon X est fixe, et c'est l'échantillon qui bouge d'un angle Θ et le détecteur d'un angle 2Θ .

- De la partie traitement des résultats (logiciel EVA) qui permet l'analyse du diffractogramme en comparant le profil des pics (nombre, position, intensité) à une banque de pics de minéraux connus pour identifier les phases minérales.

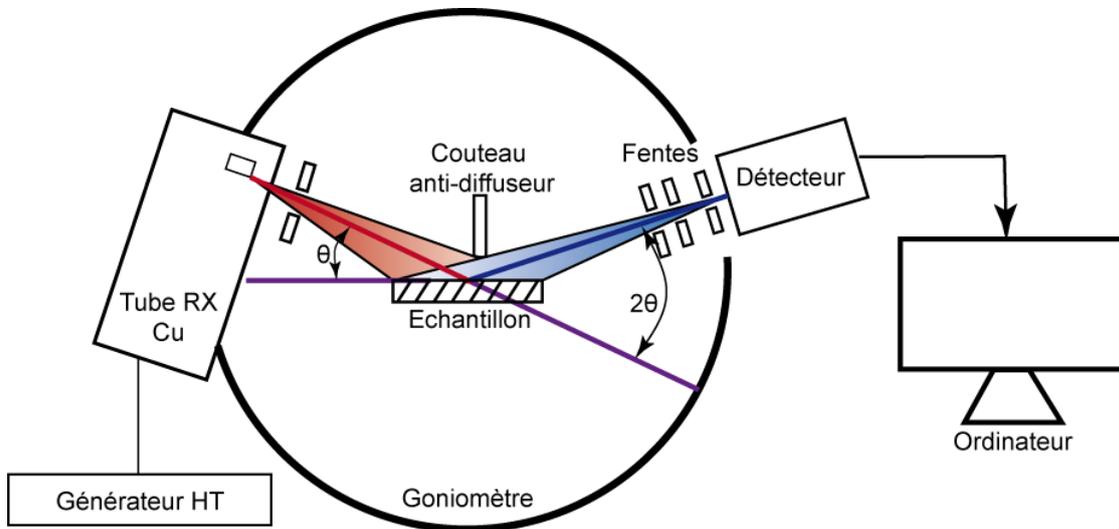


Figure 48 : Schéma de la composition d'un diffractomètre. (Evrard, 2012)

2.5.2.2. Protocole

Les sections polies sont conservées à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ sont laissées 5 min à température ambiante toujours dans la fiole Pénicilline sous N_2 . Elles sont ensuite sorties et déposées dans une boîte de Pétri stérile afin de retirer l'enveloppe de Téflon qui servait à les maintenir dans la cuve du bioréacteur. Les sections sont placées sur un plot métallique à l'aide d'un ruban adhésif double face. Ce plot est ensuite fixé au support échantillon à l'aide d'une pâte à modeler. La surface à analyser doit être parfaitement parallèle à la surface du porte échantillon. La section doit donc être parfaitement fixée sur le plot et ne pas bouger durant l'analyse et la rotation du porte échantillon.

2.5.3 MEB-EDS

2.5.3.1. Métallisation (sputtering) par pulvérisation cathodique d'or

2.5.3.1.a Principe

Le but de cette étape est de déposer un léger film d'or (de 2 à 3 nm d'épaisseur) sur la surface de l'échantillon par pulvérisation cathodique afin d'éviter un effet de charge (c'est-à-dire que les électrons s'accumulent à la surface du matériel et nuisent à l'acquisition des images). Les échantillons sont placés à l'intérieur d'une enceinte dans laquelle un vide est fait avec une légère entrée gazeuse continue d'argon. Un courant est ensuite appliqué entre la cathode (cible en or) et l'anode (le porte échantillon)

ce qui génère des ions Ar^+ lors de la collision entre les électrons et les atomes du gaz neutre. Le gaz se transforme alors en plasma. Les ions Ar^+ sont ensuite accélérés vers la cathode qu'ils percutent avec assez d'énergie pour libérer des atomes d'or qui retombent alors sur l'échantillon.

2.5.3.1.b Protocole

Directement après l'analyse XRD, les sections fixées sur un plot métallique à l'aide d'un ruban adhésif double face carboné conducteur sont métallisées. Afin de mieux permettre l'évacuation des électrons, une laque d'argent est également appliquée autour de la base de l'échantillon (FIGURE 49). Un temps de séchage de 5 min est appliqué avant la métallisation. Les sections sont placées dans l'enceinte du métaliseur (SCD 040, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein) pour être métallisées avec les paramètres suivant : 30 secondes ; Courant 0.15 mA ; Vide > 0.15 mBar.

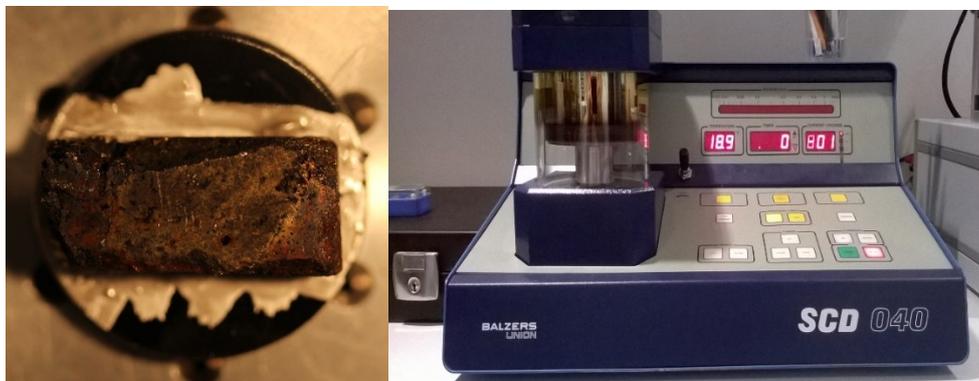


Figure 49 : Section polie prête à être métallisée dans le métaliseur en marche.

2.5.3.2. Microscopie Electronique par Balayage

2.5.3.2.a Principe

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour *scanning electron microscopy*) permet d'obtenir des images des surfaces d'échantillons avec une résolution de l'ordre du nanomètre par balayage d'un faisceau d'électrons. Il est constitué d'un canon à électron, d'une colonne électronique (constituée de lentilles magnétiques et de bobine de balayage), d'une pompe à vide et de détecteur (à dispersion d'énergie (EDS)) (FIGURE 50).

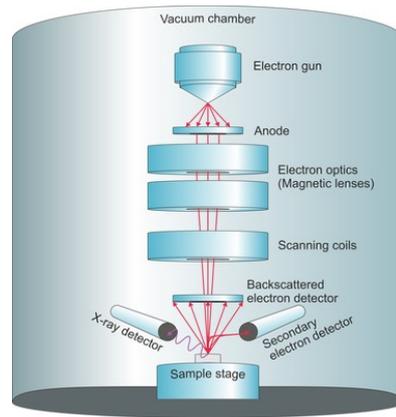


Figure 50 : Schéma de la colonne optique d'un microscope électronique à balayage. (T. Schmid, <https://fakultaeten.hu-berlin.de>).

La sonde électronique (c'est-à-dire le faisceau d'électrons) est émise à l'aide d'un canon à électron (par effet thermoélectronique lors du chauffage d'un filament de tungstène). Des lentilles électromagnétiques (condenseur et objectif) permettent ensuite de la focaliser sur l'échantillon en adaptant le diamètre et l'intensité. La colonne du microscope est sous vide secondaire (10^{-5} à 10^{-6} mbar) afin d'éviter les interactions avec les molécules gazeuses. L'interaction entre les électrons et l'échantillon génère l'émission :

- D'électrons secondaires (SE) de faible énergie avec une large dispersion. Il est produit par collision d'un électron primaire du faisceau (qui perd alors de l'énergie) avec les électrons des atomes de l'échantillon (qui s'ionise). Ils permettent de mettre en évidence les contrastes de topographie (des contours, d'inclinaison, d'arête, de pointe, d'ombrage, ...).
- D'électrons rétrodiffusés (BSE : *back-scattered electron*) d'énergie élevée avec une section efficace fortement dépendante de la nature des atomes émetteurs (type de contraste en fonction du numéro atomique Z). Ils n'ont pas échangé d'énergie avec les atomes de l'échantillon lors de leur collision. Un élément lourd donnera un signal intense et donc une zone claire; un élément léger donnera un signal faible et donc une zone sombre, en quelque sorte une cartographie de numéro atomique
- De Rayonnement X. Lorsqu'un électron primaire entre en collision avec les atomes de l'échantillon, il éjecte un électron (secondaire) qui est remplacé par un électron d'une couche supérieure et ainsi de suite. Un photon d'énergie égale à la différence entre les deux niveaux d'énergie électronique est émis. Les raies caractéristiques correspondent à des transitions électroniques (les électrons de l'atome « sautent » d'un niveau à l'autre) et sont propres à chaque élément chimique (et de son nombre atomique). La spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDS *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) sert donc à

déterminer la composition élémentaire par détection des raies caractéristiques X. Le spectrogramme d'un point ou d'une zone sélectionnée représentera le nombre de photons reçus en coups/eV en fonction de l'énergie des photons X détectés en keV (FIGURE 51).

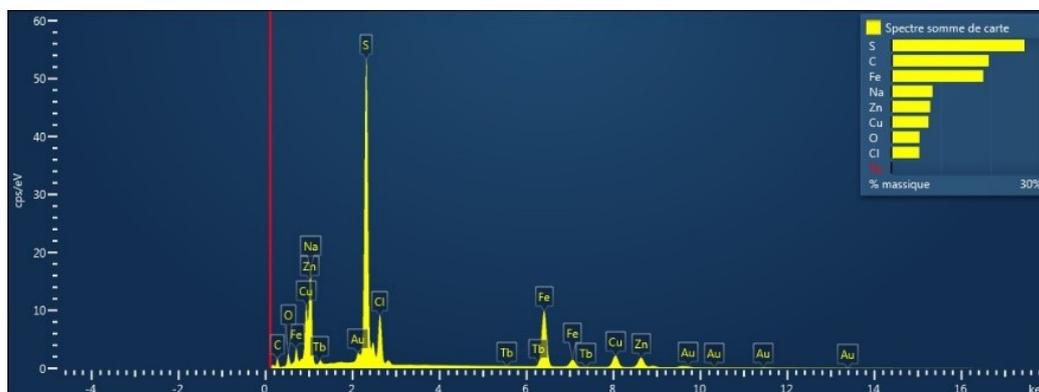


Figure 51 : Exemple d'un spectrogramme (nombre de photons reçus en coups/eV en fonction de l'énergie des photons X détectés en keV) obtenu avec le logiciel d'acquisition et d'analyse Aztec.

2.5.3.2.b Protocole

Les sections polies après métallisation sont conservées à l'abri de l'humidité dans des armoires adaptées. Elles sont ensuite analysées à l'aide du MEB (Quanta™ 200, FEI-Thermo Fisher Scientific, Hillsboro, OR, USA) équipée d'une sonde X-Max 80 (Oxford Instruments, Abingdon, UK) et avec le logiciel d'analyse Aztec (Oxford Instruments, Abingdon, UK).

2.6. Biologie moléculaire

L'analyse des séquences codant pour le gène de l'ARNr 16S est une des méthodes les plus utilisées pour identifier une Bactérie ou une Archée (Woese & Fox, 1977) ou une communauté de procaryote (Forterre, 1995; Pace, 2009). Le gène codant pour l'ARNr 16S est utilisé comme marqueur phylogénétique. L'ARNr 16S une sous-unité des ribosomes dont la fonction est de synthétiser les protéines en assurant la traduction de l'information portée par les ARN messenger. Ce sont des complexes ribonucléoprotéiques (constitués d'ARN et de protéines) composés de deux sous-unités : une grande qui assemble les acides aminés et une petite qui traduit l'ARN messenger en protéine. En se basant sur le concept d'horloge moléculaire (Zuckerkandl & Pauling, 1965), Woese et ses collaborateurs ont été les premiers à utiliser l'ARN ribosomique pour étudier la phylogénie (Woese & Fox, 1977). En effet cette molécule présente des avantages : elle est universelle chez tous les organismes, possède des domaines hypervariables et très conservés permettant une discrimination taxonomique (du phylum jusqu'à l'espèce), a évolué lentement sans transfert latéraux et elle est abondante dans la cellule.

Toutefois il faut garder à l'esprit qu'elle ne constitue pas le marqueur optimal, par exemple certains micro-organismes possèdent plusieurs copies de ce gène présentant d'importantes variations (Amann & Ludwig, 2000).

Les analyses de biologie moléculaire se déroulent en quatre étapes (FIGURE 52) : la première est l'extraction des acides nucléiques, la seconde est l'amplification des séquences avec des amorces spécifiques pour augmenter le signal, la troisième étape est le séquençage afin de déterminer la séquence en acides nucléiques ; et enfin la quatrième étape est le traitement bio-informatique des séquences pour l'assignation taxonomique.

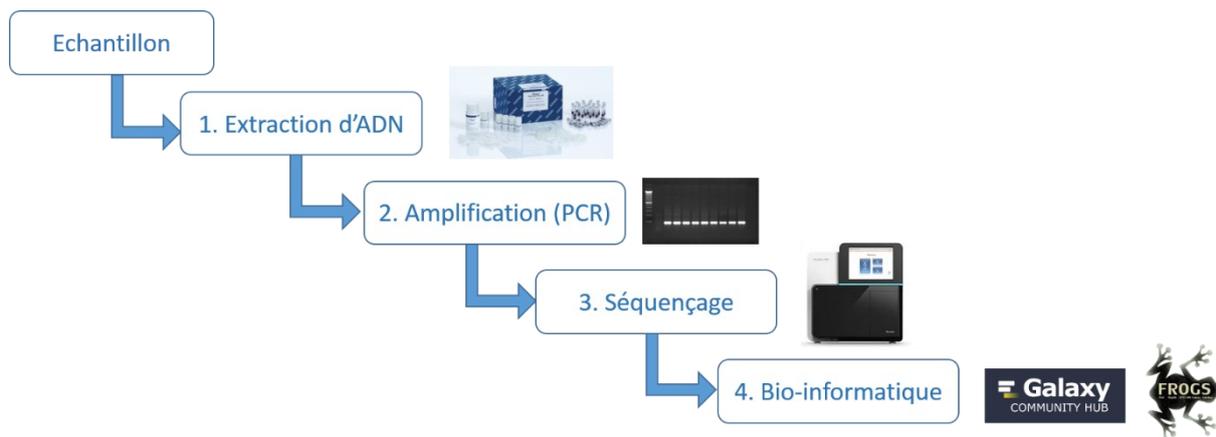


Figure 52 : Schéma synthétique des différentes étapes de l'analyse de biologie moléculaire. (©Galaxy).

2.6.1 Extraction et purification des acides nucléiques

Les extractions des acides nucléiques ont été réalisées en utilisant deux kits commerciaux d'extractions, le kit FastDNA™ Pro Soil-direct Kit (MP Biomedical, Santa Ana, CA, USA) et DNeasy PowerMax® Soil DNA Isolation (Qiagen, Carlsbad, CA, USA). L'extraction est basée sur une lyse mécanique des cellules par l'utilisation de petites billes de silice et de céramique (*bead-beating*) puis la purification de l'ADN par passage sur une colonne. Les extractions ont été effectuées en champ stérile dans une hotte Captair® Bio (Erlab, Val-de-Reuil, France) préalablement exposée pendant 2 h à un rayonnement d'UV-C. Les tubes Eppendorf Biopure® Safe lock (Eppendorf, New-York, USA), Falcon® (Dutscher, Brumath, France) et les cônes à filtres ont aussi été passés sous rayonnement d'UV-C pendant 2 min (UV Cross-Linker CL-508, Uvitec, Cambridge, UK).

2.6.1.1. Extraction d'ADN sur les fluides

Les ADN des fluides ont été extraits à partir d'un volume de 50 ml de fluide décongelé sur glace avant centrifugation (15 000 × g, 1 h, 4 °C). Le surnageant a été prudemment retiré et l'ADN extrait à partir du

culot. Le kit FastDNA™ Pro Soil-direct Kit (MP Biomedical, Santa Ana, CA, USA) est utilisé selon les recommandations du fabricant modifiées avec une intensité de lyse mécanique de 5,5 m/s pendant 30 s. Les extraits d'ADN ont été conservés à 4 °C.

2.6.1.2. Extraction d'ADN sur les échantillons solides

Les ADN des échantillons bruts et des sections polies de sulfures massifs ont quant à eux été extraits à l'aide du kit DNeasy PowerMax® Soil DNA Isolation conçu pour l'extraction d'ADN à partir d'échantillons solides contenant des inhibiteurs de PCR tels que des métaux lourds. Les recommandations du fabricant ont été respectées à l'exception de l'ajout de 250 µL d'acide polyadénylique (Sigma Aldrich, Saint Louis, MI, USA) à 660 mg mL⁻¹ entre les étapes 2 et 3 du protocole original. Ces oligonucléotides se fixent aux sites de potentiels contaminants de l'ADN contenus dans les minéraux (Webster et al., 2003). Les ADN sont ensuite concentrés en utilisant le kit Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices (Merck-Millipore, Billerica, MA, USA) selon les recommandations du fabricant.

2.6.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les amplifications d'ADN ont été réalisées dans un volume réactionnel de 50 µL comprenant : 1 X de tampon PCR avec MgCl₂, dNTP Mix à 0,1 mM chacun (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) et 2,5 U de Taq DNA Polymerase du kit Taq Core (MP Biomedical, Santa Ana, CA, USA) ainsi que des amorces à 0,2 µM final chacune et complété *qsp* avec de l'eau UltraPure™ Dnase/Rnase-Free (Life Technologies, New-York, USA). Les amorces utilisées sont référencées ci-dessous (TABLEAU 8).

Des contrôles négatifs (T-) contenant uniquement du mélange réactionnel ont été réalisés ainsi que des contrôles positifs avec la souche bactérienne *Thermosipho melanesiensis* et archéenne *Pyrococcus abyssi* GE5 à 46 µg mL⁻¹. Lors de la PCR nichée, les contrôles négatifs (T--) et positifs (T++) ont également été ré-amplifiés.

Tableau 8 : Amorces de PCR ciblant les gènes codant pour l'ARNr16S.

Cible	Amorce	Longueur fragment (pb)	Séquence 5'-3'	Référence	Condition de PCR	Objectif
<i>Bacteria</i>	E8F	1484	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	(Eden et al., 1991)	5 min à 94 °C - 30 cycles (1 min à 94 °C, 1 min30s à 53 °C, 2 min à 72 °C) - 6 min à 72 °C	Détection de signal bactérien
	U1492R		GGTTACCTTGTTACGACTT			
<i>Archaea</i>	A24F	1484	CGGTTGATCCTGCCGGA	(Eden et al., 1991)	5 min à 94 °C - 30 cycles (1 min à 94 °C, 1 min30s à 51 °C, 2 min à 72 °C) - 6 min à 72 °C	1ère PCR, détection de signal archéen
	A1492R		GGCTACCTTGTTACGACTT	(DeLong, 1992)		
	A344F	571	AYGGGGYGCASCAGGSG	(Stahl, 1991)	5 min à 94 °C - 30 cycles (1min à 94 °C, 1min30s à 57 °C, 2min à 72 °C) - 6 min à 72 °C	Banque de clone
	A915		GTGCTCCCCCGCCAATTCCT			
	A344F	462	AYGGGGYGCASCAGGSG	(Stahl, 1991)	5 min à 94 °C - 30 cycles (1 min à 94 °C, 1 min30s à 57 °C, 2 min à 72 °C) - 6 min à 72 °C	Séquençage Haut-débit
	A806		GGACTACVSGGGTATCTAAT	(Takai & Horikoshi, 2000)		

Afin de concentrer l'ADN amplifié issue de la première PCR pour les archées, les produits de première ont été concentrés avec le kit NucleoSpin Gel and PCR Clean Up suivant les indications du fabricant (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne); Les amplifications du gène codant pour l'ARNr 16S bactérien et archéen ont été réalisées sur les thermocycleurs Veriti96Well Thermal Cycle et GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) suivant les programmes PCR définies (TABLEAU 8). Les produits amplifiés (5 µL additionné de 4 µL de tampon de charge) ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (Eurobio, France) à 0,8 % préparé dans un tampon TAE 1 X contenant du bromure d'éthidium (10 mg/mL). Deux marqueurs de poids moléculaires Smart Ladder & Smart Ladder Small Fragment (Eurogentec, Liège, Belgique) ont été utilisés en fonction de la taille des fragments d'amplification attendue. Après migration (80 V), le gel a été visualisé avec le Biorad Molecular Imager®ChemidocTMXRS+ (Biorad, Hercules, USA) et du logiciel QuantaBiogène® (BioGene Technology, Hong Kong, China).

2.6.3 Clonage et séquençage

Les produits PCR ont été concentrés et purifiés avec le kit PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) suivant les recommandations du fabricant. Afin d'éviter une amplification des contaminants bactériens, la détection de séquence bactérienne se limite à une seule PCR avec les amorces larges E8f/U1492r. Pour augmenter la sensibilité de détection des séquences d'Archées, une

deuxième PCR avec les amorces A315/A944 ou A806/A944 a été nécessaire en utilisant un pool purifié de produit de 1ère PCR.

La diversité archéenne des échantillons de la première fermentation (BICOSE 1) a été étudiée par clonage-séquençage tandis que par la suite la diversité des fermentations (HERMINE, MOMAR17, BICOSE 2 et MOMAR18) a été obtenue directement par séquençage haut-débit. La biomasse bactérienne est trop faible pour obtenir un signal avec les outils moléculaires utilisés.

2.6.3.1. Banque de clone

Les banques de clones ont été construites par transformation de cellules *E. coli* souche K12 en utilisant le kit de clonage pGEMR-T (Promega, Madison, USA) suivant les instructions du fabricant légèrement modifié (ajout de 3 µL de produit PCR pour la transformation). 50 clones par banques ont été aléatoirement sélectionnés puis envoyés à séquencer chez GATC Biotech (Konstanz, Germany) qui ont réalisé l'extraction plasmidique, la purification et le séquençage des inserts.

2.6.3.2. Séquençage haut-débit

Les ADN extraits des échantillons ont été séquencés par l'entreprise MrDNA (Shallowater, TX, USA), qui a préparé les libraires et réalisé un séquençage Illumina *Miseq paired-read* (FIGURE 53). Le principe est le suivant : sur les fragments d'ADN à séquencer des adaptateurs spécifiques sont ligaturés à chaque extrémité (a). Les fragments sont ensuite fixés aléatoirement par hybridation sur une puce (la « *flow cell* ») sur laquelle se trouvent de courtes amorces complémentaires des deux adaptateurs (b). Chaque fragment à séquencer est amplifié par pontage (c). Le fragment va se fixer à la plaque par ses deux extrémités. Une polymérase permet la synthèse du brin complémentaire. Après dénaturation, deux fragments simples brins sont donc obtenus. Une succession d'amplifications par ponts permet d'obtenir une zone « *cluster* » contenant plusieurs centaines de milliers de copies d'ADN simple brin identiques (d). Le séquençage se fait en cours de synthèse par cycles successifs d'ajouts simultanés des quatre nucléotides (e). Chaque nucléotide est porteur d'un fluorochrome spécifique auquel est fixé un terminateur labile. Le terminateur permet d'éviter l'insertion de plusieurs nucléotides au cours du même cycle. Après lavage, les fluorochromes sont excités et les émissions lumineuses détectées et enregistrées. À chaque cycle sur une position définie, l'identité d'un nucléotide est déterminée en fonction du signal fluorescent. Le terminateur et le fluorophore sont ensuite clivés et éliminés pour permettre le prochain cycle d'incorporation.

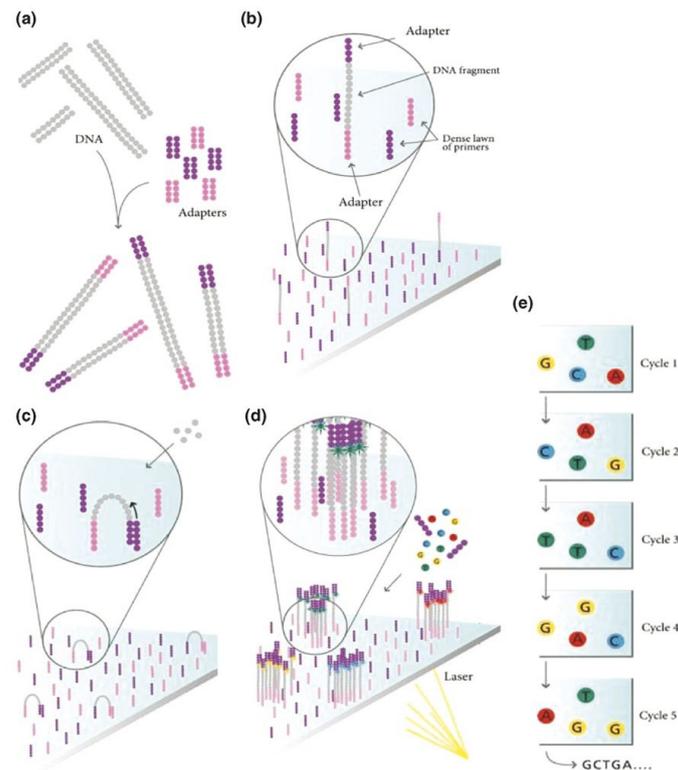


Figure 53 : Principe du séquençage Illumina. (Strausberg et al., 2008).

2.6.4 Traitement bio-informatique

2.6.4.1. Données de séquençages Sanger

Les séquences du gène de l'ARNr 16S ont été alignées et éditées avec le programme BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999) en utilisant ClustalW (Thompson, 1994). Les séquences chimères ont été éliminées en utilisant le programme Decipher (Wright et al., 2012). L'arbre phylogénétique a été réalisé en utilisant SeaView (Galtier et al., 1996). La robustesse de la topologie a été testée par ré-échantillonnage en utilisant 1000 *bootstraps* sur la base de l'algorithme Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) avec les corrections de Jukes&Cantor. Le positionnement phylogénétique a été réalisé en utilisant le programme BLAST à partir du site NCBI et de la base de données GenBank. Le regroupement de toutes les séquences présentant une similarité d'au moins 97 % au sein d'un OTU a été généré par le programme SON (Schloss & Handelsman, 2005). L'analyse phylogénétique des séquences affiliées au *Nanoarcheota* a été réalisée par les méthodes d'inférence Bayésienne, Maximum Likelihood (ML), Maximum de Parcimonie (MP), et Neighbour-Joining (NJ). Le modèle de substitution des nucléotides utilisé (TIM1+I+G) pour les inférences Bayessienne et ML a été sélectionné en utilisant j Modeltest 2.1.7. L'inférence Bayésienne a été réalisée avec MrBayes 3.2.5 amorcée avec un arbre aléatoire sur une base 10^6 générations. Les analyses en ML furent réalisées avec PhyML 3.1 en utilisant les mêmes paramètres que pour l'inférence Bayésienne. Les

analyses en NJ et MP furent réalisées en utilisant SeaView avec les mêmes paramètres que pour les arbres des *Crenarcheota* et des *Euryarcheota*.

2.6.4.2. Données de séquençages haut-débit

Les données du séquençage ont été analysées à l'aide du pipeline FROGS (*Find Rapidly OTU with Galaxy Solution*) (Escudié et al., 2018) sous les plateformes Galaxy Datarmor de l'Ifremer et Genotoul de l'INRA. Cet outil a été conçu pour analyser un large jeu de donnée de séquences d'amplicons d'ADN et de générer rapidement et efficacement une table d'abondance des OTU avec leur affiliation taxonomique. Le processus se déroule en plusieurs étapes (FIGURE 54) :

- Etape de démultiplexage : les données sont ensuite démultiplexées pour associer *in silico* chaque séquence d'ADN à son échantillon d'origine qui possèdent leur barcode spécifique.
- Etape de pré-process : un premier tri est réalisé en pré-process pour supprimer les amorces (*primers*) et les séquences trop courtes ou de mauvaise qualité (par exemple ne contenant pas les deux amorces).
- Etape de regroupement taxonomique (*clustering*) : les séquences restantes sont regroupées en unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) avec l'outil SWARM (Mahé et al., 2014). Contrairement aux autres algorithmes basés sur des matrices de distance et des seuils subjectifs (comme 97 %), SWARM utilise une approche de regroupement progressif en partant de séquences « graines » aléatoires « *cluster seed* », et procède à une agrégation des séquences proches (selon un seuil de similarité choisi (distance d'agrégation)) pour créer des OTUs. Le regroupement est réalisé en deux temps, tout d'abord avec une distance d'agrégation $d=1$ puis dans un second temps avec le seuil de similarité choisi (dans notre cas $d=3$). La première étape permet de construire des clusters avec un minimum de différence (1 étant la valeur la plus basse) et ne pas regrouper ensemble des séquences trop distantes qui pourraient correspondre à plusieurs espèces. Ensuite le second regroupement est réalisée à partir des séquences représentatives issus de la première étape Il est important de réaliser l'étape de regroupement avant l'étape suivante pour réduire le nombre de séquences afin de la rendre plus efficaces.
- Etape de retrait des séquences chimériques : la détection des séquences chimériques (séquence artificielle formée par l'assemblage de deux ou plusieurs séquences biologiques réelles) est réalisée par VSEARCH (Rognes et al., 2016) qui utilise la méthode de novo UCHIME (Edgar et al., 2011). Les séquences chimériques sont d'abord détectées indépendamment dans chaque échantillon mais ne sont supprimées que si elles le sont notées dans tous les échantillons où elles y sont présentes.

- Etape de filtrage : les OTUs qui représentent moins de 0,005 % (seuil optimal conseillé (Bokulich et al., 2013)) des séquences sont retirées du jeu de données au cas où il puisse s'agir d'éventuelles chimères non détectées dans l'étape précédentes. Il semblerait que ce soit le seuil optimal.
- Etape d'affiliation : Les OTUs restantes ont été affiliées à l'aide de la base de données SILVA_132_16S (Quast et al., 2012). L'outil blastn+ permet de comparer chaque séquence à la base de données afin d'assigner taxonomiquement (Domaine - Phylum - Classe - Ordre - Famille - Genre – Espèce) chaque OTU d'après le meilleur résultat (*best hits*) (Camacho et al., 2009). Pour les OTUs avec des séquences qui ont des assignations taxonomiques différentes, un consensus est indiqué avec le terme *Multi-affiliations* au niveau du rang taxonomique divergent.

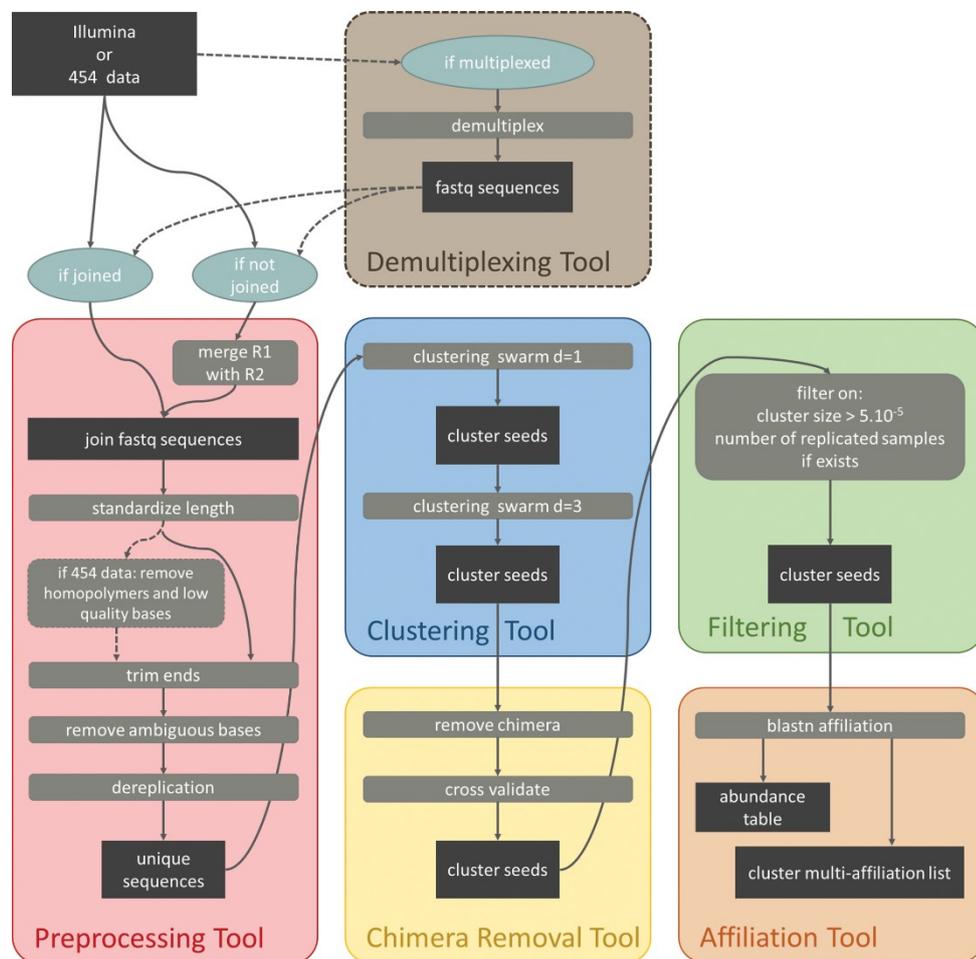


Figure 54 : Organigramme du traitement des données de séquençage à l'aide du pipeline FROGS. (Escudié et al., 2018).

2.6.4.3. Arbre phylogénomique des génomes de *Thermococcales*

Cette étape a été réalisée par D. Courtine (LMEE)

Un arbre phylogénomique des *Thermococcales* a été réalisé en utilisant un jeu de données de 59 marqueurs phylogénétiques protéiques (Rinke et al., 2013) (ANNEXE 1 - LISTE DES GENOMES UTILISES POUR LA REALISATION DE L'ARBRE PHYLOGENOMIQUE DES THERMOCOCCALES) extraites de tous les génomes de *Thermococcales* accessibles en ligne. Pour chaque protéine, les séquences ont été alignées avec MAFFT v7.055b (paramètre « linsi ») et les alignements ont été ajustés avec BMGE v1.12 (paramètre par défaut). Ensuite, tous les alignements ont été concaténés et les positions conservées pour tous les génomes ont été supprimés avec Seaview v4.6. L'arbre phylogénétique a été réalisé avec PhyML v3 sur le serveur <http://www.atgc-montpellier.fr/>. La sélection du modèle a été effectuée avec SMS en utilisant Akaike Information Criterion (AIC). Le meilleur modèle d'évolution pour l'arbre était « LG ».

2.6.5 Analyse statistique

La composition et la structure des communautés ont été appréhendée par plusieurs approches : analyses taxonomiques et des mesures des indices de diversité alpha et beta. Trois indices de diversité alpha ont été calculés (observed, Shannon et de invSimpson). Les analyses statistiques des données ont été réalisées sur le logiciel R (R Development Core Team 2013) et du package Phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013).

2.7. Dosage des anions par chromatographie échangeuse d'anion

2.7.1 Présentation de la chromatographie échangeuse d'ions

Le système Dionex de chromatographie échangeuse d'ions ICS-2000 permet l'analyse des anions en utilisant la détection de conductivité supprimée. La méthode consiste au passage de l'échantillon à analyser dans une phase liquide, l'éluant, au travers du système constitué d'une pompe haute pression, d'un passeur et injecteur automatique, d'un générateur d'éluant, d'une colonne de séparation, d'un suppresseur chimique et d'une cellule de conductivité (FIGURE 55). L'analyse d'un composé par chromatographie ionique peut se décomposer en quatre étapes : la génération de l'éluant et l'injection de l'échantillon, la séparation des analytes (et la suppression du bruit de fond), la mesure de la conductivité électrique puis le traitement et l'analyse du signal. Une cinquième étape peut s'ajouter à savoir la collection de fraction.

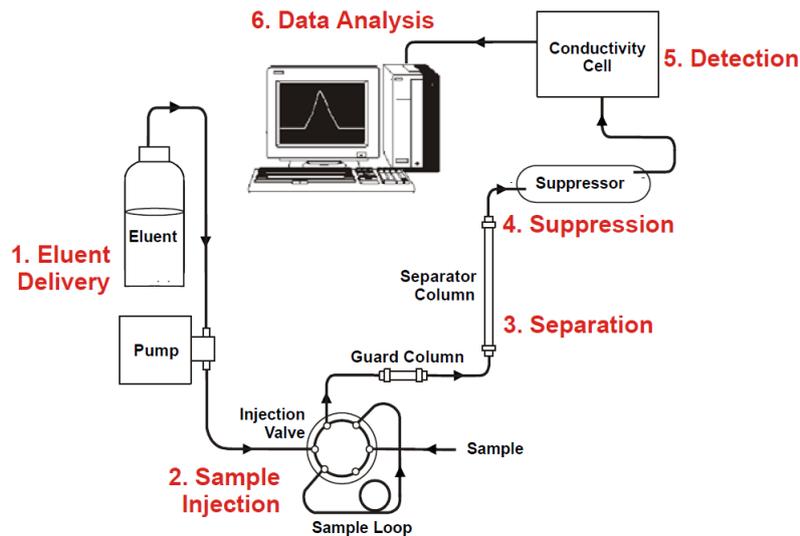


Figure 55 : Schéma des différentes étapes d'une analyse en chromatographie ionique. ©Dionex.

2.7.2 Principe de la chromatographie échangeuse d'ions

L'éluant est le liquide qui transporte les ions de l'échantillon au travers du système de chromatographie et qui facilite les processus de séparation des ions. Dans notre cas, l'éluant est le KOH et est généré à partir d'eau désionisée à l'aide d'un générateur d'éluant (cartouche de génération Dionex EGC-KOH). La cartouche de génération consiste en une chambre de génération des KOH contenant une anode, et d'un réservoir basse pression d'électrolyte K^+ connectés par un connecteur échangeur de cations. La concentration de KOH est déterminée par le courant appliqué au générateur de KOH et du débit de la chambre de génération. Un CRTC (pour *Continuously Regenerated Trap Column*) est installé en aval du générateur d'éluant pour supprimer les contaminants anioniques présents dans l'éluant. La pompe permet de tirer la solution et de la pousser dans le système (pression de travail 2300 PSI / 159 bars) et d'en contrôler le débit. Les échantillons sont ensuite introduits dans la ligne d'analyse par la vanne d'injection six voie Rheodyne (deux positions possibles : LOAD et INJECT). Les ions de l'échantillon sont séparés lors de leur passage dans la pré-colonne (AG15) puis dans la colonne de séparation (Colonne AS15 dans un four à 30 °C) en fonction de leur facilité à migrer au travers. La colonne de séparation contient des résines échangeuses d'anion (groupe fonctionnel : ammonium quaternaire) qui permettent une fixation sélective des anions présents dans la solution. Les anions sont ensuite progressivement décrochés en fonction de leur taille, leur charge et de leur degré d'hydratation. Avant le passage dans la cellule de conductivité, le mélange éluant/échantillon passe au travers du suppresseur (ASR5 4mm, *Anion Self-Regenerating Suppressor*) constitué de deux membranes échangeuses de cations. Il permet ainsi d'augmenter la sensibilité de détection (amélioration du rapport signal/bruit de fond) en supprimant la conductivité résiduelle de l'éluant et en augmentant celle des

ions de l'échantillon en les transformant sous forme acides avec des protons comme contre ions qui sont plus conducteur. Les ions sont ensuite dirigés vers la cellule de conductivité qui permet la mesure de la conductivité électrique des ions de l'échantillon (en $\mu\text{S m}^{-1}$) lors de leur passage au travers de la cellule chauffée à 35 °C. La conductivité électrique est la capacité d'un corps ou d'une solution à laisser les charges électriques se déplacer et donc permettre le passage d'un courant électrique. La conductivité de chaque anion est donc directement proportionnelle à sa concentration. Le mélange éluant/échantillon après passage au travers de la cellule de conductivité est recyclé dans le supprimeur où il est utilisé comme source d'eau pour la chambre de régénération. Il restaure ainsi les sites d'échanges d'ions dans leur état original.

1.2. Traitement et analyse du signal

La cellule de conductivité transmet le signal (le chromatogramme) à un système d'acquisition de données (logiciel Chromeleon®). Le logiciel permet d'identifier les ions en fonction de leur temps de rétention et par intégration de la surface des pics d'en déterminer la concentration par comparaison à ceux de standards préalablement passés. En effet avant passage de l'échantillon, le système a été calibré par l'utilisation de standard aux concentrations bien définies. La comparaison des résultats de l'échantillon à ceux des standards permet la quantification des ions connus. L'instrument a été calibré en utilisant cinq standards de concentration croissante de composés d'intérêts dans une matrice d'eau de mer artificielle (Fluorure, Acétate, Lactate, Formate, Propionate, Acrylate, Chlorure, Sulfate, Oxalate, Fumarate, Phosphate, Bromure, Nitrate et Thiosulfate).

1.3. Protocole

Les anions ont été mesurés en utilisant un système ICS-2000 équipé d'un Dionex AS50 autosampler (Dionex, Camberley, UK). La séparation chromatographique a été réalisée par une colonne AS15 à 30 °C avec un supprimeur Dionex (ASR5 4 mm) et à un débit de 0,9 ml min⁻¹.

Un volume de 0,5 mL d'échantillon à analyser est transféré avec une seringue de 1 mL dans un Eppendorf puis centrifugé 15 min à 12'000 g à température ambiante afin d'éliminer les cellules. Le surnageant est ensuite transféré dans un chromacol en verre borosilicaté et conservé à -20 °C. Avant analyse, une dilution au dixième (volume final 1 mL) est réalisée avec de l'eau ultrapure (Milli-Q system; Millipore). Afin d'éviter toute contamination, des précautions sont prises. Tout d'abord les chromacol ont été préalablement passés au four à 450 °C pour éliminer toute trace de matière organique. Les bouchons sont rincés avec de l'eau ultrapure avant d'être autoclavé 20 min à 121 °C. Les dilutions sont réalisées sous hotte PSM2 à flux laminaire Biocyt 120 (FluFrance, Wissous, France) en utilisant des cônes à filtres. Le protocole pour le recueil de fraction dans le cadre d'utilisation de radiotraceur est détaillé dans la partie suivante.

2.8. Mesures d'activités métaboliques par utilisation de radiotraceurs

2.8.1 Mesure d'incorporation de carbone radiomarqué

La production de biomasse a été estimée par l'incorporation de 28 µL de [14C] bicarbonate (Perkin, réf : NECO86H001MC) du 2014.12.09 avec une activité spécifique de 59,0 mCi/mmol (2,183 Gbq/mmol) dans 50 mL de culture en triplicata (à 96 kBq activité final). Les cultures ont été incubées pendant 8 jours à 80 °C. Les cultures sont stoppées par l'ajout de 250 µL de NaOH 10 M puis 5 mL sont prélevés et filtrés sur un filtre de 0,22 µm. Le filtre est lavé par deux lavages (10 mL) de solution saline stérile (NaCl 37 g L⁻¹) puis par acidification 3 mL d'HCl 1 M (5 min de repos). Les filtres sont transférés dans une fiole de comptage de 12 mL contenant 10 mL de liquide de scintillation Optiphase HiSafe 3 (PerkinElmer, Waltham, USA) puis comptés sur un analyseur à scintillation liquide Tri-Carb® 2910TR (PerkinElmer, Waltham, USA). Les témoins stériles correspondent à des fioles de cultures autoclavées 20 min à 121 °C après inoculation. Les témoins négatifs sont des fioles non inoculées.

2.8.2 Utilisation de radiotraceur ([¹⁴C] Bicarbonate) avec collection de fraction

2.8.2.1. Principe

L'utilisation de radiotraceur permet de réaliser le suivi d'atomes radio-marqués d'un composé donné afin de déterminer les produits issus de son utilisation au sein des cellules. Dans notre étude, nous souhaitons confirmer que la réaction ($\text{HCOO}^- + \text{H}_2\text{O} \Rightarrow \text{H}_2 + \text{HCO}_3^-$) est bien à l'origine de la production de formate. C'est la raison pour laquelle nous utilisons du bicarbonate marqué ($\text{H}^{[14]}\text{COO}^-$). Pour être sûr de mesurer la radioactivité des seules molécules de formate, il est nécessaire de les séparer des autres molécules. Il est possible de le faire en utilisant une chromatographie ionique qui permet la séparation des anions (FIGURE 56). Pour recueillir la fraction d'intérêt correspondant au formate dans notre cas il faut déterminer le temps de rétention de la molécule d'intérêt. La zone d'élution du formate est entre 22,8 et 24,25 min avec le pic d'élution à $T=23,463$ min. Dans un second temps, il est nécessaire de collecter l'ensemble des fractions de l'analyse d'un échantillon test (lorsqu'un standard radiomarqué n'est pas disponible) pour être sûr qu'il n'y ait pas d'autres produits métaboliques radiomarqués et pour limiter au maximum la zone de collection (FIGURE 56).

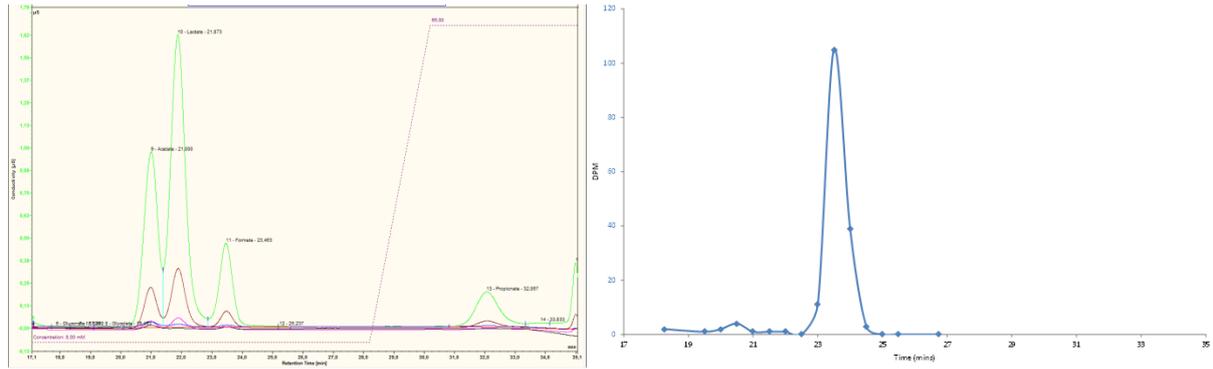


Figure 56 : Mise au point de la collection de formate radiomarqués. A : Chromatogramme des différents standards servant à calibrer la chromatographie avec le pic n°11 correspondant au formate détecté par un détecteur à conductivité. B : Mesure des activités (en désintégration par min) des différentes fractions issues de l'analyse en chromatographie ionique d'une culture de *Thermococcus onnurineus* NA1 (incubées avec du bicarbonate marqué au ^{14}C et collectées entre le T=18 et T=27 min).

2.8.2.2. Protocole

Des prélèvements de 500 μL ont été réalisés pour doser la concentration des anions à différents temps d'incubations (0, 24, 48, 72, 96 et 192 h) des cultures utilisées pour la production de biomasse. La collection du formate marqué (HCOO^-) est réalisé par chromatographie échangeuse d'ions équipée d'un collecteur de fraction automatique AFC-3000 (ThermoScientific, Waltham, USA). La mesure d'activité est réalisée à partir d'un pool de trois fractions par échantillon dilué au cinquième (100 μL de culture dans 400 μL d'eau désionisée) pour augmenter la sensibilité.

CHAPITRE III : RÉSULTATS

Etude A. Influence des conditions physico-chimiques sur l'enrichissement de communautés hyperthermophiles de cheminées hydrothermales de la ride médio-Atlantique en cultures en continu

Collaborateurs ayant participé à cette étude : S. Le Guellec^[1], D. François^[1], F. Lesongeur^[1], J. Aube^[1], E. Pelleter^[2], A. Godfroy^[1], Y. Fouquet^[2], E. G. Roussel^[1]

[1] Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes

[2] Laboratoire Cycles Géochimiques et ressources

A.1. Introduction

Notre vision des écosystèmes profonds s'est radicalement modifiée depuis la découverte des sources hydrothermales profondes. Dans ces environnements, les dépôts de sulfures massifs enrichis en métaux résultent de la précipitation de minéraux réduits lors du mélange, au niveau du plancher océanique, des fluides hydrothermaux (surchauffés et réduits) avec l'eau de mer (froide et oxygénée). Ces édifices hydrothermaux abritent des écosystèmes complexes qui ont comme particularité d'avoir à la base de leurs chaînes trophiques une production primaire chimiotrophe réalisée par des micro-organismes chimiolithotrophes. Ce sont des biotopes très hétérogènes et dynamiques caractérisés par des gradients physico-chimiques très marqués à l'échelle du cm au mm et par une diversité minéralogique complexe, engendrant une multitude de microenvironnements favorables au développement d'une riche diversité de micro-organismes.

Ces micro-organismes sont présents à l'interface géosphère-biosphère, il est ainsi essentiel de déterminer leur diversité et leurs fonctions. Encore trop peu d'études se sont intéressées aux mécanismes d'interactions entre les micro-organismes et les minéralisations hydrothermales mais les premiers résultats montrent que de par leurs activités métaboliques les micro-organismes peuvent modifier la minéralogie des cheminées et la composition du fluide hydrothermal en favorisant la dissolution ou au contraire la précipitation de certains minéraux. La caractérisation des populations microbiennes constituant les communautés de ces écosystèmes reste difficile à réaliser en raison du faible nombre de micro-organismes cultivables. Le développement de nouvelles méthodes de culture en continu à l'aide d'un bioréacteur Gas-Lift permet de réaliser des cultures d'enrichissement à haute température et d'accéder à une plus grande diversité inaccessible par les méthodes culturelles classiques.

Dans cette étude, nous avons comme objectif d'analyser la diversité microbienne des communautés hyperthermophiles d'échantillons de cheminées de sources hydrothermales profondes en réalisant, dans les mêmes conditions physico-chimiques, 5 cultures d'enrichissements en continu en bioréacteur Gas-lift. Ces opérations ont été réalisées à partir d'échantillons de sulfures de 3 champs hydrothermaux de la ride médio-Atlantique (TAG, Snake Pit et Lucky Strike). L'analyse de la diversité associée à des sections polies de minéralisations naturelles hydrothermales représentatives de celle trouvées au niveau de chacun des édifices hydrothermaux incubées avait pour but de déterminer les processus de colonisation. De plus, dans une des cultures en continu, une variation de l'activité hydrothermale a été simulée par une diminution progressive de la température et un apport d'oxygène avant de revenir aux conditions initiales. Cette modification des conditions chimiques sur les micro-organismes colonisateurs permet de déterminer leur capacité de résilience en cas de perturbations de leur environnement comme c'est le cas *in situ*.

A.2. Mises en œuvre des incubations

Les échantillons de cheminées hydrothermales ont été prélevés sur 3 champs hydrothermaux de la ride médio-Atlantique (Snake Pit, TAG et Lucky Strike) au cours de différentes campagnes océanographiques : [MOMARSAT2017](#), [HERMINE](#), [BICOSE 2](#), et [MOMARSAT2018](#) (TABLEAU 9).

Les cultures ont été réalisées à 80 °C à pH 6,5 sous un balayage gazeux N₂/CO₂/H₂ (75/20/5) en utilisant pour la première fois du fluide hydrothermal non filtré comme base minérale et inoculé avec des morceaux de cheminées hydrothermales prélevés sur le site de provenance du fluide (TABLEAU 10). Les incubations SNc_2017 et SNb_2018 ont été réalisées à partir d'échantillons de cheminées différentes du site « Les Ruches », les incubations LSa_2017 et LSc_2018 proviennent de deux sites différents, distants de 1 km, du champ de Lucky Strike et l'incubation TAGn_2018 a été réalisée à partir d'échantillon de TAG. Plusieurs sections polies de sulfures massifs de 1 cm² environ étaient incorporées dès le démarrage de l'incubation. Ces sections polies ont été échantillonnées différents temps d'incubations et conditionnées pour analyser la diversité microbienne et la minéralogie. Les surfaces des sections polies sont représentatives de l'exposition de surfaces fraîches et réactives engendrées par l'activité hydrothermale.

Une perte d'activité a été simulée au cours de l'incubation TAGn_2018 avec à partir du 12^{ième} jour la diminution progressive de la température de 80 à 4 °C jour sur plusieurs jours, le changement de la composition du balayage gazeux de N₂/H₂/CO₂ (75:20:5) à une composition N₂/O₂ (78:21) et enfin par l'apport d'eau de mer prélevée à basse température (2 °C, BIC2-PL01-PBT4-A). Les conditions d'incubation au cours de cette période était instable car le le pH variait entre 6,5 et 8. Après 2 jours à

4 °C (J15 et J16), la température a progressivement été remontée à 80 °C (T=501 h) avec un retour à un balayage gazeux de N₂/H₂/CO₂ (75:20:5) à T=549 h.

Tableau 9 : Récapitulatif des échantillons analysés dans le cadre de cette étude.

Campagne	Champ de prélèvement	Site	Coordonnées	Engin	Code échantillon
HERMINE (2016)	Snake Pit	Les Ruches (cheminée Cliff Tower)	(N23'22.1162 W044'57.1154)	Nautile (1877-02)	HER-PLO2-PBT2
MOMARSAT17 (2017)	Lucky Strike	Tour Eiffel (Cheminée Aisics)	(N37'17.33 W32'16.53)	Victor (668-2)	MOM17 Aisics2 PBT4
MOMARSAT2018 (2018)	Lucky Strike	Capelinhos	(N37'17.3651 W032'15.8390)	Victor (698-3)	MOM18-CAP-2
BICOSE 2 (2018)	Snake Pit	Les Ruches	(N23'22.114 W044'57.111)	Nautile (1919-13)	BIC2- PL1919_13_PBT_01
BICOSE 2 (2018)	TAG	Zone des nurseries	(N26'08.211 W044'49.542)	Nautile (1907-01)	BIC2-PLO1-PBT4

Tableau 10 : Récapitulatif des 5 incubations.

Nom de l'incubation	Durée totale d'incubation (jours)	Site de prélèvement	Nombre de fraction liquide prélevées (durée d'incubation en heures)	Incubation de section polies de sulfures massifs (durée d'incubation en heures)
SNc_2017 (HERMINE)	24	Snake Pit (Les ruches)	n=13 (0, 24, 48, 72, 108, 155, 205, 255, 300, 349, 397, 448, 496 et 564)	Non
LSa_2017 (MOMARSAT2017)	11	Lucky Strike (tour Eiffel)	n=11 (24, 48, 72, 96, 120, 144, 157, 192, 216, 240 et 263)	2 (263)
LSc_2018 (MOMARSAT2018)	12	Lucky Strike (Capelinhos)	n=12 (0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 148, 168, 192, 216, 240 et 248)	Non
SNb_2018 (BICOSE 2)	13	Snake Pit (Les ruches)	n=8 (0, 44, 144, 165, 210, 259 et 303)	6 (165 et 303)
TAGn_2018 (BICOSE 2)	32	TAG	n=21 (48, 96, 145, 165, 191, 241, 286, 301, 337, 356, 373, 382, 425, 432, 454, 475, 504, 547, 573, 645 et 733)	9 (165, 301, 454 et 733)

La diversité archéenne a été analysée par séquençage Illumina (A344f/A806r). Il n'a pas été possible de détecter la présence de séquences bactériennes par amplification PCR suggérant que la biomasse bactérienne pourrait être inférieure à celle des archées. Un total de 5 488 723 séquences a été obtenu sur l'ensemble des 85 échantillons formant 201 OTUs. Les échantillons correspondent aux fractions liquides prélevées à différents temps au cours de 5 incubations réalisées à l'aide d'un bioréacteur Gas-lift. Pour trois des incubations, des sections polies de sulfures massifs ont été incubées au sein des cultures en continu et récupérées à différents temps d'incubation. La majorité des séquences (4 888 950) appartient au phylum des *Euryarchaeota* (qui comprend 137 OTU). Le nombre de séquence par échantillon a été ramené à 9000 après normalisation pour l'analyse des diversités.

A.3. Résultats & Discussions

A.3.1 Diversité des échantillons bruts

Les cinq cultures en bioréacteurs Gas-lift ont été inoculées avec des morceaux de cheminées matures composées majoritairement de sulfures de cuivre et de fer dont l'abondance varie entre les cheminées (TABLEAU 11).

Tableau 11 : Composition minéralogique des échantillons bruts ayant servis d'inoculum pour les incubations en bioréacteur Gas-lift.

Minéralogie	Formule	LSa_2017	LSc_2018	SNc_2017	SNb_2018	TAGn_2018
Anhydrite	CaSO ₄	/	/	33	13	3
Chalcopyrite	CuFeS ₂	11	23	61	/	40
Isocubanite	CuFe ₂ S ₃	/	/	/	19	/
Marcasite	FeS ₂	39	42	/	/	5
Pyrite	FeS ₂	48	22	6	9	35
Pyrrhotite	Fe _{1-x} S	/	/	/	55	/
Sphalérite	(Zn,Fe)S	/	11	/	2	17

Certaines cheminées sont également composées d'anhydrite (jusqu'à 33 % pour la cheminée SNc_2017). Les deux cultures LSa_2017 et LSc_2018 ont été réalisées à partir d'échantillons prélevés sur le champ hydrothermal de Lucky Strike mais de deux sites distants d'environ 1 km. La culture LSa_2017 a été réalisée à partir d'un échantillon de la partie basse de la cheminée Aisics (MOM17-Aisics2-PL668-PBT4) au pied du site Tour Eiffel alors que la culture LSc_2018 a été réalisée à partir d'un échantillon de la cheminée Capelinhos (MOM18_cap2). Les cultures SNc_2017 et SNb_2018 ont été inoculées avec deux cheminées différentes qui proviennent du même site (Les Ruches) du champ

hydrothermal Snake Pit. La cheminée de SNC_2017 (HER-PLO2-PBT2) est composée de chalcopryrite (61 %), d'anhydrite (33 %) et de pyrite (6 %) alors que la cheminée SNb_2018 (BIC2-PL13-PBT-01) prélevée dans la zone de la cheminée Bénitier est constituée majoritairement d'un assemblage de pyrrhotite (55 %), d'isocubanite (19 %), d'anhydrite (13 %), de pyrite (9 %) et de sphalérite (2 %). La culture TAGn_2018 a été réalisée à partir d'un échantillon d'une cheminée active de type diffuseur (BIC2-PL01-PBT-4) de la zone des nurseries et composée de chalcopryrite (40 %), de pyrite (35 %), de sphalérite (17 %), de marcasite (5 %) et d'anhydrite (3 %).

Les diversités microbiennes des échantillons bruts sont majoritairement constituées d'*Euryarchaeota* mais présentent des différences les uns des autres avec des variations importantes d'abondances relatives (FIGURE 57).

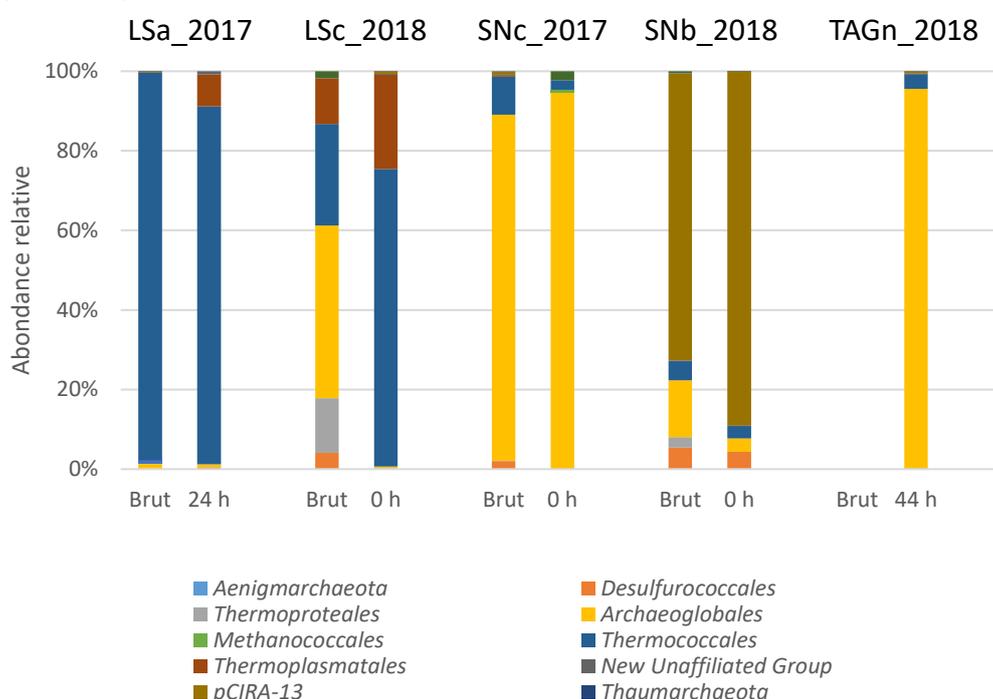


Figure 57 : Comparaison des diversités archéennes des échantillons bruts ayant servis d'inoculum et des fractions obtenue par séquençage Illumina (344f-806r).

Pour la culture LSA_2017, la diversité de l'échantillon brut est faible et est majoritairement constituée de *Thermococcales* (98,4 %) et d'un peu d'*Archaeoglobales* (1,2 %). La diversité de l'échantillon brut de la culture LSc_2018 est plus importante avec des *Archaeoglobales* (43,4 %), des *Thermococcales* (25,5 %), des *Thermoproteales* (13,7 %), des *Thermoplasmatales* (11,4 %) et des *Desulfurococcales* (4,1 %). Pour les cultures inoculées avec des cheminées du champ Snake Pit, la diversité de l'échantillon brut de l'incubation SNC_2017 (HER-PL02-PBT2) est majoritairement constituée d'*Archaeoglobales* (87 %), ainsi que de *Thermococcales* (10 %) et de *Desulfurococcales* (2 %) tandis que celle de l'échantillon brut de la culture SNb_2018 est constituée à 72 % de séquences affiliées à une séquence

d'un clone pCIRA-13 (AB095138, 99 %) appartenant au phylum des *Euryarchaeota*, à 14 % d'*Archaeoglobales*, à 5,4 % de *Desulfurococcales* et à 4,8 % de *Thermococcales*. La séquence du clone pCIRA-13 a été identifiée sur un substrat du module de colonisation ISCS d'un site de la ride Centrale Indienne déployé à 2 m du point d'émission à une température moyenne de 2 °C (Takai, Gamo, et al., 2004). Les plus proches représentants cultivés sont *Archaeoglobus* sp. NI85-A (AB175518.1) et *Thermococcus litoralis* DSM5473 (CP006670) avec 86 % de similarité.

Il n'a pas été possible d'obtenir des signaux d'amplification de séquence pour l'échantillon brut de l'incubation TAGn_2018 ni pour les deux premiers prélèvements (T=0 h et T=24 h) de la fraction liquide. Les diversités détectées sont cohérentes avec les résultats de précédentes études de cheminées hydrothermales (Kormas et al., 2006; Li et al., 2014; Reysenbach et al., 2000; Schrenk et al., 2003; Takai et al., 2001).

Les diversités détectées dans les bioréacteurs après inoculation aux T=0h qui correspondent à la somme des diversités de l'échantillon brut et de celles des fluides hydrothermaux sont similaires à celles des échantillons bruts pour les incubations LSa_2017, SNc_2017 et SNb_2018. Pour l'incubation LSa_2017, aucune amplification PCR positive n'a pu être obtenue sur le T=0 h. Néanmoins la diversité de la fraction liquide au T=24 h diffère légèrement avec l'apparition de *Thermoplasmatales* (DHVE2) (8 %) correspondant à une diminution des *Thermococcales* (90 %). Leurs séquences sont affiliées à 100 % à la séquence d'*Aciduliprofundum* sp. MAR08-339 (CP003168) isolée d'une cheminée de Lucky Strike (Flores et al., 2011). La diversité de l'échantillon brut est différente pour l'incubation LSc_2018 avec la présence d'*Archaeoglobales* (33 %), de *Thermoproteales* (13,4 %) et de *Desulfurococcales* (4 %) qui ne sont pas détectées dans l'échantillon T=0 h mais qui le sont par la suite. Cette différence de diversité pourrait s'expliquer par une biomasse du fluide plus importante que celle de l'échantillon brut (le signal d'amplification en PCR était faible) mais avec une diversité plus faible avec que des *Thermococcales* (75 %) et des *Thermoplasmatales* (23,7 %). La diversité des différents enrichissements est donc représentative de celles des échantillons bruts.

A.3.2 Évolution de la diversité microbienne au sein des différents bioréacteurs

De manière générale, la composition des communautés se complexifie au cours de l'incubation dans les différents incubateurs avec une augmentation du nombre de cluster de 18 (T=0h) à 43 (T=496h) pour l'incubation SNc_2017, de 76 (T=24 h) à 109 (T=263 h) pour l'incubation LSa_2017, de 58 (T=0 h) à 87 (T=248h) pour l'incubation LSc_2018, de 53 (T=48 h) à 74 (T=301 h) pour TAGn_2018, et de 50 (T=0 h) à 72 (T=303 h) pour l'incubation SNb_2018 (FIGURE 58). La structure des communautés de chaque incubation est significativement différente les unes aux autres ($p > 0.001$) mais la diversité

phylogénétique est similaire avec une très grande majorité d'*Euryarchaeota* (*Thermococcales* et *Archaeoglobales*) (FIGURE 59).

L'absence de détection de séquences bactériennes avait déjà été constaté au cours d'une précédente incubation réalisée à 85 °C à partir d'échantillons de TAG (Byrne et al., 2009). La dominance du domaine des archées dans des conditions de température supérieur à 80°C et dans des conditions oligotrophes sans ajout de matière organique est cohérente.

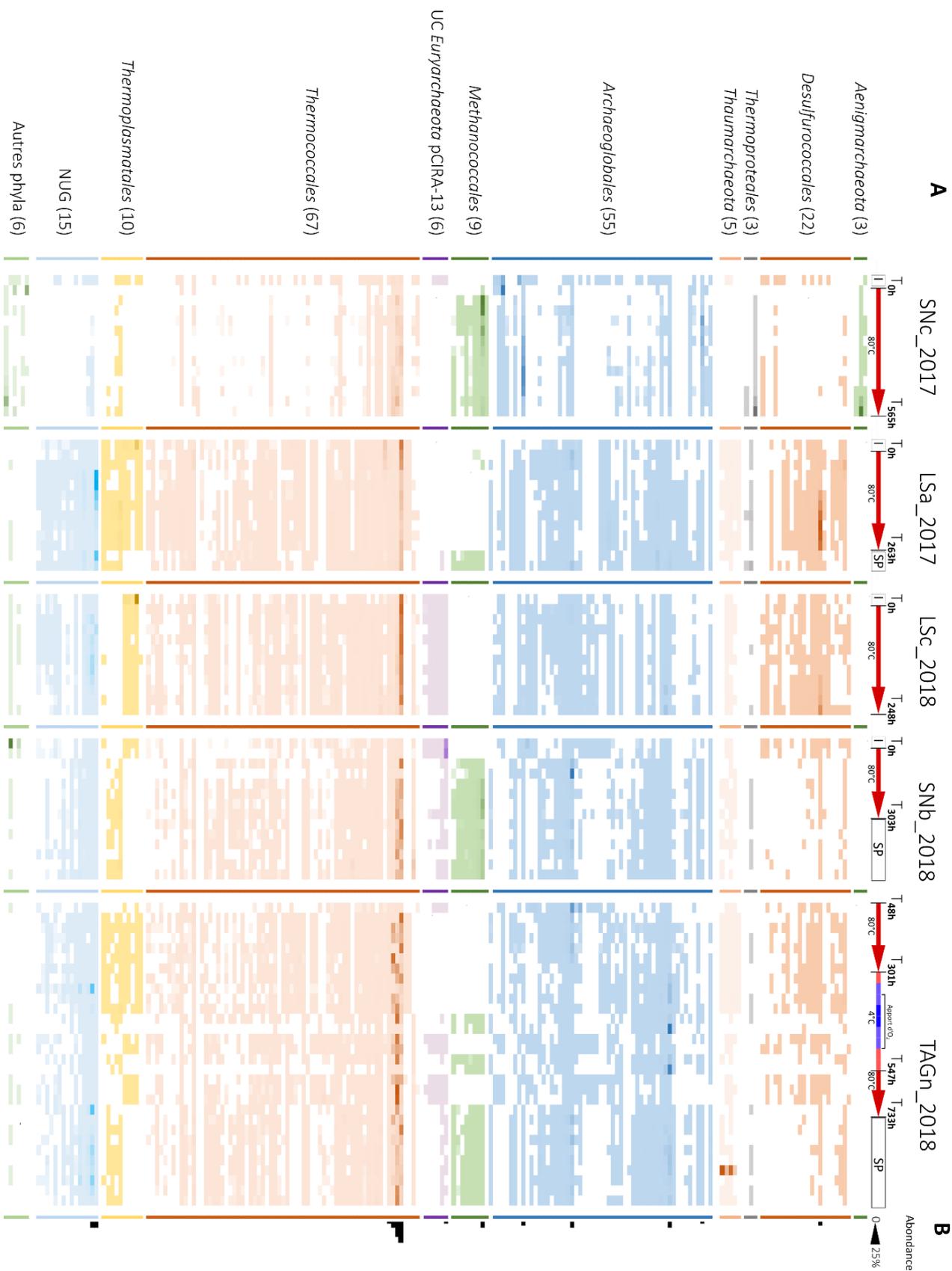
La diversité des archées est majoritairement représentée par 13 OTU qui sont retrouvés en abondance (> 1 %) et qui constituent 83,7 % du nombre des séquences totales (FIGURE 59B). 5 OTUs sont identifiés dans tous les échantillons dont trois affiliés à l'ordre des *Thermococcales* et qui constituent une fraction importante en représentant de la diversité totale (5, 16 et 27 %).

Les séquences représentatives de ces OTUs présentent 100 % de similarité avec les séquences des gènes codant pour l'ARNr 16S d'espèce de *Thermococcus* isolées de sites de la ride médio-Atlantique : l'OTU 1 est affiliée à *T. barophilus* Ch5 (100 % de similarité, CP013050) et *T. barophilus* MP^T (100 %, CP002372) isolées respectivement du champ d'Ashadze (Oger et al., 2016) et de Snake Pit (Marteinsson et al., 1999), l'OTU2 est affiliée à *T. thioeducens* OGL-20P, 100 % (CP015105) isolée de Rainbow (Pikuta et al., 2007) et l'OTU5 est affilié à *T. atlanticus* MA898 (100 %, NR_042075) isolée d'échantillons de TAG et de Snake Pit (Cambon-Bonavita et al., 2002). Les *Thermococcales* sont présentes dans une très grande majorité des études de diversité des sources hydrothermales (Orcutt et al., 2011; Schrenk et al., 2008; Takai et al., 2006; Takai & Nakamura, 2010) et un grand nombre ont été isolés et étudiés d'échantillons hydrothermaux (Schut et al., 2014) dont certaines de Snake Pit comme *T. marinus* EJ1 (Jolivet et al., 2004) et *T. barophilus* MP^T qui est l'une des premières souches piézophiles hyperthermophiles décrites. Elles sont (hyper)thermophiles, identifiées comme chimioorganotrophes fermentaires anaérobies capable de réduire différents composés soufrés (Schut et al., 2014).

Deux autres clusters affiliés aux *Archaeoglobales* sont également retrouvés dans toutes les fractions liquides et représentent 5,2 et 4,6 % du nombre total de séquence. Les séquences du premier sont affiliées à 100 % à *Geoglobus ahangari* 234 (CP011267) et le deuxième à *Archaeoglobus fulgidus* DSM 8774 (CP006577). Les *Archaeoglobus* sont des hyperthermophiles (température optimale de croissance autour de 80 °C) qui réduisent le SO₄²⁻ mais également le thiosulfate ou le sulfite en utilisant l'H₂ ou des composés organiques comme l'acétate ou le pyruvate comme donneur d'électron (Burggraf et al., 1990). Six espèces composent le genre dont *A. veneficus* isolée de Snake Pit (Huber et al., 1997). L'ordre des *Archaeoglobales* contient deux autres genres celui des *Geoglobus* et celui des *Ferroglobus*. Les représentants cultivés (*Geoglobus acetivorans* (Slobodkina et al., 2009), *G. ahangari* (Kashefi et al., 2002) et *Ferroglobus placidus* (Hafenbradl et al., 1996)) sont capables de réduire le fer (III). Les

Geoglobus sont capables de croître en litho-autotrophie (oxydation de l' H_2) ou en organo-hétérotrophie (oxydation du pyruvate ou encore de l'acétate) avec le fer III comme accepteur d'électron. Les *Thermococcales* et les *Archaeoglobales* figurent parmi les taxons les plus détectés des études de diversité des environnements hydrothermaux (Rutherford, 2014). Ils représentent ainsi la majorité des séquences (71 % de *Thermococcales* et 22 % d'*Archaeoglobus*) précédemment obtenus sur le module de colonisation Vent caps déployé sur Snake Pit en 1995 (Reysenbach et al., 2000). Les *Thermococcales*, contrairement aux *Archaeoglobales*, ont été systématiquement retrouvées en abondance au cours des précédentes culture en bioréacteurs Gas-lift inoculé avec des échantillons de même nature (Byrne et al., 2009; Callac et al., 2015; Landreau, 2016; Postec et al., 2007; Postec et al., 2005). Néanmoins, l'enrichissement de *Thermococcales* dans ces conditions de notre étude (balayage en H_2 et sans ajout de matière organique ni de soufre) est inattendu (Byrne et al., 2009). En effet en culture pure et en absence de S^0 , la croissance des *Thermococcales* est inhibée par de faibles concentrations en H_2 , produit terminal de son métabolisme, suggérant ainsi un mécanisme permettant à ces *Thermococcales* de réduire leur pression partielle d' H_2 intracellulaire. Ce mécanisme pourrait, être la conséquence d'une association à des souches hydrogénotrophes ou la présence d'une voie métabolique indépendante de l'utilisation du soufre.

Figure 58 : Représentation graphique de l'abondance relative des 201 OTUs identifiés par séquençage Illumina (344f/806r) pour chaque incubation analysée dans le cadre de cette étude (SNc_2017, Lsa_2017, LSc_2018, SNb_2018 et TAGn_2018). Chaque colonne représente la diversité associée à un temps d'incubation. Les échantillons sont classés par incubation et par ordre de prélèvement : les colonnes I correspondent aux échantillons bruts ayant servi d'inoculum aux incubations, les flèches rouges correspondent aux fractions liquides et enfin les colonnes SP correspondent aux sections polies de sulfure massif incubées. L'intensité de la coloration est fonction de l'abondance de cet OTU par rapport aux autres OTUs du même groupe phylogénétique. Une case blanche indique l'absence de séquence de cet OTU. Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de d'OTU appartenant au groupe phylogénétique. NUG pour « New Unaffiliated Group ». L'abondance relative des OTU les plus abondants (> 1 %) au sein de la diversité totale est indiquée sur la colonne de droite.



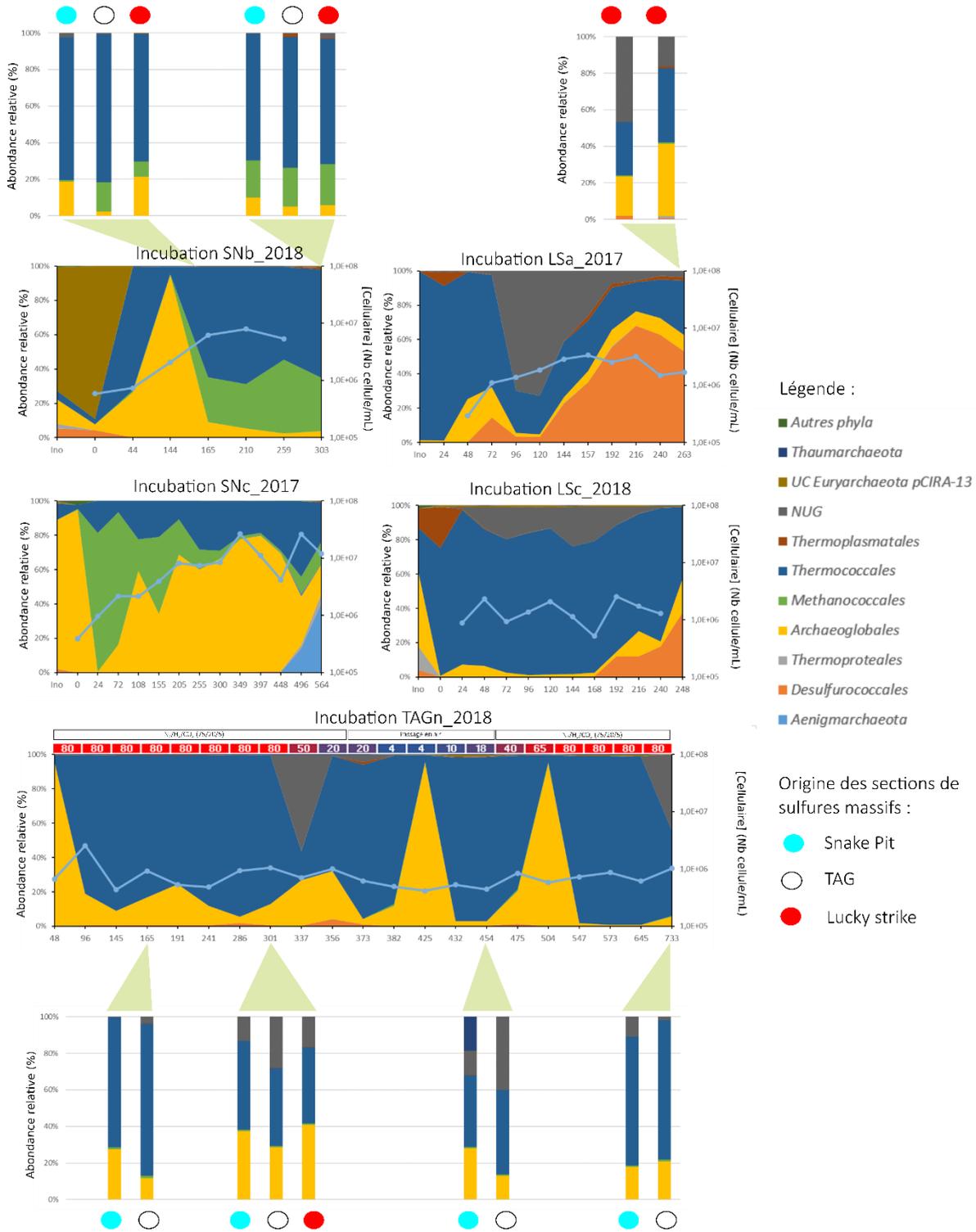


Figure 59 : Représentation graphique de la diversité archéenne obtenue par séquençage Illumina (344f/806r) pour chaque incubation au cours du temps, associée à celle (quand disponible) de la diversité de sections polies de sulfures massifs incubées. Les cercles indiquent l'origine des sulfures, bleu pour Snake Pit, blanc pour TAG et rouge pour Lucky Strike. La concentration cellulaire (en cellules mL⁻¹) des fractions liquides est représentée en ordonnée.

A.3.3 Diversité des archées spécifiques à certaines incubations

Des séquences affiliées à 100 % au gène codant pour l'ARNr 16S de la souche méthanogène *Methanoterris igneus* Kol 5 (NR102901) sont en effet identifiées en abondance dans les fractions liquides des incubations SNC_2017 et SNb_2018 mais sont absentes des fractions liquides des incubations LSa_2017 et LSc_2018.

C'est la première fois que des méthanogènes hyperthermophiles sont enrichies en bioréacteurs Gas-lift. L'enrichissement des incubations en *Methanoterris* semble très rapide car leurs proportions relatives augmentent de 0,6 à 80 % en 24 h sur SNC_2017. Elles apparaissent plus tardivement au cours de l'incubation SNb_2018 avec un optimum de 42,8 % après 259 h. Cette méthanogène est chimiolithoautotrophe utilisant l'H₂ comme donneur d'électrons a une température optimale de croissance de 88 °C (Burggraf et al., 1990). Sa présence dans la phase liquide est également corrélée par l'observation de cellules auto-fluorescentes à 420 nm (présence de l'enzyme F₄₂₀) caractéristique des méthanogènes. La présence de *M. igneus* avait déjà été référencée par Jeanthon et collaborateur en 1999 à partir d'échantillon de cheminées prélevées sur le champ de Snake Pit (Jeanthon et al., 1999). Une souche de *M. igneus* a également pu être isolée à partir d'échantillons bruts d'une cheminée prélevée sur le site La Ruche au cours de la campagne BICOSE 1 (communication personnelle S. L'Haridon). Les concentrations en H₂ des fluides de ces trois champs basaltiques sont du même ordre de grandeur avec 0,35 mM de moyenne (Charlou et al., 2002) et largement inférieures à celles de champs hydrothermaux ultramafiques (13,6 mM de moyenne) dans lesquels les méthanogènes sont identifiés dans les inventaires moléculaires. Dans les cheminées et diffuseurs actifs de Snake Pit la pyrrhotite et l'isocubanite sont les sulfures de fer et de cuivre dominants, ils traduisent des conditions plus réductrices que celles de TAG et Lucky Strike pour lesquelles la pyrite (sulfure de fer) et la chalcopryrite (sulfure de cuivre) sont les sulfures dominants. La formation de ces minéraux dans les cheminées actives traduit les conditions plus ou moins réductrices du fluide (non mélangé à l'eau de mer).

Des séquences d'*Aeropyrum* sont détectées en abondance dans les incubations LSa_2017 et LSc_2018 et dans une moindre importance dans les incubations SNC_2017, SNb_2018 et TAGn_2018 (< 1 %). Ces séquences sont affiliées à 97 % à une séquence d'*Aeropyrum* sp. AF1T6.18 (FM242724) détectée dans une culture en bioréacteur réalisée à partir d'échantillon du site de TAG (Byrne et al., 2009). Bien que des séquences d'*Aeropyrum* aient déjà été identifiées en abondance dans des inventaires moléculaires d'échantillons provenant de Lucky Strike (Flores et al., 2011) et sur d'autres sites hydrothermaux de la MAR comme Ashadze (Roussel et al., 2011), leur enrichissement dans ces conditions est surprenant. En effet les deux espèces de ce genre, *Aeropyrum camini* et *A. pernix* sont des hyperthermophiles (optimum

85-95 °C) hétérotrophes avec comme particularité d'être strictement microaérophiles en utilisant l'O₂ comme accepteur terminal d'électron (Nakagawa et al., 2004; Sako et al., 1996).

Deux phylotypes très divergents de représentant cultivés ont été enrichies dans 3 incubations. Ils représentent 2,9 et 3,3 % de la diversité totale ne sont affiliés à un clone incultivé HTM873I-A9 (AB611366, similarité 97 % pour le gène codant pour l'ARNr 16S) identifié sur une cheminée hydrothermale du Pacifique (Yoshida-Takashima et al., 2012). Les plus proches représentants cultivés sont *Thermosphaera aggregans* à 82 % (NR074380) et *Vulcanisaeta sp* à 83% (HM594677). Ils sont particulièrement abondants dans les cultures L_{Sa}_2017 et L_{Sc}_2018 jusqu'à représenter 70% de la diversité totale à T=120 h sur L_{Sa}_2017 et 23 % à T=144 h sur L_{Sc}_2018. Ils sont également présents en faible abondance (< 1 % de l'abondance) dans les incubations S_{Nc}_2017, S_{Nb}_2018 et TAG_n_2018 à l'exception pour cette dernière d'un enrichissement épisodique à 56 % (T=337 h). Cette augmentation coïncide avec la diminution de la température à 50 °C. Ces séquences ont déjà été détectées et enrichies (< 42 % de la diversité relative)) au cours d'une première culture en continue réalisée à partir d'échantillons de Snake Pit (campagne BICOSE 2014) (données non montrées). Elles ont été aussi détectées lors d'analyses de la diversité d'échantillons de cheminée hydrothermale de deux champs hydrothermaux (Futuna (SW Pacifique) et Lucky Strike) (communication personnelle V. Redou et A. Godfroy). Elles ont été nommées de NUG pour « *New Unaffiliated Group* ».

Ces différences de diversité (opposition présence de méthanogène/*Aeopyrum* et NUG) pourraient être expliquées par un état plus réducteur des incubations de Snake Pit et moins réducteur pour les incubations de Lucky Strike et de TAG. Il serait intéressant de mesurer le potentiel redox de prochaines incubations pour déterminer si ce facteur est déterminant pour l'enrichissement de ces phylotypes. L'apport d'H₂ en condition réductrice permet donc d'enrichir les méthanogènes hydrogénotrophes présents en faible quantité dans l'environnement de Snake Pit

Alors que la grande majorité des OTU (166 sur 201) sont retrouvées dans au moins 4 des incubations, certaines sont spécifiques à une seule incubation (S_{Nc}_2017) dont 4 sont retrouvés en abondance (> 1 % de la diversité) (FIGURE 58). L'incubation HER se distingue par sa durée de 24 jours, plus longue que les autres incubations qui elles ont duré entre 11 et 13 jours (l'incubation TAG_n_2018 a duré 32 jours mais au 12^{ième} jour une perte d'activité a été simulée perturbant son équilibre). Trois de ces phylotypes originaux ne possèdent pas de représentant cultivé proche (dont la séquence codant l'ARNr 16S avec une similarité supérieure à 85 %). Le premier qui est peu présent au cours de l'incubation (> 0,02 %), est progressivement enrichi en passant de 0,2 % (T=448 h) à 40,5 % (T=564 h). L'analyse phylogénétique des séquences les placent dans le phylum des *Candidatus Aenigmarchaeota*. Aucun micro-organisme appartenant à ce phylum n'avait été jusqu'ici enrichi en culture. Les deux autres

phylotypes associés à 85 % à *Methanocaldococcus indicus* SL43 et à 82 % à *Thermococcus marinus* EJ1 sont moins abondants avec une abondance maximale respective de 2,6 % et de 1,3 % (à T=496 h). Enfin le quatrième phylotype est associé à 96 % à *Thermofilum pendens* avec une abondance maximale de 5,1 % à T=564 h. Ces phylotypes sont apparus après une longue période d'incubation suggérant le pouvoir des incubations pour le développement d'organismes.

A.3.4 Diversités associées à des surfaces minérales incubées dans les bioréacteurs

Plusieurs sections polies de sulfures massifs de 1 cm² environ étaient incorporées dès le démarrage de l'incubation. Ces sections polies ont été échantillonnées différents temps d'incubations et conditionnées pour analyser la diversité microbienne et la minéralogie. Les roches ayant servies à la préparation de ces sections polies les modifications minéralogiques. Les sulfures proviennent d'échantillons prélevés lors de précédentes campagnes sur ces mêmes sites. Leur composition minéralogique est différente. Ainsi les sections polies provenant de TAG sont composées de pyrite et de marcasite (FeS₂), c'est également le cas pour celle de Lucky Strike qui contiennent également des traces de chalcopryrite (CuFeS₂). Les sulfures de Snake Pit se composent de chalcopryrite (CuFeS₂) et d'isocubanite (CuFe₂S₃).

Les sections polies de sulfures massifs de l'incubation SNb_2018 ont été échantillonnées à deux temps (T=165 h et T=303 h) pour lesquels, les trois types de sulfures massifs ont été utilisées (provenant de Snake Pit, de TAG et de Lucky Strike). Celles de l'incubation TAG l'ont été à T=161 h et à T=303 h puis après une simulation de perte d'activité hydrothermale à T=455 h et T=733 h. Enfin dans le cadre de l'incubation LSa_2017, deux sections de sulfures provenant du site Lucky Strike ont été récupérées à T=263 h.

Les diversités des communautés développées à la surface des sections polies incubées dans les mêmes conditions (jusqu'au T=303 h) sont similaires à celle des fractions liquides avec une majorité de *Thermococcales* (entre 42 et 83 %) et d'*Archaeoglobales* (entre 2 et 41 %) principalement affiliée à *Geoglobus ahangari*.

Les *Methanococcales* détectées dans les fractions liquides de l'incubation SNb_2018 le sont également sur les sections de sulfures massifs (entre 1 et 22,4 % pour SNb_2018), alors qu'elles ne sont pas détectées dans les fractions liquides de l'incubation TAG, elles sont présentes dans les sections de sulfures massifs (0,8 à 1,1 %). Les NUG sont peu abondants sur les sections de l'incubation SNb_2018 (entre 0,4 et 3 %) mais le sont sur celles de l'incubation TAG avec un enrichissement important au T=303 h avec une abondance entre 13,3 et 27,8 %.

La diversité microbienne associée aux deux sections polies de l'incubation L_{Sa}_2017 est également similaire à celles des autres incubations, avec une majorité de *Thermococcales* (29,1 et 40,4 %) et d'*Archaeoglobales* (21,5 et 39,5 %), ainsi qu'avec une plus grande abondance des séquences affiliées au NUG (46,8 et 16,2 %). La principale différence avec la diversité de la fraction liquide est la faible abondance de *Desulfurococcales* affiliés à 98 % au genre *Aeropyrum* dans les sections de sulfures massifs (0,5 et 2 % par rapport au 53 % de la fraction liquide).

Il n'y a pas eu, à la surface des sections polies, d'enrichissements spécifiques de micro-organismes sur qui ne sont pas détectés dans les sections de sulfures massifs. De plus la composition minéralogique des sulfures n'influence pas la composition des communautés microbiennes (FIGURE 59). Ce résultat suggère qu'il n'y a pas eu de colonisation spécifique mais plus un dépôt à la surface des sulfures des micro-organismes de la phase liquide. L'utilisation de substrat d'une autre nature comme des basaltes ou inerte comme du verre permettrait de le confirmer.

A.3.5 Résilience des communautés microbiennes après un choc oxygène et une diminution de la température

Avant la modification des conditions d'incubations (température, anoxie et pH), la diversité des archées était principalement composée de *Thermococcales* (86,5 %) et d'*Archaeoglobales* (12,6 %) à T=301 h avec une concentration cellulaire de l'ordre de 1.10^6 cellules/mL (FIGURE 59). Celles-ci ont ensuite progressivement diminué de moitié jusqu'à atteindre $4,1.10^5$ cellules/mL à T=425 h. Le rétablissement des conditions anaérobies et l'augmentation progressive de la température a entraîné une lente augmentation de la biomasse jusqu'à atteindre la même concentration cellulaire d'avant la baisse d'activité (1.10^6 cellules/mL) à T=733 h. Les *Thermococcales* représentent la grande majorité de la diversité (98 %) de T=547 h à T=645 h avec une faible présence des *Archaeoglobales* (0,9 % de moyenne) sur cette période. Cependant la structure des communautés des fractions liquides après rétablissement des conditions est significativement différente de celles d'avant la simulation de la perte d'activité ($p < 0.01$) et est similaire à celle associées aux sections polies qui elle est restée la même pendant l'ensemble de l'incubation (FIGURE 60). Par exemple, des séquences de *Methanotorris igneus* ne sont pas détectées dans la fraction liquide avant le choc oxygène mais le sont des sections polies (1,1 % à T=161 h et 0,8 % à T=303 h). Après le choc oxygène elles sont alors détectées dans la fraction liquide (0,6 % à T=480 h). Les méthanogènes nécessitent un potentiel redox très bas, les microniches présents au sein des sections polies de sulfures massifs leur offre des bonnes conditions.

L'absence de signal bactérien est notable malgré la diminution de température. Lors de précédentes expériences avec un bioréacteur Gas-lift, des communautés bactériennes s'étaient développées à 60 °C (Byrne et al., 2009; Postec et al., 2007). La diminution de température est peut-être trop rapide (environ 20 °C/jour) pour permettre l'enrichissement de communauté thermophile, mésophile ou psychophile.

L'augmentation de la biomasse dès le rétablissement des conditions initiales démontre une capacité de résilience plus importante chez les communautés hyperthermophiles que chez les micro-organismes mésophiles et psychophiles. Ce qui indique que les micro-organismes hyperthermophiles sont présents dans des environnements marqués par des variations rapides et brutales des conditions physico-chimiques et doivent y répondre rapidement afin de survivre.

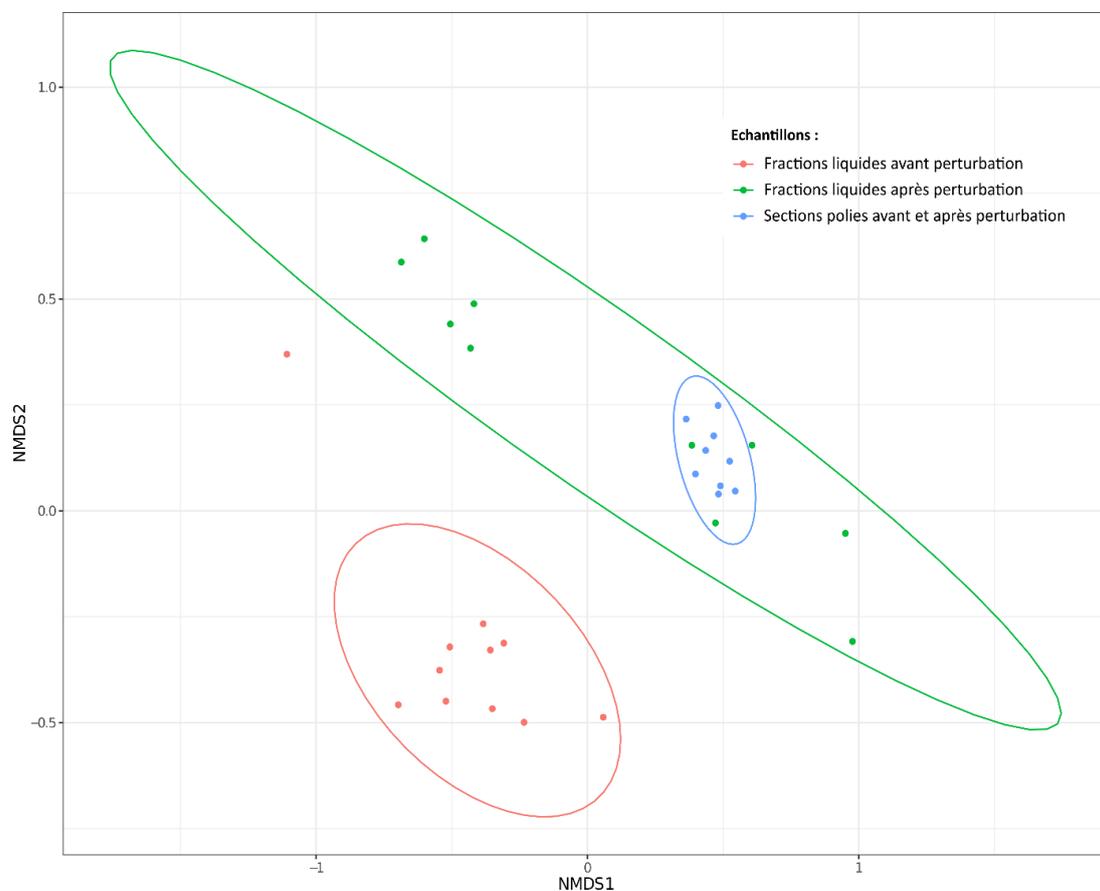


Figure 60 : Analyse du Positionnement multidimensionnel non métrique (NMDS) de Bray-Curtis des échantillons. L'ellipse rouge comprend les échantillons des fractions liquides avant la perturbation (baisse de température et apport d'oxygène), l'ellipse verte comprend les échantillons des fractions liquides pendant et après la perturbation et enfin l'ellipse bleue comprend les échantillons des sections polies avant et après la perturbation.

Il est démontré expérimentalement qu'en culture pure certaines hyperthermophiles anaérobies (principalement des *Thermococcales* mais également des bactéries comme des *Thermotoga*) sont immédiatement sensibles à l'exposition à de faibles concentrations d'oxygène à température optimale

de croissance. Cependant elles tolèrent la présence de concentrations importantes d'oxygène pendant de longue période (jusqu'à plusieurs années) lorsqu'elles y sont exposées à de faible température (4 °C) (Erauso et al., 1993; González et al., 1996; Jannasch et al., 1992; Kobori et al., 2010; Thorgersen et al., 2012). Elles sont d'autant plus résistantes en conditions oligotrophes (Erauso et al., 1993; Marteinson et al., 1997) suggérant qu'elles sont plus sensibles à l'oxygène lorsqu'elles ne sont en phase active de croissance (González et al., 1996). Cette capacité peut être vue comme un mécanisme majeur de dispersion des hyperthermophiles anaérobiques des sources hydrothermales dans l'eau de mer. Des micro-organismes hyperthermophiles ont notamment été isolés de panaches hydrothermaux ou de piège à particules localisés à 1 km du site actif respectivement du Mont MacDonald (Pacifique) et de Lucky Strike (Atlantique) (Huber et al., 1990; Lesongeur et al., 2014).

Nos résultats expérimentaux viennent compléter les données déjà acquises (isolement d'hyperthermophile anaérobiques d'échantillons d'eau de mer et de tolérance à l'oxygène en culture pure) sur les capacités de résiliences des communautés hyperthermophiles anaérobiques. Les micro-organismes présents dans les sections polies de sulfures massifs sont plus résistants aux chocs oxygènes et à la diminution de température que ceux présents dans la fraction liquide. Les surfaces des sections polies sont représentatives de l'exposition de surface fraîche et réactive présentes au sein des particules minérales des panaches hydrothermaux qui pourraient ainsi être de possibles véhicules de dispersion de micro-organismes sur de longues distances (Dick et al., 2013; Lupton, 1996).

A.4. Conclusions

Plusieurs cultures en continu ont été réalisées dans les mêmes conditions de cultures (80 °C sous un balayage gazeux N₂/H₂/CO₂ (75:20:5)). L'utilisation de fluide hydrothermal non filtré utilisé pour la première fois comme inoculum et base minérale et un renouvellement plus lent (20 mL h⁻¹), a permis l'enrichissement de nombreux micro-organismes. Les communautés archéennes se développant au sein de chaque incubation sont significativement différentes les unes des autres malgré la présence de phylotypes communs.

En plus des micro-organismes habituellement détectés dans les échantillons bruts et enrichies dans des cultures en continu (*Thermococcales*, *Archaeoglobales*), des phylotypes jusqu'ici non détectés dans les inventaires moléculaires comme les NUG ont été enrichis. Malgré leur absence dans les inventaires moléculaires, ces derniers semblent être ubiquistes de ces environnements. Pour la première fois en culture en continu, des méthanogènes ont également été enrichis (incubation SNC_2017 et SNb_2018). Leurs enrichissements dans les incubations de Snake Pit pourraient résulter de condition plus réductrice

de ces environnements par rapport aux sites de Lucky Strike et de TAG. Inversement l'enrichissement des micro-aérophiles *Aeropyrum* sur Lucky Strike témoignerait de condition moins réductrice.

L'incubation de sections polies de sulfures massifs n'a pas permis de mettre en évidence d'enrichissement spécifique de certains phylotypes à leur surface. Il semblerait donc que ce soit plus un phénomène d'attachement opportuniste à une surface qui influence le développement des micro-organismes associés (puisque les communautés microbiennes étaient similaires entre les sections de différents sulfures). Cependant l'attachement aux surfaces minérales permet aux micro-organismes une protection contre les perturbations environnementales. Les surfaces des sections polies sont similaires à celles des particules des panaches hydrothermaux. Ce résultat renforce l'hypothèse d'une dispersion des micro-organismes hyperthermophiles au sein de la colonne d'eau à l'aide des particules des panaches. Le bioréacteur Gas-lift pour des cultures en continu est un outil qui permet d'accéder à une diversité microbienne jusqu'ici inconnue et de tester les variations des conditions physico-chimiques sur cette diversité.

Remerciements :

Les contributeurs remercient l'ensemble des membres des différentes campagnes océanographiques : les équipages, les équipes Nautille/Rov, les équipes scientifiques et plus particulièrement les chefs de missions. Les contributeurs remercient également Nicolas Gayet (LEP – Ifremer) pour les observations au microscope électronique à balayage, ainsi que Philippe Fernagu (LCG – Ifremer) pour la préparation et la découpe des sections polies.

Etude B. H₂-dependant formate production by (hyper)thermophilic *Thermococcales*

Les *Thermococcales* forment l'un des ordres d'archées les plus ubiquistes des écosystèmes hydrothermaux. Ils sont ainsi retrouvés dans une multitude d'environnements comme les sources hydrothermales côtières et profondes, les dépôts pétroliers ou encore les sédiments profonds (Schut et al., 2014). Ils sont aussi devenus un groupe modèle d'étude pour les hyperthermophiles du fait de la facilité pour les cultiver permettant d'obtenir des biomasses importantes (Leigh et al., 2011).

Les premiers travaux sur *Pyrococcus furiosus* à la fin des années 80 ont mis en évidence qu'ils sont strictement hétérotrophes anaérobiques en poussant sur des milieux riches en sucres et autres composés organiques complexes avec production de CO₂ et d'H₂ comme principaux produits métaboliques (Fiala & Stetter, 1986; Malik et al., 1989; Schäfer et al., 1994). L'accumulation d'H₂ inhibe la croissance de certaines *Thermococcales*. Cette inhibition peut être évitée soit en réalisant un balayage gazeux dans la culture pour éviter son accumulation, soit par ajout de S⁰. Cette addition de S⁰ lève l'inhibition de l'expression de certains gènes activant ainsi une voie métabolique permettant l'élimination du pouvoir réducteur par réduction des protons en H₂S (p. 96). En absence de S⁰, l'accumulation d'H₂ empêche le pool de ferrédoxine de se renouveler (l'oxydation des ferrédoxines étant couplée à la réduction des protons en H₂). Le pouvoir réducteur ne peut donc plus être évacué. Cependant, la tolérance vis-à-vis de l'H₂ ne semble pas être la même chez toutes les souches de *Thermococcales*, puisque certaines sont présentes dans des niches environnementales riches en H₂ et sans la présence de S⁰. De plus deux nouvelles souches de *Thermococcales* ont été isolées (Dalmaso et al., 2016), dont une à partir de nos cultures en bioréacteurs, sur milieu pour hydrogénotrophes en présence d'H₂ (80 % de la phase gazeuse) et en absence de S⁰. Certaines souches de *Thermococcales* pourraient ainsi posséder un mécanisme alternatif leur permettant d'éviter une inhibition par l'H₂. Deux scénarii sont possibles : un nouveau système d'évacuation des électrons qui permettrait de renouveler le pool de ferrédoxines en couplant l'oxydation de ferrédoxines réduites avec un autre accepteur terminal d'électrons (autre que les protons ou que le S⁰); ou un mécanisme pour éviter l'accumulation de l' H₂ produit et ainsi évacuer le surplus d'électrons.

Le travail présenté ici est consacré à l'étude de ce nouveau mécanisme sous la forme d'un article, suivi d'une présentation de résultats et de discussions supplémentaires pour compléter cette étude.

B.1. Abstract

Thermococcales are one of the most ubiquitous *Archaea* found in hydrothermal ecosystems colonizing a wide range of ecological niche such as deep-sea hydrothermal vent (Schut et al., 2014). They are described as obligate anaerobes and organotrophs utilizing primarily peptides or carbohydrates with H₂S/H₂, acetate and CO₂ as major end products. Some *Thermococcales* have a conserved Formate-

hydrogenlyase (FHL) complex encoding by the *fdh-mfh-mnh* cluster and can use formate as energy source (Kim et al., 2010). In pure culture conditions, Formate oxidation to H₂ and CO₂ (HCOO⁻ + H₂O => H₂ + HCO₃⁻) is coupled to ATP synthesis for *Thermococcus onnurineus* NA1 (Lim et al., 2014). However, it remains unclear whether this reaction could be performed *in situ* by *Thermococcales* in hydrothermal environment (Topçuoğlu et al., 2018).

Here we show H₂-dependent formate production by some hyperthermophilic *Thermococcales* prevents H₂-inhibition of catabolic metabolism and improves cell growth. This formate production is thermodynamically controlled by the H₂ partial pressure and is limited by the formate concentration. In presence of H₂, 27 % of *Thermococcales* tested (n= 45) produced *ca.* 1 to 10 mM formate. This metabolic trait is evenly distributed among *Thermococcales*. A comparative genomic analysis showed that in addition to the FHL-Mrp complex, another complex composed of a formate dehydrogenase associated with a putative oxidoreductase could catalyze this reaction. Hence H₂-dependent formate production could contribute to the wide distribution of *Thermococcales* and may play an important ecological role in deep marine ecosystems.

B.2. Introduction

Endogenous or environmental H₂ inhibit *Thermococcales* growth by blocking the regeneration of the ferredoxin pool and its electron discard (Schäfer & Schönheit, 1991). S⁰ reduce this inhibition as reducing equivalents are disposed either by reduction of S⁰ to H₂S or in its absence by proton reduction to H₂. In both case, an electrochemical sodium ion gradient is generated driving the synthesis of ATP by a Na⁺/ATP Synthase (Pisa et al., 2007). It was recently suggested that *Thermococcus paralvinellae* ES1^T owning *fdh-mnh-mrp* cluster, could dispose of the excess electrons through H₂ oxidation to formate (Topçuoğlu et al., 2018). Indeed, some formate dehydrogenase, are known to catalyze this reaction (Alissandratos et al., 2014; Schuchmann & Müller, 2013; Woods, 1936). Due to its slight Gibbs free energy change in standard conditions ($\Delta G^\circ = +1.3 \text{ kJ mol}^{-1}$), the direction of reaction is primarily controlled by concentrations of reagents until reaching the thermodynamic equilibrium. The purpose of this work is to characterize this reaction in *Thermococcales*.

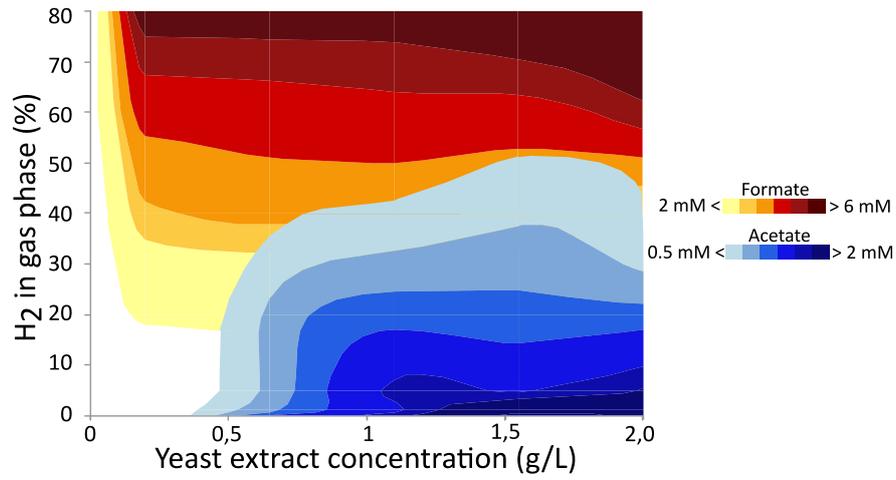
B.3. Results & Discussions

As *T. onnurineus* NA1 was previously described for formate oxidation, it was used as model for our study of H₂-dependent formate production. As H₂ production by *Thermococcales* is partially controlled by organic substrates availability, we tested the effect of various organic matter concentrations on H₂-dependent formate production. When H₂ was in excess, there is no correlation between organic matter

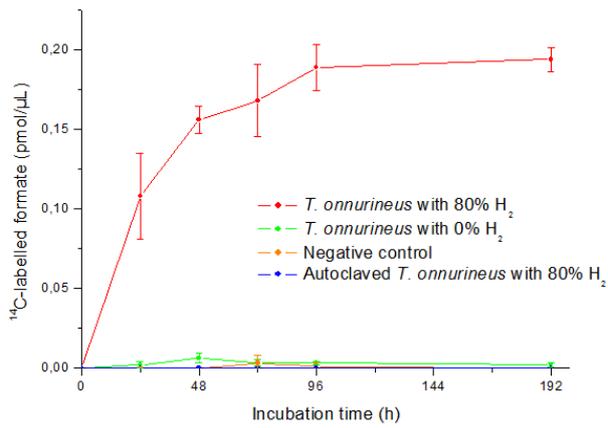
concentration and formate production (FIGURE 61A). This reaction only requires a minimum concentration of 0.02 g L⁻¹ of yeast extract to ensure cell viability. However, in absence of H₂ in the gas phase, formate production is directly correlated to the increase in yeast extract as H₂ concentrations also during fermentation. In order to confirm *T. onnurineus* NA1 could use bicarbonate and H₂ to produce formate, it was incubated with ¹⁴C-radiolabelled bicarbonate in presence of an 80 % H₂ headspace. *T. onnurineus* NA1 required H₂ to produce ¹⁴C-formate as the negative control incubated without H₂ did not produce any detectable ¹⁴C-formate (FIGURE 61B). We also examined the effect of substrates and products concentrations. Production of formate was positively and linearly correlated to the H₂ partial pressure and the concentration bicarbonate in the system (R²= 0.99) whereas it is negatively correlated to the concentration of formate (R²= -0.99) (FIGURE 61C&D). As for formate oxidation, increase of S⁰ concentration inhibits formate production (FIGURE 61E). In contrast, production of acetate used as proxy to estimate fermentation process was stimulated. S⁰ regulation of gene expression by the presence of a SurR binding site upstream of the first ORF start of the *fdh-mnh-mrp* cluster could probably explain inhibition of H₂-dependent formate in presence of S⁰ (Kozhevnikova et al., 2016; Lipscomb et al., 2009).

Figure 61 : Effects of different parameters on the production of formate in *T. onnurineus* NA1 at 80 °C. **a**, Influence of cross concentrations of yeast extract and H₂ (at 200 kPa) on production of formate (in yellow-red) and acetate (in bleu) after an incubation of 48 h. Incubation conditions: 30 mM HCO₃⁻, no S⁰. Darker colors represent higher concentrations. **b**, ¹⁴C-labelled formate production from ¹⁴C-labelled HCO₃⁻ (final activity of 96 kBq) with H₂/CO₂ or N₂/CO₂ headspace gas phase (80:20; v/v; 200 kPa). Negative control was not inoculated. Autoclaved control was autoclaved during 21 min at 120 °C after inoculation. Incubation conditions: 30 mM HCO₃⁻, no S⁰, 0.2 g L⁻¹ yeast extract. **c**, Influence of proportion of H₂ in headspace gas phase (at 200 kPa) (black diamond) and concentration of bicarbonate (red square) and after 48 h. Incubation conditions: no S⁰, 0.2 g L⁻¹ yeast extract. **d**, Influence of concentration of formate on its production after 192 h. Incubation conditions: 30 mM HCO₃⁻, no S⁰, 0.2 g L⁻¹ yeast extract, H₂/CO₂ in headspace gas (80:20; v/v; 200 kPa). **e**, Influence of concentration of S⁰ on production of formate (red circle) and acetate (blue triangle) after 384 h. Incubation conditions: 30 mM HCO₃⁻, 2 g L⁻¹ yeast extract, H₂/CO₂ in headspace gas (80:20; v/v; 200 kPa). Each culture was performed at 80 °C. Error bars in b, c, d and e are standard deviations (s.d.) of biological replicates (n = 3).

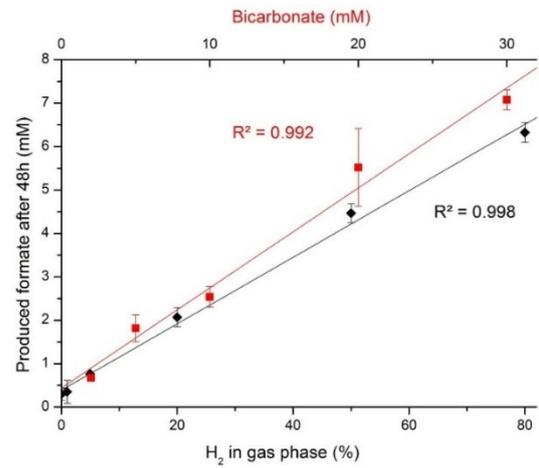
a



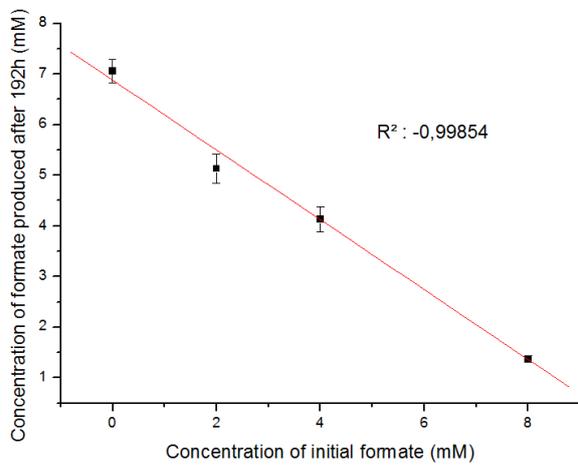
b



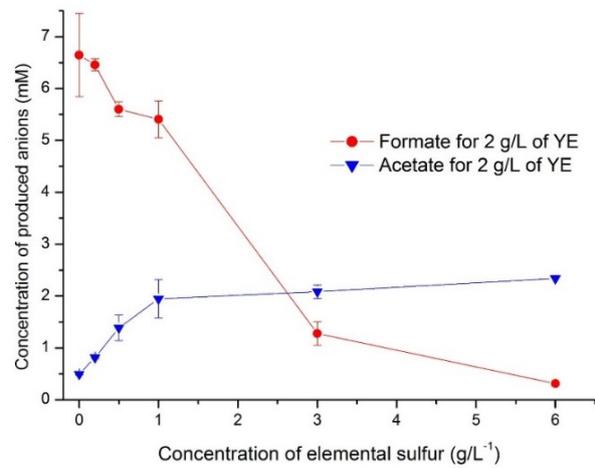
c



d



e



To gain functional insight into how formate production ameliorates H₂ inhibition in *Thermococcales*, we investigated the inhibition of cell growth by H₂ in absence of S⁰ in 45 strains of *Thermococcales*. Twelve of strains (27 %) presented significant growth and were always associated with production of formate whereas 33 did not show neither (73 %). Positive strains were evenly distributed across the *Thermococcales* order with no clear distribution pattern as we identified nine *Thermococcus*, two *Pyrococcus* and one *Palaeococcus* (FIGURE 62).

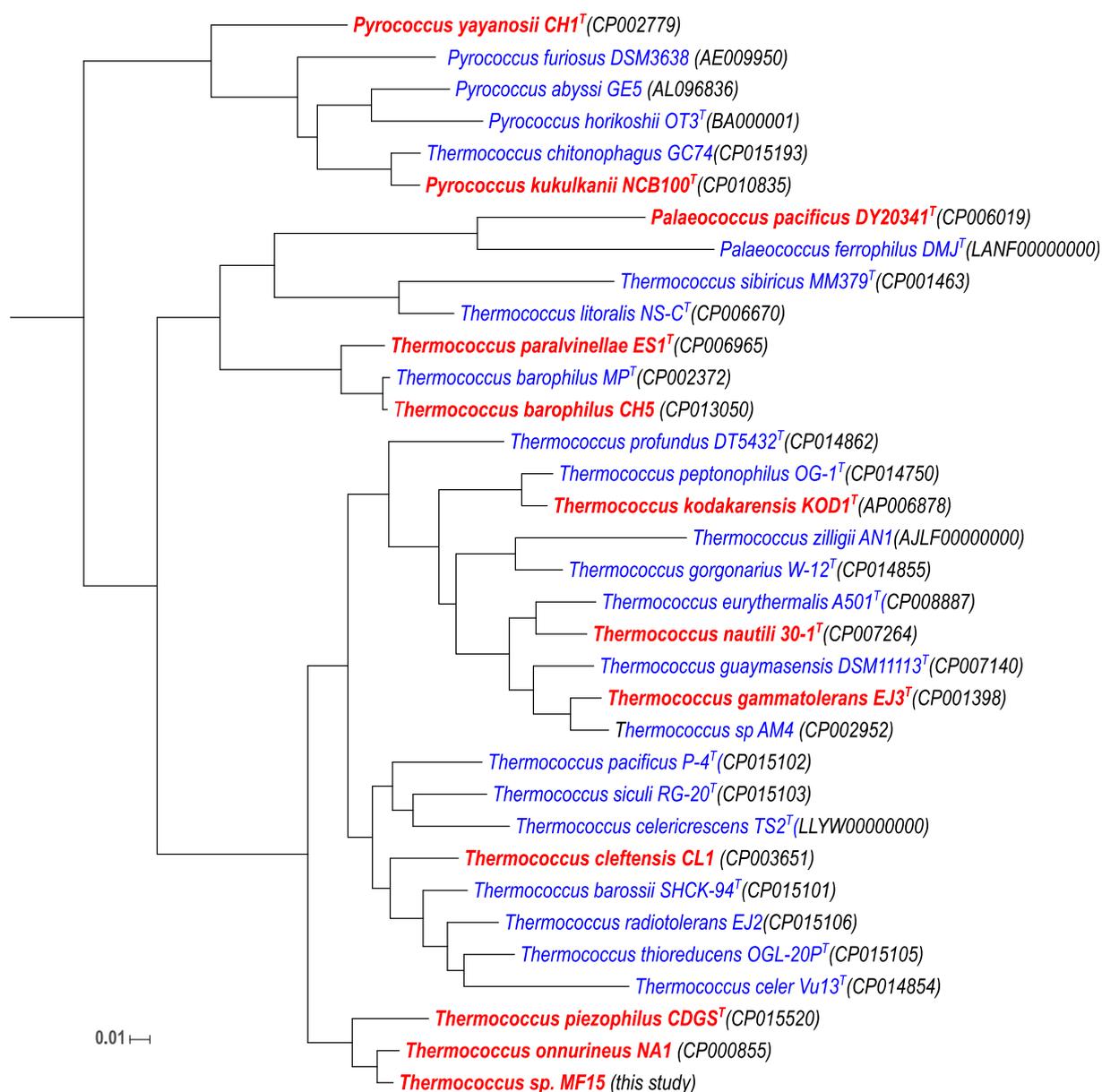


Figure 62: Phylogenetic position of *Thermococcales* making H₂-dependant formate production. *Thermococcales* showing H₂-dependant production of formate are marked in red. Others with no production of formate are indicated in blue. The phylogenetic tree was based on 59 archaeal marker genes. The topology shown was calculated with PhyML v3. Accession numbers are given in brackets. Bootstrap values (%) are based on 1000 replicates. Bar, 1 substitution per 100 nucleotides.

Concentration of formate produced after 72 h differed widely between positive strains ranging from 0.8 to 11.9 mM (FIGURE 63). To identify the metabolic pathway involved in the production of formate, we compared genomes of all positive strains to those of twenty-two negative strains. Surprisingly not all the positive strains had the *fdh-mfh-mnh* cluster in their genomes. However, all positive strains had conserved gene sequences coding for two Fdh and formate channel belonging to the family nitrite transporters (FNT) (FIGURE 63).

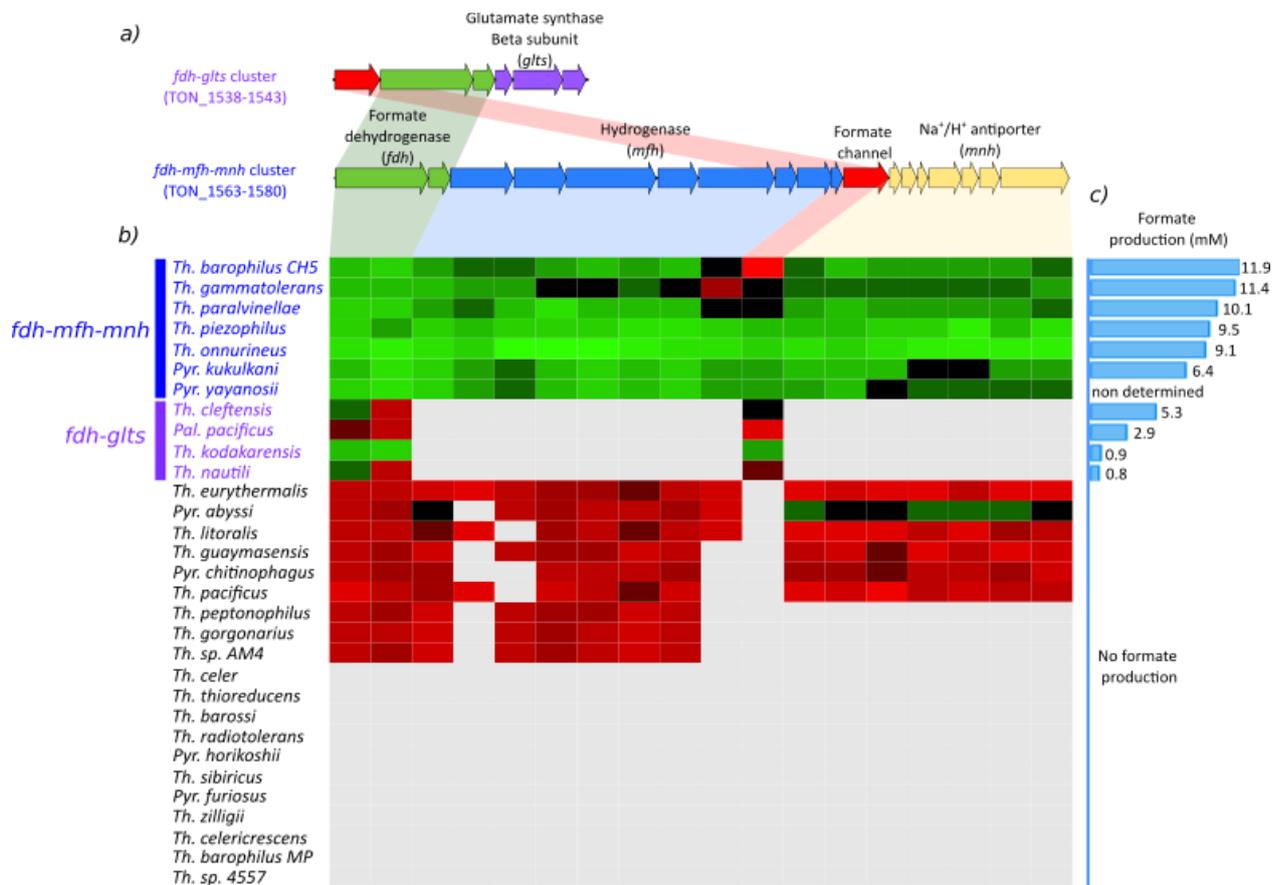


Figure 63 : *Thermococcales* formate producers present two different clusters that include a formate channel associated with a formate dehydrogenase. a, Structure of the two gene clusters involving in the H₂-dependant formate production in *Thermococcales*. Clusters of *T. onnurineus* NA1 *fdh-glts* (TON_1538-1543) and *fdh-mfh-mnh* (TON_1563-1580) serve as reference. b, Conservation of each protein encoding by *fdh-mfh-mnh* cluster in *Thermococcales* to those from cluster of *T. onnurineus* NA1 (TON_1563-80). Comparison is made on blastp score between amino acids sequence of *T. onnurineus* NA1 and the respective amino acid sequence. The map presents sequence similarity of the respective protein (% identity, starting at 20 % (low similarity, colored red), 60 % (medium similarity, colored black) to 100 % (high similarity, colored green). Gray squares indicate that no proteins were found in the corresponding genome. Strains with *fdh-mfh-mnh* cluster in their genomes are indicated in blue and with *fdh-glts* cluster in purple. Strains with neither in black. c, Formate production by some *Thermococcales* after 96 h of incubation. Incubation conditions: 30 mM HCO₃⁻, no S⁰, 0.2 g L⁻¹ yeast extract, H₂/CO₂ in headspace gas (80:20; v/v; 200 kPa). *Thermococcus* and *Palaeococcus* were cultivated at 80 °C and *Pyrococcus* at 95 °C. *Pyrococcus yayanossii* Ch1^T an obligate piezophilic was not tested.

Although functional mechanism of members of FNTs still unclear, there are more and more evidence that they function as specific bidirectional formate channel (Falke et al., 2010; Suppmann & Sawers, 1994; Y. Wang et al., 2009). Formate dehydrogenase always associated with this formate channel, are well-conserved within the *Thermococcales* orders and form a tight cluster.

Genomic analysis also revealed that the eight most productive strains shared conserved gene sequences of the FHL operon. Interestingly, four strains only had a tripartite gene cluster composed of the formate channel, a formate dehydrogenase and a putative sub-unit B of a glutamate synthase (GltB) (FIGURE 63). *T. onnurineus* NA1 had also a *fdh-glts* cluster (TON_0538-0544) in addition to its *fdh-mfh-mnh* cluster. However, physiological function of the glutamate synthase remains unknown. Amino acid sequence of *T. onnurineus* NA1 GltB (TON_542) showed homologies (~25 %) to GltA of *P. horikoshii* (PH0876 and PH1873) and *T. kodakarensis* KOD1^T (TK_1325) which showed NADPH-dependent oxidoreductase activities (Dincturk et al., 2011; Jongsareejit et al., 1997). Proteome analysis of *T. onnurineus* NA1 revealed up-expression of this cluster during CO culture but not in formate or starch conditions (Moon et al., 2012; Yun et al., 2011). Transcriptomic analysis showed that formate channel associated with the *fdh-mfh-mnh* cluster (TON_1573) was strongly upregulated in presence of formate while that of *fdh-glts* cluster (TON_538) was slightly downregulated (Kim et al., 2010). A *frhA* deletion in *T. onnurineus* NA1, induced an over-expression of the cluster (up to 64 fold for *fdh*) on formate yet without significant effect on the cell growth (Lee et al., 2017). These four strains (*T. cleftensis* CL1^T, *T. nautili* 30-1^T, *T. kodakarensis* KOD1^T and *Palaeococcus pacificus* DY20341^T) did not possess other Fdh associated with a formate channel in their genomes. In *T. kodakarensis* KOD1^T cultivated on medium rich in organic matter, deletion of the catalytic subunit of the Fdh (TK_2076) leads to no production of formate contrary to the wild type (Nohara et al., 2014). Moreover, we observed that *P. pacificus* DY20341^T is able to produce formate in presence of H₂ and then to consume it when H₂ is remove from the headspace suggesting the bi-functionality of the enzyme (FIGURE 64). In *T. onnurineus* NA1, expression of the cluster *fdh-glts* is always correlated with that of cluster *sulfl* (TON_0539-0542) encoding a NADPH-dependant cytosolic hydrogenase (Lee et al., 2017; Moon et al., 2012; Yun et al., 2011). These two complexes might act together in production of formate from HCO₃⁻ and H₂ with implication of NADPH in electron transfer. Deletion of Sulfl in *T. kodakarensis* KOD1^T led to reduced growth and increased of H₂ accumulation in absence of S⁰ (Santangelo et al., 2011). These results suggest that this cluster is not involve in formate driven growth. At least for these four strains with *fdh-glts* cluster, H₂ dependant formate production function is to dispose H₂ (either endogenous from CO or OM oxidation either external) and maintaining the cellular redox balance in absence of S⁰. Therefore, how it functions have to be elucidate.

As in [FIGURE 64](#), depending on the substrate/product ratio, the formate dehydrogenase of *Thermococcales* can either catalyze formate production or oxidation. When associated with a Mbh-Mrp-type modular system into a specific cluster, *Thermococcales* can obtain energy from formate oxidation in the laboratory setting ([Lim et al., 2012](#)). In this condition with high formate concentration (147 μM), no H_2 and low bicarbonate (12 mM) concentration, the difference of concentration is sufficiently important to generate energy. However, it seems unclear whether cells can gain enough energy from formate oxidation to sustain growth at concentration close to the *in situ* one as suggested in some studies ([Kozhevnikova et al., 2016](#); [Lim et al., 2012](#); [Topçuoğlu et al., 2018](#)). While formate is present at very low concentration ($< \mu\text{M}$) in deep-sea hydrothermal vent environment ([Lang et al., 2010](#)), H_2 and CO_2 concentrations can exceed millimolar levels ([Charlou et al., 2002](#)).

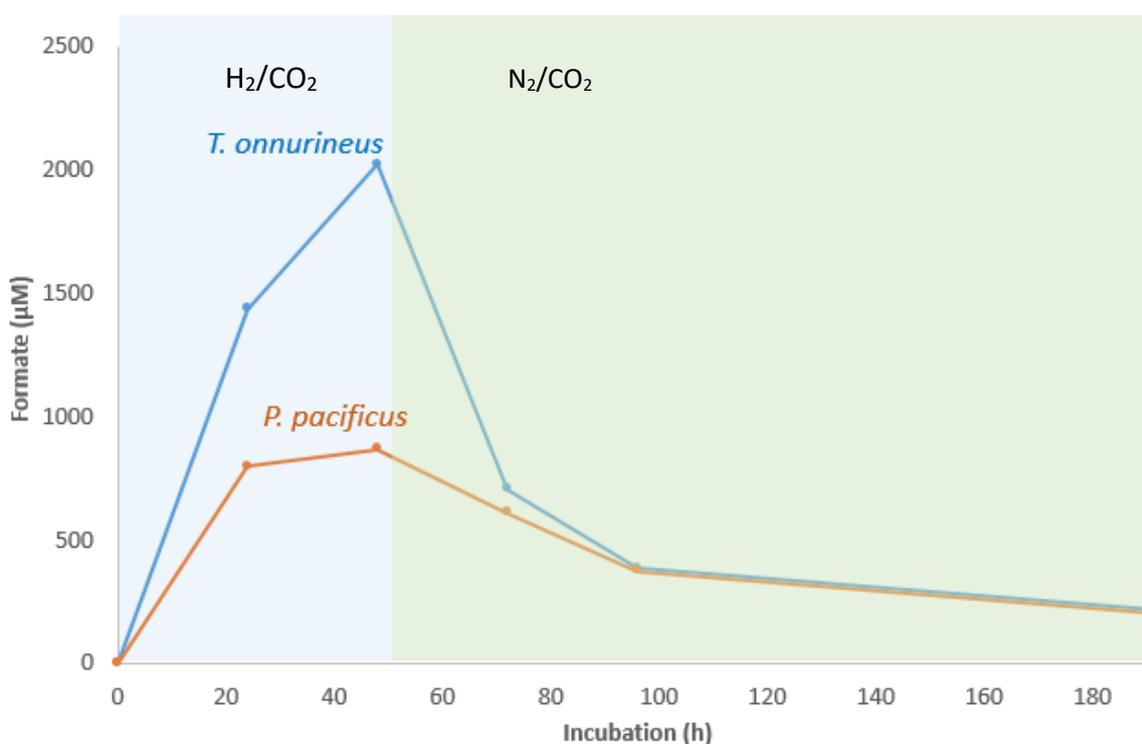


Figure 64 : Effect hydrogen partial pressures on formate concentration in *Thermococcus onnurineus* NA1 and *Palaeococcus pacificus* DY20341^T. Formate concentration in *T. onnurineus* NA1 culture is indicated in blue and in *P. pacificus* DY20341^T culture in orange (n=1). After 48 h, H_2/CO_2 headspace gas phase (blue shade; 80:20; v/v; 200 kPa) was replaced by N_2/CO_2 (green shade; 80:20; v/v; 200 kPa) after 48 h. Incubation conditions: 2 mM HCO_3^- , no S^0 , 0.2 g L^{-1} yeast extract and 80 °C.

Clearly in basalt and mostly of ultramafic-hosted hydrothermal vent, formate oxidation is not thermodynamically favorable. The Lost City Hydrothermal Field is often mentioned to be a suitable environment to allow formate driven growth ([Kozhevnikova et al., 2016](#); [Lim et al., 2012](#)). Theoretically, reaction could occur despite the elevated H_2 concentration (up to 12.3 mM) by dint of elevated

concentration of formate (up to 158 $\mu\text{mol kg}^{-1}$) and the removal of bicarbonate in fluid (Lang et al., 2010). Nevertheless, other environmental conditions are very harsh for growth. At the exception of three 16S rRNA gene sequences related to *Thermococcales* detected in clone library from Lost city fluids samples (Brazelton et al., 2006), they are not retrieve in mostly of studies (Lang et al., 2018; Roussel et al., 2011; Schrenk et al., 2013). Furthermore, they must have ability to use formate as could only one quarter of *Thermococcales* and none sequence of *Thermococcales* FdhA have been find in the metagenomics data (Lang et al., 2018). In addition of the thermodynamic condition, others parameters have to be taken in consideration. *Thermococcales* needs organic carbon available for anabolism. Direct assimilation of formate or bicarbonate for biosynthesis of cell mass has never be demonstrated in *Thermococcales* despite some suspicion from proteome analysis in *T. onnurineus* NA1 (Moon et al., 2012). Altogether, these elements do not call for making oxidation formate a prevalent energy source in natural ecosystem for *Thermococcales* as previously suggested by Topçuoğlu et al. (Topçuoğlu et al., 2018). We suggest that the main function of these clusters in *Thermococcales* is to catalyze the CO_2 reduction in order to reduce intracellular H_2 partial pressure. First, there is more thermodynamically favorable environment for H_2 dependent formate production than for formate oxidation. We investigated production of formate in *T. onnurineus* NA1 inoculated in a sterile hydrothermal fluid (filtered at 22 μm before incubation) sampled from Snake Pit hydrothermal field. Concentration of dissolved H_2 was adjusted at 0.12 mM corresponding to the minimal H_2 concentration in end member fluid from this site (Charlou et al., 2002). Formate production was detected in sterile fluid demonstrating that for *in situ* concentrations of reactant reaction occurs (FIGURE 65).

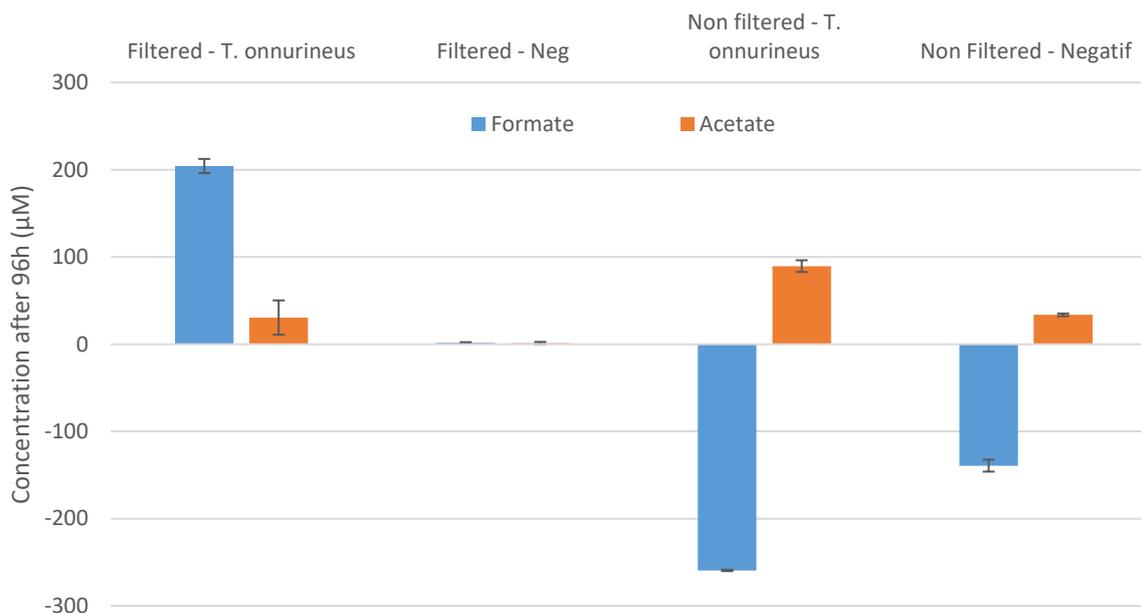


Figure 65 : Concentrations of formate and acetate in hydrothermal fluid inoculated with *T. onnurineus* NA1. Fluid was sampled in Snake Pit hydrothermal vent field and was filtered through a 0.22 μm filter prior repartition in anaerobic serum bottle. *T. onnurineus* NA1 was inoculated at 1 % from exponential phase culture. Incubation conditions: N₂/H₂ headspace gas phase (90:10; v/v; 200 kPa) , 80 °C. Concentrations of acetate are indicated in orange and formate in blue and were mesured after 96 h of incubation. Error bars are standard deviations (s.d.) of biological replicates (n = 3).

For non-filtered hydrothermal fluid, organic matter was probably mainly oxidized by *T. onnurineus* NA1 as acetate production was measured. However, no formate accumulation was measured production as a probable consequence of its rapid turnover. This could be explain by a syntrophic relation with hydrogenotrophs such as methanogens which could decrease H₂ partial pressure, and/or consumption of formate by other microorganisms (Topçuoğlu et al., 2016). Reducing H₂ inhibition presents more advantage to the cell than the putative limited energy harnessed from formate oxidation. In presence of S⁰, H₂ inhibition is limited since electron are disposed by S⁰ reduction. This could explain why in presence of S⁰, transcription of cluster is inhibited as there is no benefit to produce formate. We compared the effect of different H₂ concentrations on growth of two different *T. barophilus* species strains MP and CH5 (FIGURE 66). Although, these two strains are phylogenetically close, *T. barophilus* Ch5 has 310 ORF more than *T. barophilus* MP^T including the *fdh-mfh-mnh* cluster (Oger et al., 2016). Hence, *T. barophilus* ChH5 can reduce its intracellular H₂ partial pressure through H₂ dependent formate production Hence, increasing H₂ partial pressures lead quickly to the total growth inhibition for MP whilst for *T. barophilus* Ch5, growth is far less affected by H₂ as it has only been halved for elevated concentration (FIGURE 66).

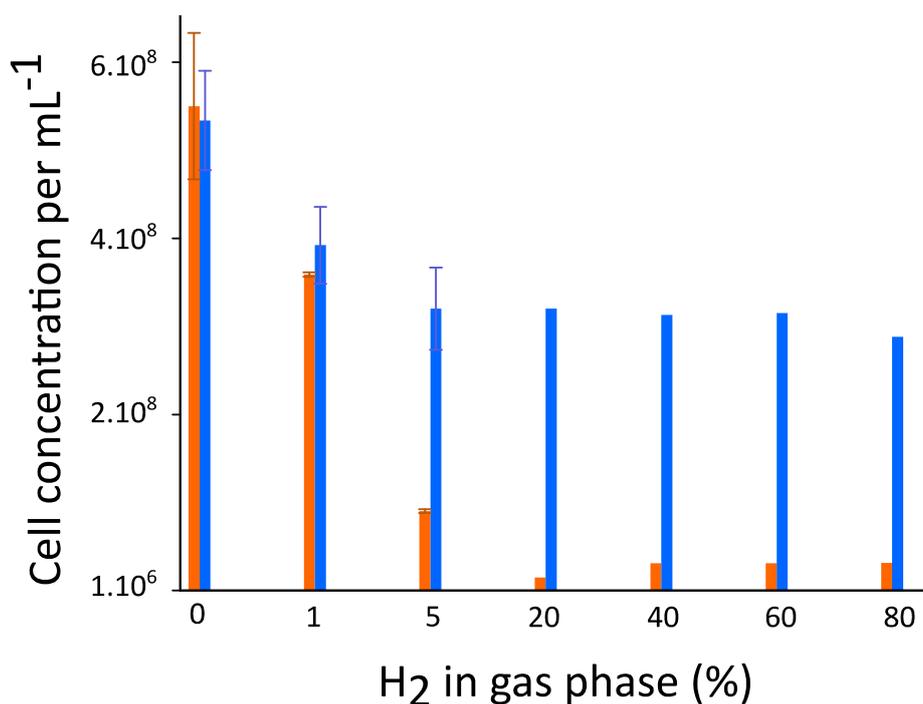


Figure 66 : Effects of H₂ on growth of two strains of *Thermococcus barophilus* (MP^T and Ch5) after 24 h. Incubation conditions: 30 mM HCO₃⁻, no S⁰, 2 g L⁻¹ yeast extract. Error bars are standard deviations (s.d.) of biological replicates (n = 3).

B.4. Conclusions

Our study shows how H₂-dependent formate production could give *Thermococcales* a selective advantage in a broad range of environments with limited S⁰ availability or/and high H₂ concentrations (e.g. ultramafic systems...). In absence of S⁰, it reduces H₂ partial pressure and yet prevents inhibition of organic matter fermentation processes. Two gene clusters encoding a formate dehydrogenase associated with a formate channel are involved in this reaction. We showed by cultural and genomics approaches that mechanism is widespread within the *Thermococcales* order. However, it remains unknown if CO₂ reduction is coupled to synthesis of ATP. In any case, exploration of the phylogenetic history of these clusters could bring some answers on the purpose of these clusters. Future experiments with genetic studies including mutagenesis will clarify how exactly these clusters function and how it is involved within H₂ metabolism. Given the ubiquity of *Thermococcales* in hydrothermal ecosystems and even in sub-sea-floor (ex. (Roussel et al., 2008)), H₂ dependant formate production could play a role in the distribution of microbial communities and has to be integrated into biogeo-chemicals models of these ecosystems.

B.5. Résultats & discussions complémentaires

B.5.1 Création de mutants

A ce jour, il manque encore une démonstration expérimentale qui validera l'hypothèse que les deux opérons sont responsables de la production H₂-dépendante de formate chez les *Thermococcales*. C'est la raison pour laquelle, une collaboration avec le Dr. Dulermo (LM2E, IFREMER) a été initiée afin de les valider par mutagenèse. La stratégie est de compléter la souche modèle de notre laboratoire *T. barophilus* MP^T qui ne présente pas de production de formate avec un des opérons. Pour cela le plasmide réplcatif utilisé est pRD150. Le promoteur fort choisi est celui d'un des gènes les plus transcrit, celui du gène TERMP_00604 codant pour le facteur d'élongation 1 α . Les différentes combinaisons testées sont :

- transporteur de formate (TON_1573) : L'un des éléments absolument nécessaires pour la production de formate est la présence d'un canal de formate pour éviter l'accumulation du produit dans la cellule. Cependant la recherche de formate déshydrogénase dans le génome de *T. barophilus* MP^T n'a rien donné. L'absence de production de formate pour ce mutant n'est pas une surprise.

- formate dehydrogénase (TON_1563/1564) : La formate déshydrogénase est le deuxième élément important dans la production de formate. Cependant aucun canal de formate n'a été identifié dans le génome de *T. barophilus* MP^T. L'absence de production de formate pour ce mutant n'est pas surprenant non plus.

- transporteur de formate + formate dehydrogénase (TON_1563/1564/1573) : La combinaison de ces deux éléments aurait pu permettre une production de formate. Cependant il n'y a pas eu de production de formate pour les quelques mutants obtenus. Cette absence de production peut s'expliquer par la nécessité d'avoir un autre complexe pour fournir les électrons comme l'hydrogénase ou la glutamate synthase.

- opéron entier (TON_1563-1580) : aucun transformant positif n'a été obtenu. Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer ces échecs peut être que le fragment est trop long et qu'il y a un problème de stabilité du plasmide. Le choix de placer l'opéron sous un promoteur fort n'est peut-être pas adéquat.

Pour la suite à envisager, différentes combinaisons sont à tester comme avec uniquement une partie de l'opéron (TON_1562-1573) qui pourrait être suffisante pour obtenir une production de formate, le module antiport Na⁺/H⁺ ne semble théoriquement pas essentiel. L'option du deuxième cluster (transporteur de formate – FDH – oxydoréductase) est également une possibilité.

B.5.2 Cinétiques de production de formate

Plusieurs cinétiques de production de formate ($T= 0, 24, 48, 72, 96$ et 192 h) sous différentes pressions partielles en H_2 (0, 1, 5, 20, 50 et 80 % d' H_2 dans la phase gaz à 1,5 bar) ont été réalisées pour plusieurs espèces productrices de formate (*T. gammatolerans* EJ3^T, *T. piezophilus* CDGS^T, *T. onnurineus* NA1 et *T. sp.* MF15). Des cinétiques de production (à $T= 0, 24, 48$ et 192 h) ont également été réalisées pour 3 espèces non productrices de formate (*T. hydrothermalis* AL662^T, *T. marinus* EJ1 et *T. barophilus* MP^T) sous deux atmosphères gazeuses (0 et 80 % d' H_2 dans la phase gaz à 1,5 bar). Un témoin négatif (non inoculé) a été réalisé dans les mêmes conditions pour exclure toute production abiotique de formate. La production d'acétate a également été mesurée comme *proxy* pour suivre les processus de fermentation de la matière organique. Les profils de productions de formate sont similaires pour les espèces productrices de formate avec une phase exponentielle de production pendant 48 h, puis une diminution de la production jusqu'à atteindre un plateau (FIGURE 67). La production est positivement et linéairement corrélée à la teneur d' H_2 de la phase gazeuse. Il n'y a pas de production de formate pour les trois espèces non productrices ni pour le témoin négatif.

Concernant les processus de fermentations ils sont négativement impactés par la pression partielle d' H_2 pour l'ensemble des souches.

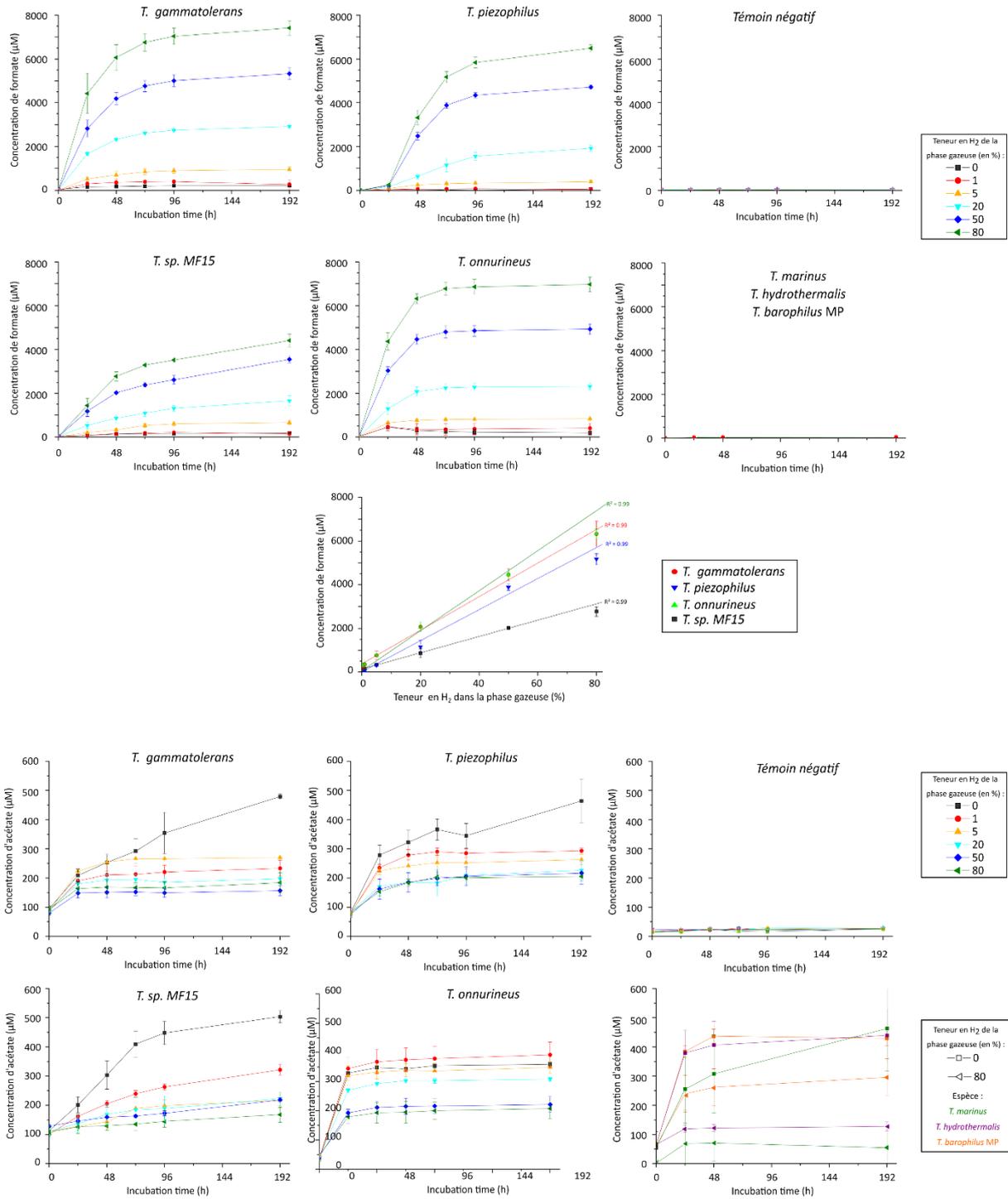


Figure 67 : Cinétiques de production de formate (en haut) et d'acétate (en bas) chez plusieurs souches de *Thermococcus* cultivées avec différentes concentrations en H₂. Les prélèvements ont été faits à 6 temps différents (T=0, 24, 48, 72, 96 et 192 h) pour les espèces « formate positif » de *Thermococcus* (*T. gammatolerans* EJ3^T, *T. sp. MF15*, *T. piezophilus* CDGS^T, *T. onnurineus* NA1) ; et à 4 temps (T=0, 24, 48 et 192 h) les espèces « formate négatif » sont *T. marinus* EJ1, *T. hydrothermalis* AL662^T et *T. barophilus* MP^T.

B.5.3 Effet de la pression hydrostatique sur la production de formate

L'effet de la pression hydrostatique sur la physiologie et le métabolisme a été étudié chez plusieurs espèces de *Thermococcales* dont *T. barophilus* MP^T, *T. kodakarensis* KOD1^T, *T. piezophilus* CDGS^T, *P. furiosus* ou bien encore *P. yayanossii* Ch1^T (Birien, 2018; Cario, 2013; Dalmasso, 2016; Michoud, 2014; Vannier, 2012). La réponse des différentes espèces de *Thermococcales* dépend principalement de leurs pressions optimales de croissance. En effet certaines sont sensibles aux hautes pressions (*T. kodakarensis* KOD1^T, *P. furiosus*), piézophiles (*T. piezophilus* CDGS^T) ou encore piézophiles strictes (*P. yayanossii* Ch1^T). Ces études ont montré que les variations de pression hydrostatique induisent des changements à aux niveaux transcriptionnel, traductionnel et physiologique. La variation de la pression hydrostatique impacte directement les fonctions liées à la mobilité, aux échanges (fluidité de la membrane, transporteur, ...), à la maintenance génique et au métabolisme. *T. piezophilus* CDGS^T a été choisie pour tester l'effet de la pression hydrostatique sur la production de formate. En effet cette espèce piézophile (optimum de croissance de 50 MPa) est productrice de formate et est proche phylogénétiquement de *T. onnurineus* NA1.

Au moment de cette étude, nous ne disposons pas encore de matériel opérationnel permettant de réaliser des cultures à hautes pressions avec une atmosphère gazeuse. Des essais avec des seringues gas-tight ont été tentés mais n'ont pas été concluants. Les seringues gas-tight classiques ne sont pas étanches à l'H₂. Cependant des cultures en fioles pénicillines sans phase gazeuse avec du milieu préalablement saturé en H₂ ont été réalisées. Le milieu de culture était composé d'eau de mer synthétique, avec 0,2 g L⁻¹ d'extrait de levure, 30 mM de bicarbonate et sans ajout de S⁰. A pression atmosphérique dans les mêmes conditions de culture en fiole et sans phase gazeuse, la production de formate est de 480 μM (±163 μM), correspondant à la valeur attendue par rapport à la quantité d'H₂ dissous (équivalent à 5 % d'H₂ en phase gaz à 200 kPa) (FIGURE 68). Pour des pressions hydrostatiques plus importantes (30, 50 et 60 MPa), la production de formate est doublée (956, 941 et 942 μM respectivement) (FIGURE 68). La concentration cellulaire est quant à elle dans le même ordre de grandeur (entre 3 et 5 10⁷ cellules/mL) pour les quatre conditions.

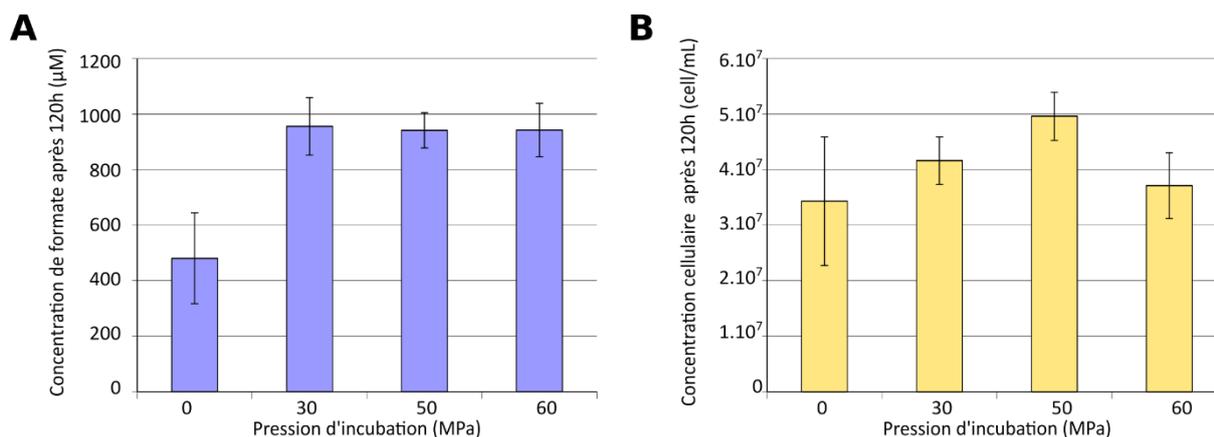


Figure 68 : Effet de la pression hydrostatique après 120 h d'incubation sur la production de formate (A) et sur la concentration cellulaire (B) chez *T. piezophilus* CDGS^T. Conditions de cultures : 0,2 g L⁻¹ d'extrait de levures, 30 mM de bicarbonate, sans S⁰ (n=3).

L'augmentation de la pression hydrostatique pourrait avoir plusieurs effets qui peuvent impacter directement ou indirectement la production de formate :

- Une augmentation de la dissolution de l'H₂ et du CO₂. Il a été montré chez *E. coli* que l'augmentation de la pression partielle d'H₂ et de CO₂ (jusqu'à 10 bars) a pour effet d'augmenter considérablement le rendement de la réaction (Roger et al., 2018). L'augmentation de la concentration en substrats favorise la réaction en la rendant plus exergonique.
- Variation de l'expression de certains opérons. Chez *T. piezophilus* CDGS^T, l'opéron *mrp-mbh-fdh2* est surexprimé à pression atmosphérique par rapport à 50 MPa alors que certains gènes de l'opéron *fdh-gltS* sont eux sous-exprimés (Moalic et al., in press). Il est difficile d'en tirer des conclusions puisque les études ne sont pas réalisées avec les mêmes conditions de culture (milieux différents, absence de S⁰, peu de matière organique avec 0,2 g L⁻¹ d'extrait de levure) et que la cellule possède les deux complexes responsables de la production de formate et qu'ils pourraient répondre différemment aux variations de pressions hydrostatiques. Pour déterminer leur réponse respective il faudrait soit inactiver séparément les deux clusters et comparer la production à la souche sauvage soit compléter *T. barophilus* MP^T avec l'un et/ou l'autre. Chez *P. yayanossii* Ch1^T, les gènes codant pour la formate déshydrogénase et la formate hydrogénylase de l'opéron *fdh-mnh-mrp* sont sous exprimés en condition sub-optimal (20 MPa) et supra-optimal (80 MPa) par rapport en condition de pression optimale (50 MPa) (Michoud & Jebbar, 2016). De plus l'expression des gènes codant les autres complexes impliqués dans le métabolisme de l'H₂ (Mbh, SHI/SHII, Mbx) est également impactée et pourrait influencer la production de formate.

B.5.4 Effet de la température

L'effet de la température sur la production hydrogène-dépendante de formate a été étudiée chez *T. onnurineus* NA1 (condition de culture : H₂/CO₂ (80:20; v/v; 200 kPa) ; 30 mM de bicarbonate ; 0,2 g L⁻¹ d'extrait de levure ; pas de S⁰) (FIGURE 69). La comparaison de l'effet de la température sur la production de formate et sur le taux de croissance (données des taux de croissance ont été extraites de (Bae et al., 2006)) révèle une similarité dans le profil des courbes avec cependant un décalage de 5 °C entre les deux courbes. La température optimale de production de formate est de 85 °C avec une production en 24 h de 6,4 mM de formate pour une température optimale de croissance de 80 °C. Alors que *T. onnurineus* NA1 ne présente pas de croissance pour des températures de 60 et de 95 °C, la production de formate reste importante de l'ordre de 4,3 et de 4,8 mM respectivement. Ce résultat concorde avec ceux obtenus avec *P. furiosus* complétement du complexe FHL de *T. onnurineus* NA1 qui présentait une oxydation du formate à 95 °C (Lipscomb et al., 2014). Il serait également intéressant de réaliser un gradient avec deux espèces qui présentent la différence de températures optimales de croissances la plus importante à savoir *T. piezophilus* CDGS^T (75 °C) et *P. kulkkanii* NCB100^T (105 °C). Cette comparaison entre les trois espèces permettra de déterminer si la production est corrélée à leurs conditions optimales de croissance.

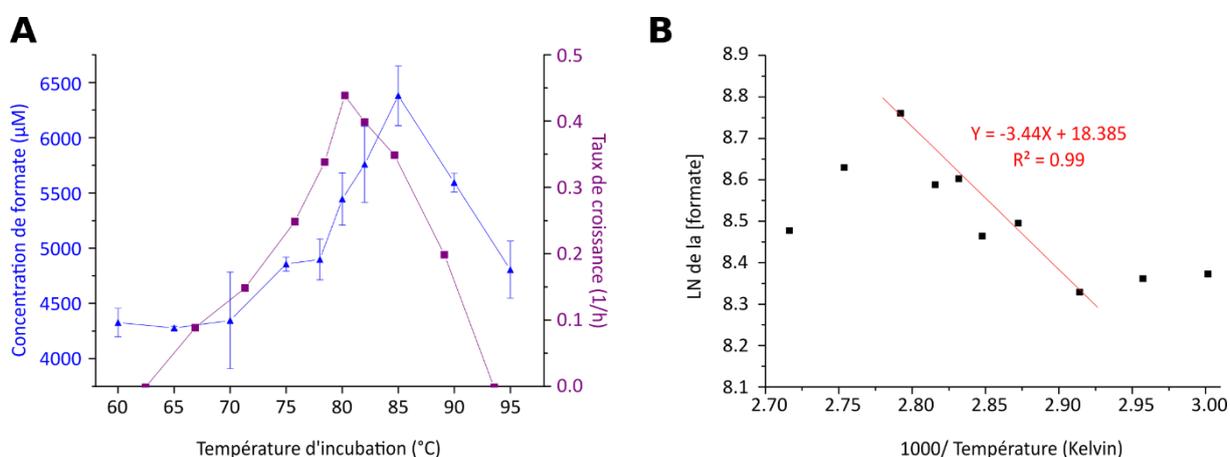


Figure 69 : Effet de la température sur la production de formate. A : Production de formate et taux de croissance de *T. onnurineus* NA1 en fonction de différentes températures d'incubations (en °C). B : Graphique d'Arrhenius (log de la concentration de formate en fonction de l'inverse de la température (1000 K⁻¹)).

Il est possible de calculer l'énergie d'activation (Ea) en utilisant le profil de point d'Arrhenius (d'après l'équation $\ln(k) = \ln(A) + ((-Ea/R)*(1/T))$). L'énergie d'activation de la réaction de production hydrogène-dépendante de formate est de -28,6 kJ mol⁻¹ chez *T. onnurineus* NA1. Le Q₁₀ de la réaction entre 80 et 90 °C est de 1,3 démontrant la simplicité de la réaction et sa faible dépendance de la réaction à la

variation de la température. Cet élément vient renforcer l'idée que la température a un très faible effet sur la thermodynamique de la réaction (Schink et al., 2017). Une augmentation de 10 °C change le ΔG° de $-0,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Lim et al., 2012) ce qui est négligeable. Un des arguments en faveur d'un scénario de croissance sur formate à haute température est que la réaction devient exergonique dès 42 °C. En condition standard il est de ΔG° (à 25 °C) = $+1,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ et pour 80 °C il est de ΔG° (à 80 °C) = $-2,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Kim et al., 2010). Au regard de la faible valeur des ΔG° , le principal facteur qui contrôle la direction de la réaction est le quotient de réaction avec 1 comme nombre stœchiométrique des trois espèces chimiques.

Pour compléter l'expérience, il faudrait augmenter l'amplitude du gradient testé pour déterminer les limites de températures d'activités de production de formate. Le maintien d'une production pour des températures non favorables à la croissance de la cellule est à prendre en considération dans la remise en contexte environnemental. Deux hypothèses sont possibles : soit la réaction se réalise en grande partie indépendamment du reste du métabolisme de la cellule (il s'agit juste d'atteindre l'équilibre thermodynamique de la réaction) soit bien que peu probable, la production a un rôle dans la résistance au stress thermique (production d'énergie, maintien du redox, ...). Pour tester la première hypothèse, il faudrait compléter avec l'opéron *fdh-mnh-mrp* de *T. onnurineus* NA1 une souche présentant une température optimale de croissance différente de *T. onnurineus* NA1 (80 °C) comme *P. furiosus* (100 °C) et appliquer le même gradient de température que précédemment. Pour tester la deuxième hypothèse, il faudrait comparer le taux de croissance d'une souche qui possède/ne possède pas l'opéron avec celui de son mutant sans/avec le complexe FHL pour différentes températures de culture en fiole et en bioréacteur sous flux de N_2 pour éviter l'inhibition par l' H_2 .

B.5.5 Production de formate en présence de CO

Certaines *Thermococcus* utilisent l'oxydation du CO avec production d' H_2 comme source d'énergie ($\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$, $\Delta G^\circ = -20 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Amend & Shock, 2001; Sokolova et al., 2004). La capacité d'utiliser le CO est liée à la présence d'un cluster de gènes spécifiques : *codh-mch-mnh* (Kim et al., 2013) ou *codh-glt* (6 gènes) (FIGURE 35) présents chez plusieurs espèces : *T. barophilus* MP^T, *T. barophilus* Ch5, *T. sp.* AM4, *T. onnurineus* NA1, *T. parvalvinellae* ES1^T, *T. guaymasensis* TYS^T, *T. gammatolerans* EJ3^T, *T. profundus* DT5432^T, *T. radiotolerans* EJ2, *T. siculi* RG-20^T et *T. barossii* SHCK-94^T.

T. onnurineus NA1, qui possède cet opéron, a été cultivée avec un mélange gazeux CO/N_2 (50:50; v/v; 200 kPa), $0,2 \text{ g L}^{-1}$ d'extrait de levure et sans S^0 pendant 112 h. La culture présentait une biomasse importante ($1,5 \cdot 10^8$ cellules/ml) associée à une production de formate de 5,1 mM. La fonction

physiologique de la production hydrogène-dépendante de formate pourrait être de diminuer l'inhibition de l'H₂ sur le catabolisme lors de la croissance sur CO. Il avait déjà été suggéré chez *T. onnurineus* NA1 que la formate dehydrogénase codée par le cluster *fdh-glt* soit impliquée dans la production de formate en utilisant le CO₂ et l'H₂ générés par l'oxydation du CO (Lee et al., 2017). Les clusters *fdh-mnh* et *fdh-glt* sont surexprimés chez *T. onnurineus* NA1 en présence de CO (Kim et al., 2013; Yun et al., 2011). Il a été montré que la délétion du gène *mfh2* du cluster *fdh-mnh-mrp* (TON_1569) entraîne une baisse de la biomasse et de la production d'H₂ sous CO par rapport à la souche sauvage (Kim et al., 2013). De plus chez *T. barophilus* Ch5 qui possède les deux clusters *codh-mch-mrp* et *fdh-mnh-mrp*, la présence de formate (30 mM) limite fortement l'oxydation de CO et la production de biomasse (Kozhevnikova et al., 2016). Quatre *Thermococcales* possèdent la capacité d'oxyder le CO et de réaliser la réaction reverse d'oxydation du formate à savoir *T. gammatolerans* EJ3^T, *T. barophilus* Ch5, *T. onnurineus* NA1 et *T. paralvinellae* ES1^T.

B.5.6 Transporteur ou canal de formate ?

La présence d'un transporteur de formate est une des conditions essentielles pour la production de formate. Plusieurs espèces de *Thermococcales* possèdent l'opéron sans le transporteur de formate et ne sont pas productrices de formate en présence d'H₂ (exemple de *T. litoralis* NS-C^T (Takács et al., 2008)). Ces cellules ne peuvent donc évacuer le formate produit qui s'accumule à l'intérieur et qui inhibe la réaction. Cette protéine appartient à la famille des Formate/Nitrite Transporters (FNTs) qui est retrouvée parmi les trois domaines du vivant et qui est divisée en 8 sous-familles dont la plus étudiée est celle du canal formate (FocA) (Suppmann & Sawers, 1994). Les transporteurs des *Thermococcales* forment d'ailleurs une nouvelle sous-famille des FNTs selon une analyse phylogénétique basée sur l'étude de 2 043 séquences de FNTs procaryotes (Mukherjee et al., 2017). Le mécanisme de transport des FNTs n'est toujours pas compris malgré les efforts réalisés sur FocA. Plusieurs mécanismes sont encore discutés sur la dépendance au pH (Lü et al., 2013; Wiechert & Beitz, 2017) ou encore le couplage du passage du formate avec celui d'un proton (Atkovska & Hub, 2017; Wiechert & Beitz, 2017). Les FNTs partagent une structure homo-pentamérique symétrique similaire aux protéines membranaires de la famille des aquaporines (Falke et al., 2010; Lü et al., 2013; Waight et al., 2013; Y. Wang et al., 2009). La cavité hydrophobe au centre du pore est entourée de chaque côté de deux constriction. Un résidu histidine localisé dans la cavité est retrouvé chez tous les membres de cette famille et pourrait jouer un rôle clé dans le passage du formate. Il a été démontré que celui-ci est impliqué dans un mouvement bidirectionnel du formate au travers de la membrane cytoplasmique (Falke et al., 2010; Suppmann & Sawers, 1994). La nature de transporteur ou de canal est toujours discutée.

A notre connaissance il n'existe qu'une seule étude publiée concernant le transporteur/canal de formate chez les *Thermococcales* (Jung et al., 2017). Il a été mis en évidence qu'une mutation d'un nucléotide de la séquence du gène codant pour le canal de formate chez *T. onnurineus* NA1 (TON_1573) permet l'augmentation de la consommation de formate. La mutation sur le nucléotide 154 (G qui devient A) entraîne le remplacement d'une alanine par une thréonine en position 52. Ce changement intervient au niveau de la face interne du pore central et pourrait améliorer l'affinité du substrat avec le canal. Le mutant présente une meilleure croissance ($\times 1.62$) et une meilleure production d' H_2 ($\times 1.27$) par rapport à la souche type. La consommation de formate est quant à elle améliorée de 9 % ($281,6 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). La délétion du gène TON_1573 diminue significativement la croissance, la production d' H_2 et le taux de consommation de formate ($187,2 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). *T. onnurineus* NA1 possède une deuxième copie de ce transporteur (TON_0538) ce qui pourrait expliquer le maintien du transport du formate.

Cette étude met en évidence le rôle clé du canal dans le métabolisme du formate. Contrairement aux autres protéines de l'opéron *fdh-mnh-mfh*, la séquence protéique du canal est assez divergente avec par exemple 27 % de similarité entre le canal de *T. onnurineus* NA1 (TON_1573) et celui de *T. barophilus* Ch5. La structure du canal joue probablement un rôle important dans la production de formate bien que ce ne soit sûrement pas le seul paramètre expliquant la différence de production entre les souches positives. Pour déterminer si le transporteur est un élément limitant la réaction, il faudrait échanger le transporteur de *T. barophilus* Ch5 avec celui d'une autre souche qui ne possède qu'un seul transporteur (donc cela exclut *T. onnurineus* NA1 et *T. piezophilus* CDGS^T) et de comparer leurs productions respectives de formate. Il serait également intéressant de le rajouter chez les espèces qui possèdent différentes versions amoindries de l'opéron sans le transporteur de formate comme *T. litoralis* NS-C^T ou *P. abyssi* pour déterminer si leurs opérons sont encore fonctionnels.

B.5.7 Coculture et association avec une méthanogène

L'association en co-culture de micro-organismes hétérotrophes et de méthanogènes améliore leurs croissances et stimule leurs métabolismes (Bonch-Osmolovskaya & Stetter, 1991; Canganella & Jones, 1994; Muralidharan et al., 1997; Topçuoğlu et al., 2016). Les méthanogènes, ne représentant que quelques pourcents de la population totale de la coculture, utilisent l' H_2 produit des processus de fermentation des cellules hétérotrophes entraînant alors la baisse de la pression partielle d' H_2 ce qui diminue la rétro-inhibition de l' H_2 sur les processus fermentaires. En culture pure, *T. paralvinellae* ES1^T produit du formate en présence d' H_2 alors qu'aucune production de formate n'est détectée en coculture avec une méthanogène *Methanocaldococcus jannaschii* (Topçuoğlu et al., 2018). *M. jannaschii* ne réalisant pas de méthanogénèse sur formate, il est peu probable que *T. paralvinellae* ES1^T

produise du formate pour diminuer l'inhibition de l' H_2 , et que celui-ci soit ensuite utilisé par la méthanogène. Il semblerait donc que la consommation de l' H_2 par les méthanogènes soit suffisante pour réduire assez la pression partielle d' H_2 et ainsi limiter la production de formate par les *Thermococcales*. Cette hypothèse a été testée par la réalisation de coculture en plaçant des tubes dans un Schott donc sans contact physique entre les deux espèces (FIGURE 70) :

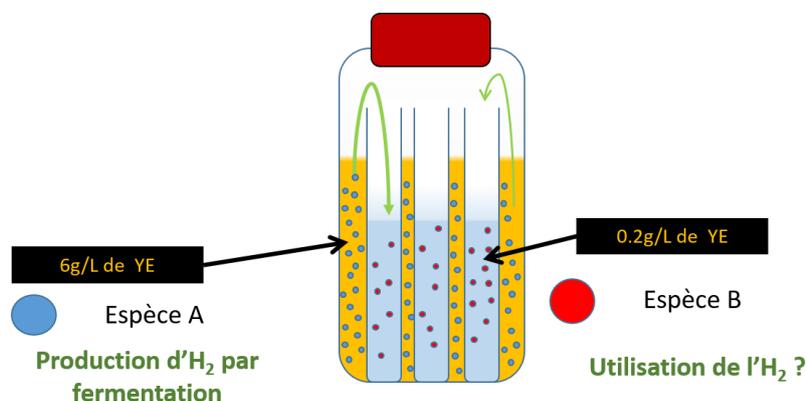


Figure 70 : Schéma du principe de coculture entre deux espèces sans contact direct afin de favoriser les échanges gazeux.

L'espèce A productrice d' H_2 est *Thermococcus*. sp. MF15 incubée avec 6 g L^{-1} d'extrait de levure (*T.* sp. MF15 a été isolée au laboratoire à partir de prélèvement de l'incubation en bioréacteur réalisée pendant la campagne BICOSE 1). Trois combinaisons pour l'espèce B ont été testées :

- *T.* sp. MF15 avec $0,2\text{ g L}^{-1}$ d'extrait de levure : une production de formate de $473\text{ }\mu\text{M}$ est détectée dans les tubes. Cette production est de l'ordre de grandeur de la production attendue par rapport à la teneur en H_2 de la phase gazeuse qui est de $4,1\%$ (à 200 kPa).
- Témoin négatif non inoculé : une faible quantité de formate a été produite dans les tubes ($181\text{ }\mu\text{M}$). L'hypothèse la plus probable est la contamination du témoin négatif par quelques cellules de *Thermococcales* puisqu'aucune production abiotique de formate n'a été observé dans les fioles seules des témoins négatifs.
- *Methanotorris igneus* ColBic1 (méthanogène hyperthermophile) : une production de CH_4 est détectée après 192 h et une faible teneur en H_2

Pour la culture A productrice d' H_2 , les productions de formate sont de $\sim 1,2\text{ mM}$ pour les deux premières conditions (avec *T.* sp. MF15 et le témoin négatif). Pour la condition avec *M. igneus*, la production de formate est de $0,2\text{ }\mu\text{M}$ suggérant que la consommation de l' H_2 par les méthanogènes a suffisamment baissé la pression partielle d' H_2 pour réduire la production de formate. Il est à noter que

la concentration d'acétate (proxy de la fermentation) est également diminuée (0,8 μM) par rapport aux deux premières conditions ($\approx 2,5 \text{ mM}$)

L' H_2 produit par la fermentation de la matière organique par les *Thermococcales* est utilisé comme donneur d'électron par les méthanogènes et peut être recyclé par les *Thermococcales* formate productrices.

Il avait été observé que l'association entre une espèce hétérotrophe et une espèce méthanogène s'établit lorsque les cellules sont physiquement proches, par exemple si les deux cultures sont séparées par une membrane, il n'y a pas de production de CH_4 (Muralidharan et al., 1997). Le résultat de notre expérience suggère qu'une proximité spatiale n'est pas obligatoire. Cependant il faut prendre en considération que les deux approches sont différentes, il est difficile de tirer des conclusions.

Pour améliorer les résultats de notre expérience, il faudrait utiliser une souche non productrice de formate comme productrice d' H_2 pour éviter d'avoir une production de formate. De plus les trois tubes de chaque Schott étaient des répliques de la même espèce, il serait possible dans chaque tube d'avoir des combinaisons de différentes espèces (*Thermococcales* productrices ou non de formate, méthanogènes utilisatrices de formate ou non, d'autres hydrogénotrophes comme des *Archaeoglobales*, ...) et ceux dans des conditions différentes (variation de la quantité et de la forme de la matière organique, température, ...). Il serait pertinent de réaliser des RT-PCR pour déterminer l'expression de l'opéron codant la FHL.

B.5.8 Voie autotrophe d'incorporation de $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ chez les *Thermococcales* ?

Lors de l'incubation avec du $^{14}\text{C}-\text{HCO}_3^-$ (dont l'objectif était de déterminer l'origine du formate), la fixation autotrophe de carbone dans la biomasse de *T. onnurineus* NA1 et de *T. sp. MF15* a été quantifiée (FIGURE 71). Les filtrats des contrôles négatifs ne présentent pas d'activité importante (témoin négatif, et les cultures de *T. onnurineus* NA1 et de *T. sp. MF15* neutralisées par autoclavage après inoculation). *T. onnurineus* NA1 et *T. sp. MF15* sont capables de fixer le bicarbonate quelque soit les concentrations d' H_2 . L'incorporation est d'ailleurs plus importante en absence d' H_2 préalablement additionné. Ceci peut être expliqué par le ralentissement du métabolisme en présence d' H_2 mais également par la production de formate qui capte une partie du bicarbonate marqué.

Il s'agit à notre connaissance de la première démonstration expérimentale d'incorporation de CO_2 chez les *Thermococcales*. La voie supposée de fixation du CO_2 celle du métabolisme de l'AMP (Aono et al.,

2015). Cependant l'inactivation du gène de la RuBisCo chez *T. kodakarensis* KOD1^T a montré qu'il n'était pas essentiel pour la croissance malgré une diminution de la concentration cellulaire (Sato et al., 2007). Une voie alternative est la voie des Pentoses Biphosphate qui consiste à la génération de R15P à partir de Ribose-1-Phosphate par une carbohydrate kinase (Aono et al., 2015). L'incorporation de CO₂ au travers d'autres voies métaboliques doit également être supposée. Par exemple l'analyse des génomes a montré la présence potentielle d'enzymes du cycle de l'acide tricarboxylique bien que cette voie est toujours incomplète (Fukui et al., 2005; Moon et al., 2012; Zivanovic et al., 2009).

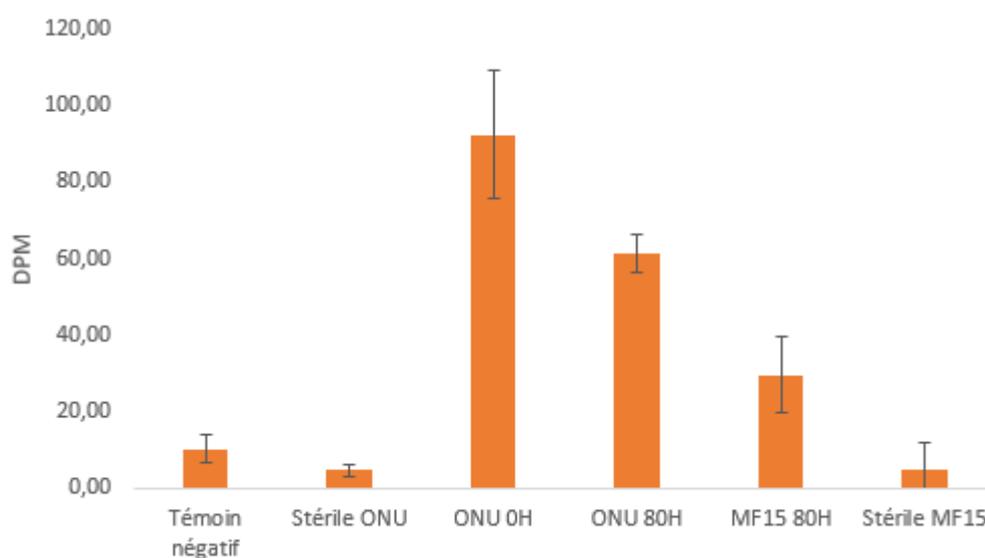


Figure 71 : Mesure d'incorporation de carbone 14 chez les *Thermococcales*. Pour rappel, les conditions de cultures étaient les suivantes : eau de mer synthétique, 30 mM HCO₃⁻, 0,2 g L⁻¹ d'extrait de levure, H₂/CO₂ ou N₂/CO₂ (80:20; v/v; 200 kPa) et sans ajout de S⁰.

L'étude de l'incorporation n'étant pas dans nos objectifs initiaux, les résultats ne sont que préliminaires.

Pour renforcer les résultats plusieurs manipulations sont possibles :

- Une expérience pour déterminer si la RuBisCo est la seule voie d'incorporation serait de construire un mutant Δ RuBisCo (délétion ou inactivation) et de comparer l'incorporation de bicarbonate marqué avec la souche non mutée. L'ajout d'AMP dans le milieu boosterait la voie métabolique. L'utilisation d'une souche carboxydrotrophe serait à privilégier. En effet si la RuBisCo est la voie principale d'incorporation de CO₂, alors le mutant Δ RuBisCo ne présentera pas de croissance importante sur CO.
- Une seconde expérience serait d'utiliser la souche *T. barophilus* Ch5 qui est à la fois carboxydrotrophe et productrice de formate pour déterminer le bénéfice de la production de

formate pour la cellule sur CO. La production hydrogène-dépendante de formate permet à la cellule de tirer la réaction d'oxydation du CO mais en même temps utilise le CO₂ susceptible d'être incorporer dans la cellule. Une alternative serait de rajouter l'opéron FHL chez *T. barophilus* MP^T qui est carboxydrotrophe.

D'autres paramètres seraient à tester comme la quantité et la forme de matière organique (peptide vs sucre), la présence ou absence de S⁰ ou encore la pression partielle en H₂.

B.6. Conclusions

Nous avons mis en évidence un mécanisme inédit de tolérance à l'H₂ chez les *Thermococcales*, la production hydrogène-dépendante de formate. Il était jusqu'alors considéré que la croissance des *Thermococcales* était très sensible à la concentration d'H₂ avec une inhibition totale pour de faible concentration. La production de formate à partir de l'H₂ et du bicarbonate permet de réduire la pression partielle intracellulaire de l'H₂ et de lever l'inhibition sur les voies cataboliques. En présence d'H₂, un quart des souches testées (n=45) présente une croissance, celle-ci associée à une production de formate allant de 1 à 12 mM. Une comparaison génomique a mis en évidence la présence exclusive de deux clusters de gènes uniquement chez les souches positives. Ces opérons sont notamment constitués d'une formate dehydrogénase et d'un transporteur de formate. Comme la réaction d'oxydation du formate ($\text{HCOO}^- + \text{H}_2\text{O} \Rightarrow \text{H}_2 + \text{HCO}_3^-$) est facilement réversible du fait de sa faible enthalpie libre ($\Delta G^\circ = +1.3 \text{ kJ mol}^{-1}$), la réaction « reverse » de production de formate est thermodynamiquement contrôlée par la concentration de ses substrats (concentration de bicarbonate et pression partielle d'H₂) et est limitée par la concentration du formate. Une régulation par le S⁰ a également été mise en évidence. Les souches possédant ce mécanisme présentent donc des croissances non négligeables en présence d'H₂ à des concentrations inhibitrices pour toutes les autres souches. Cette nouvelle capacité métabolique constitue un nouvel élément pour comprendre la distribution ubiquiste des *Thermococcales* dans l'écosystème hydrothermale et doit être pris en compte dans les modèles bio-géo-chimiques de ce dernier.

CHAPITRE IV : SYNTHÈSE **GÉNÉRALE &** **PERSPECTIVES**

4.1. Rappel des objectifs

Les sources hydrothermales océaniques profondes sont caractérisées par l'émission, au niveau du plancher océanique, de fluide chaud (température pouvant dépasser 400 °C) contenant de nombreux éléments chimiques réduits et anoxiques dont principalement des ions métalliques (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}), du soufre S^- et des gaz dissous (CO_2 , CH_4 , H_2 et H_2S) (Charlou et al., 2002; Kelley et al., 2002). Les zones d'émissions de fluide hydrothermal sont généralement caractérisées par la formation de structures minérales en forme de cheminées présentant des associations minéralogiques complexes et diverses, résultat de l'interaction du fluide chaud et réduit avec de l'eau de mer froide et oxygène. Les minéraux principaux sont les sulfures métalliques de Cu, Fe ou Zn vers l'intérieur des cheminées et les sulfates de Ca ou de Ba vers l'extérieur. Les sites actifs forment des écosystèmes complexes abritant une biocénose endémique et originale qui a comme particularité d'avoir à l'origine de sa chaîne trophique une production primaire chimiotrophe basée sur les éléments chimiques dissous présents dans les fluides hydrothermaux et assurée par des micro-organismes chimio-synthétique (Jannasch & Wirsen, 1979). Au niveau des systèmes hydrothermaux, les micro-organismes permettent le développement et le maintien de la faune de ces écosystèmes de part des interactions à l'interface entre la biosphère et la géosphère. Étudiée depuis maintenant près de 40 années, la diversité microbienne associée aux édifices hydrothermaux commence à être relativement bien décrite grâce aux approches culturales et moléculaires qui sont complémentaires. En effet, les techniques de cultures ne permettent pas d'identifier de manière exhaustive la diversité présente dans un échantillon mais permettent la caractérisation fonctionnelle des souches isolées. Les techniques moléculaires indépendantes des techniques culturales permettent d'identifier l'importante diversité qui reste non cultivable à ce jour mais ne permettent pas une caractérisation fonctionnelle. Cependant, le fonctionnement et la compréhension des processus d'interactions entre les communautés microbiennes et les surfaces minérales restent mal définis, principalement en raison des contraintes expérimentales imposées par ces environnements complexes et difficiles d'accès. L'objectif général de ce travail de thèse était d'identifier et de caractériser fonctionnellement les communautés microbiennes en interaction avec les minéralisations hydrothermales. Pour répondre à ces questions, des approches innovantes de colonisation *ex situ* de substrats naturels de sulfures massifs ont été privilégiés grâce à des incubations de ces substrats en bioréacteur Gas-lift inoculés à partir d'échantillons de cheminées et de fluides hydrothermaux. L'utilisation de culture en continu permet un contrôle des conditions biotiques et abiotiques des incubations. Dans ce cadre, les travaux se sont principalement concentrés sur l'étude de la diversité et de la structure des communautés présentes dans la fraction liquide et de celles associées aux substrats de sulfures massifs.

4.2. Influence des conditions physico-chimiques sur l'enrichissement de communautés hyperthermophiles de cheminées hydrothermales de la ride médio-Atlantique en cultures en continu

4.2.1 Enrichissement de communautés hyperthermophiles

Dans le cadre de cette étude, cinq cultures en continu en bioréacteur Gas-lift ont été réalisées à partir d'échantillon de cheminées hydrothermales actives provenant de trois champs hydrothermaux situés le long de la ride médio-Atlantique : deux ont été réalisées à partir d'échantillons prélevés sur le champ hydrothermal de Lucky Strike sur les sites respectifs Tour Eiffel et Capelinhos distants d'environ 1 km, deux autres à partir de cheminées qui proviennent du même site (Les Ruches) du champ Snake Pit et la cinquième à partir d'un échantillon d'une cheminée active de la zone des nurseries de TAG.

La mise en œuvre des cultures en continu a été modifiée par rapport aux travaux antérieurs. La principale modification est l'utilisation de fluide hydrothermal non filtré comme base minérale et inoculum avec un débit d'apport de milieu plus faible de 20 mL h⁻¹. Le fluide est également conservé directement dans sa poche de prélèvement ce qui améliore sa conservation.

Les diversités détectées dans les bioréacteurs après inoculation aux T=0 h qui correspondent à la somme des diversités de l'échantillon brut de cheminée et des fluides hydrothermaux sont similaires à celles des échantillons bruts et sont donc représentatives de la diversité présente *in situ*. Les diversités initiales sont majoritairement constituées d'*Euryarchaeota* principalement des *Thermococcales* et des *Archaeoglobales* mais présentent des variations importantes d'abondances relatives. La présence d'*Archaeoglobales* et de *Thermococcales* est courante dans les études de diversité microbienne de cheminées hydrothermales (Kormas et al., 2006; Li et al., 2014; Reysenbach et al., 2000; Schrenk et al., 2003; Takai et al., 2001). Les *Thermococcales* sont des chimioorganotrophes fermentaires anaérobies capables de réduire différents composés soufrés (Schut et al., 2014) tandis que les *Archaeoglobales* réduisent le SO₄²⁻ (*Archaeoglobus*) ou le fer (III) (*Geoglobus* ou *Ferroglobus*) en oxydant l'H₂ ou des composés organiques (tel que l'acétate ou le pyruvate). Elles se maintiennent durant les différentes incubations dont certaines (58 % de la diversité totale) sont présentes dans tous les échantillons (échantillons bruts, fractions liquides et sections polies des 5 incubations).

La réalisation de culture en bioréacteur permet également d'enrichir de nouveaux micro-organismes non détectés dans l'échantillon brut initial comme cela a été démontré par le passé. Les modifications apportées au protocole de culture utilisé durant cette thèse ont permis d'enrichir pour la première fois des phylotypes originaux tels que les *Methanotorris*. Elles ont été enrichies dans les incubations réalisées à partir d'échantillons de Snake Pit et sont absentes des incubations de celles réalisées à partir d'échantillons de Lucky Strike et de TAG. Ce résultat est cohérent avec l'isolement par le passé de

souches de *Methanotorris* à partir d'échantillon de Snake Pit (Jeanthon et al., 1999). Elles ne sont toutefois pas détectées dans les inventaires moléculaires. Les concentrations en H₂ des fluides de ces trois champs basaltiques sont du même ordre de grandeur (0,35 mM de moyenne (Charlou et al., 2002)) et largement inférieures à celles de champs hydrothermaux ultramafiques (13,6 mM de moyenne) dans lesquels les méthanogènes sont identifiés dans les inventaires moléculaires. Dans les cheminées et diffuseurs actifs de Snake Pit la pyrrhotite et l'isocubanite sont les sulfures de fer et de cuivre dominants, ils traduisent des conditions plus réductrices que celles de TAG et Lucky Strike pour lesquelles la pyrite (sulfure de fer) et la chalcopryrite (sulfure de cuivre) sont les sulfures dominants. La formation de ces minéraux dans les cheminées actives traduit les conditions plus ou moins réductrices du fluide (non mélangé à l'eau de mer). Au contraire, les incubations de Lucky Strike présentent des enrichissements en micro-aérophile *Aeropyrum*. C'est le contraire pour les phylotypes associés aux *Aeropyrum* qui sont connus pour être des microaérophiles. Ces différences de diversité pourraient être expliquées par un état plus réducteur des incubations de Snake Pit. Il serait intéressant de mesurer le potentiel redox de prochaines incubations pour déterminer si ce facteur est déterminant pour l'enrichissement de ces phylotypes. L'apport d'H₂ en condition réductrice permet donc d'enrichir les méthanogènes hydrogénotrophes présents en faible quantité dans l'environnement de Snake Pit.

L'étude a également mis en évidence l'enrichissement de plusieurs phylotypes originaux. Deux phylotypes nommés NUG pour « *New Unaffiliated Group* » ont été enrichis jusqu'à 72 %. Ils sont affiliés qu'à un clone incultivé HTM8731-A9 (AB611366,) identifié sur une cheminée hydrothermale du Pacifique (Yoshida-Takashima et al., 2012). Le plus proche représentant cultivé est *Thermosphaera aggregans* à 82 % (NR074380). Ils sont également présents en faible abondance (< 1 % de l'abondance) dans les autres incubations. De plus, trois phylotypes originaux sont uniquement présents dans l'une des incubations de Snake Pit. L'analyse phylogénétique les placent dans le phylum des *Candidatus Aenigmarchaeota* dont aucun représentant n'avait été jusqu'ici enrichi en culture. Ces dernières années, l'apport des données de métagénomiques a permis la découverte de nouvelles lignées d'archées et la réévaluation de leur modèle d'évolution (Adam et al., 2017; Spang et al., 2017). La quasi-totalité de ces nouvelles lignées ne possèdent pas de représentants cultivés à ce jour et sont encore mal caractérisées du point de vue physiologique et métabolique. L'enrichissement de ces phylotypes en bioréacteur Gas-lift confirme que cette technique est performante pour cultiver des micro-organismes originaux qui échappaient aussi bien aux approches culturales que moléculaires. L'un des principaux avantages est le prélèvement d'un grand volume de fluide qui permet d'obtenir une biomasse importante ce qui améliore la qualité de séquençage en métagénomique. C'est dans cette optique qu'une approche de métagénomique a été tentée sur des échantillons de poche de sortie de milieu afin d'obtenir le génome des phylotypes affiliés à *Candidatus Aenigmarchaeota*. La mauvaise qualité du

séquençage n'a pas permis d'obtenir le génome complet mais il semblerait qu'il soit probablement de petite taille et ne possède aucune voie métabolique complète. L'enrichissement de phylotypes de NUG et de méthanogènes dans une culture en bioréacteur réalisée au laboratoire un an après le prélèvement démontre l'importance du conditionnement et la conservation des poches des fluides. L'enrichissement des *Candidatus Aenigmarchaeota* au 18^{ième} jour de l'incubation est intéressant, les autres incubations dureraient moins longtemps (contraintes imposées par la durée des campagnes océanographiques) et met en évidence l'existence de succession écologique.

La présence de phylotypes de *Thermococcales* et d'*Archaeoglobales* dans chaque échantillon ainsi que l'enrichissement dans plusieurs incubations des phylotypes de NUG démontrent la reproductibilité de l'approche. Il semblerait également qu'il y ait une diversité commune de ces trois champs hydrothermaux qui pour de mêmes conditions physico-chimiques sont enrichies. Nos résultats donnent une image de la diversité microbienne associée à plusieurs types de cheminées hydrothermales de champs hydrothermaux basaltiques de la ride Médio-Atlantique et enrichis dans des conditions déterminées (80 °C, pH de 6.5, présence d'H₂). Ces études devraient être complétées par des incubations avec des échantillons de site hydrothermaux basés sur des substrats de roches du manteau (ultramafique comme par exemple Rainbow) dont les fluides sont caractérisés par des pH légèrement plus bas que ceux des environnements basaltiques et surtout par des concentrations en H₂ pouvant atteindre 19 mM (moyenne des sites mantelliques 13,6 contre 0,35 mM pour les sites basaltiques) et en fer dissous (24 mM).

4.2.2 Colonisation de nouvelles surfaces minérales

Un certain nombre d'études sont consacrées au processus de colonisation dans les environnements hydrothermaux. Elles reposent sur l'utilisation de modules de colonisation placés sur le passage du fluide hydrothermal au travers d'une chambre dans laquelle des substrats sont introduits afin de suivre la colonisation de leur surface par des micro-organismes (Karl et al., 1988; Nercessian et al., 2003; Pagé et al., 2008; Reysenbach et al., 2000; Schrenk et al., 2003). Les diversités obtenues lors du déploiement de module de colonisation concordent avec les diversités microbiennes des échantillons bruts. Cependant il reste difficile de conclure sur les processus de colonisation. Les conditions de déploiement des modules sont différentes : temps d'incubations variables sur des sites différents avec des données physico-chimique manquantes (température, pH, ...) et utilisant des substrats différents (naturels ou artificiels). Les approches *in-situ* ne permettent pas de caractériser les interactions existantes entre les cellules colonisatrices et le substrat de colonisation. De plus, de fortes variations de température et de pH dans des intervalles de temps de quelques min sont observées dans certains fluides présentent de grande variabilité spatio-temporelle à petite échelle. C'est pour cette raison qu'une approche *ex-situ* a

été choisie afin d'appréhender les processus de colonisation de nouvelles surfaces. Plusieurs sections polies de sulfures massifs ont été incorporées à l'intérieur du bioréacteur Gas-lift au cours de plusieurs cultures en continu. L'utilisation de ce bioréacteur permet d'accéder à une plus grande diversité inaccessible par les méthodes culturales classiques tout en contrôlant les conditions physico-chimiques (température et pH). L'incubation de sections polies de sulfures massifs a permis de simuler l'exposition de surfaces fraîches et réactives (tel que rencontré *in situ* directement exposées aux fluides hydrothermaux) et de favoriser l'adhésion de micro-organismes capables de se développer sur ces surfaces. Les diversités des communautés développées à la surface des sections polies incubées dans les mêmes conditions sont similaires à celle des fractions liquides avec une majorité de *Thermococcales* (entre 42 et 83 %) et d'*Archaeoglobales* (entre 2 et 41 %) principalement affiliée à *Geoglobus ahangari*. Il n'y a pas eu d'enrichissement spécifique de phylotypes appartenant à un ordre particulier à la surface des sections polies de sulfures. De plus la composition minéralogique des sulfures (trois types de sections polies ont été testés) n'influence pas la composition des communautés microbiennes. Ce résultat suggère qu'il n'y a pas eu de colonisation spécifique mais plus un dépôt à la surface des sulfures des micro-organismes de la fraction liquide. L'utilisation de substrat d'une autre nature comme des basaltes ou inertes comme du verre avec notre protocole de culture permettrait de le confirmer. Les observations microscopiques mettent en évidence que, pour les durées d'incubation courtes de nos cultures, les cellules sont présentes individuellement à la surface des sections polies sans former de biofilm comme cela avait été observé dans les études *in situ*.

4.2.3 Résilience des communautés microbiennes après un choc oxique et une diminution de la température d'incubation

Une perte d'activité a été simulée au cours de l'incubation de TAG avec la diminution progressive de la température de 80 à 4 °C sur plusieurs jours puis le changement de la composition du balayage gazeux de N₂/H₂/CO₂ (75:20:5) à une composition N₂/O₂ (78:21). Les diversités microbiennes présentes à la surface des sections polies ne sont pas impactées par cette perte d'activité, au contraire de celles des fractions liquides dont les structures des communautés sont différentes de celle d'avant la perte d'activité. Elles deviennent similaires à celles associées aux sections polies suggérant que les micro-organismes présents dans les sections polies de sulfures massifs sont plus résistants aux chocs oxiques et à la diminution de température que ceux présents dans la fraction liquide. Nos résultats expérimentaux viennent compléter les données déjà acquises (isolement d'hyperthermophile anaérobiques d'échantillons d'eau de mer et de tolérance à l'oxygène en culture pure) sur les capacités de résiliences des communautés hyperthermophiles anaérobiques.

4.3. La production de formate comme mécanisme de tolérance à l'H₂ chez les *Thermococcales*

4.3.1 Principaux résultats

La diversité des incubations en bioréacteur Gas-lift est majoritairement constituée de *Thermococcales*. L'enrichissement de *Thermococcales* dans ces conditions physico-chimiques de culture (présence d'H₂, aucun ajout de matière organique ni de S⁰) est inattendu. En effet il était considéré qu'en culture pure et en absence de S⁰, la croissance des *Thermococcales* est inhibée par de faibles concentrations en H₂, produit terminal de son métabolisme (Schut et al., 2014). Pour expliquer leur enrichissement, deux hypothèses étaient possibles, la première est qu'elles s'associent à des souches hydrogénotrophes comme des méthanogènes (Topçuoğlu et al., 2016) ce qui permet la diminution locale de la concentration en H₂, la seconde est la présence d'un mécanisme permettant l'évacuation intracellulaire de l'H₂. La tolérance à l'H₂ chez les *Thermococcales* en absence de S⁰ n'avait pas été testée dans la littérature, les résultats des travaux sur *P. furiosus* avaient été généralisé à l'ensemble des représentants de cet ordre (Fiala & Stetter, 1986; Malik et al., 1989). La croissance de 45 souches de *Thermococcales* (parmi les trois genres) en présence d'H₂ a donc été vérifiée et il s'avère que 27 % (12 souches) d'entre elles présentaient une croissance associée à une production importante de formate (variant de 0,8 à 11,9 mM au bout de 72 h avec 80 % d'H₂ dans la phase gazeuse à 200 kPa). Les 12 souches tolérantes à l'H₂ comprennent 2 *Pyrococcus* (*P. yayanossii* Ch1^T et *P. kukulkanii* NCB100^T), 1 *Palaeococcus* (*P. pacificus* DY20341^T) et 9 *Thermococcus* (*T. paralvinellae* ES1^T, *T. barophilus* Ch5, *T. kodakarensis* KOD1^T, *T. nautili* 30-1^T, *T. gammatolerans* EJ3^T, *T. cleftensis* CL1^T, *T. piezophilus* CDGS^T, *T. onnurineus* NA1 et *T. sp.* MF15). En réalisant une comparaison entre les génomes des souches tolérantes (les génomes de 12 souches tolérantes étaient disponibles) et de ceux de souches non tolérantes (22 génomes), il est apparu qu'un seul gène codant un transporteur de formate est unique aux souches tolérantes.

Ce gène est retrouvé au sein de deux clusters de gènes et toujours associé à une formate dehydrogénase. Le premier cluster de 18 gènes (*fdh-mfh-mnh*) était connu en tant que complexe de la formate-hydrogénylase, il avait été décrit chez *T. onnurineus* NA1 dans le cadre de la croissance sur formate ($\text{HCOO}^- + \text{H}_2\text{O} \Rightarrow \text{H}_2 + \text{HCO}_3^-$) (Kim et al., 2010) (FIGURE 72). Lim et al avaient démontré qu'il permettait de coupler l'oxydation du formate en H₂ et CO₂ à la synthèse d'ATP (Lim et al., 2014). Les 8 souches tolérantes à l'H₂ avec la production de formate la plus importante possédaient ce cluster. L'utilisation de bicarbonate radiomarquée au ¹⁴C a permis de confirmer l'origine du carbone du formate produit lors de l'exposition de *T. onnurineus* NA1 à une forte teneur en H₂. Chez les 4 autres souches, le transporteur de formate était présent dans un autre cluster de 6 gènes non décrit codant également pour une formate dehydrogénase ainsi qu'à une protéine homologue à 25 % à la sous-unité B de la

glutamate synthase de *T. kodakarensis* KOD1^T qui présente une activité d'oxydoréductase NADPH-dépendante (Dincturk et al., 2011; Jongsareejit et al., 1997). *T. onnurineus* NA1 possède également ce cluster (TON_0538-0543) (FIGURE 72) dont l'expression est toujours corrélée à celle du cluster de *sulfi* (TON_0534-0537) qui code pour une hydrogénase cytosolique NADPH-dépendante (Lee et al., 2017; Moon et al., 2012; Yun et al., 2011). Il est ainsi possible d'extrapoler que ces deux complexes agissent ensemble avec l'utilisation de NADPH comme transporteur d'électron entre les deux.

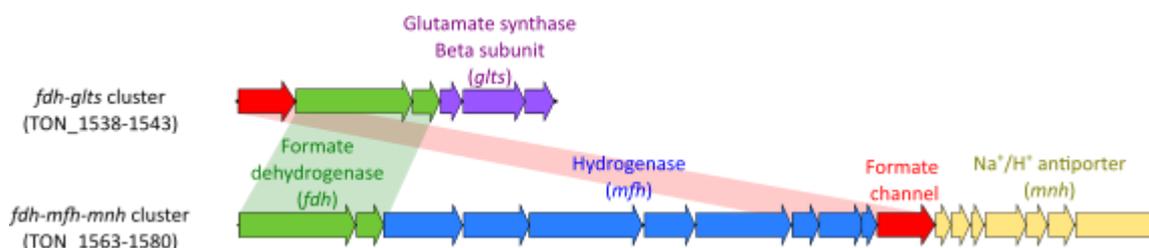


Figure 72 : Comparaison des deux clusters *fdh-mfh-mnh* et *fdh-gltS* identifiés chez *T. onnurineus* NA1.

Certaines enzymes comme la formate dehydrogénase sont connues pour être réversibles, le sens de la réaction dépendant des concentrations des substrats/produits ($\text{HCOO}^- + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2 + \text{HCO}_3^-$). La réversibilité de la réaction chez les *Thermococcales* a été mise en évidence avec la consommation du formate préalablement produit chez *T. onnurineus* NA1 et *P. pacificus* DY20341^T (qui possèdent respectivement les clusters *fdh-mfh-mnh* et *fdh-gltS*) suite au changement des conditions de culture (remplacement de l' H_2 de la phase gazeuse par du N_2). La croissance de deux souches génétiquement proches *T. barophilus* sp. Ch5 et sp. MP a été comparée. Le génome de Ch5 possède 310 ORF de plus que celui de MP dont le cluster *fdh-mfh-mnh*. Alors que la croissance de *T. barophilus* MP^T est rapidement inhibée par la présence d' H_2 (inhibition complète pour une teneur en H_2 entre 5 et 20 % de la phase gazeuse à 1,5 bar), la croissance de Ch5 n'est impactée que de moitié jusqu'à 80 % d' H_2 . L'analyse de nos données suggèrent l'implication de ces deux clusters dans la production de formate en tant que mécanisme de tolérance à l' H_2 chez les *Thermococcales*. Pour véritablement confirmer ces résultats et déterminer les fonctions des différents éléments, il faudrait réaliser des expériences génétiques sur ces deux clusters. Des essais ont été tentés mais n'ont pas aboutis. Les données génétiques, transcriptomiques et protéomiques accumulées sur *T. onnurineus* NA1 en font un bon modèle d'étude, d'autant plus que c'est une espèce particulière puisqu'elle possède les deux clusters *fdh-mfh-mnh* et *fdh-gltS*.

4.3.2 Quel est le sens de la réaction *in situ* ?

Il semble très improbable que la réaction d'oxydation du formate puisse représenter une source d'énergie pour les *Thermococcales* au niveau des sources hydrothermales profondes (Topçuoğlu et al.,

2018). En effet la croissance et la synthèse d'ATP sur formate ont été obtenue en conditions de laboratoire (concentration importante de formate et de matière organique, et faible concentration de bicarbonate et absence d'H₂). Dans ces écosystèmes les concentrations environnementales de formate sont très faibles (de l'ordre du µM) et celles d'H₂ peuvent être plus importantes (de l'ordre du 0,32 mM dans les systèmes basaltiques contre 13,6 mM en domaine mantellique) (Charlou et al., 2002).

Dans la littérature, le ΔG° de la réaction d'oxydation du formate ($\text{HCOO}^- (\text{aq}) + \text{H}_2\text{O} (\text{liq}) \Rightarrow \text{H}_2 (\text{g}) + \text{HCO}_3^- (\text{aq})$) est calculé en considérant l' H₂ sous sa forme gazeuse alors qu'en conditions hydrothermales profondes, les gaz sont présents sous forme dissoute et doivent être considérés comme tel dans les calculs thermodynamiques (Amend & Shock, 2001). Le ΔG° de la réaction de changement d'état ($\text{H}_2 (\text{g}) \leftrightarrow \text{H}_2 (\text{aq})$) est de 22,20 kJ mol⁻¹. La réaction d'oxydation du formate qui est légèrement endergonique en considérant l'H₂ (g) ($\Delta G^\circ = +1,5 \text{ kJ mol}^{-1}$) l'est encore plus en considérant l'H₂ comme dissous la réaction ($\Delta G^\circ = +19 \text{ kJ mol}^{-1}$). Certains auteurs soulignent également l'importance du changement du ΔG° avec l'augmentation de température, en effet à 25 °C la réaction est endergonique ($\Delta G^\circ = +1,5 \text{ kJ mol}^{-1}$) et elle devient exergonique à une température de 80 °C ($\Delta G^\circ = -1,8 \text{ kJ mol}^{-1}$). En considérant l'H₂ dissous, la réaction reste endergonique dans la gamme de température du vivant.

De plus la régulation de l'expression du cluster par le S⁰ est un autre argument en faveur que la fonction première du complexe *fdh-mfh-mnh* soit la production de formate pour la tolérance à l'H₂. Il a été démontré que l'ajout de S⁰ en culture a un effet inhibiteur sur la production de formate. Cette régulation pourrait être expliquée par la présence d'un site de fixation du régulateur transcriptionnel spécifique SurR (Sulfur Response Regulator) (Lipscomb et al., 2009; Yang et al., 2010) en amont du cluster qui empêche la transcription du cluster en présence de S⁰ (Kozhevnikova et al., 2016). En présence de S⁰, les électrons sont évacués par production d'H₂S ce qui lève le rôle inhibiteur de l'H₂ sur le métabolisme des *Thermococcales*. Dans l'hypothèse que la réaction d'oxydation du formate soit la principale fonction de l'enzyme *in situ*, la réaction aurait alors deux rôles physiologiques. Le premier, est la production d'énergie comme suggéré par Kim et al (Kim et al., 2010). Le second serait d'empêcher l'accumulation du formate généré lors de la fermentation et ainsi de maintenir l'homéostasie de son pH cytoplasmique (Takács et al., 2008). Le recyclage du formate endogène paraît improbable en l'état actuel de connaissance puisqu'aucune accumulation de formate n'est observée chez les espèces non productrices de formate et que seulement deux voies de biosynthèse de formate ont été décrites chez les *Thermococcales* : il pourrait être produit par l'intermédiaire d'une pyruvate-formate-lyase (PFL) qui clive le pyruvate en formate et en acétyl-CoA. L'analyse des génomes des *Thermococcales* a montré que trois espèces possèdent une PFL, à savoir *T. kodakarensis* KOD1^T, *T. litoralis* NS-C^T et *T. sibiricus*. La fonction hypothétique du complexe FHL de recycler le formate généré lors de la fermentation de peptide est

plausible chez *T. litoralis* NS-C^T. En effet *T. litoralis* NS-C^T possède le cluster *fdh-mnh-mrp* mais n'a pas le transporteur de formate (dont la présence est obligatoire en cas d'exposition à l'H₂ pour évacuer le formate et garder la réaction exergonique). De plus le cluster *fdh-mnh* est fortement exprimé en présence de caséine alors qu'en présence de maltose l'expression est limitée (Takács et al., 2008). Chez *T. kodakarensis* KOD1^T qui possède le cluster *fdh-gltS*, la délétion des gènes codant pour la PFL n'a entraînée aucune diminution de production de formate suggérant que le formate est produit autrement (Nohara et al., 2014). *T. sibiricus* n'a aucun de ces deux clusters (Mardanov et al., 2009). Aucune autre enzyme présentant une activité PFL n'a été détectée chez les autres *Thermococcales*, cela ne semblerait pas être la source majeure de formate. Le formate pourrait être produit par clivage du gluconate-6-phosphate en formate et ribulose-5-phosphate dans la voie métabolique du pentose phosphoketolase (PPK). Cette voie permettrait d'éviter l'inhibition par l'H₂ et du renouvellement du pool de ferrédoxines des réactions ferrédoxine-dépendantes de la voie d'Embden-Meyerhof (Topçuoğlu et al., 2018). Comme les enzymes impliquées ne sont pas connues, il n'est pas possible de connaître la distribution de cette voie au sein des *Thermococcales*. Cependant si cette voie est activée en présence d'H₂, l'oxydation du formate n'est donc pas thermodynamiquement possible.

Le formate pourrait alors être exogène et être produit de manière biotique ou abiotique. Une seule production importante de formate par des micro-organismes à hautes températures en culture pure a été décrite. Il s'agit d'*Archaeoglobus fulgidus* qui produit jusqu'à 11 mM de formate au bout de 10 h d'incubation en culture sous CO mais celui-ci est ensuite totalement consommé par la cellule (Henstra et al., 2007). Le précurseur du formate est le CO₂ produit par oxydation du CO. La production de formate sous CO a également été identifiée chez une méthanogène mésophile *Methanosarcinales acetivorans* qui produit elle aussi du formate pendant sa phase exponentielle de croissance sur CO et qui ne le réutilise pas ensuite (Rother & Metcalf, 2004). Il existe de nombreuses voies qui produisent le formate comme intermédiaire métabolique, comme dans la voie de Wood-Ljungdhal (aussi appelée voie réductrice de l'acétyl-CoA) pour laquelle la réduction du CO₂ en formate par une formate déhydrogénase est la première réaction de la branche méthyl de cette voie (Schuchmann & Müller, 2014). Cette voie est retrouvée chez certaines méthanogènes hyperthermophiles.

La source potentielle la plus probable du formate est une origine abiotique : le formate peut-être produit par réduction du CO₂ dans des fluides riches en H₂ jusqu'à ce que l'équilibre thermodynamique de la réaction $\text{CO}_2 + \text{H}_2 = \text{HCOO}^- + \text{H}^+$ soit atteint (McDermott et al., 2015). Cependant les données environnementales indiquent que le formate n'est que peu présent dans les fluides hydrothermaux à l'exception du site de Lost City (Lang et al., 2010) formé sur un substrat mantelliques dans lequel les fluides sont basiques et les températures inférieures à 100°C. Il s'agit donc d'un site très différent des sites étudiés dans cette thèse. L'absence de détection de formate n'est pas preuve de l'absence de

formate, il pourrait être rapidement utilisé par les micro-organismes. Les *Thermococcales* ne sont pas détectées dans la majorité des inventaires de diversités d'échantillons de Lost City (Lang et al., 2018; Roussel et al., 2011; Schrenk et al., 2013) à l'exception de trois séquences du gène codant l'ARNr 16S en 2006 (Brazelton et al., 2006).

4.3.3 Quelle est la réalité écologique ?

Il serait intéressant de modéliser les concentrations de formate, d' H_2 et de S^0 dans les microniches qu'occupent les *Thermococcales*, pour déterminer dans un premier temps si le cluster *fdh-mfh-mnh* est exprimé et dans quel sens. Il faudrait également déterminer la proportion de *Thermococcales* possédant cet opéron en fonction de son environnement (contexte basaltique ou ultramafique par exemple). Nous avons montré que parmi les *Thermococcales* testées, une souche sur 4 possédait la capacité de tolérer l' H_2 . Cependant est-ce que ce nombre pourrait être sous-estimé puisque l'isolement de *Thermococcales* a toujours été en présence de S^0 et sans H_2 . Le cluster *fdh-mnh-mrp* fait 18 kb soit 1 % de la taille du génome, est-ce suffisant pour être pénalisant pour les souches la possédant en condition sans H_2 ? Pour déterminer la proportion de *Thermococcales* possédant cet opéron, des études de métagénomiques pourraient être envisagées en recherchant le gène codant pour la sous-unité catalytique de la formate déhydrogénase (et surtout celui qui code pour le transporteur de formate qui est unique de ce taxon et de ces deux clusters. Pour la remise en contexte, il faut également penser aux interactions inter-espèces. Par exemple, il a été montré qu'en coculture avec une méthanogène, il n'y a pas de production de formate chez *T. sp.* MF15 ni chez *T. paralvinellae* ES1^T (Topçuoğlu et al., 2018). Il faudrait comparer l'expression de l'opéron en culture pure ou en coculture avec une espèce hydrogénotrophe pour confirmer que seule la diminution de la pression partielle d' H_2 par la consommation de l'hydrogénotrophe soit à l'origine de l'absence de production.

4.3.4 Quelle est l'histoire évolutive de cet opéron ?

La question de l'origine de ces opérons chez les *Thermococcales* se pose : à quel moment sont-ils apparus dans l'histoire évolutive ? Quelle était leur fonction primaire ? Est-ce qu'ils ont été perdus au cours de l'évolution par la majorité des espèces ou est ce qu'ils ont été obtenus par certaines souches par transferts horizontaux de gènes ? Une étude récente montre qu'il n'y a aucune évidence d'insertion d'éléments près des opérons ni de différence de GC % qui supportent l'hypothèse d'un transfert de gène (Topçuoğlu et al., 2018). Cependant un élément en faveur de ce processus est à la présence d'un cluster similaire de *fdh-mfh-mnh* chez *Thermofilum pendens* Hrk5 (FIGURE 73) (Anderson et al., 2008). Cette espèce de l'ordre des *Thermoproteales* possède des caractéristiques communes avec les *Thermococcales* puisqu'elle est hétérotrophe anaérobie stricte, hyperthermophile (température

optimale entre 85 et 90 °C) et réalise la réduction du S^0 . C'est le seul micro-organisme en dehors de l'ordre des *Thermococcales* qui possède un homologue du transporteur de formate (24 et 28 % d'homologie avec TON_1573 et TON_0531 respectivement). Les auteurs pensent que le rôle physiologique de ce complexe est similaire à celui de chez *E. coli* à savoir oxyder le formate en CO_2 quand il n'y a pas d'autres accepteur d'électrons que le proton. Il serait intéressant de cultiver ce micro-organisme pour déterminer s'il produit également du formate en présence d' H_2 et en absence de S^0 comme mécanisme de tolérance à l' H_2 . Son opéron présente de grandes différences avec ceux des *Thermococcales*.

L'existence de deux types de clusters similaires couplant la formate/CO déhydrogénase à une hydrogénase/putative oxydoréductase nous interroge sur leurs origines. Une analyse phylogénétique indique que les complexes Mrp-Mbh associées au Fdh et Codh sont phylogénétiquement proches ainsi qu'avec les Mrp-Mbh-NADPH retrouvés chez les *Crenarchaeota* et différents du module seul Mrp-Mbh suggérant une émergence assez tôt dans l'évolution des archées (Schut et al., 2013).

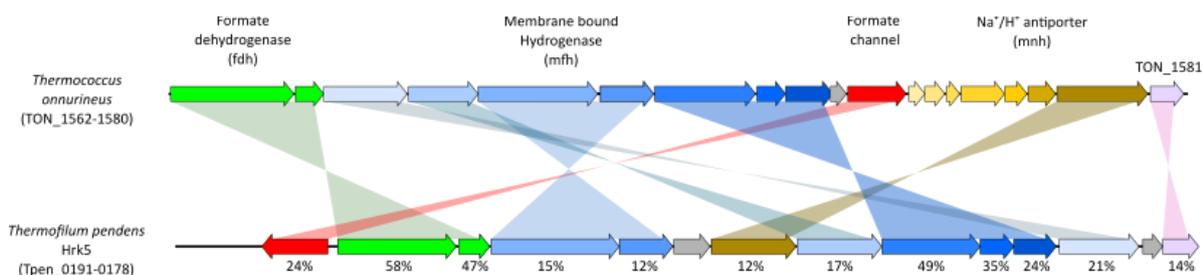


Figure 73 : Comparaison de cluster de gènes de *T. onnurineus* NA1 et de *Thermofilum pendens*.

4.3.5 Transfert d'électrons abiotique ?

Les cheminées hydrothermales sont constituées de matériaux conducteurs qui permettent la génération d'un courant au travers de la cheminée en couplant la réduction de l'eau de mer environnante avec l'oxydation du fluide hydrothermal (Yamamoto et al., 2017). Moins d'une centaine de micro-organismes ont été identifiés comme électro-actifs et capables d'interagir avec une électrode via un transfert extracellulaire d'électron (EET) (Koch & Harnisch, 2016; Lovley & Phillips, 1988). Une culture d'enrichissement réalisée à partir de cheminée hydrothermale du site Rainbow (MAR) a mis en évidence un enrichissement spécifique d'archées dont un quart de *Thermococcales* sur l'électrode (Pillot et al., 2018). Une étude sur *Pyrococcus furiosus* a montré que les *Thermococcales* peuvent être capable de transfert extracellulaire d'électron et générer de l'électricité cependant les mécanismes impliqués n'ont pas encore été identifiés (Sekar et al., 2017). Est-ce que le transfert extracellulaire

d'électrons est un mécanisme courant pour évacuer le surplus d'électrons chez les *Thermococcales* ? Si c'est le cas, il faudrait déterminer lequel des deux mécanismes (production de formate ou transfert extracellulaire d'électrons) est le plus efficace pour la cellule.

4.4. Conclusions

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse ont pour objectifs de définir le rôle des écosystèmes microbiens dans les interactions biosphère-géosphère associées aux environnements hydrothermaux. L'aspect innovant de ces travaux réside en l'approche expérimentale mise en œuvre pour répondre à cet objectif. Afin de limiter les biais associés à la grande hétérogénéité physico-chimique de ces environnements très dynamiques, des incubations en mésocosme ont été réalisées en bioréacteur Gas-lift dans des conditions contrôlées et homogènes (80 °C, 6,5 de pH et sous un balayage continu en H₂). Cette approche a permis la comparaison des communautés microbiennes à partir d'échantillons prélevés sur la ride médio-atlantique sur trois champs hydrothermaux (Lucky Strike, Snake Pit et TAG). Des sections polies de sulfures massifs ont été incubées à l'intérieur de deux bioréacteurs afin d'étudier

Dans l'ensemble, la diversité microbienne enrichie durant ces incubations est homogène, marquée par une absence de séquence bactérienne, et une diversité archéenne assez faible. Les *Thermococcales* et *Archaeoglobales* constituent la majorité de la diversité et sont présentes dans les cinq bioréacteurs. Les conditions réductrices des fluides semblent influencer l'enrichissement de certains micro-organismes. La minéralogie des sulfures de Snake Pit (présence de pyrrhotite et d'isocubanite) indique un état plus réducteur des fluides que de ceux de TAG et de Lucky Strike. Les incubations à partir d'échantillon de Snake Pit sont caractérisées par l'enrichissement de méthanogènes *Methanotorris* qui nécessitent des conditions réductrices et qui ne sont pas enrichies dans les incubations de TAG et de Lucky Strike. Au contraire, les incubations de Lucky Strike présentent des enrichissements en micro-aérophile *Aeopyrum*. Les méthanogènes sont majoritairement détectées au niveau des sites hydrothermaux qui présentent des fluides riches en H₂ comme les sites ultramafiques. L'apport en H₂ permet d'enrichir les méthanogènes hydrogénotrophes présents en faible quantité dans l'environnement.

L'enrichissement de *Thermococcales* dans ces mésocosmes enrichis en H₂ est cependant inattendu. Il était jusqu'à présent admis que la croissance de toutes les *Thermococcales* était inhibée en présence d'H₂ et en absence de S⁰. Un mécanisme inédit de tolérance à l'H₂ présent chez un quart des *Thermococcales* testées a pu être ainsi identifié et décrit. Ces *Thermococcales* réduisent le CO₂ en formate avec oxydation de l'H₂ ce qui leur permet la diminution de la concentration intracellulaire d'H₂. Deux groupes de gènes codant notamment pour une formate déhydrogénase et un transporteur de formate ont été identifiés à l'origine de cette capacité. Ce trait métabolique permet d'expliquer la présence de *Thermococcales* dans des environnements riches en H₂ comme les sites ultramafiques, en subsurface et leur enrichissement dans les incubations en bioréacteurs sous balayage en H₂.

Les surfaces des sections polies incubé dans les mésocosmes ont été colonisées par des communautés d'Archaea dont les structures de populations sont similaires à celle des fractions liquides. La colonisation est lente et marquée par une faible biomasse. La simulation d'une perte d'activité (baisse de température et apport d'oxygène) impacte les communautés des fractions liquides qui à la suite de ce changement de condition sont remplacées par les communautés associées aux sections polies. Ainsi les communautés hyperthermophiles présentes à la surface des substrats minéraux sont plus résilientes que celles de la fraction liquide. Ce résultat suggère le rôle important des particules minérales comme vecteur de dispersion des micro-organismes hyperthermophiles.

Le bioréacteur Gas-lift constitue un outil performant pour l'étude des interactions entre les micro-organismes et les minéralisations hydrothermales. La comparaison des résultats de la diversité de nos incubations avec celles de culture en continu réalisées dans les mêmes conditions à partir d'échantillon de champs hydrothermaux ultramafiques riches en H₂ permettrait de confirmer le rôle de l'H₂ dans le contrôle des communautés microbiennes des environnements hydrothermaux.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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. *The ISME journal*, *11*(11), 2407-2425.
- Alain, K., Olagnon, M., Desbruyères, D., Pagé, A., Barbier, G., Juniper, S. K., Quéréllou, J., & Cambon-Bonavita, M.-A. (2002). Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with mucous secretions of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis*. *FEMS Microbiology Ecology*, *42*(3), 463-476.
- Albers, S.-V., Koning, S. M., Konings, W. N., & Driessen, A. J. (2004). Insights into ABC transport in archaea. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, *36*(1), 5-15.
- Alissandratos, A., Kim, H.-K., & Easton, C. J. (2014). Formate production through carbon dioxide hydrogenation with recombinant whole cell biocatalysts. *Bioresource technology*, *164*, 7-11.
- Alt, J. C. (1995). Subseafloor processes in mid-ocean ridge hydrothermal systems. *Geophysical Monograph-American Geophysical Union*, *91*, 85-85.
- Amann, R., & Ludwig, W. (2000). Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS microbiology reviews*, *24*(5), 555-565.
- Amend, J. P., Rogers, K. L., & Meyer-Dombard, D. (2004). Microbially mediated sulfur-redox: energetics in marine hydrothermal vent systems. *SPECIAL PAPERS-GEOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA*, 17-34.
- Amend, J. P., & Shock, E. L. (2001). Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria. *FEMS microbiology reviews*, *25*(2), 175-243.
- Amor, M., Busigny, V., Durand-Dubief, M., Tharaud, M., Ona-Nguema, G., Gélabert, A., Alphandéry, E., Menguy, N., Benedetti, M. F., & Chebbi, I. (2015). Chemical signature of magnetotactic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(6), 1699-1703.
- Anderson, I., Risso, C., Holmes, D., Lucas, S., Copeland, A., Lapidus, A., Cheng, J.-F., Bruce, D., Goodwin, L., & Pitluck, S. (2011). Complete genome sequence of *Ferroglobus placidus* AEDII12DO. *Standards in genomic sciences*, *5*(1), 50-60.
- Anderson, I., Rodriguez, J., Susanti, D., Porat, I., Reich, C., Ulrich, L. E., Elkins, J. G., Mavromatis, K., Lykidis, A., & Kim, E. (2008). Genome sequence of *Thermofilum pendens* reveals an exceptional loss of biosynthetic pathways without genome reduction. *Journal of bacteriology*, *190*(8), 2957-2965.
- Andreini, C., Bertini, I., & Rosato, A. (2009). Metalloproteomes: a bioinformatic approach. *Accounts of chemical research*, *42*(10), 1471-1479.
- Ang, R., Khan, A. U., Tsujii, N., Takai, K., Nakamura, R., & Mori, T. (2015). Thermolectricity generation and electron-magnon scattering in a natural chalcopyrite mineral from a deep-sea hydrothermal vent. *Angewandte Chemie*, *127*(44), 13101-13105.
- Antoine, E., Cilia, V., Meunier, J., Guezennec, J., Lesongeur, F., & Barbier, G. (1997). *Thermosiphon melanesiensis* sp. nov., a new thermophilic anaerobic bacterium belonging to the order Thermotogales, isolated from deep-sea hydrothermal vents in the southwestern Pacific Ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *47*(4), 1118-1123.
- Aono, R., Sato, T., Imanaka, T., & Atomi, H. (2015). A pentose biphosphate pathway for nucleoside degradation in Archaea. *Nature chemical biology*, *11*(5), 355-360.
- Aono, R., Sato, T., Yano, A., Yoshida, S., Nishitani, Y., Miki, K., Imanaka, T., & Atomi, H. (2012). Enzymatic characterization of AMP phosphorylase and ribose-1, 5-bisphosphate isomerase functioning in an archaeal AMP metabolic pathway. *Journal of bacteriology*, *194*(24), 6847-6855.
- Argandona, M., Martínez-Checa, F., Llamas, I., Arco, Y., Quesada, E., & Del Moral, A. (2006). A membrane-bound nitrate reductase encoded by the narGHJI operon is responsible for anaerobic respiration in *Halomonas maura*. *Extremophiles*, *10*(5), 411-419.
- Arp, A., Childress, J. J., & Vetter, R. (1987). The sulphide-binding protein in the blood of the vestimentiferan tube-worm, *Riftia pachyptila*, is the extracellular haemoglobin. *Journal of Experimental Biology*, *128*(1), 139-158.
- Atkins, M. S., Hanna, M. A., Kupetsky, E. A., Saito, M. A., Taylor, C. D., & Wirsén, C. O. (2002). Tolerance of flagellated protists to high sulfide and metal concentrations potentially encountered at deep-

- sea hydrothermal vents. *Marine Ecology Progress Series*, 226, 63-75.
- Atkovska, K., & Hub, J. S. (2017). Energetics and mechanism of anion permeation across formate-nitrite transporters. *Scientific reports*, 7(1), 1-14.
- ## B
- Bachraty, C., Legendre, P., & Desbruyeres, D. (2009). Biogeographic relationships among deep-sea hydrothermal vent faunas at global scale. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 56(8), 1371-1378.
- Bae, S.-S., Kim, Y.-J., Yang, S.-H., Lim, J.-K., Jeon, J.-H., Lee, H.-S., Kang, S.-G., Kim, S.-J., & Lee, J.-H. (2006). *Thermococcus onnurineus* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent area at the PACMANUS field. *Journal of microbiology and biotechnology*, 16(11), 1826-1831.
- Bae, S. S., Kim, T. W., Lee, H. S., Kwon, K. K., Kim, Y. J., Kim, M.-S., Lee, J.-H., & Kang, S. G. (2012). H₂ production from CO, formate or starch using the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus onnurineus*. *Biotechnology letters*, 34(1), 75-79.
- Bak, F., & Cypionka, H. (1987). A novel type of energy metabolism involving fermentation of inorganic sulphur compounds. *Nature*, 326(6116), 891-892.
- Baker, B. J., Lesniewski, R. A., & Dick, G. J. (2012). Genome-enabled transcriptomics reveals archaeal populations that drive nitrification in a deep-sea hydrothermal plume. *The ISME journal*, 6(12), 2269-2279.
- Balch, W., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R., & Wolfe, R. S. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiological reviews*, 43(2), 260.
- Balkwill, D., Maratea, D., & Blakemore, R. (1980). Ultrastructure of a magnetotactic spirillum. *Journal of Bacteriology*, 141(3), 1399-1408.
- Barco, R. A., Hoffman, C. L., Ramírez, G. A., Toner, B. M., Edwards, K. J., & Sylvan, J. B. (2017). In-situ incubation of iron-sulfur mineral reveals a diverse chemolithoautotrophic community and a new biogeochemical role for *Thiomicrospira*. *Environmental microbiology*, 19(3), 1322-1337.
- Barge, L. M., Krause, F. C., Jones, J.-P., Billings, K., & Sobron, P. (2018). Geoelectrodes and fuel cells for simulating hydrothermal vent environments. *Astrobiology*, 18(9), 1147-1158.
- Barnes, I., LaMarche, J. V., & Himmelberg, G. (1967). Geochemical evidence of present-day serpentinization. *Science*, 156(3776), 830-832.
- Barreyre, T., Escartín, J., Garcia, R., Cannat, M., Mittelstaedt, E., & Prados, R. (2012). Structure, temporal evolution, and heat flux estimates from the Lucky Strike deep-sea hydrothermal field derived from seafloor image mosaics. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 13(4).
- Barriga, F., Fouquet, Y., Almeida, A., Biscoito, M., Charlou, J., Costa, R., Dias, A., Marques, A., Miranda, J., & Olu, K. (1998). Discovery of the Saldanha hydrothermal field on the FAMOUS segment of the MAR (36° 30' N). *Eos Trans. AGU*, 79(45 Fall Meet. Suppl.), F67.
- Bartlett, D. (2002). Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1595(1-2), 367-381.
- Bates, A. E., Tunnicliffe, V., & Lee, R. W. (2005). Role of thermal conditions in habitat selection by hydrothermal vent gastropods. *Marine Ecology Progress Series*, 305, 1-15.
- Batuev, B. (1994). Massive sulfide deposits discovered at 14° 45' N, Mid-Atlantic Ridge. *Bridge Newsletter*, 6, 6-10.
- Beal, E. J., House, C. H., & Orphan, V. J. (2009). Manganese- and iron-dependent marine methane oxidation. *Science*, 325(5937), 184-187.
- Beatty, J. T., Overmann, J., Lince, M. T., Manske, A. K., Lang, A. S., Blankenship, R. E., Van Dover, C. L., Martinson, T. A., & Plumley, F. G. (2005). An obligately photosynthetic bacterial anaerobe from a deep-sea hydrothermal vent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(26), 9306-9310.
- Beaulieu, S. E., Baker, E. T., & German, C. R. (2015). Where are the undiscovered hydrothermal vents on oceanic spreading ridges? *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 121, 202-212.
- Bennett, S. A., Achterberg, E. P., Connelly, D. P., Statham, P. J., Fones, G. R., & German, C. R. (2008). The distribution and stabilisation of dissolved Fe in deep-sea hydrothermal plumes. *Earth and Planetary Science Letters*, 270(3-4), 157-167.
- Berg, I. A. (2011). Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways. *Applied and environmental microbiology*, 77(6), 1925-1936.
- Berg, I. A., Kockelkorn, D., Buckel, W., & Fuchs, G. (2007). A 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate

- autotrophic carbon dioxide assimilation pathway in Archaea. *Science*, 318(5857), 1782-1786.
- Berg, I. A., Kockelkorn, D., Ramos-Vera, W. H., Say, R. F., Zarzycki, J., Hügler, M., Alber, B. E., & Fuchs, G. (2010). Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 447-460.
- Berner, E. K., & Berner, R. A. (2012). *Global environment: water, air, and geochemical cycles*. Princeton University Press.
- Beveridge, T. (1981). Ultrastructure, chemistry, and function of the bacterial wall. *International review of cytology*, 72, 229-317.
- Beveridge, T., & Murray, R. (1980). Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 141(2), 876-887.
- Biddle, J. F., Cardman, Z., Mendlovitz, H., Albert, D. B., Lloyd, K. G., Boetius, A., & Teske, A. (2012). Anaerobic oxidation of methane at different temperature regimes in Guaymas Basin hydrothermal sediments. *The ISME journal*, 6(5), 1018-1031.
- Birien, T. (2018). Génétique et génomique des microorganismes piézophiles des sources hydrothermales océaniques profondes (Adaptation aux hautes pressions hydrostatiques chez l'archée piézo-hyperthermophile: *Thermococcus barophilus*, apport de la génétique et impact des hydrogénases).
- Birrien, J.-L., Zeng, X., Jebbar, M., Cambon-Bonavita, M.-A., Quérellou, J., Oger, P., Bienvenu, N., Xiao, X., & Prieur, D. (2011). *Pyrococcus yayanosii* sp. nov., an obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(12), 2827-2881.
- Bjorck, C. E., Dobson, P. D., & Pandhal, J. (2018). Biotechnological conversion of methane to methanol: evaluation of progress and potential. *AIMS Bioengineering*, 5(1), 1-38.
- Blakemore, R. (1975). Magnetotactic bacteria. *Science*, 190(4212), 377-379.
- Blamey, J. M., & Adams, M. W. (1993). Purification and characterization of pyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1161(1), 19-27.
- Blounot, C., & Dickson, F. (1969). The solubility of anhydrite (CaSO₄) in NaCl-H₂O from 100 to 450 C and 1 to 1000 bars. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 33(2), 227-245.
- Blöchl, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H. W., & Stetter, K. O. (1997). *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 C. *Extremophiles*, 1(1), 14-21.
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C. J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., Amann, R., Jørgensen, B. B., Witte, U., & Pfannkuche, O. (2000). A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, 407(6804), 623-626.
- Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight, R., Mills, D. A., & Caporaso, J. G. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature methods*, 10(1), 57-59.
- Bonch-Osmolovskaya, E., & Stetter, K. (1991). Interspecies hydrogen transfer in cocultures of thermophilic Archaea. *Systematic and applied microbiology*, 14(3), 205-208.
- Bonch-Osmolovskaya, E. A., Perevalova, A. A., Kolganova, T. V., Rusanov, I. I., Jeanthon, C., & Pimenov, N. V. (2011). Activity and distribution of thermophilic prokaryotes in hydrothermal fluid, sulfidic structures, and sheaths of alvinellids (East Pacific Rise, 13 N). *Applied and environmental microbiology*, 77(8), 2803-2806.
- Borrel, G., O'Toole, P. W., Harris, H. M., Peyret, P., Brugere, J.-F., & Gribaldo, S. (2013). Phylogenomic data support a seventh order of methylotrophic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis. *Genome biology and evolution*, 5(10), 1769-1780.
- Bourbonnais, A., Lehmann, M. F., Butterfield, D. A., & Juniper, S. K. (2012). Subseafloor nitrogen transformations in diffuse hydrothermal vent fluids of the Juan de Fuca Ridge evidenced by the isotopic composition of nitrate and ammonium. *Geochemistry, geophysics, geosystems*, 13(2).
- Brault, M., Simoneit, B., Marty, J., & Saliot, A. (1988). Hydrocarbons in waters and particulate material from hydrothermal environments at the East Pacific Rise, 13 N. *Organic Geochemistry*, 12(3), 209-219.
- Brazelton, W. J., Schrenk, M. O., Kelley, D. S., & Baross, J. A. (2006). Methane- and sulfur-metabolizing microbial communities dominate the Lost City hydrothermal field ecosystem. *Applied and environmental microbiology*, 72(9), 6257-6270.
- Bridger, S. L., Clarkson, S. M., Stirrett, K., DeBarry, M. B., Lipscomb, G. L., Schut, G. J., Westpheling, J., Scott, R. A., & Adams, M. W. (2011). Deletion strains

- reveal metabolic roles for key elemental sulfur-responsive proteins in *Pyrococcus furiosus*. *Journal of bacteriology*, 193(23), 6498-6504.
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., & Forterre, P. (2008). Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology*, 6(3), 245-252.
- Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). *Brock biology of microorganisms*. Upper Saddle River (NJ): Prentice-Hall, 2003.
- Brown, C. T., Hug, L. A., Thomas, B. C., Sharon, I., Castelle, C. J., Singh, A., Wilkins, M. J., Wrighton, K. C., Williams, K. H., & Banfield, J. F. (2015). Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria. *Nature*, 523(7559), 208-211.
- Bruneau, L., Jerlov, N., & Koczy, F. (1953). Red Sea. *Natl Board Fish Inst Hydr Res, Göteborg, Rep Swedish deep-sea expedition*, 3(4), 14-30.
- Bryant, F., & Adams, M. (1989). Characterization of hydrogenase from the hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Biological Chemistry*, 264(9), 5070-5079.
- Burggraf, S., Jannasch, H. W., Nicolaus, B., & Stetter, K. O. (1990). *Archaeoglobus profundus* sp. nov., represents a new species within the sulfate-reducing archaeobacteria. *Systematic and applied microbiology*, 13(1), 24-28.
- Byrne, N., Lesongeur, F., Bienvenu, N., Geslin, C., Alain, K., Prieur, D., & Godfroy, A. (2009). Effect of variation of environmental conditions on the microbial communities of deep-sea vent chimneys, cultured in a bioreactor. *Extremophiles*, 13(4), 595-608.
- C**
- Callac, N., Oger, P., Lesongeur, F., Rattray, J. E., Vannier, P., Michoud, G., Beauverger, M., Gayet, N., Rouxel, O., & Jebbar, M. (2016). *Pyrococcus kukulkanii* sp. nov., a hyperthermophilic, piezophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(8), 3142-3149.
- Callac, N., Rommevaux-Jestin, C., Rouxel, O., Lesongeur, F., Liorzou, C., Bollinger, C., Ferrant, A., & Godfroy, A. (2013). Microbial colonization of basaltic glasses in hydrothermal organic-rich sediments at Guaymas Basin. *Frontiers in microbiology*, 4, 250.
- Callac, N., Rouxel, O., Lesongeur, F., Liorzou, C., Bollinger, C., Pignet, P., Chéron, S., Fouquet, Y., Rommevaux-Jestin, C., & Godfroy, A. (2015). Biogeochemical insights into microbe–mineral–fluid interactions in hydrothermal chimneys using enrichment culture. *Extremophiles*, 19(3), 597-617.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*, 10(1), 421.
- Cambon-Bonavita, M.-A., Lesongeur, F., Pignet, P., Wery, N., Lambert, C., Godfroy, A., Querellou, J., & Barbier, G. (2002). *Thermococcus atlanticus* sp nov., a hyperthermophilic Archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent in the Mid-Atlantic Ridge [corrected]. *Extremophiles*, 7(2), 101-109.
- Cameron, V., House, C. H., & Brantley, S. L. (2012). A first analysis of metallome biosignatures of hyperthermophilic archaea. *Archaea*, 2012.
- Campanaro, S., Vezzi, A., Vitulo, N., Lauro, F. M., D'Angelo, M., Simonato, F., Cestaro, A., Malacrida, G., Bertoloni, G., & Valle, G. (2005). Laterally transferred elements and high pressure adaptation in *Photobacterium profundum* strains. *BMC genomics*, 6(1), 1-15.
- Campbell, A., Palmer, M., Klinkhammer, G., Bowers, T., Edmond, J., Lawrence, J., Casey, J., Thompson, G., Humphris, S., & Rona, P. (1988). Chemistry of hot springs on the Mid-Atlantic Ridge. *Nature*, 335(6190), 514.
- Campbell, B. J., & Cary, S. C. (2004). Abundance of reverse tricarboxylic acid cycle genes in free-living microorganisms at deep-sea hydrothermal vents. *Applied and environmental microbiology*, 70(10), 6282-6289.
- Campbell, B. J., Engel, A. S., Porter, M. L., & Takai, K. (2006). The versatile ϵ -proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nature Reviews Microbiology*, 4(6), 458-468.
- Canganella, F., & Jones, W. J. (1994). Fermentation studies with thermophilic Archaea in pure culture and in syntrophy with a thermophilic methanogen. *Current Microbiology*, 28(5), 293-298.
- Capone, D. G., Bronk, D. A., Mulholland, M. R., & Carpenter, E. J. (2008). *Nitrogen in the marine environment*. Elsevier.
- Cario, A. (2013). *Adaptations à la vie sous haute pression hydrostatique chez les microorganismes piézophiles, l'exemple de Thermococcus barophilus* Lyon, École normale supérieure].
- Cary, S. C., Fisher, C. R., & Felbeck, H. (1988). Mussel growth supported by methane as sole carbon and energy source. *Science*, 240(4848), 78-80.

- Castelle, C. J., & Banfield, J. F. (2018). Major new microbial groups expand diversity and alter our understanding of the tree of life. *Cell*, 172(6), 1181-1197.
- Cavanaugh, C. M., Gardiner, S. L., Jones, M. L., Jannasch, H. W., & Waterbury, J. B. (1981). Prokaryotic cells in the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* Jones: possible chemoautotrophic symbionts. *Science*, 340-342.
- Charlou, J., Donval, J., Douville, E., Jean-Baptiste, P., Radford-Knoery, J., Fouquet, Y., Dapoigny, A., & Stievenard, M. (2000). Compared geochemical signatures and the evolution of Menez Gwen (37° 50' N) and Lucky Strike (37° 17' N) hydrothermal fluids, south of the Azores Triple Junction on the Mid-Atlantic Ridge. *Chemical geology*, 171(1-2), 49-75.
- Charlou, J., Donval, J., Fouquet, Y., Jean-Baptiste, P., & Holm, N. (2002). Geochemistry of high H₂ and CH₄ vent fluids issuing from ultramafic rocks at the Rainbow hydrothermal field (36° 14' N, MAR). *Chemical geology*, 191(4), 345-359.
- Charlou, J.-L., Donval, J.-P., Douville, D., Knoery, J., Fouquet, Y., Jean-Baptiste, P., Bourg, C., Prieur, D., & German, C. (1998). Fluides hydrothermaux en contexte de roches ultrabasiques: exemples de Logatchev (14°45'N) et Rainbow (36°14'N) sur la dorsale médio-Atlantique. *Réunion des Sciences de la Terre RST*, 31(98), 89.
- Charlou, J. L., Donval, J. P., Jean-Baptiste, P., Dapoigny, A., & Rona, P. A. (1996). Gases and helium isotopes in high temperature solutions sampled before and after ODP Leg 158 drilling at TAG hydrothermal field (26° N, MAR). *Geophysical Research Letters*, 23(23), 3491-3494.
- Chavagnac, V., Leleu, T., Fontaine, F., Cannat, M., Ceuleneer, G., & Castillo, A. (2018). Spatial Variations in Vent Chemistry at the Lucky Strike Hydrothermal Field, Mid-Atlantic Ridge (37° N): Updates for Subseafloor Flow Geometry from the Newly Discovered Capelinhos Vent. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 19(11), 4444-4458.
- Cho, J.-C., & Giovannoni, S. J. (2004). Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine Gammaproteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 432-440.
- Ciobanu, M.-C., Burgaud, G., Dufresne, A., Breuker, A., Rédou, V., Maamar, S. B., Gaboyer, F., Vandanebeele-Trambouze, O., Lipp, J. S., & Schippers, A. (2014). Microorganisms persist at record depths in the subseafloor of the Canterbury Basin. *The ISME journal*, 8(7), 1370-1380.
- Copley, J., Jorgensen, P., & Sohn, R. (2007). Assessment of decadal-scale ecological change at a deep Mid-Atlantic hydrothermal vent and reproductive time-series in the shrimp *Rimicaris exoculata*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87(4), 859-867.
- Corliss, J. B., Dymond, J., Gordon, L. I., Edmond, J. M., von Herzen, R. P., Ballard, R. D., Green, K., Williams, D., Bainbridge, A., & Crane, K. (1979). Submarine thermal springs on the Galapagos Rift. *Science*, 203(4385), 1073-1083.
- Corre, E., Reysenbach, A.-L., & Prieur, D. (2001). ε-Proteobacterial diversity from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. *FEMS Microbiology Letters*, 205(2), 329-335.
- Cosson, R. (1996). La bioaccumulation des éléments minéraux chez le vestimentifère *Riftia pachyptila* (Jones): bilan des connaissances. *Oceanologica acta*, 19(2), 163-176.
- Cosson, R. P., Thiébaud, É., Company, R., Castrec-Rouelle, M., Colaço, A., Martins, I., Sarradin, P.-M., & Bebianno, M. J. (2008). Spatial variation of metal bioaccumulation in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Marine environmental research*, 65(5), 405-415.
- Cossu, M. (2017). *Genomic evolution of archaea thermococcales* Université Paris-Saclay (ComUE)].
- Cottrell, M. T., & Cary, S. C. (1999). Diversity of dissimilatory bisulfite reductase genes of bacteria associated with the deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid *Alvinella pompejana*. *Applied and environmental microbiology*, 65(3), 1127-1132.
- Courtine, D. (2017). *Comparative genomics of closely related Thermococcus isolates, a genus of hyperthermophilic Archaea* Université de Bretagne occidentale-Brest].
- Cragg, B. A., & Parkes, R. J. (2014). Bacterial and Archaeal direct counts: a faster method of enumeration, for enrichment cultures and aqueous environmental samples. *Journal of microbiological methods*, 98, 35-40.
- Creasey, S., Rogers, A., & Tyler, P. (1996). Genetic comparison of two populations of the deep-sea vent shrimp *Rimicaris exoculata* (Decapoda: Bresiliidae) from the Mid-Atlantic Ridge. *Marine Biology*, 125(3), 473-482.
- Crepo-Medina, M., Chatziefthimiou, A. D., Bloom, N. S., Luther, G. W. I., Wright, D. D., Reinfelder, J. R., Vetriani, C., & Barkay, T. (2009). Adaptation of chemosynthetic microorganisms to elevated

- mercury concentrations in deep-sea hydrothermal vents. *Limnology and Oceanography*, 54(1), 41-49.
- Cruz, K., Guézennec, J., & Barkay, T. (2017). Binding of Hg by bacterial extracellular polysaccharide: a possible role in Hg tolerance. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(13), 5493-5503.
- Crépeau, V. (2010). *Diversité et fonctions dans les tapis microbiens du site hydrothermal de Lucky Strike Brest*].
- Crépeau, V., Cambon Bonavita, M.-A., Lesongeur, F., Randrianalivelo, H., Sarradin, P.-M., Sarrazin, J., & Godfroy, A. (2011). Diversity and function in microbial mats from the Lucky Strike hydrothermal vent field. *FEMS microbiology ecology*, 76(3), 524-540.
- Csotonyi, J. T., Stackebrandt, E., & Yurkov, V. (2006). Anaerobic respiration on tellurate and other metalloids in bacteria from hydrothermal vent fields in the eastern Pacific Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 4950-4956.
- Cuvelier, D., Sarradin, P. M., Sarrazin, J., Colaço, A., Copley, J. T., Desbruyères, D., Glover, A. G., Santos, R. S., & Tyler, P. A. (2011). Hydrothermal faunal assemblages and habitat characterisation at the Eiffel Tower edifice (Lucky Strike, Mid-Atlantic Ridge). *Marine Ecology*, 32(2), 243-255.
- Cuvelier, D., Sarrazin, J., Colaço, A., Copley, J., Desbruyères, D., Glover, A. G., Tyler, P., & Santos, R. S. (2009). Distribution and spatial variation of hydrothermal faunal assemblages at Lucky Strike (Mid-Atlantic Ridge) revealed by high-resolution video image analysis. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 56(11), 2026-2040.
- D**
- Dalmasso, C., Oger, P., Selva, G., Courtine, D., L'Haridon, S., Garlaschelli, A., Roussel, E., Miyazaki, J., Reveillaud, J., & Jebbar, M. (2016). *Thermococcus piezophilus* sp. nov., a novel hyperthermophilic and piezophilic archaeon with a broad pressure range for growth, isolated from a deepest hydrothermal vent at the Mid-Cayman Rise. *Systematic and applied microbiology*, 39(7), 440-444.
- Dalmasso, C. c. (2016). *Approches physiologiques et génomiques d'une archée thermo-piezophile Thermococcus piezophilus Brest*].
- Damsté, J. S. S., Strous, M., Rijpstra, W. I. C., Hopmans, E. C., Genevasen, J. A., van Duin, A. C., Van Niftrik, L. A., & Jetten, M. S. (2002). Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. *Nature*, 419(6908), 708-712.
- Dang, H., & Chen, C.-T. A. (2017). Ecological energetic perspectives on responses of nitrogen-transforming chemolithoautotrophic microbiota to changes in the marine environment. *Frontiers in microbiology*, 8, 1246.
- de Angelis, M. A., Baross, J. A., & Lilley, M. D. (1991). Enhanced microbial methane oxidation in water from a deep-sea hydrothermal vent field at simulated in situ hydrostatic pressures. *Limnology and oceanography*, 36(3), 565-570.
- DeLong, E. F. (1992). Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(12), 5685-5689.
- Deming, J. W., & Baross, J. A. (1993). Deep-sea smokers: windows to a subsurface biosphere? *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 57(14), 3219-3230.
- Desbruyères, D., Almeida, A., Biscoito, M., Comtet, T., Khripounoff, A., Le Bris, N., Sarradin, P., & Segonzac, M. (2000). A review of the distribution of hydrothermal vent communities along the northern Mid-Atlantic Ridge: dispersal vs. environmental controls. *Island, Ocean and Deep-Sea Biology*, 201-216.
- Desbruyères, D., Biscoito, M., Caprais, J.-C., Colaço, A., Comtet, T., Crassous, P., Fouquet, Y., Khripounoff, A., Le Bris, N., & Olu, K. (2001). Variations in deep-sea hydrothermal vent communities on the Mid-Atlantic Ridge near the Azores plateau. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 48(5), 1325-1346.
- Dhillon, A., Lever, M., Lloyd, K. G., Albert, D. B., Sogin, M. L., & Teske, A. (2005). Methanogen diversity evidenced by molecular characterization of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes in hydrothermal sediments of the Guaymas Basin. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4592-4601.
- Dhillon, A., Teske, A., Dillon, J., Stahl, D. A., & Sogin, M. L. (2003). Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2765-2772.
- Dib, R., Chobert, J.-M., Dalgalarrodo, M., Barbier, G., & Haertlé, T. (1998). Purification, molecular properties and specificity of a thermoactive and thermostable proteinase from *Pyrococcus abyssi*, strain st 549, hyperthermophilic archaea from deep-sea hydrothermal ecosystem. *FEBS letters*, 431(2), 279-284.

- Dick, G. J., Anantharaman, K., Baker, B. J., Li, M., Reed, D. C., & Sheik, C. S. (2013). The microbiology of deep-sea hydrothermal vent plumes: ecological and biogeographic linkages to seafloor and water column habitats. *Frontiers in Microbiology*, *4*, 124.
- Dick, G. J., & Tebo, B. M. (2010). Microbial diversity and biogeochemistry of the Guaymas Basin deep-sea hydrothermal plume. *Environmental Microbiology*, *12*(5), 1334-1347.
- Dincturk, H. B., Cunin, R., & Akce, H. (2011). Expression and functional analysis of glutamate synthase small subunit-like proteins from archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *Microbiological research*, *166*(4), 294-303.
- Distel, D. L., Lee, H., & Cavanaugh, C. M. (1995). Intracellular coexistence of methano- and thioautotrophic bacteria in a hydrothermal vent mussel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(21), 9598-9602.
- Dong, H. (2010). Mineral-microbe interactions: a review. *Frontiers of Earth Science in China*, *4*(2), 127-147.
- Dopson, M., Baker-Austin, C., Koppineedi, P. R., & Bond, P. L. (2003). Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic microorganisms. *Microbiology*, *149*(8), 1959-1970.
- Dopson, M., & Johnson, D. B. (2012). Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms. *Environmental Microbiology*, *14*(10), 2620-2631.
- Douville, E., Charlou, J., Donval, J., Fouquet, Y., Oelkers, E., Jove Colon, C., Bienvenu, P., Prieur, D., & Appriou, P. (1999). Trace metals in hot acidic fluids from a deep-sea hydrothermal system in an ultra-mafic environment: Rainbow vent field (36°14' N, MAR). *AMORES Azores Mid-Oceanic Ridge Ecosystem Studies, Final detailed scientific report, Theme N*, 82.
- Duperron, S., Bergin, C., Zielinski, F., Blazejak, A., Pernthaler, A., McKiness, Z. P., DeChaine, E., Cavanaugh, C. M., & Dubilier, N. (2006). A dual symbiosis shared by two mussel species, *Bathymodiolus azoricus* and *Bathymodiolus puteoserpentis* (Bivalvia: Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology*, *8*(8), 1441-1447.
- Eberhard, C., Wirsén, C. O., & Jannasch, H. W. (1995). Oxidation of polymetal sulfides by chemolithoautotrophic bacteria from deep-sea hydrothermal vents. *Geomicrobiology Journal*, *13*(3), 145-164.
- Eden, P. A., Schmidt, T. M., Blakemore, R. P., & Pace, N. R. (1991). Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *International journal of systematic and Evolutionary microbiology*, *41*(2), 324-325.
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, *27*(16), 2194-2200.
- Edgcomb, V. P., Molyneux, S. J., Saito, M. A., Lloyd, K., Böer, S., Wirsén, C. O., Atkins, M. S., & Teske, A. (2004). Sulfide ameliorates metal toxicity for deep-sea hydrothermal vent archaea. *Applied and environmental microbiology*, *70*(4), 2551-2555.
- Edmond, J., Campbell, A., Palmer, M., Klinkhammer, G., German, C., Edmonds, H., Elderfield, H., Thompson, G., & Rona, P. (1995). Time series studies of vent fluids from the TAG and MARK sites (1986, 1990) Mid-Atlantic Ridge: a new solution chemistry model and a mechanism for Cu/Zn zonation in massive sulphide orebodies. *Geological Society, London, Special Publications*, *87*(1), 77-86.
- Edwards, K. J., Bach, W., & McCollom, T. M. (2005). Geomicrobiology in oceanography: microbe-mineral interactions at and below the seafloor. *TRENDS in Microbiology*, *13*(9), 449-456.
- Edwards, K. J., Bond, P. L., & Banfield, J. F. (2000). Characteristics of attachment and growth of *Thiobacillus caldus* on sulphide minerals: a chemotactic response to sulphur minerals? *Environmental microbiology*, *2*(3), 324-332.
- Edwards, K. J., Glazer, B., Rouxel, O. J., Bach, W., Emerson, D., Davis, R. E., Toner, B. M., Chan, C., Tebo, B., & Staudigel, H. (2011). Ultra-diffuse hydrothermal venting supports Fe-oxidizing bacteria and massive uranium deposition at 5000 m off Hawaii. *The ISME Journal*, *5*(11), 1748-1758.
- Edwards, K. J., McCollom, T. M., Konishi, H., & Buseck, P. R. (2003). Seafloor bioalteration of sulfide minerals: results from in situ incubation studies. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *67*(15), 2843-2856.
- Ehrlich, H. L. (1999). Microbes as geologic agents: their role in mineral formation. *Geomicrobiology Journal*, *16*(2), 135-153.
- Eichinger, I., Schmitz-Esser, S., Schmid, M., Fisher, C. R., & Bright, M. (2014). Symbiont-driven sulfur crystal formation in a thiotrophic symbiosis from deep-

- sea hydrocarbon seeps. *Environmental microbiology reports*, 6(4), 364-372.
- Eisele, T., & Gabby, K. (2014). Review of reductive leaching of iron by anaerobic bacteria. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review*, 35(2), 75-105.
- Elder, J. W. (1965). Physical processes in geothermal areas. *Terrestrial heat flow*, 8, 211-239.
- Elderfield, H., & Schultz, A. (1996). Mid-ocean ridge hydrothermal fluxes and the chemical composition of the ocean. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 24(1), 191-224.
- Elsaied, H. E., Hayashi, T., & Naganuma, T. (2004). Molecular analysis of deep-sea hydrothermal vent aerobic methanotrophs by targeting genes of 16S rRNA and particulate methane monooxygenase. *Marine biotechnology*, 6(5), 503-509.
- Elsaigaard, L., Guezennec, J., Benbouzidrollet, N., & Prieur, D. (1995). Mesophilic sulfate-reducing bacteria from 3 deep-sea hydrothermal vent sites. *Oceanologica acta*, 18(1), 95-104.
- Emerson, D., Fleming, E. J., & McBeth, J. M. (2010). Iron-oxidizing bacteria: an environmental and genomic perspective. *Annual review of microbiology*, 64, 561-583.
- Emerson, D., Rentz, J. A., Lilburn, T. G., Davis, R. E., Aldrich, H., Chan, C., & Moyer, C. L. (2007). A novel lineage of proteobacteria involved in formation of marine Fe-oxidizing microbial mat communities. *PLoS one*, 2(8), e667.
- Erauso, G., Reysenbach, A.-L., Godfroy, A., Meunier, J.-R., Crump, B., Partensky, F., Baross, J. A., Marteinsson, V., Barbier, G., & Pace, N. R. (1993). *Pyrococcus abyssi* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Archives of microbiology*, 160(5), 338-349.
- Erb, T. J., & Zarzycki, J. (2018). A short history of RubisCO: the rise and fall (?) of Nature's predominant CO₂ fixing enzyme. *Current opinion in biotechnology*, 49, 100-107.
- Erickson, K., Macko, S., & Van Dover, C. (2009). Evidence for a chemoautotrophically based food web at inactive hydrothermal vents (Manus Basin). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 56(19-20), 1577-1585.
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., & Pascal, G. (2018). FROGS: find, rapidly, OTUs with galaxy solution. *Bioinformatics*, 34(8), 1287-1294.
- Estelmann, S., Ramos-Vera, W. H., Gad'on, N., Huber, H., Berg, I. A., & Fuchs, G. (2011). Carbon dioxide fixation in 'Archaeoglobus lithotrophicus': are there multiple autotrophic pathways? *FEMS microbiology letters*, 319(1), 65-72.
- Evans, M., Buchanan, B. B., & Arnon, D. I. (1966). A new ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 55(4), 928.
- Evans, P. N., Parks, D. H., Chadwick, G. L., Robbins, S. J., Orphan, V. J., Golding, S. D., & Tyson, G. W. (2015). Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics. *Science*, 350(6259), 434-438.
- Evrard, C. (2012). *Processus métallogéniques associés aux interactions hydrothermales entre l'eau de mer et les roches ultrabasiques du manteau, exemple de la ride Médio-Atlantique Université de Bretagne occidentale-Brest*].
- Ezaki, S., Maeda, N., Kishimoto, T., Atomi, H., & Imanaka, T. (1999). Presence of a structurally novel type ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. *Journal of Biological Chemistry*, 274(8), 5078-5082.

F

- Falke, D., Schulz, K., Doberenz, C., Beyer, L., Lilie, H., Thiemer, B., & Sawers, R. G. (2010). Unexpected oligomeric structure of the FocA formate channel of *Escherichia coli*: a paradigm for the formate-nitrite transporter family of integral membrane proteins. *FEMS microbiology letters*, 303(1), 69-75.
- Falkowski, P. G., Fenchel, T., & Delong, E. F. (2008). The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *science*, 320(5879), 1034-1039.
- Fallon, E. K., Petersen, S., Brooker, R. A., & Scott, T. B. (2017). Oxidative dissolution of hydrothermal mixed-sulphide ore: An assessment of current knowledge in relation to seafloor massive sulphide mining. *Ore Geology Reviews*, 86, 309-337.
- Feely, R. A., Lewison, M., Massoth, G. J., Robert-Baldo, G., Lavelle, J. W., Byrne, R. H., Von Damm, K. L., & Curl, H. C. (1987). Composition and dissolution of black smoker particulates from active vents on the Juan de Fuca Ridge. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 92(B11), 11347-11363.

- Ferry, J. G. (2012). *Methanogenesis: ecology, physiology, biochemistry & genetics*. Springer Science & Business Media.
- Fiala, G., & Stetter, K. O. (1986). *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100 C. *Archives of Microbiology*, 145(1), 56-61.
- Fiala, G., Stetter, K. O., Jannasch, H. W., Langworthy, T. A., & Madon, J. (1986). *Staphylothermus marinus* sp. nov. represents a novel genus of extremely thermophilic submarine heterotrophic archaeobacteria growing up to 98 C. *Systematic and Applied Microbiology*, 8(1-2), 106-113.
- Flores, G. E., Campbell, J. H., Kirshtein, J. D., Meneghin, J., Podar, M., Steinberg, J. I., Seewald, J. S., Tivey, M. K., Voytek, M. A., & Yang, Z. K. (2011). Microbial community structure of hydrothermal deposits from geochemically different vent fields along the Mid-Atlantic Ridge. *Environmental microbiology*, 13(8), 2158-2171.
- Forget, N., Murdock, S., & Juniper, S. (2010). Bacterial diversity in Fe-rich hydrothermal sediments at two South Tonga Arc submarine volcanoes. *Geobiology*, 8(5), 417-432.
- Forterre, P. (1995). Thermoreduction, a hypothesis for the origin of prokaryotes. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, 318(4), 415-422.
- Forterre, P. (2002). A hot story from comparative genomics: reverse gyrase is the only hyperthermophile-specific protein. *Trends in Genetics*, 18(5), 236-237.
- Fortin, D., Ferris, F. G., & Scott, S. D. (1998). Formation of Fe-silicates and Fe-oxides on bacterial surfaces in samples collected near hydrothermal vents on the Southern Explorer Ridge in the northeast Pacific Ocean. *American Mineralogist*, 83(11-12_Part_2), 1399-1408.
- Fouquet, Y. (1997). Discovery and first submersible investigations on the Rainbow Hydrothermal Field on the MAR (36° 14'N). *Eos Transactions of American Geophysical Union*, 78, 832.
- Fouquet, Y., Cambon, P., Etoubleau, J., Charlou, J. L., Ondréas, H., Barriga, F. J., Cherkashov, G., Semkova, T., Poroshina, I., & Bohn, M. (2013). Geodiversity of hydrothermal processes along the Mid-Atlantic Ridge and ultramafic-hosted mineralization: A new type of oceanic Cu-Zn-Co-Au volcanogenic massive sulfide deposit. In *Diversity Of Hydrothermal Systems On Slow Spreading Ocean Ridges Diversity Of Hydrothermal Systems On Slow Spreading Ocean Ridges* (pp. 321-367). Wiley-Blackwell.
- Fouquet, Y., & Party, I. S. (2001). IRIS cruise report. *IFREMER, Plouzane, France*.
- Fouquet, Y., Wafik, A., Cambon, P., Mevel, C., Meyer, G., & Gente, P. (1993). Tectonic setting and mineralogical and geochemical zonation in the Snake Pit sulfide deposit (Mid-Atlantic Ridge at 23 degrees N). *Economic geology*, 88(8), 2018-2036.
- Francis, C. A., Roberts, K. J., Beman, J. M., Santoro, A. E., & Oakley, B. B. (2005). Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(41), 14683-14688.
- Frank, K. L., Rogers, D. R., Olins, H. C., Vidoudez, C., & Girguis, P. R. (2013). Characterizing the distribution and rates of microbial sulfate reduction at Middle Valley hydrothermal vents. *The ISME journal*, 7(7), 1391-1401.
- Frank, K. L., Rogers, K. L., Rogers, D. R., Johnston, D. T., & Girguis, P. R. (2015). Key factors influencing rates of heterotrophic sulfate reduction in active seafloor hydrothermal massive sulfide deposits. *Frontiers in microbiology*, 6, 1449.
- Frankel, R. B., Bazylinski, D. A., Johnson, M. S., & Taylor, B. L. (1997). Magneto-aerotaxis in marine coccoid bacteria. *Biophysical journal*, 73(2), 994-1000.
- Friedrich, C. G., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A., & Fischer, J. (2001). Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Applied and environmental microbiology*, 67(7), 2873-2882.
- Friedrich, M. W. (2002). Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-5'-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms. *Journal of bacteriology*, 184(1), 278-289.
- Friedrich, M. W. (2005). Methyl-coenzyme M reductase genes: unique functional markers for methanogenic and anaerobic methane-oxidizing Archaea. *Methods in enzymology*, 397, 428-442.
- Frolova, A., Slobodkina, G., Baslerov, R., Novikov, A., Bonch-Osmolovskaya, E., & Slobodkin, A. (2018). *Thermosulfurimonas marina* sp. nov., an autotrophic sulfur-disproportionating and nitrate-reducing bacterium isolated from a shallow-sea hydrothermal vent. *Microbiology*, 87(4), 502-507.
- Fujiwara, Y., Takai, K., Uematsu, K., Tsuchida, S., Hunt, J. C., & Hashimoto, J. (2000). Phylogenetic characterization of endosymbionts in three hydrothermal vent mussels: influence on host distributions. *Marine Ecology Progress Series*, 208, 147-155.

- Fukui, T., Atomi, H., Kanai, T., Matsumi, R., Fujiwara, S., & Imanaka, T. (2005). Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes. *Genome research*, 15(3), 352-363.
- G**
- Gadd, G. M. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 156(3), 609-643.
- Gadd, G. M., & Griffiths, A. J. (1977). Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial ecology*, 4(4), 303-317.
- Galagan, J. E., Nusbaum, C., Roy, A., Endrizzi, M. G., Macdonald, P., FitzHugh, W., Calvo, S., Engels, R., Smirnov, S., & Atnoor, D. (2002). The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome research*, 12(4), 532-542.
- Galkin, S., & Moskalev, L. (1990). Hydrothermal fauna of the Mid-Atlantic Ridge. *Oceanology*, 30(5), 624-627.
- Galtier, N., Gouy, M., & Gautier, C. (1996). SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Bioinformatics*, 12(6), 543-548.
- Gartman, A., Picard, A., Olins, H., Sarode, N., Clarke, D., & Girguis, P. (2017). Microbes facilitate mineral deposition in bioelectrochemical systems. *ACS Earth and Space Chemistry*, 1(5), 277-287.
- Gavrilov, S. N., Stracke, C., Jensen, K., Menzel, P., Kallnik, V., Slesarev, A., Sokolova, T., Zayulina, K., Bräsen, C., & Bonch-Osmolovskaya, E. A. (2016). Isolation and characterization of the first xylanolytic hyperthermophilic euryarchaeon *Thermococcus* sp. strain 2319x1 and its unusual multidomain glycosidase. *Frontiers in microbiology*, 7, 552.
- Georgieva, M., Little, C., Ball, A., & Glover, A. (2015). Mineralization of *A. lvinella* polychaete tubes at hydrothermal vents. *Geobiology*, 13(2), 152-169.
- Geret, F., Riso, R., Sarradin, P.-M., Caprais, J.-C., & Cosson, R. P. (2002). Metal bioaccumulation and storage forms in the shrimp, *Rimicaris exoculata*, from the Rainbow hydrothermal field (Mid-Atlantic Ridge); preliminary approach to the fluid-organism relationship. *Cahiers de biologie marine*, 43(1), 43-52.
- German, C. R., Bowen, A., Coleman, M., Honig, D., Huber, J. A., Jakuba, M. V., Kinsey, J. C., Kurz, M. D., Leroy, S., & McDermott, J. M. (2010). Diverse styles of submarine venting on the ultraslow spreading Mid-Cayman Rise. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32), 14020-14025.
- Giovannoni, S. J., DeLong, E. F., Olsen, G. J., & Pace, N. R. (1988). Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *Journal of bacteriology*, 170(2), 720-726.
- Girguis, P. R., & Childress, J. J. (2006). Metabolite uptake, stoichiometry and chemoautotrophic function of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*: responses to environmental variations in substrate concentrations and temperature. *Journal of experimental biology*, 209(18), 3516-3528.
- Girguis, P. R., & Holden, J. F. (2012). On the potential for bioenergy and biofuels from hydrothermal vent microbes. *Oceanography*, 25(1), 213-217.
- Godfroy, A., Postec, A., & Raven, N. (2006). 4 Growth of Hyperthermophilic Microorganisms for Physiological and Nutritional Studies. In *Methods in Microbiology* (Vol. 35, pp. 93-108). Elsevier.
- Godfroy, A., Raven, N. D., & Sharp, R. J. (2000). Physiology and continuous culture of the hyperthermophilic deep-sea vent archaeon *Pyrococcus abyssi* ST549. *FEMS microbiology letters*, 186(1), 127-132.
- Gold, T. (1992). The deep, hot biosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(13), 6045-6049.
- González, J. M., Kato, C., & Horikoshi, K. (1996). Culturability and survival of an extreme thermophile isolated from deep-sea hydrothermal vents. *Archives of microbiology*, 166(1), 64-67.
- González, J. M., Sheckells, D., Viebahn, M., Krupatkina, D., Borges, K. M., & Robb, F. T. (1999). *Thermococcus waioapuensis* sp. nov., an extremely thermophilic archaeon isolated from a freshwater hot spring. *Archives of microbiology*, 172(2), 95-101.
- Gorby, Y. A., Beveridge, T. J., & Blakemore, R. P. (1988). Characterization of the bacterial magnetosome membrane. *Journal of bacteriology*, 170(2), 834-841.
- Gorlas, A., Jacquemot, P., Guigner, J.-M., Gill, S., Forterre, P., & Guyot, F. (2018). Greigite nanocrystals produced by hyperthermophilic archaea of *Thermococcales* order. *PLoS one*, 13(8), e0201549.
- Gorlas, A., Krupovic, M., Forterre, P., & Geslin, C. (2013). Living side by side with a virus: characterization of two novel plasmids from *Thermococcus prierii*, a host for the spindle-shaped virus TPV1. *Applied*

- and environmental microbiology, 79(12), 3822-3828.
- Gorlas, A., Marguet, E., Gill, S., Geslin, C., Guigner, J.-M., Guyot, F., & Forterre, P. (2015). Sulfur vesicles from Thermococcales: a possible role in sulfur detoxifying mechanisms. *Biochimie*, 118, 356-364.
- Govenar, B., Le Bris, N., Gollner, S., Glanville, J., Aperghis, A. B., Hourdez, S., & Fisher, C. R. (2005). Epifaunal community structure associated with Riftia pachytila aggregations in chemically different hydrothermal vent habitats. *Marine Ecology Progress Series*, 305, 67-77.
- Graham, U. M., Bluth, G. J., & Ohmoto, H. (1988). Sulfide-sulfate chimneys on the East Pacific Rise, 11 degrees and 13 degrees N latitudes; Part I, Mineralogy and paragenesis. *The Canadian Mineralogist*, 26(3), 487-504.
- Grove, J., Tanapongpipat, S., Thomas, G., Griffiths, L., Crooke, H., & Cole, J. (1996). Escherichia coli K-12 genes essential for the synthesis of c-type cytochromes and a third nitrate reductase located in the periplasm. *Molecular microbiology*, 19(3), 467-481.
- Guezennec, J., Ortega-Morales, O., Ragueneas, G., & Geesey, G. (1998). Bacterial colonization of artificial substrate in the vicinity of deep-sea hydrothermal vents. *FEMS microbiology ecology*, 26(2), 89-99.
- Guezennec, J., Pignet, P., Ragueneas, G., Deslandes, E., Lijour, Y., & Gentric, E. (1994). Preliminary chemical characterization of unusual eubacterial exopolysaccharides of deep-sea origin. *Carbohydrate polymers*, 24(4), 287-294.
- Gulmann, L. K., Beaulieu, S. E., Shank, T. M., Ding, K., Seyfried Jr, W. E., & Sievert, S. M. (2015). Bacterial diversity and successional patterns during biofilm formation on freshly exposed basalt surfaces at diffuse-flow deep-sea vents. *Frontiers in microbiology*, 6, 901.
- Guri, M., Durand, L., Cueff-Gauchard, V., Zbinden, M., Crassous, P., Shillito, B., & Cambon-Bonavita, M.-A. (2012). Acquisition of epibiotic bacteria along the life cycle of the hydrothermal shrimp Rimicaris exoculata. *The ISME journal*, 6(3), 597-609.
- Guy, L., & Ettema, T. J. (2011). The archaeal 'TACK'superphylum and the origin of eukaryotes. *Trends in microbiology*, 19(12), 580-587.
- Götz, D., Banta, A., Beveridge, T., Rushdi, A., Simoneit, B., & Reysenbach, A. (2002). Persephonella marina gen. nov., sp. nov. and Persephonella guaymasensis sp. nov., two novel, thermophilic, hydrogen-oxidizing microaerophiles from deep-sea hydrothermal vents. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(4), 1349-1359.
- Hafenbradl, D., Keller, M., Dirmeier, R., Rachel, R., Roßnagel, P., Burggraf, S., Huber, H., & Stetter, K. O. (1996). Ferroglobus placidus gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeum that oxidizes Fe²⁺ at neutral pH under anoxic conditions. *Archives of microbiology*, 166(5), 308-314.
- Hager, K. W., Fullerton, H., Butterfield, D. A., & Moyer, C. L. (2017). Community structure of lithotrophically-driven hydrothermal microbial mats from the Mariana Arc and Back-Arc. *Frontiers in microbiology*, 8, 1578.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*,
- Hallam, S. J., Girguis, P. R., Preston, C. M., Richardson, P. M., & DeLong, E. F. (2003). Identification of methyl coenzyme M reductase A (mcrA) genes associated with methane-oxidizing archaea. *Applied and environmental microbiology*, 69(9), 5483-5491.
- Hallam, S. J., Konstantinidis, K. T., Putnam, N., Schleper, C., Watanabe, Y.-i., Sugahara, J., Preston, C., de la Torre, J., Richardson, P. M., & DeLong, E. F. (2006). Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote Cenarchaeum symbiosum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(48), 18296-18301.
- Hannington, M. D., Jonasson, I. R., Herzig, P. M., & Petersen, S. (1995). Physical and chemical processes of seafloor mineralization at mid-ocean ridges. *Seafloor hydrothermal systems: Physical, chemical, biological, and geological interactions*, 91, 115-157.
- Hanson, R. S., & Hanson, T. E. (1996). Methanotrophic bacteria. *Microbiological reviews*, 60(2), 439-471.
- Hardivillier, Y., Denis, F., Demattei, M.-V., Bustamante, P., Lulier, M., & Cosson, R. (2006). Metal influence on metallothionein synthesis in the hydrothermal vent mussel Bathymodiolus thermophilus. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(3), 321-332.
- Harhangi, H. R., Le Roy, M., van Alen, T., Hu, B.-I., Groen, J., Kartal, B., Tringe, S. G., Quan, Z.-X., Jetten, M. S., & den Camp, H. J. O. (2012). Hydrazine synthase, a unique phylomarker with which to study the presence and biodiversity of anammox bacteria.

- Applied and environmental microbiology*, 78(3), 752-758.
- Harmsen, H., Prieur, D., & Jeanthon, C. (1997). Distribution of microorganisms in deep-sea hydrothermal vent chimneys investigated by whole-cell hybridization and enrichment culture of thermophilic subpopulations. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), 2876-2883.
- Haroon, M. F., Hu, S., Shi, Y., Imelfort, M., Keller, J., Hugenholtz, P., Yuan, Z., & Tyson, G. W. (2013). Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage. *Nature*, 500(7464), 567-570.
- Haymon, R. M. (1983). Growth history of hydrothermal black smoker chimneys. *Nature*, 301(5902), 695-698.
- Haymon, R. M., & Kastner, M. (1981). Hot spring deposits on the East Pacific Rise at 21 N: preliminary description of mineralogy and genesis. *Earth and Planetary Science Letters*, 53(3), 363-381.
- Hedrick, D. B., Pledger, R. D., White, D. C., & Baross, J. A. (1992). In situ microbial ecology of hydrothermal vent sediments. *FEMS Microbiology Letters*, 101(1), 1-10.
- Heider, J., Mai, X., & Adams, M. (1996). Characterization of 2-ketoisovalerate ferredoxin oxidoreductase, a new and reversible coenzyme A-dependent enzyme involved in peptide fermentation by hyperthermophilic archaea. *Journal of bacteriology*, 178(3), 780-787.
- Henstra, A. M., Dijkema, C., & Stams, A. J. (2007). Archaeoglobus fulgidus couples CO oxidation to sulfate reduction and acetogenesis with transient formate accumulation. *Environmental Microbiology*, 9(7), 1836-1841.
- Herbert, R. (1999). Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS microbiology reviews*, 23(5), 563-590.
- Herzig, P. M., & Hannington, M. D. (1995). Polymetallic massive sulfides at the modern seafloor a review. *Ore Geology Reviews*, 10(2), 95-115.
- Herzog, B., & Wirth, R. (2012). Swimming behavior of selected species of Archaea. *Applied and environmental microbiology*, 78(6), 1670-1674.
- Hess, H., Engel, A., James, H., & Leonard, B. (1962). History of ocean basins.
- Higashi, Y., Sunamura, M., Kitamura, K., Nakamura, K.-i., Kurusu, Y., Ishibashi, J.-i., Urabe, T., & Maruyama, A. (2004). Microbial diversity in hydrothermal surface to subsurface environments of Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, using a catheter-type in situ growth chamber. *FEMS microbiology ecology*, 47(3), 327-336.
- Hirayama, H., Abe, M., Miyazaki, M., Nunoura, T., Furushima, Y., Yamamoto, H., & Takai, K. (2014). Methyloarminovum caldicuralii gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic methanotroph isolated from a shallow submarine hydrothermal system, and proposal of the family Methylothermaceae fam. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(3), 989-999.
- Hoek, J., Banta, A., Hubler, F., & Reysenbach, A. L. (2003). Microbial diversity of a sulphide spire located in the Edmond deep-sea hydrothermal vent field on the Central Indian Ridge. *Geobiology*, 1(2), 119-127.
- Holden, J. F., & Adams, M. W. (2003). Microbe-metal interactions in marine hydrothermal environments. *Current opinion in chemical biology*, 7(2), 160-165.
- Holden, J. F., & Baross, J. A. (1993). Enhanced thermotolerance and temperature-induced changes in protein composition in the hyperthermophilic archaeon ES4. *Journal of bacteriology*, 175(10), 2839-2843.
- Holden, J. F., Summit, M., & Baross, J. A. (1998). Thermophilic and hyperthermophilic microorganisms in 3–30 C hydrothermal fluids following a deep-sea volcanic eruption. *FEMS Microbiology Ecology*, 25(1), 33-41.
- Holler, T., Widdel, F., Knittel, K., Amann, R., Kellermann, M. Y., Hinrichs, K.-U., Teske, A., Boetius, A., & Wegener, G. (2011). Thermophilic anaerobic oxidation of methane by marine microbial consortia. *The ISME journal*, 5(12), 1946-1956.
- Horiuchi, A., Aslam, M., Kanai, T., & Atomi, H. (2016). A structurally novel chitinase from the chitin-degrading hyperthermophilic archaeon Thermococcus chitonophagus. *Applied and environmental microbiology*, 82(12), 3554-3562.
- Hsu-Kim, H., Mullaugh, K. M., Tsang, J. J., Yucel, M., & Luther, G. W. (2008). Formation of Zn-and Fe-sulfides near hydrothermal vents at the Eastern Lau Spreading Center: implications for sulfide bioavailability to chemoautotrophs. *Geochemical transactions*, 9(1), 1-14.
- Huber, H., Burggraf, S., Mayer, T., Wyszckony, I., Rachel, R., & Stetter, K. O. (2000). Ignicoccus gen. nov., a novel genus of hyperthermophilic, chemolithoautotrophic Archaea, represented by two new species, Ignicoccus islandicus sp. nov. and Ignicoccus pacificus sp. nov. *International Journal*

- of *Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6), 2093-2100.
- Huber, H., Gallenberger, M., Jahn, U., Eylert, E., Berg, I. A., Kockelkorn, D., Eisenreich, W., & Fuchs, G. (2008). A dicarboxylate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon assimilation cycle in the hyperthermophilic Archaeum *Ignicoccus hospitalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(22), 7851-7856.
- Huber, H., Jannasch, H., Rachel, R., Fuchs, T., & Stetter, K. O. (1997). *Archaeoglobus veneficus* sp. nov., a novel facultative chemolithoautotrophic hyperthermophilic sulfite reducer, isolated from abyssal black smokers. *Systematic and Applied Microbiology*, 20(3), 374-380.
- Huber, J. A., Butterfield, D. A., & Baross, J. A. (2002). Temporal changes in archaeal diversity and chemistry in a mid-ocean ridge seafloor habitat. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1585-1594.
- Huber, J. A., Welch, D. B. M., Morrison, H. G., Huse, S. M., Neal, P. R., Butterfield, D. A., & Sogin, M. L. (2007). Microbial population structures in the deep marine biosphere. *science*, 318(5847), 97-100.
- Huber, R., Kristjansson, J., & Stetter, K. (1987). *Pyrobaculum* gen. nov., a new genus of neutrophilic, rod-shaped archaeobacteria from continental solfataras growing optimally at 100 C. *Archives of microbiology*, 149(2), 95-101.
- Huber, R., Sacher, M., Vollmann, A., Huber, H., & Rose, D. (2000). Respiration of arsenate and selenate by hyperthermophilic archaea. *Systematic and applied microbiology*, 23(3), 305-314.
- Huber, R., Stotters, P., Cheminee, J., Richnow, H., & Stetter, K. (1990). Hyperthermophilic archaeobacteria within the crater and open-sea plume of erupting Macdonald Seamount. *Nature*, 345(6271), 179-182.
- Humphris, S. E., Herzig, P., Miller, D., Alt, J., Becker, K., Brown, D., Brüggmann, G., Chiba, H., Fouquet, Y., & Gemell, J. (1995). The internal structure of an active sea-floor massive sulphide deposit. *Nature*, 377(6551), 713-716.
- Hügler, M., Huber, H., Molyneaux, S. J., Vetriani, C., & Sievert, S. M. (2007). Autotrophic CO₂ fixation via the reductive tricarboxylic acid cycle in different lineages within the phylum Aquificae: evidence for two ways of citrate cleavage. *Environmental Microbiology*, 9(1), 81-92.
- Hügler, M., & Sievert, S. M. (2010). Beyond the Calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean.
- Hügler, M., Wirsén, C. O., Fuchs, G., Taylor, C. D., & Sievert, S. M. (2005). Evidence for autotrophic CO₂ fixation via the reductive tricarboxylic acid cycle by members of the ε subdivision of proteobacteria. *Journal of bacteriology*, 187(9), 3020-3027.
- Imanaka, H., Fukui, T., Atomi, H., & Imanaka, T. (2002). Gene cloning and characterization of fructose-1, 6-bisphosphate aldolase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Journal of bioscience and bioengineering*, 94(3), 237-243.
- Inagaki, F., Takai, K., Komatsu, T., Kanamatsu, T., Fujioka, K., & Horikoshi, K. (2001). Archaeology of Archaea: geomicrobiological record of Pleistocene thermal events concealed in a deep-sea seafloor environment. *Extremophiles*, 5(6), 385-392.
- Innis, M. A., Myambo, K. B., Gelfand, D. H., & Brow, M. (1988). DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(24), 9436-9440.
- Ishii, S. i., Suzuki, S., Norden-Krichmar, T. M., Tenney, A., Chain, P. S., Scholz, M. B., Neelson, K. H., & Bretschger, O. (2013). A novel metatranscriptomic approach to identify gene expression dynamics during extracellular electron transfer. *Nature communications*, 4(1), 1-10.
- Ishii, T., Kawaichi, S., Nakagawa, H., Hashimoto, K., & Nakamura, R. (2015). From chemolithoautotrophs to electrolithoautotrophs: CO₂ fixation by Fe (II)-oxidizing bacteria coupled with direct uptake of electrons from solid electron sources. *Frontiers in microbiology*, 6, 994.
- Jacq, E., Prieur, D., Nichols, P., White, D., Porter, T., & Geesey, G. G. (1989). Microscopic examination and fatty acid characterization of filamentous bacteria colonizing substrata around subtidal hydrothermal vents. *Archives of microbiology*, 152(1), 64-71.
- Jahn, U., Huber, H., Eisenreich, W., Hügler, M., & Fuchs, G. (2007). Insights into the autotrophic CO₂ fixation pathway of the archaeon *Ignicoccus hospitalis*: comprehensive analysis of the central carbon metabolism. *Journal of bacteriology*, 189(11), 4108-4119.

- James, R., Elderfield, H., & Palmer, M. (1995). The chemistry of hydrothermal fluids from the Broken Spur site, 29 N Mid-Atlantic Ridge. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(4), 651-659.
- Jan, C., Petersen, J. M., Werner, J., Teeling, H., Huang, S., Glöckner, F. O., Golyshina, O. V., Dubilier, N., Golyshin, P. N., & Jebbar, M. (2014). The gill chamber epibiosis of deep-sea shrimp *Rimicaris exoculata*: an in-depth metagenomic investigation and discovery of *Zetaproteobacteria*. *Environmental microbiology*, 16(9), 2723-2738.
- Jannasch, H. W., & Mottl, M. J. (1985). Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents. *Science*, 229(4715), 717-725.
- Jannasch, H. W., & Wirsén, C. O. (1979). Chemosynthetic primary production at East Pacific sea floor spreading centers. *Bioscience*, 29(10), 592-598.
- Jannasch, H. W., & Wirsén, C. O. (1981). Morphological survey of microbial mats near deep-sea thermal vents. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(2), 528-538.
- Jannasch, H. W., Wirsén, C. O., Molyneux, S. J., & Langworthy, T. A. (1988). Extremely thermophilic fermentative archaeobacteria of the genus *Desulfurococcus* from deep-sea hydrothermal vents. *Applied and environmental microbiology*, 54(5), 1203-1209.
- Jannasch, H. W., Wirsén, C. O., Molyneux, S. J., & Langworthy, T. A. (1992). Comparative physiological studies on hyperthermophilic archaea isolated from deep-sea hot vents with emphasis on *Pyrococcus* strain GB-D. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(11), 3472-3481.
- Jean-Baptiste, P., Charlou, J., Stievenard, M., Donval, J., Bougault, H., & Mevel, C. (1991). Helium and methane measurements in hydrothermal fluids from the Mid-Atlantic Ridge: the Snake Pit site at 23 N. *Earth and Planetary Science Letters*, 106(1-4), 17-28.
- Jeanthon, C. (2000). Molecular ecology of hydrothermal vent microbial communities. *Antonie van Leeuwenhoek*, 77(2), 117-133.
- Jeanthon, C., l'Haridon, S., Reysenbach, A.-L., Corre, E., Vernet, M., Messner, P., Sleytr, U., & Prieur, D. (1999). *Methanococcus vulcanius* sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen isolated from East Pacific Rise, and identification of *Methanococcus* sp. DSM 4213Tas *Methanococcus fervens* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(2), 583-589.
- Jeanthon, C., & Prieur, D. (1990). Susceptibility to heavy metals and characterization of heterotrophic bacteria isolated from two hydrothermal vent polychaete annelids, *Alvinella pompejana* and *Alvinella caudata*. *Applied and environmental microbiology*, 56(11), 3308-3314.
- Johnson, K. S., Gordon, R. M., & Coale, K. H. (1997). What controls dissolved iron concentrations in the world ocean? *Marine chemistry*, 57(3-4), 137-161.
- Jolivet, E., Corre, E., l'Haridon, S., Forterre, P., & Prieur, D. (2004). *Thermococcus marinus* sp. nov. and *Thermococcus radiotolerans* sp. nov., two hyperthermophilic archaea from deep-sea hydrothermal vents that resist ionizing radiation. *Extremophiles*, 8(3), 219-227.
- Jones, C. G., Lawton, J. H., & Shachak, M. (1994). Organisms as ecosystem engineers. In *Ecosystem management* (pp. 130-147). Springer.
- Jones, M. L. (1981). *Riftia pachyptila* Jones: observations on the vestimentiferan worm from the Galapagos Rift. *Science*, 213(4505), 333-336.
- Jones, W., Leigh, J., Mayer, F., Woese, C., & Wolfe, R. (1983). *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Archives of Microbiology*, 136(4), 254-261.
- Jongsareejit, B., Rahman, R., Fujiwara, S., & Imanaka, T. (1997). Gene cloning, sequencing and enzymatic properties of glutamate synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. KOD1. *Molecular and General Genetics MGG*, 254(6), 635-642.
- Jung, H.-C., Lee, S. H., Lee, S.-M., An, Y. J., Lee, J.-H., Lee, H. S., & Kang, S. G. (2017). Adaptive evolution of a hyperthermophilic archaeon pinpoints a formate transporter as a critical factor for the growth enhancement on formate. *Scientific reports*, 7(1), 1-9.
- Juniper, S., Thompson, J., & Calvert, S. (1986). Accumulation of minerals and trace elements in biogenic mucus at hydrothermal vents. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 33(3), 339-347.
- Juniper, S. K., & Fouquet, Y. (1988). Filamentous iron-silica deposits from modern and ancient hydrothermal sites. *The Canadian Mineralogist*, 26(3), 859-869.
- Juniper, S. K., Jonasson, I. R., Tunnicliffe, V., & Southward, A. J. (1992). Influence of a tube-building polychaete on hydrothermal chimney mineralization. *Geology*, 20(10), 895-898.
- Jäger, D., Förstner, K. U., Sharma, C. M., Santangelo, T. J., & Reeve, J. N. (2014). Primary transcriptome map

- of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *BMC genomics*, 15(1), 1-15.
- Jørgensen, B. B. (1977). The sulfur cycle of a coastal marine sediment (Limfjorden, Denmark) 1. *Limnology and Oceanography*, 22(5), 814-832.
- Jørgensen, B. B., Isaksen, M. F., & Jannasch, H. W. (1992). Bacterial sulfate reduction above 100 C in deep-sea hydrothermal vent sediments. *Science*, 258(5089), 1756-1757.
- ## K
- Kallmeyer, J., & Boetius, A. (2004). Effects of temperature and pressure on sulfate reduction and anaerobic oxidation of methane in hydrothermal sediments of Guaymas Basin. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 1231-1233.
- Kanai, T., Matsuoka, R., Beppu, H., Nakajima, A., Okada, Y., Atomi, H., & Imanaka, T. (2011). Distinct physiological roles of the three [NiFe]-hydrogenase orthologs in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *Journal of bacteriology*, 193(12), 3109-3116.
- Kannan, Y., Koga, Y., Inoue, Y., Haruki, M., Takagi, M., Imanaka, T., Morikawa, M., & Kanaya, S. (2001). Active subtilisin-like protease from a hyperthermophilic archaeon in a form with a putative prosequence. *Applied and environmental microbiology*, 67(6), 2445-2452.
- Kappler, A., Emerson, D., Gralnick, J. A., Roden, E. E., & Muehe, E. M. (2015). Geomicrobiology of iron. *Ehrlich's geomicrobiology*, 343-400.
- Kappler, A., & Straub, K. L. (2005). Geomicrobiological cycling of iron. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 59(1), 85-108.
- Karl, D. (1995). Ecology of free-living, hydrothermal vent microbial community. *The microbiology of deep-sea hydrothermal vents*.
- Karl, D. M., Taylor, G. T., Novitsky, J. A., Jannasch, H. W., Wirsén, C. O., Pace, N. R., Lane, D. J., Olsen, G. J., & Giovannoni, S. J. (1988). A microbiological study of Guaymas Basin high temperature hydrothermal vents. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 35(5), 777-791.
- Kashefi, K., Holmes, D. E., Baross, J. A., & Lovley, D. R. (2003). Thermophily in the Geobacteraceae: *Geothermobacter ehrlichii* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic member of the Geobacteraceae from the "Bag City" hydrothermal vent. *Applied and environmental microbiology*, 69(5), 2985-2993.
- Kashefi, K., & Lovley, D. R. (2000). Reduction of Fe (III), Mn (IV), and toxic metals at 100 C by *Pyrobaculum islandicum*. *Applied and environmental microbiology*, 66(3), 1050-1056.
- Kashefi, K., Tor, J. M., Holmes, D. E., Van Praagh, C. V. G., Reysenbach, A.-L., & Lovley, D. R. (2002). *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon capable of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe (III) serving as the sole electron acceptor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(3), 719-728.
- Kashefi, K., Tor, J. M., Nevin, K. P., & Lovley, D. R. (2001). Reductive precipitation of gold by dissimilatory Fe (III)-reducing bacteria and archaea. *Applied and environmental microbiology*, 67(7), 3275-3279.
- Kato, M., & Hayashi, R. (1999). Effects of high pressure on lipids and biomembranes for understanding high-pressure-induced biological phenomena. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 63(8), 1321-1328.
- Kato, S., Hashimoto, K., & Watanabe, K. (2013). Iron-oxide minerals affect extracellular electron-transfer paths of *Geobacter* spp. *Microbes and environments*, ME12161.
- Kato, S., Ikehata, K., Shibuya, T., Urabe, T., Ohkuma, M., & Yamagishi, A. (2015). Potential for biogeochemical cycling of sulfur, iron and carbon within massive sulfide deposits below the seafloor. *Environmental microbiology*, 17(5), 1817-1835.
- Kato, S., Takano, Y., Kakegawa, T., Oba, H., Inoue, K., Kobayashi, C., Utsumi, M., Marumo, K., Kobayashi, K., & Ito, Y. (2010). Biogeography and biodiversity in sulfide structures of active and inactive vents at deep-sea hydrothermal fields of the Southern Mariana Trough. *Applied and environmental microbiology*, 76(9), 2968-2979.
- Kecha, M., Benallaoua, S., Touzel, J. P., Bonaly, R., & Duchiron, F. (2007). Biochemical and phylogenetic characterization of a novel terrestrial hyperthermophilic archaeon pertaining to the genus *Pyrococcus* from an Algerian hydrothermal hot spring. *Extremophiles*, 11(1), 65-73.
- Kelley, D. S., Baross, J. A., & Delaney, J. R. (2002). Volcanoes, fluids, and life at mid-ocean ridge spreading centers. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 30(1), 385-491.
- Kelley, D. S., Karson, J. A., Blackman, D. K., Fruëh-Green, G. L., Butterfield, D. A., Lilley, M. D., Olson, E. J., Schrenk, M. O., Roe, K. K., & Lebon, G. T. (2001). An off-axis hydrothermal vent field near the Mid-Atlantic Ridge at 30 N. *Nature*, 412(6843), 145-149.

- Kelley, D. S., Karson, J. A., Früh-Green, G. L., Yoerger, D. R., Shank, T. M., Butterfield, D. A., Hayes, J. M., Schrenk, M. O., Olson, E. J., & Proskurowski, G. (2005). A serpentinite-hosted ecosystem: the Lost City hydrothermal field. *Science*, *307*(5714), 1428-1434.
- Kengen, S. M., & Stams, A. J. (1994). Growth and energy conservation in batch cultures of *Pyrococcus furiosus*. *FEMS microbiology letters*, *117*(3), 305-309.
- Kengen, S. W., Tuininga, J. E., de Bok, F. A., Stams, A. J., & de Vos, W. M. (1995). Purification and characterization of a novel ADP-dependent glucokinase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(51), 30453-30457.
- Kennedy, C., Scott, S., & Ferris, F. (2003). Characterization of bacteriogenic iron oxide deposits from Axial Volcano, Juan de Fuca Ridge, northeast Pacific Ocean. *Geomicrobiology Journal*, *20*(3), 199-214.
- Kim, M.-S., Bae, S. S., Kim, Y. J., Kim, T. W., Lim, J. K., Lee, S. H., Choi, A. R., Jeon, J. H., Lee, J.-H., & Lee, H. S. (2013). CO-dependent H₂ production by genetically engineered *Thermococcus onnurineus* NA1. *Appl. Environ. Microbiol.*, *79*(6), 2048-2053.
- Kim, M.-S., Choi, A. R., Lee, S. H., Jung, H.-C., Bae, S. S., Yang, T.-J., Jeon, J. H., Lim, J. K., Youn, H., & Kim, T. W. (2015). A novel CO-responsive transcriptional regulator and enhanced H₂ production by an engineered *Thermococcus onnurineus* NA1 strain. *Applied and environmental microbiology*, *81*(5), 1708-1714.
- Kim, Y. J., Lee, H. S., Kim, E. S., Bae, S. S., Lim, J. K., Matsumi, R., Lebedinsky, A. V., Sokolova, T. G., Kozhevnikova, D. A., & Cha, S.-S. (2010). Formate-driven growth coupled with H₂ production. *Nature*, *467*(7313), 352.
- King, D. W., Lounsbury, H. A., & Millero, F. J. (1995). Rates and mechanism of Fe (II) oxidation at nanomolar total iron concentrations. *Environmental science & technology*, *29*(3), 818-824.
- Klein, F., Bach, W., & McCollom, T. M. (2013). Compositional controls on hydrogen generation during serpentinization of ultramafic rocks. *Lithos*, *178*, 55-69.
- Klein, M., Friedrich, M., Roger, A. J., Hugenholtz, P., Fishbain, S., Abicht, H., Blackall, L. L., Stahl, D. A., & Wagner, M. (2001). Multiple lateral transfers of dissimilatory sulfite reductase genes between major lineages of sulfate-reducing prokaryotes. *Journal of bacteriology*, *183*(20), 6028-6035.
- Kletzin, A., & Adams, M. (1996). Molecular and phylogenetic characterization of pyruvate and 2-ketoisovalerate ferredoxin oxidoreductases from *Pyrococcus furiosus* and pyruvate ferredoxin oxidoreductase from *Thermotoga maritima*. *Journal of Bacteriology*, *178*(1), 248-257.
- Klevenz, V., Sander, S. G., Perner, M., & Koschinsky, A. (2012). Amelioration of free copper by hydrothermal vent microbes as a response to high copper concentrations. *Chemistry and Ecology*, *28*(5), 405-420.
- Knief, C. (2015). Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on *pmoA* as molecular marker. *Frontiers in microbiology*, *6*, 1346.
- Knittel, K., & Boetius, A. (2009). Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annual review of microbiology*, *63*, 311-334.
- Kobori, H., Ogino, M., Orita, I., Nakamura, S., Imanaka, T., & Fukui, T. (2010). Characterization of NADH oxidase/NADPH polysulfide oxidoreductase and its unexpected participation in oxygen sensitivity in an anaerobic hyperthermophilic archaeon. *Journal of bacteriology*, *192*(19), 5192-5202.
- Koch, C., & Harnisch, F. (2016). Is there a specific ecological niche for electroactive microorganisms? *ChemElectroChem*, *3*(9), 1282-1295.
- Kojima, H., Umezawa, K., & Fukui, M. (2016). *Caldimicrobium thiodismutans* sp. nov., a sulfur-disproportionating bacterium isolated from a hot spring, and emended description of the genus *Caldimicrobium*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *66*(4), 1828-1831.
- Komeili, A. (2012). Molecular mechanisms of compartmentalization and biomineralization in magnetotactic bacteria. *FEMS microbiology reviews*, *36*(1), 232-255.
- Koning, S. M., Elferink, M. G., Konings, W. N., & Driessen, A. J. (2001). Cellobiose Uptake in the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* Is Mediated by an Inducible, High-Affinity ABC Transporter. *Journal of bacteriology*, *183*(17), 4979-4984.
- Konn, C., Charlou, J.-L., Donval, J.-P., Holm, N., Dehairs, F., & Bouillon, S. (2009). Hydrocarbons and oxidized organic compounds in hydrothermal fluids from Rainbow and Lost City ultramafic-hosted vents. *Chemical Geology*, *258*(3-4), 299-314.
- Kono, T., Mehrotra, S., Endo, C., Kizu, N., Matusda, M., Kimura, H., Mizohata, E., Inoue, T., Hasunuma, T.,

- & Yokota, A. (2017). A RuBisCO-mediated carbon metabolic pathway in methanogenic archaea. *Nature communications*, 8(1), 1-12.
- Kormas, K. A., Smith, D. C., Edgcomb, V., & Teske, A. (2003). Molecular analysis of deep subsurface microbial communities in Nankai Trough sediments (ODP Leg 190, Site 1176). *FEMS Microbiology Ecology*, 45(2), 115-125.
- Kormas, K. A., Tivey, M. K., Von Damm, K., & Teske, A. (2006). Bacterial and archaeal phylotypes associated with distinct mineralogical layers of a white smoker spire from a deep-sea hydrothermal vent site (9° N, East Pacific Rise). *Environmental Microbiology*, 8(5), 909-920.
- Koski, R. A., Jonasson, I. R., Kadko, D. C., Smith, V. K., & Wong, F. L. (1994). Compositions, growth mechanisms, and temporal relations of hydrothermal sulfide-sulfate-silica chimneys at the northern Cleft segment, Juan de Fuca Ridge. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 99(B3), 4813-4832.
- Kozhevnikova, D., Taranov, E., Lebedinsky, A., Bonch-Osmolovskaya, E., & Sokolova, T. (2016). Hydrogenogenic and sulfidogenic growth of *Thermococcus* archaea on carbon monoxide and formate. *Microbiology*, 85(4), 400-410.
- Kurr, M., Huber, R., König, H., Jannasch, H. W., Fricke, H., Trincone, A., Kristjansson, J. K., & Stetter, K. O. (1991). *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110 C. *Archives of Microbiology*, 156(4), 239-247.
- Kuwabara, T., Minaba, M., Saida, H., Urabe, T., & Kamekura, M. (2007). In situ culture of thermophilic/hyperthermophilic anaerobes of hydrothermal vents. Proceedings of International Symposium on Extremophiles and Their Applications International Symposium on Extremophiles and Their Applications 2005,
- Kuypers, M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 263.
- Kádár, E., Costa, V., Martins, I., Santos, R. S., & Powell, J. J. (2005). Enrichment in trace metals (Al, Mn, Co, Cu, Mo, Cd, Fe, Zn, Pb and Hg) of macro-invertebrate habitats at hydrothermal vents along the Mid-atlantic Ridge. *Hydrobiologia*, 548(1), 191-205.
- Kägi, J. H. (1991). [69] Overview of metallothionein. *Methods in enzymology*, 205, 613-626.
- König, H., Skorko, R., Zillig, W., & Reiter, W.-D. (1982). Glycogen in thermoacidophilic archaeobacteria of the genera *Sulfolobus*, *Thermoproteus*, *Desulfurococcus* and *Thermococcus*. *Archives of Microbiology*, 132(4), 297-303.
- Könneke, M., Bernhard, A. E., José, R., Walker, C. B., Waterbury, J. B., & Stahl, D. A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 437(7058), 543-546.
- L
- l'Haridon, S., Cilia, V., Messner, P., Raguene, G., Gambacorta, A., Sleytr, U., Prieur, D., & Jeanthon, C. (1998). *Desulfurobacterium thermolithotrophum* gen. nov., sp. nov., a novel autotrophic, sulphur-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(3), 701-711.
- Lalou, C., Reyss, J. L., Bricchet, E., Arnold, M., Thompson, G., Fouquet, Y., & Rona, P. A. (1993). New age data for Mid-Atlantic Ridge hydrothermal sites: TAG and Snakepit chronology revisited. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 98(B6), 9705-9713.
- Lam, P., Cowen, J. P., & Jones, R. D. (2004). Autotrophic ammonia oxidation in a deep-sea hydrothermal plume. *FEMS microbiology ecology*, 47(2), 191-206.
- Lam, P., Cowen, J. P., Popp, B. N., & Jones, R. D. (2008). Microbial ammonia oxidation and enhanced nitrogen cycling in the Endeavour hydrothermal plume. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(9), 2268-2286.
- Landreau, M. (2016). *Immobilisation et culture continue en bioréacteur gas-lift de microorganismes marins thermophiles et hyperthermophiles anaérobies* Université de Bretagne occidentale-Brest].
- Lang, S. Q., Butterfield, D. A., Schulte, M., Kelley, D. S., & Lilley, M. D. (2010). Elevated concentrations of formate, acetate and dissolved organic carbon found at the Lost City hydrothermal field. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74(3), 941-952.
- Lang, S. Q., Früh-Green, G. L., Bernasconi, S. M., Brazelton, W. J., Schrenk, M. O., & McGonigle, J. M. (2018). Deeply-sourced formate fuels sulfate reducers but not methanogens at Lost City hydrothermal field. *Scientific reports*, 8(1), 755.
- Lang, S. Q., Früh-Green, G., Bernasconi, S., & Butterfield, D. (2013). Sources of organic nitrogen at the serpentinite-hosted Lost City hydrothermal field. *Geobiology*, 11(2), 154-169.

- Langmuir, C., Charlou, J.-L., Colodner, D., Costa, I., Desbruyeres, D., Desonie, D., Emerson, T., Fornari, D., Fouquet, Y., & Humphris, S. (1993). Lucky strike—a newly discovered hydrothermal site on the Azores platform. *Ridge Events*, 4(2), 3-5.
- Lee, H.-S., Shockley, K. R., Schut, G. J., Conners, S. B., Montero, C. I., Johnson, M. R., Chou, C.-J., Bridger, S. L., Wigner, N., & Brehm, S. D. (2006). Transcriptional and biochemical analysis of starch metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of bacteriology*, 188(6), 2115-2125.
- Lee, H. S., Kang, S. G., Bae, S. S., Lim, J. K., Cho, Y., Kim, Y. J., Jeon, J. H., Cha, S.-S., Kwon, K. K., & Kim, H.-T. (2008). The complete genome sequence of *Thermococcus onnurineus* NA1 reveals a mixed heterotrophic and carboxydrotrophic metabolism. *Journal of bacteriology*, 190(22), 7491-7499.
- Lee, S. H., Kim, M.-S., Kim, Y. J., Kim, T. W., Kang, S. G., & Lee, H. S. (2017). Transcriptomic profiling and its implications for the H₂ production of a non-methanogen deficient in the frhAGB-encoding hydrogenase. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(12), 5081-5088.
- Lees, H., & Simpson, J. (1957). The biochemistry of the nitrifying organisms. 5. Nitrite oxidation by *Nitrobacter*. *Biochemical Journal*, 65(2), 297-305.
- Leigh, J. A. (2000). Nitrogen fixation in methanogens: the archaeal perspective. *Current issues in molecular biology*, 2, 125-131.
- Leigh, J. A., Albers, S.-V., Atomi, H., & Allers, T. (2011). Model organisms for genetics in the domain Archaea: methanogens, halophiles, Thermococcales and Sulfolobales. *FEMS microbiology reviews*, 35(4), 577-608.
- Lein, A. Y., Gurvich, E., Bogdanov, Y. A., & Grichuk, D. (2000). A new type of hydrogen-and methane-rich hydrothermal solutions in the Rift zone of the Mid-Atlantic Ridge. *Doklady Earth Sciences*.
- Lemor, M., Kong, Z., Henry, E., Brizard, R., Laurent, S., Bossé, A., & Henneke, G. (2018). Differential activities of DNA polymerases in processing ribonucleotides during DNA synthesis in archaea. *Journal of molecular biology*, 430(24), 4908-4924.
- Lesniewski, R. A., Jain, S., Anantharaman, K., Schloss, P. D., & Dick, G. J. (2012). The metatranscriptome of a deep-sea hydrothermal plume is dominated by water column methanotrophs and lithotrophs. *The ISME journal*, 6(12), 2257-2268.
- Lesongeur, F., Briand, P., Godfroy, A., Crassous, P., Byrne, N., & Khripounoff, A. (2014). Export of deep-sea hydrothermal particles, indigenous thermophilic microorganisms and larvae to the surrounding Ocean. *Cahiers de biologie marine*, 55(4), 409-420.
- Leveille, R. J., & Juniper, S. K. (2002). Microbial colonization and weathering of sulphide minerals at deep-sea hydrothermal vents: in situ exposure experiments. *Cahiers de biologie marine*, 43(3/4), 285-288.
- Lever, M. A., & Teske, A. P. (2015). Diversity of methane-cycling archaea in hydrothermal sediment investigated by general and group-specific PCR primers. *Applied and environmental microbiology*, 81(4), 1426-1441.
- Li, J., Zhou, H., Fang, J., Sun, Y., & Dasgupta, S. (2014). Microbial distribution in different spatial positions within the walls of a black sulfide hydrothermal chimney. *Marine Ecology Progress Series*, 508, 67-85.
- Lilley, M., Butterfield, D., Olson, E., Lupton, J., Macko, S., & McDuff, R. (1993). Anomalous CH₄ and NH₄⁺ concentrations at an unsedimented mid-ocean-ridge hydrothermal system. *Nature*, 364(6432), 45-47.
- Lim, J. K., Bae, S. S., Kim, T. W., Lee, J.-H., Lee, H. S., & Kang, S. G. (2012). Thermodynamics of formate-oxidizing metabolism and implications for H₂ production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(20), 7393-7397.
- Lim, J. K., Mayer, F., Kang, S. G., & Müller, V. (2014). Energy conservation by oxidation of formate to carbon dioxide and hydrogen via a sodium ion current in a hyperthermophilic archaeon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(31), 11497-11502.
- Lin, J., Breves, E., Dyar, M., Ver Eecke, H., Jamieson, J., & Holden, J. (2014). Magnetite formation from ferrihydrite by hyperthermophilic archaea from Endeavour Segment, Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent chimneys. *Geobiology*, 12(3), 200-211.
- Lin, T. J., El Sebae, G., Jung, J.-H., Jung, D.-H., Park, C.-S., & Holden, J. F. (2016). *Pyrodictium delaneyi* sp. nov., a hyperthermophilic autotrophic archaeon that reduces Fe (III) oxide and nitrate. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(9), 3372.
- Lipscomb, G. L., Keese, A. M., Cowart, D. M., Schut, G. J., Thomm, M., Adams, M. W., & Scott, R. A. (2009). SurR: a transcriptional activator and repressor controlling hydrogen and elemental sulphur metabolism in *Pyrococcus furiosus*. *Molecular microbiology*, 71(2), 332-349.
- Lipscomb, G. L., Schut, G. J., Thorgersen, M. P., Nixon, W. J., Kelly, R. M., & Adams, M. W. (2014). Engineering hydrogen gas production from formate in a

- hyperthermophile by heterologous production of an 18-subunit membrane-bound complex. *Journal of Biological Chemistry*, 289(5), 2873-2879.
- Lister, C. (1972). On the thermal balance of a mid-ocean ridge. *Geophysical Journal International*, 26(5), 515-535.
- Little, C., Herrington, R., Maslennikov, V., & Zaykov, V. (1998). The fossil record of hydrothermal vent communities. *Geological Society, London, Special Publications*, 148(1), 259-270.
- Lizama, H. M., & Suzuki, I. (1989). Rate equations and kinetic parameters of the reactions involved in pyrite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(11), 2918-2923.
- Ljungdahl, L. G. (2009). A life with acetogens, thermophiles, and cellulolytic anaerobes. *Annual review of microbiology*, 63, 1-25.
- Llanos, J., Capasso, C., Parisi, E., Prieur, D., & Jeanthon, C. (2000). Susceptibility to heavy metals and cadmium accumulation in aerobic and anaerobic thermophilic microorganisms isolated from deep-sea hydrothermal vents. *Current Microbiology*, 41(3), 201-205.
- Lloyd, D. (2006). Hydrogen sulfide: clandestine microbial messenger? *Trends in microbiology*, 14(10), 456-462.
- Lloyd, K. G., Edgcomb, V. P., Molyneaux, S. J., Böer, S., Wirsén, C. O., Atkins, M. S., & Teske, A. (2005). Effects of dissolved sulfide, pH, and temperature on growth and survival of marine hyperthermophilic archaea. *Applied and environmental microbiology*, 71(10), 6383-6387.
- Loaëc, M., Olier, R., & Guezennec, J. (1997). Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. *Water Research*, 31(5), 1171-1179.
- Longnecker, K., Sievert, S. M., Sylva, S. P., Seewald, J. S., & Kujawinski, E. B. (2018). Dissolved organic carbon compounds in deep-sea hydrothermal vent fluids from the East Pacific Rise at 9° 50' N. *Organic Geochemistry*, 125, 41-49.
- Lossouarn, J., Dupont, S., Gorlas, A., Mercier, C., Bienvenu, N., Marguet, E., Forterre, P., & Geslin, C. (2015). An abyssal mobilome: viruses, plasmids and vesicles from deep-sea hydrothermal vents. *Research in microbiology*, 166(10), 742-752.
- Lovley, D. R. (1991). Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 55(2), 259-287.
- Lovley, D. R. (1993). Dissimilatory metal reduction. *Annual review of microbiology*, 47(1), 263-290.
- Lovley, D. R., Holmes, D. E., & Nevin, K. P. (2004). Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction. *Advances in microbial physiology*, 49(2), 219-286.
- Lovley, D. R., & Phillips, E. J. (1986). Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Applied and environmental microbiology*, 51(4), 683-689.
- Lovley, D. R., & Phillips, E. J. (1988). Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Applied and environmental microbiology*, 54(6), 1472-1480.
- Lupton, J. E. (1996). A far-field hydrothermal plume from Loihi Seamount. *Science*, 272(5264), 976-979.
- Luther, G. W., Glazer, B., Ma, S., Trouwborst, R., Shultz, B. R., Druschel, G., & Kraiya, C. (2003). Iron and sulfur chemistry in a stratified lake: Evidence for iron-rich sulfide complexes. *Aquatic Geochemistry*, 9(2), 87-110.
- Luther, G. W., Rozan, T. F., Taillefert, M., Nuzzio, D. B., Di Meo, C., Shank, T. M., Lutz, R. A., & Cary, S. C. (2001). Chemical speciation drives hydrothermal vent ecology. *Nature*, 410(6830), 813-816.
- Luther III, G. W., Glazer, B. T., Hohmann, L., Popp, J. I., Taillefert, M., Rozan, T. F., Brendel, P. J., Theberge, S. M., & Nuzzio, D. B. (2001). Sulfur speciation monitored in situ with solid state gold amalgam voltammetric microelectrodes: polysulfides as a special case in sediments, microbial mats and hydrothermal vent waters. *Journal of Environmental Monitoring*, 3(1), 61-66.
- Lösekan, T., Knittel, K., Nadalig, T., Fuchs, B., Niemann, H., Boetius, A., & Amann, R. (2007). Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea. *Applied and environmental microbiology*, 73(10), 3348-3362.
- Lü, W., Du, J., Schwarzer, N. J., Wacker, T., Andrade, S. L., & Einsle, O. (2013). The formate/nitrite transporter family of anion channels. *Biological chemistry*, 394(6), 715-727.



Ma, K., & Adams, M. W. (2001). [6 NAD (P) H: rubredoxin oxidoreductase from *Pyrococcus furiosus*. *Methods in enzymology*, 334, 55-62.

- Ma, K., Hutchins, A., Sung, S.-J. S., & Adams, M. W. (1997). Pyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*, functions as a CoA-dependent pyruvate decarboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(18), 9608-9613.
- Ma, K., Schicho, R. N., Kelly, R. M., & Adams, M. (1993). Hydrogenase of the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* is an elemental sulfur reductase or sulfhydrogenase: evidence for a sulfur-reducing hydrogenase ancestor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(11), 5341-5344.
- Macdonald, K. C. (1983). A geophysical comparison between fast and slow spreading centers: Constraints on magma chamber formation and hydrothermal activity. In *Hydrothermal Processes at seafloor spreading centers* (pp. 27-51). Springer.
- Macdonald, K. C., Becker, K., Spiess, F., & Ballard, R. (1980). Hydrothermal heat flux of the "black smoker" vents on the East Pacific Rise. *Earth and Planetary Science Letters*, *48*(1), 1-7.
- Maginn, E. J., Little, C. T., Herrington, R. J., & Mills, R. A. (2002). Sulphide mineralisation in the deep sea hydrothermal vent polychaete, *Alvinella pompejana*: implications for fossil preservation. *Marine Geology*, *181*(4), 337-356.
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., & Dunthorn, M. (2014). Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ*, *2*, e593.
- Mai, X., & Adams, M. (1994). Indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. A new enzyme involved in peptide fermentation. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(24), 16726-16732.
- Mai, X., & Adams, M. (1996). Characterization of a fourth type of 2-keto acid-oxidizing enzyme from a hyperthermophilic archaeon: 2-ketoglutarate ferredoxin oxidoreductase from *Thermococcus litoralis*. *Journal of bacteriology*, *178*(20), 5890-5896.
- Makita, H., Tanaka, E., Mitsunobu, S., Miyazaki, M., Nunoura, T., Uematsu, K., Takaki, Y., Nishi, S., Shimamura, S., & Takai, K. (2017). *Mariprofundus micogutta* sp. nov., a novel iron-oxidizing zetaproteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal field at the Bayonnaise knoll of the Izu-Ogasawara arc, and a description of *Mariprofundales* ord. nov. and *Zetaproteobacteria* classis nov. *Archives of microbiology*, *199*(2), 335-346.
- Malik, B., Su, W. w., Wald, H., Blumentals, I., & Kelly, R. (1989). Growth and gas production for hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*. *Biotechnology and bioengineering*, *34*(8), 1050-1057.
- Maltman, C., Walter, G., & Yurkov, V. (2016). A diverse community of metal (loid) oxide respiring bacteria is associated with tube worms in the vicinity of the Juan de Fuca Ridge black smoker field. *PLoS one*, *11*(2), e0149812.
- Mardanov, A. V., Beletsky, A. V., Kadnikov, V. V., Slobodkin, A. I., & Ravin, N. V. (2016). Genome analysis of *Thermosulfurimonas dismutans*, the first thermophilic sulfur-disproportionating bacterium of the phylum *Thermodesulfobacteria*. *Frontiers in microbiology*, *7*, 950.
- Mardanov, A. V., Ravin, N. V., Svetlitchnyi, V. A., Beletsky, A. V., Miroshnichenko, M. L., Bonch-Osmolovskaya, E. A., & Skryabin, K. G. (2009). Metabolic versatility and indigenous origin of the archaeon *Thermococcus sibiricus*, isolated from a siberian oil reservoir, as revealed by genome analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, *75*(13), 4580-4588.
- Markert, S., Arndt, C., Felbeck, H., Becher, D., Sievert, S. M., Hügler, M., Albrecht, D., Robidart, J., Bench, S., & Feldman, R. A. (2007). Physiological proteomics of the uncultured endosymbiont of *Riftia pachyptila*. *Science*, *315*(5809), 247-250.
- Marlow, J. J., Steele, J. A., Case, D. H., Connon, S. A., Levin, L. A., & Orphan, V. J. (2014). Microbial abundance and diversity patterns associated with sediments and carbonates from the methane seep environments of Hydrate Ridge, OR. *Frontiers in Marine Science*, *1*, 44.
- Marteinsson, V. T., Birrien, J.-L., Reysenbach, A.-L., Vernet, M., Marie, D., Gambacorta, A., Messner, P., Sleytr, U. B., & Prieur, D. (1999). *Thermococcus barophilus* sp. nov., a new barophilic and hyperthermophilic archaeon isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *49*(2), 351-359.
- Marteinsson, V. T., Moulin, P., Birrien, J., Gambacorta, A., Vernet, M., & Prieur, D. (1997). Physiological responses to stress conditions and barophilic behavior of the hyperthermophilic vent Archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Applied and environmental microbiology*, *63*(4), 1230-1236.
- Maruyama, A., Urabe, T., Ishibashi, J., Feely, R. A., & Baker, E. T. (1998). Global hydrothermal primary production rate estimated from the southern East Pacific Rise. *Cah. Biol. Mar.*, *39*, 249-252.

- Mayer, F., & Müller, V. (2014). Adaptations of anaerobic archaea to life under extreme energy limitation. *FEMS microbiology reviews*, 38(3), 449-472.
- McCliment, E. A., Voglesonger, K. M., O'Day, P. A., Dunn, E. E., Holloway, J. R., & Cary, S. C. (2006). Colonization of nascent, deep-sea hydrothermal vents by a novel Archaeal and Nanoarchaeal assemblage. *Environmental Microbiology*, 8(1), 114-125.
- McCollom, T. M. (2000). Geochemical constraints on primary productivity in submarine hydrothermal vent plumes. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 47(1), 85-101.
- McCollom, T. M. (2007). Geochemical constraints on sources of metabolic energy for chemolithoautotrophy in ultramafic-hosted deep-sea hydrothermal systems. *Astrobiology*, 7(6), 933-950.
- McCollom, T. M., & Shock, E. L. (1997). Geochemical constraints on chemolithoautotrophic metabolism by microorganisms in seafloor hydrothermal systems. *Geochimica et cosmochimica acta*, 61(20), 4375-4391.
- McDermott, J. M., Seewald, J. S., German, C. R., & Sylva, S. P. (2015). Pathways for abiotic organic synthesis at submarine hydrothermal fields. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(25), 7668-7672.
- 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(2), 205-210.
- McKenzie, D. P., & Parker, R. L. (1967). The North Pacific: an example of tectonics on a sphere. *Nature*, 216(5122), 1276-1280.
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS one*, 8(4), e61217.
- McNichol, J., Stryhanyuk, H., Sylva, S. P., Thomas, F., Musat, N., Seewald, J. S., & Sievert, S. M. (2018). Primary productivity below the seafloor at deep-sea hot springs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(26), 6756-6761.
- Mehta, M. P., & Baross, J. A. (2006). Nitrogen fixation at 92 °C by a hydrothermal vent archaeon. *Science*, 314(5806), 1783-1786.
- Mehta, M. P., Butterfield, D. A., & Baross, J. A. (2003). Phylogenetic diversity of nitrogenase (*nifH*) genes in deep-sea and hydrothermal vent environments of the Juan de Fuca Ridge. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 960-970.
- Meier, D. (2016). *Bacterial niche adaptation at hydrothermal vents* [Universität Bremen].
- Meng, X., Li, X., Chu, F., Fu, B., Lei, J., Li, Z., Wang, H., & Chen, L. (2019). Multi-stage growth and fluid evolution of a hydrothermal sulphide chimney in the East Pacific Ridge 1–2 S hydrothermal field: constraints from in situ sulphur isotopes. *Geological Magazine*, 156(6), 989-1002.
- Michoud, G., & Jebbar, M. (2016). High hydrostatic pressure adaptive strategies in an obligate piezophile *Pyrococcus yayanosii*. *Scientific reports*, 6(1), 1-10.
- Michoud, G. (2014). *Etude des effets des hautes pressions hydrostatiques sur *Pyrococcus yayanosii*, un piézophile extrême par une approche multi-"omics"* Université de Bretagne occidentale-Brest].
- Middelburg, J. J. (2011). Chemoautotrophy in the ocean. *Geophysical Research Letters*, 38(24).
- Milucka, J., Ferdelman, T. G., Polerecky, L., Franzke, D., Wegener, G., Schmid, M., Lieberwirth, I., Wagner, M., Widdel, F., & Kuypers, M. M. (2012). Zero-valent sulphur is a key intermediate in marine methane oxidation. *Nature*, 491(7425), 541-546.
- Minic, Z., Serre, V., & Hervé, G. (2006). Adaptation des organismes aux conditions extrêmes des sources hydrothermales marines profondes. *Comptes Rendus Biologies*, 329(7), 527-540.
- Miroshnichenko, M. L., Hippe, H., Stackebrandt, E., Kostrikina, N. A., Chernyh, N. A., Jeanthon, C., Nazina, T. N., Belyaev, S. S., & Bonch-Osmolovskaya, E. A. (2001). Isolation and characterization of *Thermococcus sibiricus* sp. nov. from a Western Siberia high-temperature oil reservoir. *Extremophiles*, 5(2), 85-91.
- Miroshnichenko, M. L., Kostrikina, N. A., Chernyh, N. A., Pimenov, N. V., Tourova, T. P., Antipov, A. N., Spring, S., Stackebrandt, E., & Bonch-Osmolovskaya, E. A. (2003). *Caldithrix abyssi* gen. nov., sp. nov., a nitrate-reducing, thermophilic, anaerobic bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent, represents a novel bacterial lineage. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(1), 323-329.
- Miyazaki, J., Higa, R., Toki, T., Ashi, J., Tsunogai, U., Nunoura, T., Imachi, H., & Takai, K. (2009). Molecular characterization of potential nitrogen fixation by anaerobic methane-oxidizing archaea in the methane seep sediments at the number 8 Kumano Knoll in the Kumano Basin, offshore of Japan. *Applied and environmental microbiology*, 75(22), 7153-7162.

- Moalic, Y., Desbruyères, D., Duarte, C. M., Rozenfeld, A. F., Bachraty, C., & Arnaud-Haond, S. (2012). Biogeography revisited with network theory: retracing the history of hydrothermal vent communities. *Systematic Biology*, *61*(1), 127.
- Molitor, M., Dahl, C., Molitor, I., Schäfer, U., Speich, N., Huber, R., Deutzmann, R., & Trüper, H. G. (1998). A dissimilatory sirohaem-sulfite-reductase-type protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum islandicum*. *Microbiology*, *144*(2), 529-541.
- Moon, Y.-J., Kwon, J., Yun, S.-H., Lim, H. L., Kim, M.-S., Kang, S. G., Lee, J.-H., Choi, J.-S., Kim, S. I., & Chung, Y.-H. (2012). Proteome analyses of hydrogen-producing hyperthermophilic archaeon *Thermococcus onnurineus* NA1 in different one-carbon substrate culture conditions. *Molecular & Cellular Proteomics*, *11*(6), M111. 015420.
- Moreno-Vivián, C., Cabello, P., Martínez-Luque, M., Blasco, R., & Castillo, F. (1999). Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *Journal of bacteriology*, *181*(21), 6573-6584.
- Mori, J. F., Scott, J. J., Hager, K. W., Moyer, C. L., Küsel, K., & Emerson, D. (2017). Physiological and ecological implications of an iron-or hydrogen-oxidizing member of the Zetaproteobacteria, *Ghiorsea bivora*, gen. nov., sp. nov. *The ISME journal*, *11*(11), 2624-2636.
- Morikawa, M., Izawa, Y., Rashid, N., Hoaki, T., & Imanaka, T. (1994). Purification and characterization of a thermostable thiol protease from a newly isolated hyperthermophilic *Pyrococcus* sp. *Applied and environmental microbiology*, *60*(12), 4559-4566.
- Mossman, D., Reimer, T., & Durstling, H. (1999). Microbial processes in gold migration and deposition: modern analogues to ancient deposits. *Geoscience Canada*.
- Mottl, M. J., & Wheat, C. G. (1994). Hydrothermal circulation through mid-ocean ridge flanks: Fluxes of heat and magnesium. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *58*(10), 2225-2237.
- Moussard, H., Corre, E., Cambon-Bonavita, M.-A., Fouquet, Y., & Jeanthon, C. (2006). Novel uncultured Epsilonproteobacteria dominate a filamentous sulphur mat from the 13 N hydrothermal vent field, East Pacific Rise. *FEMS microbiology ecology*, *58*(3), 449-463.
- Moyer, C. L., Tiedje, J. M., Dobbs, F. C., & Karl, D. M. (1998). Diversity of deep-sea hydrothermal vent Archaea from Loihi Seamount, Hawaii. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, *45*(1-3), 303-317.
- Mukherjee, M., Vajpai, M., & Sankaramakrishnan, R. (2017). Anion-selective formate/nitrite transporters: taxonomic distribution, phylogenetic analysis and subfamily-specific conservation pattern in prokaryotes. *BMC genomics*, *18*(1), 1-19.
- Mukund, S., & Adams, M. (1991). The novel tungsten-iron-sulfur protein of the hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, is an aldehyde ferredoxin oxidoreductase. Evidence for its participation in a unique glycolytic pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(22), 14208-14216.
- Mukund, S., & Adams, M. W. (1995). Glyceraldehyde-3-phosphate ferredoxin oxidoreductase, a novel tungsten-containing enzyme with a potential glycolytic role in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(15), 8389-8392.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology,
- Muralidharan, V., Rinker, K., Hirsh, I., Bouwer, E., & Kelly, R. (1997). Hydrogen transfer between methanogens and fermentative heterotrophs in hyperthermophilic cocultures. *Biotechnology and bioengineering*, *56*(3), 268-278.
- Muyzer, G., & Stams, A. J. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature reviews microbiology*, *6*(6), 441-454.
- Mével, G., & Prieur, D. (1998). Thermophilic heterotrophic nitrifiers isolated from Mid-Atlantic Ridge deep-sea hydrothermal vents. *Canadian journal of microbiology*, *44*(8), 723-733.

N

- Nakagawa, S., & Takai, K. (2008). Deep-sea vent chemoautotrophs: diversity, biochemistry and ecological significance. *FEMS microbiology ecology*, *65*(1), 1-14.
- Nakagawa, S., Takai, K., Horikoshi, K., & Sako, Y. (2003). *Persephonella hydrogeniphila* sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *53*(3), 863-869.
- Nakagawa, S., Takai, K., Horikoshi, K., & Sako, Y. (2004). *Aeropyrum camini* sp. nov., a strictly aerobic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *International journal*

- of systematic and evolutionary microbiology, 54(2), 329-335.
- Nakagawa, S., Takai, K., Inagaki, F., Hirayama, H., Nunoura, T., Horikoshi, K., & Sako, Y. (2005). Distribution, phylogenetic diversity and physiological characteristics of epsilon-Proteobacteria in a deep-sea hydrothermal field. *Environmental microbiology*, 7(10), 1619-1632.
- Nakagawa, S., Takaki, Y., Shimamura, S., Reysenbach, A.-L., Takai, K., & Horikoshi, K. (2007). Deep-sea vent ϵ -proteobacterial genomes provide insights into emergence of pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(29), 12146-12150.
- Nakamura, R., Takashima, T., Kato, S., Takai, K., Yamamoto, M., & Hashimoto, K. (2010). Electrical current generation across a black smoker chimney. *Angewandte Chemie*, 122(42), 7858-7860.
- Nealson, K. H., Inagaki, F., & Takai, K. (2005). Hydrogen-driven subsurface lithoautotrophic microbial ecosystems (SLiMEs): do they exist and why should we care? *Trends in microbiology*, 13(9), 405-410.
- Nelson, D. C., Wirsén, C. O., & Jannasch, H. W. (1989). Characterization of large, autotrophic Beggiatoa spp. abundant at hydrothermal vents of the Guaymas Basin. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(11), 2909-2917.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.
- Nercessian, O. (2003). *Etude de la diversité spécifique et fonctionnelle des communautés microbiennes associées à des sources hydrothermales marines profondes par des approches moléculaires* [Brest].
- Nercessian, O., Bienvenu, N., Moreira, D., Prieur, D., & Jeanthon, C. (2005). Diversity of functional genes of methanogens, methanotrophs and sulfate reducers in deep-sea hydrothermal environments. *Environmental microbiology*, 7(1), 118-132.
- Nercessian, O., Reysenbach, A. L., Prieur, D., & Jeanthon, C. (2003). Archaeal diversity associated with in situ samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise (13 N). *Environmental Microbiology*, 5(6), 492-502.
- Nielsen, L. P., Risgaard-Petersen, N., Fossing, H., Christensen, P. B., & Sayama, M. (2010). Electric currents couple spatially separated biogeochemical processes in marine sediment. *Nature*, 463(7284), 1071-1074.
- Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Applied microbiology and biotechnology*, 51(6), 730-750.
- Nishizawa, M., Miyazaki, J., Makabe, A., Koba, K., & Takai, K. (2014). Physiological and isotopic characteristics of nitrogen fixation by hyperthermophilic methanogens: key insights into nitrogen anabolism of the microbial communities in Archean hydrothermal systems. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 138, 117-135.
- 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. *The ISME journal*, 10(10), 2478-2487.
- Nohara, K., Orita, I., Nakamura, S., Imanaka, T., & Fukui, T. (2014). Genetic examination and mass balance analysis of pyruvate/amino acid oxidation pathways in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *Journal of bacteriology*, 196(22), 3831-3839.
- Nunoura, T., Oida, H., Nakaseama, M., Kosaka, A., Ohkubo, S. B., Kikuchi, T., Kazama, H., Hosoi-Tanabe, S., Nakamura, K.-i., & Kinoshita, M. (2010). Archaeal diversity and distribution along thermal and geochemical gradients in hydrothermal sediments at the Yonaguni Knoll IV hydrothermal field in the Southern Okinawa Trough. *Applied and environmental microbiology*, 76(4), 1198-1211.
- Nunoura, T., Takaki, Y., Kazama, H., Hirai, M., Ashi, J., Imachi, H., & Takai, K. (2009). Microbial diversity in deep-sea methane seep sediments presented by SSU rRNA gene tag sequencing. *Microbes and Environments*, 1204130377-1204130377.

O

- Offre, P., Spang, A., & Schleper, C. (2013). Archaea in biogeochemical cycles. *Annual review of microbiology*, 67.
- Oger, P., Sokolova, T. G., Kozhevnikova, D. A., Taranov, E. A., Vannier, P., Lee, H. S., Kwon, K. K., Kang, S. G., Lee, J.-H., & Bonch-Osmolovskaya, E. A. (2016). Complete genome sequence of the hyperthermophilic and piezophilic archaeon *Thermococcus barophilus* Ch5, capable of growth at the expense of hydrogenogenesis from carbon monoxide and formate. *Genome announcements*, 4(1).
- Oger, P. M., & Jebbar, M. (2010). The many ways of coping with pressure. *Research in microbiology*, 161(10), 799-809.
- Orcutt, B. N., Sylvan, J. B., Knab, N. J., & Edwards, K. J. (2011). Microbial ecology of the dark ocean above, at, and below the seafloor. *Microbiology and molecular biology reviews*, 75(2), 361-422.

- 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(5529), 484-487.
- O'Brien, C. E., Giovannelli, D., Govenar, B., Luther, G. W., Lutz, R. A., Shank, T. M., & Vetriani, C. (2015). Microbial biofilms associated with fluid chemistry and megafaunal colonization at post-eruptive deep-sea hydrothermal vents. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 121, 31-40.
- P**
- Pace, N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276(5313), 734-740.
- Pace, N. R. (2009). Problems with "prokaryote". *Journal of bacteriology*, 191(7), 2008-2010.
- Pagé, A., Tivey, M. K., Stakes, D. S., & Reysenbach, A. L. (2008). Temporal and spatial archaeal colonization of hydrothermal vent deposits. *Environmental Microbiology*, 10(4), 874-884.
- Paradis, S., Jonasson, I. R., Le Cheminant, G. M., & Watkinsons, D. H. (1988). Two zinc-rich chimneys from the Plume Site, southern Juan de Fuca Ridge. *The Canadian Mineralogist*, 26(3), 637-654.
- Parkes, R. J., Gibson, G., Mueller-Harvey, I., Buckingham, W., & Herbert, R. (1989). Determination of the substrates for sulphate-reducing bacteria within marine and estuarine sediments with different rates of sulphate reduction. *Microbiology*, 135(1), 175-187.
- Parkes, R. J., Webster, H. S. G., & Watkins, A. (2010). 36 Methods for Studying Methanogens and Methanogenesis in Marine Sediments.
- Parte, A. C. (2018). LPSN—List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio. net), 20 years on. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(6), 1825-1829.
- Peng, X., Zhou, H., Tang, S., Yao, H., Jiang, L., & Wu, Z. (2008). Early-stage mineralization of hydrothermal tubeworms: New insights into the role of microorganisms in the process of mineralization. *Chinese Science Bulletin*, 53(2), 251-261.
- Perfit, M. R., & Davidson, J. P. (2000). Plate tectonics and volcanism. *Encyclopedia of Volcanoes*, 89-113.
- Pernthaler, A., Dekas, A. E., Brown, C. T., Goffredi, S. K., Embaye, T., & Orphan, V. J. (2008). Diverse syntrophic partnerships from deep-sea methane vents revealed by direct cell capture and metagenomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(19), 7052-7057.
- Petri, R., Podgorsek, L., & Imhoff, J. F. (2001). Phylogeny and distribution of the sox B gene among thiosulfate-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 197(2), 171-178.
- Pflugfelder, B., Fisher, C., & Bright, M. (2005). The color of the trophosome: elemental sulfur distribution in the endosymbionts of *Riftia pachyptila* (Vestimentifera; Siboglinidae). *Marine Biology*, 146(5), 895-901.
- Phillips, S. A., & Thornalley, P. J. (1993). The formation of methylglyoxal from triose phosphates: investigation using a specific assay for methylglyoxal. *European journal of biochemistry*, 212(1), 101-105.
- Picard, A., & Daniel, I. (2013). Pressure as an environmental parameter for microbial life—a review. *Biophysical chemistry*, 183, 30-41.
- Pikuta, E. V., Marsic, D., Itoh, T., Bej, A. K., Tang, J., Whitman, W. B., Ng, J. D., Garriott, O. K., & Hoover, R. B. (2007). *Thermococcus thio-reducens* sp. nov., a novel hyperthermophilic, obligately sulfur-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(7), 1612-1618.
- Pillot, G., Frouin, E., Pasero, E., Godfroy, A., Combet-Blanc, Y., Davidson, S., & Liebgott, P.-P. (2018). Specific enrichment of hyperthermophilic electroactive Archaea from deep-sea hydrothermal vent on electrically conductive support. *Bioresource technology*, 259, 304-311.
- Pimenov, N., Lein, A. Y., Sagalevich, A., & Ivanov, M. (2000). Carbon dioxide assimilation and methane oxidation in various zones of the rainbow hydrothermal field. *Microbiology*, 69(6), 689-697.
- Pisa, K. Y., Huber, H., Thomm, M., & Müller, V. (2007). A sodium ion-dependent A1AO ATP synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *The FEBS journal*, 274(15), 3928-3938.
- Pley, U., Schipka, J., Gambacorta, A., Jannasch, H. W., Fricke, H., Rachel, R., & Stetter, K. O. (1991). *Pyrodictium abyssi* sp. nov. represents a novel heterotrophic marine archaeal hyperthermophile growing at 110 °C. *Systematic and applied microbiology*, 14(3), 245-253.
- Pluchon, P.-F., Fouqueau, T., Crezé, C., Laurent, S., Briffotiaux, J., Hogrel, G., Palud, A., Henneke, G., Godfroy, A., & Hausner, W. (2013). An extended network of genomic maintenance in the archaeon *Pyrococcus abyssi* highlights unexpected

- associations between eucaryotic homologs. *PLoS One*, 8(11), e79707.
- Podar, M., Anderson, I., Makarova, K. S., Elkins, J. G., Ivanova, N., Wall, M. A., Lykidis, A., Mavromatis, K., Sun, H., & Hudson, M. E. (2008). A genomic analysis of the archaeal system *Ignicoccus hospitalis*-*Nanoarchaeum equitans*. *Genome biology*, 9(11), 1-18.
- Podowski, E. L., Ma, S., Luther III, G. W., Wardrop, D., & Fisher, C. R. (2010). Biotic and abiotic factors affecting distributions of megafauna in diffuse flow on andesite and basalt along the Eastern Lau Spreading Center, Tonga. *Marine Ecology Progress Series*, 418, 25-45.
- Polz, M. F., & Cavanaugh, C. M. (1995). Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(16), 7232-7236.
- Polz, M. F., Robinson, J. J., Cavanaugh, C. M., & Van Dover, C. L. (1998). Trophic ecology of massive shrimp aggregations at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Limnology and Oceanography*, 43(7), 1631-1638.
- Pond, D. W., Bell, M. V., Dixon, D. R., Fallick, A. E., Segonzac, M., & Sargent, J. R. (1998). Stable-carbon-isotope composition of fatty acids in hydrothermal vent mussels containing methanotrophic and thiotrophic bacterial endosymbionts. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1), 370-375.
- Poser, A., Vogt, C., Knöller, K., Ahlheim, J. r., Weiss, H., Kleinstüber, S., & Richnow, H.-H. (2014). Stable sulfur and oxygen isotope fractionation of anoxic sulfide oxidation by two different enzymatic pathways. *Environmental science & technology*, 48(16), 9094-9102.
- Postec, A., Lesongeur, F., Pignet, P., Ollivier, B., Querellou, J., & Godfroy, A. (2007). Continuous enrichment cultures: insights into prokaryotic diversity and metabolic interactions in deep-sea vent chimneys. *Extremophiles*, 11(6), 747-757.
- Postec, A., Pignet, P., Cuff-Gauchard, V., Schmitt, A., Querellou, J., & Godfroy, A. (2005). Optimisation of growth conditions for continuous culture of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus hydrothermalis* and development of sulphur-free defined and minimal media. *Research in Microbiology*, 156(1), 82-87.
- Powell, M., & Somero, G. (1986). Adaptations to sulfide by hydrothermal vent animals: sites and mechanisms of detoxification and metabolism. *The Biological Bulletin*, 171(1), 274-290.
- Powell, M., & Somero, G. N. (1983). Blood components prevent sulfide poisoning of respiration of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*. *Science*, 219(4582), 297-299.
- Preston, C. M., Wu, K. Y., Molinski, T. F., & DeLong, E. F. (1996). A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(13), 6241-6246.
- Prieur, D., Erauso, G., Geslin, C., Lucas, S., Gaillard, M., Bidault, A., Mattenet, A.-C., Rouault, K., Flament, D., & Forterre, P. (2004). Genetic elements of Thermococcales. *Biochemical Society Transactions*, 32(2), 184-187.
- Prieur, D., Erauso, G., & Jeanthon, C. (1995). Hyperthermophilic life at deep-sea hydrothermal vents. *Planetary and space science*, 43(1-2), 115-122.
- Proskurowski, G., Lilley, M. D., Seewald, J. S., Früh-Green, G. L., Olson, E. J., Lupton, J. E., Sylva, S. P., & Kelley, D. S. (2008). Abiogenic hydrocarbon production at Lost City hydrothermal field. *Science*, 319(5863), 604-607.
- Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H.-P., & Wagner, M. (2000). Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied and environmental microbiology*, 66(12), 5368-5382.
- Pérez-Rodríguez, I., Bohnert, K. A., Cuebas, M., Keddiss, R., & Vetriani, C. (2013). Detection and phylogenetic analysis of the membrane-bound nitrate reductase (Nar) in pure cultures and microbial communities from deep-sea hydrothermal vents. *FEMS microbiology ecology*, 86(2), 256-267.

Q

- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(D1), D590-D596.

R

- Rabus, R., Hansen, T. A., & Widdel, F. (2006). Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. *The prokaryotes*, 2, 659-768.

- Ragsdale, S. W., & Pierce, E. (2008). Acetogenesis and the Wood–Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1784(12), 1873-1898.
- Raguénès, G., Cambon-Bonavita, M. A., Lohier, J. F., Boisset, C., & Guezennec, J. (2003). A novel, highly viscous polysaccharide excreted by an *Alteromonas* isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *Current microbiology*, 46(6), 0448-0452.
- Ramos-Vera, W. H., Berg, I. A., & Fuchs, G. (2009). Autotrophic carbon dioxide assimilation in Thermoproteales revisited. *Journal of bacteriology*, 191(13), 4286-4297.
- Ramsay, B., Wiedenheft, B., Allen, M., Gauss, G. H., Lawrence, C. M., Young, M., & Douglas, T. (2006). Dps-like protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of inorganic biochemistry*, 100(5-6), 1061-1068.
- Rathgeber, C., Yurkova, N., Stackebrandt, E., Beatty, J. T., & Yurkov, V. (2002). Isolation of tellurite- and selenite-resistant bacteria from hydrothermal vents of the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4613-4622.
- Rau, G. H., & Hedges, J. I. (1979). Carbon-13 depletion in a hydrothermal vent mussel: suggestion of a chemosynthetic food source. *Science*, 203(4381), 648-649.
- Raven, N., Ladwa, N., Cossar, D., & Sharp, R. (1992). Continuous culture of the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus furiosus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 38(2), 263-267.
- Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R., & Blankenship, R. E. (2004). The natural history of nitrogen fixation. *Molecular biology and evolution*, 21(3), 541-554.
- Reeve, J. N., Nölling, J., Morgan, R. M., & Smith, D. R. (1997). Methanogenesis: genes, genomes, and who's on first? *Journal of bacteriology*, 179(19), 5975.
- Reeves, E. P., Yoshinaga, M. Y., Pjevac, P., Goldenstein, N. I., Peplies, J., Meyerdierks, A., Amann, R., Bach, W., & Hinrichs, K. U. (2014). Microbial lipids reveal carbon assimilation patterns on hydrothermal sulfide chimneys. *Environmental microbiology*, 16(11), 3515-3532.
- Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T., & Lovley, D. R. (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, 435(7045), 1098-1101.
- Reysenbach, A.-L., Liu, Y., Banta, A. B., Beveridge, T. J., Kirshtein, J. D., Schouten, S., Tivey, M. K., Von Damm, K. L., & Voytek, M. A. (2006). A ubiquitous thermoacidophilic archaeon from deep-sea hydrothermal vents. *Nature*, 442(7101), 444-447.
- Reysenbach, A.-L., Longnecker, K., & Kirshtein, J. (2000). Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Applied and environmental microbiology*, 66(9), 3798-3806.
- Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N. N., Anderson, I. J., Cheng, J.-F., Darling, A., Malfatti, S., Swan, B. K., & Gies, E. A. (2013). Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, 499(7459), 431.
- Robb, F. T., & Clark, D. S. (1999). Adaptation of proteins from hyperthermophiles to high pressure and high temperature. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 1(1), 101-105.
- Robb, F. T., Park, J.-B., & Adams, M. W. (1992). Characterization of an extremely thermostable glutamate dehydrogenase: a key enzyme in the primary metabolism of the hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1120(3), 267-272.
- Robidart, J. C., Bench, S. R., Feldman, R. A., Novoradovsky, A., Podell, S. B., Gaasterland, T., Allen, E. E., & Felbeck, H. (2008). Metabolic versatility of the Riftia pachyptila endosymbiont revealed through metagenomics. *Environmental Microbiology*, 10(3), 727-737.
- Roden, E. E., Sobolev, D., Glazer, B., & Luther, G. W. (2004). Potential for microscale bacterial Fe redox cycling at the aerobic-anaerobic interface. *Geomicrobiology Journal*, 21(6), 379-391.
- Roger, M., Brown, F., Gabrielli, W., & Sargent, F. (2018). Efficient hydrogen-dependent carbon dioxide reduction by *Escherichia coli*. *Current Biology*, 28(1), 140-145. e142.
- Rogers, K. L., & Amend, J. P. (2006). Energetics of potential heterotrophic metabolisms in the marine hydrothermal system of Vulcano Island, Italy. *Geochimica et cosmochimica acta*, 70(24), 6180-6200.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584.
- Rona, P., Klinkhammer, G., Nelsen, T., Trefry, J., & Elderfield, H. (1986). Black smokers, massive sulphides and vent biota at the Mid-Atlantic Ridge. *Nature*, 321(6065), 33-37.

- Ronimus, R., Reysenbach, A.-L., Musgrave, D., & Morgan, H. (1997). The phylogenetic position of the *Thermococcus* isolate AN1 based on 16S rRNA gene sequence analysis: a proposal that AN1 represents a new species, *Thermococcus zilligii* sp. nov. *Archives of microbiology*, 168(3), 245-248.
- Rother, M., & Metcalf, W. W. (2004). Anaerobic growth of *Methanosarcina acetivorans* C2A on carbon monoxide: an unusual way of life for a methanogenic archaeon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(48), 16929-16934.
- Rougeaux, H., Kervarec, N., Pichon, R., & Guezennec, J. (1999). Structure of the exopolysaccharide of *Vibriodiolobus* isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydrate research*, 322(1-2), 40-45.
- Roussel, E. (2008). *Subseafloor archaeal communities: from the surface to a deep hot biosphere?* [Université de Bretagne Occidentale].
- Roussel, E. G., Bonavita, M.-A. C., Querellou, J., Cragg, B. A., Webster, G., Prieur, D., & Parkes, R. J. (2008). Extending the sub-sea-floor biosphere. *Science*, 320(5879), 1046-1046.
- Roussel, E. G., Konn, C., Charlou, J.-L., Donval, J.-P., Fouquet, Y., Querellou, J., Prieur, D., & Cambon Bonavita, M.-A. (2011). Comparison of microbial communities associated with three Atlantic ultramafic hydrothermal systems. *FEMS microbiology ecology*, 77(3), 647-665.
- Ruby, E., Wirsén, C., & Jannasch, H. (1981). Chemolithotrophic sulfur-oxidizing bacteria from the Galapagos Rift hydrothermal vents. *Applied and environmental microbiology*, 42(2), 317-324.
- Russ, L., Kartal, B., Op Den Camp, H. J., Sollai, M., Le Bruchec, J., Caprais, J.-C., Godfroy, A., Sinnighe Damsté, J. S., & Jetten, M. S. (2013). Presence and diversity of anammox bacteria in cold hydrocarbon-rich seeps and hydrothermal vent sediments of the Guaymas Basin. *Frontiers in microbiology*, 4, 219.
- Rutherford, A. F. (2014). Abundance and Distribution of Major and Understudied Archaeal Lineages at Globally Distributed Deep-sea Hydrothermal Vents.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
- Saito, M. A., Noble, A. E., Tagliabue, A., Goepfert, T. J., Lamborg, C. H., & Jenkins, W. J. (2013). Slow-spreading submarine ridges in the South Atlantic as a significant oceanic iron source. *Nature Geoscience*, 6(9), 775-779.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Sako, Y., Nakagawa, S., Takai, K., & Horikoshi, K. (2003). *Marinithermus hydrothermalis* gen. nov., sp. nov., a strictly aerobic, thermophilic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(1), 59-65.
- Sako, Y., Nomura, N., Uchida, A., Ishida, Y., Morii, H., Koga, Y., Hoaki, T., & Maruyama, T. (1996). *Aeropyrum pernix* gen. nov., sp. nov., a novel aerobic hyperthermophilic archaeon growing at temperatures up to 100 C. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(4), 1070-1077.
- Sakuraba, H., & Ohshima, T. (2002). Novel energy metabolism in anaerobic hyperthermophilic archaea: a modified Embden-Meyerhof pathway. *Journal of bioscience and bioengineering*, 93(5), 441-448.
- Sander, S. G., Koschinsky, A., Massoth, G., Stott, M., & Hunter, K. A. (2007). Organic complexation of copper in deep-sea hydrothermal vent systems. *Environmental Chemistry*, 4(2), 81-89.
- Santangelo, T. J., Čuboňová, L. u., & Reeve, J. N. (2011). Deletion of alternative pathways for reductant recycling in *Thermococcus kodakarensis* increases hydrogen production. *Molecular microbiology*, 81(4), 897-911.
- Sapra, R., Bagramyan, K., & Adams, M. W. W. (2003). A simple energy-conserving system: Proton reduction coupled to proton translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13), 7545-7550.
- Sapra, R., Verhagen, M. F. J. M., & Adams, M. W. W. (2000). Purification and Characterization of a Membrane-Bound Hydrogenase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Bacteriology*, 182(12), 3423-3428.
- Sarrazin, J., & Juniper, S. K. (1999). Biological characteristics of a hydrothermal edifice mosaic community. *Marine Ecology Progress Series*, 185, 1-19.

- Sarrazin, J., Robigou, V., Juniper, S. K., & Delaney, J. R. (1997). Biological and geological dynamics over four years on a high-temperature sulfide structure at the Juan de Fuca Ridge hydrothermal observatory. *Marine Ecology Progress Series*, *153*, 5-24.
- Sato, T., Atomi, H., & Imanaka, T. (2007). Archaeal type III RuBisCOs function in a pathway for AMP metabolism. *Science*, *315*(5814), 1003-1006.
- Schink, B., Montag, D., Keller, A., & Müller, N. (2017). Hydrogen or formate: Alternative key players in methanogenic degradation. *Environmental microbiology reports*, *9*(3), 189-202.
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2005). Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and environmental microbiology*, *71*(3), 1501-1506.
- Schreiber, L., Holler, T., Knittel, K., Meyerdierks, A., & Amann, R. (2010). Identification of the dominant sulfate-reducing bacterial partner of anaerobic methanotrophs of the ANME-2 clade. *Environmental microbiology*, *12*(8), 2327-2340.
- Schrenk, M. O., Brazelton, W. J., & Lang, S. Q. (2013). Serpentinization, carbon, and deep life. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, *75*(1), 575-606.
- Schrenk, M. O., Holden, J. F., & Baross, J. A. (2008). Magma-to-microbe networks in the context of sulfide hosted microbial ecosystems. *Magma to microbe: modeling hydrothermal processes at oceanic spreading ridges. Geophysical monograph*, *178*, 233-258.
- Schrenk, M. O., Kelley, D. S., Delaney, J. R., & Baross, J. A. (2003). Incidence and diversity of microorganisms within the walls of an active deep-sea sulfide chimney. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(6), 3580-3592.
- Schuchmann, K., & Müller, V. (2013). Direct and reversible hydrogenation of CO₂ to formate by a bacterial carbon dioxide reductase. *Science*, *342*(6164), 1382-1385.
- Schuchmann, K., & Müller, V. (2014). Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(12), 809.
- Schut, G. J., Boyd, E. S., Peters, J. W., & Adams, M. W. (2013). The modular respiratory complexes involved in hydrogen and sulfur metabolism by heterotrophic hyperthermophilic archaea and their evolutionary implications. *FEMS microbiology reviews*, *37*(2), 182-203.
- Schut, G. J., Bridger, S. L., & Adams, M. W. (2007). Insights into the metabolism of elemental sulfur by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: characterization of a coenzyme A-dependent NAD(P) H sulfur oxidoreductase. *Journal of bacteriology*, *189*(12), 4431-4441.
- Schut, G. J., Lipscomb, G. L., Han, Y., Notey, J. S., Kelly, R. M., & Adams, M. W. (2014). The Order *Thermococcales* and the Family *Thermococcaceae*. *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and the Archaea*, 363-383.
- Schut, G. J., Lipscomb, G. L., Nguyen, D., Kelly, R. M., & Adams, M. W. (2016). Heterologous production of an energy-conserving carbon monoxide dehydrogenase complex in the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. *Frontiers in microbiology*, *7*, 29.
- Schut, G. J., Menon, A. L., & Adams, M. W. (2001). [12] 2-keto acid oxidoreductases from *Pyrococcus furiosus* and *Thennococcus litoralis*. *Methods in enzymology*, *331*, 144-158.
- Schut, G. J., Nixon, W. J., Lipscomb, G. L., Scott, R. A., & Adams, M. (2012). Mutational analyses of the enzymes involved in the metabolism of hydrogen by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Frontiers in microbiology*, *3*, 163.
- Schäfer, T., & Schönheit, P. (1991). Pyruvate metabolism of the hyperthermophilic archaebacterium *Pyrococcus furiosus*. *Archives of microbiology*, *155*(4), 366-377.
- Schäfer, T., Xavier, K. B., Santos, H., & Schönheit, P. (1994). Glucose fermentation to acetate and alanine in resting cell suspensions of *Pyrococcus furiosus*: proposal of a novel glycolytic pathway based on 13C labelling data and enzyme activities. *FEMS microbiology letters*, *121*(1), 107-114.
- Schönheit, P., & Schäfer, T. (1995). Metabolism of hyperthermophiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *11*(1), 26-57.
- Scott, J. J., Breier, J. A., Luther III, G. W., & Emerson, D. (2015). Microbial iron mats at the Mid-Atlantic Ridge and evidence that Zetaproteobacteria may be restricted to iron-oxidizing marine systems. *PLoS One*, *10*(3), e0119284.
- Segonzac, M., de Saint Laurent, M., & Casanova, B. (1993). L'énigme du comportement trophique des crevettes Alvinocarididae des sites hydrothermaux de la dorsale médio-atlantique. *Cahiers de biologie marine*, *34*(4), 535-571.
- Seitz, K. W., Lazar, C. S., Hinrichs, K.-U., Teske, A. P., & Baker, B. J. (2016). Genomic reconstruction of a novel, deeply branched sediment archaeal phylum

- with pathways for acetogenesis and sulfur reduction. *The ISME Journal*, 10(7), 1696-1705.
- Sekar, N., Wu, C. H., Adams, M. W., & Ramasamy, R. P. (2017). Electricity generation by *Pyrococcus furiosus* in microbial fuel cells operated at 90° C. *Biotechnology and bioengineering*, 114(7), 1419-1427.
- Shank, T. M., Fornari, D. J., Von Damm, K. L., Lilley, M. D., Haymon, R. M., & Lutz, R. A. (1998). Temporal and spatial patterns of biological community development at nascent deep-sea hydrothermal vents (9 50' N, East Pacific Rise). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 45(1-3), 465-515.
- Sievert, S. M., Hügler, M., Taylor, C. D., & Wirsén, C. O. (2008). Sulfur oxidation at deep-sea hydrothermal vents. In *Microbial sulfur metabolism* (pp. 238-258). Springer.
- Sievert, S. M., Wieringa, E. B., Wirsén, C. O., & Taylor, C. D. (2007). Growth and mechanism of filamentous-sulfur formation by *Candidatus Arcobacter sulfidicus* in opposing oxygen-sulfide gradients. *Environmental Microbiology*, 9(1), 271-276.
- Silva, P. J., van den Ban, E. C., Wassink, H., Haaker, H., de Castro, B., Robb, F. T., & Hagen, W. R. (2000). Enzymes of hydrogen metabolism in *Pyrococcus furiosus*. *European journal of biochemistry*, 267(22), 6541-6551.
- Simpson, F. B., & Burris, R. H. (1984). A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. *Science*, 224(4653), 1095-1097.
- Slobodkin, A., Campbell, B., Cary, S. C., Bonch-Osmolovskaya, E., & Jeanthon, C. (2001). Evidence for the presence of thermophilic Fe (III)-reducing microorganisms in deep-sea hydrothermal vents at 13 N (East Pacific Rise). *FEMS Microbiology Ecology*, 36(2-3), 235-243.
- Slobodkin, A., Reysenbach, A.-L., Slobodkina, G., Baslerov, R., Kostrikina, N., Wagner, I., & Bonch-Osmolovskaya, E. (2012). *Thermosulfurimonas dismutans* gen. nov., sp. nov., an extremely thermophilic sulfur-disproportionating bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(11), 2565-2571.
- Slobodkin, A., Reysenbach, A.-L., Slobodkina, G., Kolganova, T., Kostrikina, N., & Bonch-Osmolovskaya, E. (2013). *Dissulfuribacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, autotrophic, sulfur-disproportionating, deeply branching deltaproteobacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(6), 1967-1971.
- Slobodkin, A., Slobodkina, G., Panteleeva, A., Chernyh, N., Novikov, A., & Bonch-Osmolovskaya, E. (2016). *Dissulfurimicrobium hydrothermale* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, autotrophic, sulfur-disproportionating deltaproteobacterium isolated from a hydrothermal pond. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(2), 1022-1026.
- Slobodkina, G., Kolganova, T., Querellou, J., Bonch-Osmolovskaya, E., & Slobodkin, A. (2009). *Geoglobus acetivorans* sp. nov., an iron (III)-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(11), 2880-2883.
- Slobodkina, G. B., Kolganova, T. V., Kopitsyn, D. S., Viryasov, M. B., Bonch-Osmolovskaya, E. A., & Slobodkin, A. I. (2016). *Dissulfurirhabdus thermomarina* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, autotrophic, sulfite-reducing and disproportionating deltaproteobacterium isolated from a shallow-sea hydrothermal vent. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(7), 2515-2519.
- Slobodkina, G. B., Mardanov, A. V., Ravin, N. V., Frolova, A. A., Chernyh, N. A., Bonch-Osmolovskaya, E. A., & Slobodkin, A. I. (2017). Respiratory ammonification of nitrate coupled to anaerobic oxidation of elemental sulfur in deep-sea autotrophic thermophilic bacteria. *Frontiers in microbiology*, 8, 87.
- Slobodkina, G. B., Reysenbach, A.-L., Kolganova, T. V., Novikov, A. A., Bonch-Osmolovskaya, E. A., & Slobodkin, A. I. (2017). *Thermosulfuriphilus ammonigenes* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic bacterium capable of respiratory ammonification of nitrate with elemental sulfur. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(9), 3474-3479.
- Sogin, M. L., Morrison, H. G., Huber, J. A., Welch, D. M., Huse, S. M., Neal, P. R., Arrieta, J. M., & Herndl, G. J. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(32), 12115-12120.
- Sokolova, T. G., Jeanthon, C., Kostrikina, N. A., Chernyh, N. A., Lebedinsky, A. V., Stackebrandt, E., & Bonch-Osmolovskaya, E. A. (2004). The first evidence of anaerobic CO oxidation coupled with H₂ production by a hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Extremophiles*, 8(4), 317-323.

- Somero, G. N. (1990). Life at low volume change: hydrostatic pressure as a selective factor in the aquatic environment. *American Zoologist*, 30(1), 123-135.
- Spang, A., Caceres, E. F., & Ettema, T. J. (2017). Genomic exploration of the diversity, ecology, and evolution of the archaeal domain of life. *Science*, 357(6351).
- Spang, A., Hatzenpichler, R., Brochier-Armanet, C., Rattei, T., Tischler, P., Spieck, E., Streit, W., Stahl, D. A., Wagner, M., & Schleper, C. (2010). Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota. *Trends in microbiology*, 18(8), 331-340.
- Spang, A., Saw, J. H., Jørgensen, S. L., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Martijn, J., Lind, A. E., Van Eijk, R., Schleper, C., Guy, L., & Ettema, T. J. (2015). Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature*, 521(7551), 173-179.
- Spiess, F. N., Macdonald, K. C., Atwater, T., Ballard, R., Carranza, A., Cordoba, D., Cox, C., Garcia, V. D., Francheteau, J., & Guerrero, J. (1980). East Pacific Rise: hot springs and geophysical experiments. *Science*, 207(4438), 1421-1433.
- Stahl, D. A. (1991). Development and application of nucleic acid probes. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, 205-248.
- Steinsbu, B. O., Thorseth, I. H., Nakagawa, S., Inagaki, F., Lever, M. A., Engelen, B., Øvreås, L., & Pedersen, R. B. (2010). *Archaeoglobus sulfaticallidus* sp. nov., a thermophilic and facultatively lithoautotrophic sulfate-reducer isolated from black rust exposed to hot ridge flank crustal fluids. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(12), 2745-2752.
- Stetter, K. O. (1988). *Archaeoglobus fulgidus* gen. nov., sp. nov.: a new taxon of extremely thermophilic archaeobacteria. *Systematic and applied microbiology*, 10(2), 172-173.
- Stetter, K. O. (1999). Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS letters*, 452(1-2), 22-25.
- Stetter, K. O., König, H., & Stackebrandt, E. (1983). *Pyrodictium* gen. nov., a new genus of submarine disc-shaped sulphur reducing archaeobacteria growing optimally at 105 C. *Systematic and applied microbiology*, 4(4), 535-551.
- Straub, K. L., Benz, M., & Schink, B. (2001). Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH. *FEMS microbiology ecology*, 34(3), 181-186.
- Strausberg, R. L., Levy, S., & Rogers, Y.-H. (2008). Emerging DNA sequencing technologies for human genomic medicine. *Drug discovery today*, 13(13-14), 569-577.
- STRAUSS, G., & FUCHS, G. (1993). Enzymes of a novel autotrophic CO₂ fixation pathway in the phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*, the 3-hydroxypropionate cycle. *European Journal of Biochemistry*, 215(3), 633-643.
- Stumm, W., & Morgan, J. (1996). Aquatic chemistry: Chemical equilibria and rates in natural waters, JohnWiley & Sons. Inc., New York, 1022.
- Summit, M., & Baross, J. A. (1998). Thermophilic seafloor microorganisms from the 1996 North Gorda Ridge eruption. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 45(12), 2751-2766.
- Sunamura, M., Higashi, Y., Miyako, C., Ishibashi, J.-i., & Maruyama, A. (2004). Two bacteria phylotypes are predominant in the Suiyo Seamount hydrothermal plume. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 1190-1198.
- Suppmann, B., & Sawers, G. (1994). Isolation and characterization of hypophosphite-resistant mutants of *Escherichia coli*: identification of the FocA protein, encoded by the pfl operon, as a putative formate transporter. *Molecular microbiology*, 11(5), 965-982.
- Suzuki, Y., Inagaki, F., Takai, K., Nealson, K., & Horikoshi, K. (2004). Microbial diversity in inactive chimney structures from deep-sea hydrothermal systems. *Microbial ecology*, 47(2), 186-196.
- Sylvan, J. B., Toner, B. M., & Edwards, K. J. (2012). Life and death of deep-sea vents: bacterial diversity and ecosystem succession on inactive hydrothermal sulfides. *MBio*, 3(1).

T

- Tabita, F. R., Hanson, T. E., Satagopan, S., Witte, B. H., & Kree, N. E. (2008). Phylogenetic and evolutionary relationships of RubisCO and the RubisCO-like proteins and the functional lessons provided by diverse molecular forms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1504), 2629-2640.
- Tagliabue, A., Bopp, L., Dutay, J.-C., Bowie, A. R., Chever, F., Jean-Baptiste, P., Bucciarelli, E., Lannuzel, D., Remenyi, T., & Sarthou, G. (2010). Hydrothermal contribution to the oceanic dissolved iron inventory. *Nature Geoscience*, 3(4), 252-256.

- Takai, K., Campbell, B. J., Cary, S. C., Suzuki, M., Oida, H., Nunoura, T., Hirayama, H., Nakagawa, S., Suzuki, Y., & Inagaki, F. (2005). Enzymatic and genetic characterization of carbon and energy metabolisms by deep-sea hydrothermal chemolithoautotrophic isolates of Epsilonproteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(11), 7310-7320.
- Takai, K., Gamo, T., Tsunogai, U., Nakayama, N., Hirayama, H., Nealson, K. H., & Horikoshi, K. (2004). Geochemical and microbiological evidence for a hydrogen-based, hyperthermophilic subsurface lithoautotrophic microbial ecosystem (HyperSLiME) beneath an active deep-sea hydrothermal field. *Extremophiles*, *8*(4), 269-282.
- Takai, K., & Horikoshi, K. (1999). Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics*, *152*(4), 1285-1297.
- Takai, K., & Horikoshi, K. (2000). Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. *Applied and environmental microbiology*, *66*(11), 5066-5072.
- Takai, K., Inagaki, F., Nakagawa, S., Hirayama, H., Nunoura, T., Sako, Y., Nealson, K. H., & Horikoshi, K. (2003). Isolation and phylogenetic diversity of members of previously uncultivated ϵ -Proteobacteria in deep-sea hydrothermal fields. *FEMS microbiology letters*, *218*(1), 167-174.
- Takai, K., Komatsu, T., Inagaki, F., & Horikoshi, K. (2001). Distribution of archaea in a black smoker chimney structure. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(8), 3618-3629.
- Takai, K., Nakagawa, S., Reysenbach, A.-L., & Hoek, J. (2006). Microbial ecology of mid-ocean ridges and back-arc basins. *GEOPHYSICAL MONOGRAPH-AMERICAN GEOPHYSICAL UNION*, *166*, 185.
- Takai, K., & Nakamura, K. (2010). Compositional, physiological and metabolic variability in microbial communities associated with geochemically diverse, deep-sea hydrothermal vent fluids. In *Geomicrobiology: Molecular and environmental perspective* (pp. 251-283). Springer.
- Takai, K., Nakamura, K., Toki, T., Tsunogai, U., Miyazaki, M., Miyazaki, J., Hirayama, H., Nakagawa, S., Nunoura, T., & Horikoshi, K. (2008). Cell proliferation at 122 C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(31), 10949-10954.
- Takai, K., Oida, H., Suzuki, Y., Hirayama, H., Nakagawa, S., Nunoura, T., Inagaki, F., Nealson, K. H., & Horikoshi, K. (2004). Spatial distribution of marine crenarchaeota group I in the vicinity of deep-sea hydrothermal systems. *Applied and environmental microbiology*, *70*(4), 2404-2413.
- Takai, K., Sugai, A., Itoh, T., & Horikoshi, K. (2000). *Palaeococcus ferrophilus* gen. nov., sp. nov., a barophilic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *50*(2), 489-500.
- Takács, M., Tóth, A., Bogos, B., Varga, A., Rákhely, G., & Kovács, K. L. (2008). Formate hydrogenlyase in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus litoralis*. *BMC microbiology*, *8*(1), 88.
- Taylor, C. D., Wirsén, C. O., & Gaill, F. (1999). Rapid microbial production of filamentous sulfur mats at hydrothermal vents. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(5), 2253-2255.
- Taylor, K. G., & Konhäuser, K. O. (2011). Iron in Earth surface systems: A major player in chemical and biological processes. *Elements*, *7*(2), 83-88.
- Teske, A., Hinrichs, K.-U., Edgcomb, V., de Vera Gomez, A., Kysela, D., Sylva, S. P., Sogin, M. L., & Jannasch, H. W. (2002). Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Applied and environmental microbiology*, *68*(4), 1994-2007.
- Teske, A., & Sørensen, K. B. (2008). Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? *The ISME journal*, *2*(1), 3-18.
- Thauer, R. K., Jungermann, K., & Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological reviews*, *41*(1), 100.
- 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*(8), 579-591.
- Thompson, G., Humphris, S. E., Schroeder, B., Sulanowska, M., & Rona, P. A. (1988). Active vents and massive sulfides at 26 degrees N (TAG) and 23 degrees N (Snakepit) on the Mid-Atlantic Ridge. *The Canadian Mineralogist*, *26*(3), 697-711.
- Thompson, J. D. (1994). Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, *22*, 4673-4680.
- Thorgersen, M. P., Stirrett, K., Scott, R. A., & Adams, M. W. (2012). Mechanism of oxygen detoxification by the surprisingly oxygen-tolerant hyperthermophilic

- archaeon, *Pyrococcus furiosus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(45), 18547-18552.
- Tivey, M. K. (1995). The influence of hydrothermal fluid composition and advection rates on black smoker chimney mineralogy: Insights from modeling transport and reaction. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(10), 1933-1949.
- Tivey, M. K. (1998). How to build a black smoker chimney. *Oceanus*, 41(2), 22-26.
- Tivey, M. K. (2007). Generation of seafloor hydrothermal vent fluids and associated mineral deposits. *Oceanography*, 20(1), 50-65.
- Tobler, M., Passow, C. N., Greenway, R., Kelley, J. L., & Shaw, J. H. (2016). The evolutionary ecology of animals inhabiting hydrogen sulfide-rich environments. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 47, 239-262.
- Toner, B. M., Lesniewski, R. A., Marlow, J. J., Briscoe, L. J., Santelli, C. M., Bach, W., Orcutt, B. N., & Edwards, K. J. (2013). Mineralogy drives bacterial biogeography of hydrothermally inactive seafloor sulfide deposits. *Geomicrobiology Journal*, 30(4), 313-326.
- Toner, B. M., Santelli, C. M., Marcus, M. A., Wirth, R., Chan, C. S., McCollom, T., Bach, W., & Edwards, K. J. (2009). Biogenic iron oxyhydroxide formation at mid-ocean ridge hydrothermal vents: Juan de Fuca Ridge. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73(2), 388-403.
- Topçuoğlu, B. D., Meydan, C., Orellana, R., & Holden, J. F. (2018). Formate hydrogenlyase and formate secretion ameliorate H₂ inhibition in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus parvalvinellae*. *Environmental microbiology*, 20(3), 949-957.
- Topçuoğlu, B. D., Stewart, L. C., Morrison, H. G., Butterfield, D. A., Huber, J. A., & Holden, J. F. (2016). Hydrogen limitation and syntrophic growth among natural assemblages of thermophilic methanogens at deep-sea hydrothermal vents. *Frontiers in microbiology*, 7, 1240.
- Trotsenko, Y. A., & Murrell, J. C. (2008). Metabolic aspects of aerobic obligate methanotrophy*. *Advances in applied microbiology*, 63, 183-229.
- Tunnicliffe, V. (1991). The biology of hydrothermal vents: ecology and evolution. *Oceanography and Marine Biology*, 29, 319-407.
- Tunnicliffe, V., & Fontaine, A. (1987). Faunal composition and organic surface encrustations at hydrothermal vents on the southern Juan de Fuca Ridge. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 92(B11), 11303-11314.
- ## V
- van der Oost, J., Schut, G., Kengen, S. M., Hagen, W. R., Thomm, M., & de Vos, W. M. (1998). The Ferredoxin-dependent Conversion of Glyceraldehyde-3-phosphate in the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* Represents a Novel Site of Glycolytic Regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 273(43), 28149-28154.
- Van Dover, C. L. (1995). Ecology of mid-Atlantic ridge hydrothermal vents. *Geological Society, London, Special Publications*, 87(1), 257-294.
- Vannier, P. (2012). Bases génomiques, protéomiques et transcriptomiques de l'adaptation aux hautes pressions hydrostatiques d'une archée hyperthermophile: *Thermococcus barophilus*.
- Vannier, P., Michoud, G., Oger, P., Þór Marteinsson, V., & Jebbar, M. (2015). Genome expression of *Thermococcus barophilus* and *Thermococcus kodakarensis* in response to different hydrostatic pressure conditions. *Research in microbiology*, 166(9), 717-725.
- Vanwonterghem, I., Evans, P. N., Parks, D. H., Jensen, P. D., Woodcroft, B. J., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2016). Methylophilic methanogenesis discovered in the archaeal phylum Verstraetearchaeota. *Nature microbiology*, 1(12), 1-9.
- Vargas, M., Kashefi, K., Blunt-Harris, E. L., & Lovley, D. R. (1998). Microbiological evidence for Fe (III) reduction on early Earth. *Nature*, 395(6697), 65-67.
- Verati, C., de Donato, P., Prieur, D., & Lancelot, J. (1999). Evidence of bacterial activity from micrometer-scale layer analyses of black-smoker sulfide structures (Pito Seamount Site, Easter microplate). *Chemical Geology*, 158(3-4), 257-269.
- Verhees, C. H., Kengen, S. W., Tuininga, J. E., Schut, G. J., Adams, M. W., De Vos, W. M., & OOST, J. v. d. (2003). The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *Biochemical Journal*, 375(2), 231-246.
- Vetriani, C., Chew, Y. S., Miller, S. M., Yagi, J., Coombs, J., Lutz, R. A., & Barkay, T. (2005). Mercury adaptation among bacteria from a deep-sea hydrothermal vent. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 220-226.

- Vetriani, C., Maeder, D. L., Tolliday, N., Yip, K. S.-P., Stillman, T. J., Britton, K. L., Rice, D. W., Klump, H. H., & Robb, F. T. (1998). Protein thermostability above 100 C: a key role for ionic interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(21), 12300-12305.
- Vetriani, C., Voordeckers, J. W., Crespo-Medina, M., O'Brien, C. E., Giovannelli, D., & Lutz, R. A. (2014). Deep-sea hydrothermal vent Epsilonproteobacteria encode a conserved and widespread nitrate reduction pathway (Nap). *The ISME journal*, 8(7), 1510-1521.
- Vigneron, A., Cruaud, P., Pignet, P., Caprais, J.-C., Cambon-Bonavita, M.-A., Godfroy, A., & Toffin, L. (2013). Archaeal and anaerobic methane oxidizer communities in the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin (Gulf of California). *The ISME journal*, 7(8), 1595-1608.
- Vincent, P., Pignet, P., Talmont, F., Bozzi, L., Fournet, B., Guezennec, J., Jeanthon, C., & Prieur, D. (1994). Production and characterization of an exopolysaccharide excreted by a deep-sea hydrothermal vent bacterium isolated from the polychaete annelid *Alvinella pompejana*. *Applied and environmental microbiology*, 60(11), 4134-4141.
- Vine, F. J., & Matthews, D. H. (1963). Magnetic anomalies over oceanic ridges. *Nature*, 199(4897), 947-949.
- Vismann, B. (1991). Sulfide tolerance: physiological mechanisms and ecological implications. *Ophelia*, 34(1), 1-27.
- Von Damm, K. (1995). Controls on the chemistry and temporal variability of seafloor hydrothermal fluids. *Seafloor hydrothermal systems: Physical, chemical, biological, and geological interactions*, 91, 222-247.
- Von Damm, K., Bray, A., Buttermore, L., & Oosting, S. (1998). The geochemical controls on vent fluids from the Lucky Strike vent field, Mid-Atlantic Ridge. *Earth and Planetary Science Letters*, 160(3-4), 521-536.
- Von Damm, K., Edmond, J., Grant, B., Measures, C., Walden, B., & Weiss, R. (1985). Chemistry of submarine hydrothermal solutions at 21° N, East Pacific Rise. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 49(11), 2197-2220.
- Vorholt, J. A., Hafenbradl, D., Stetter, K. O., & Thauer, R. K. (1997). Pathways of autotrophic CO₂ fixation and of dissimilatory nitrate reduction to N₂O in *Ferroglobus placidus*. *Archives of microbiology*, 167(1), 19-23.
- W
- Wafik, A. (1992). *Processus de métallogénèse sur les dorsales lentes-L'exemple de l'amas sulfure du Snake pit (Dorsale Atlantique à 23° N)* Université de Bretagne Occidentale].
- Wagner, M., Roger, A. J., Flax, J. L., Brusseau, G. A., & Stahl, D. A. (1998). Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *Journal of bacteriology*, 180(11), 2975-2982.
- Waight, A. B., Czyzewski, B. K., & Wang, D.-N. (2013). Ion selectivity and gating mechanisms of FNT channels. *Current opinion in structural biology*, 23(4), 499-506.
- Wang, C. L., Michels, P. C., Dawson, S. C., Kitisakkul, S., Baross, J. A., Keasling, J., & Clark, D. S. (1997). Cadmium removal by a new strain of *Pseudomonas aeruginosa* in aerobic culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 4075-4078.
- Wang, C. L., Ozuna, S. C., Clark, D. S., & Keasling, J. D. (2002). A deep-sea hydrothermal vent isolate, *Pseudomonas aeruginosa* CW961, requires thiosulfate for Cd²⁺ tolerance and precipitation. *Biotechnology letters*, 24(8), 637-641.
- Wang, F., Zhou, H., Meng, J., Peng, X., Jiang, L., Sun, P., Zhang, C., Van Nostrand, J. D., Deng, Y., & He, Z. (2009). GeoChip-based analysis of metabolic diversity of microbial communities at the Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(12), 4840-4845.
- Wang, Y., Hua, Z.-S., Goh, K. M., Evans, P. N., Liu, L., Mao, Y., Hugenholtz, P., Tyson, G. W., Li, W.-J., & Zhang, T. (2018). Further expansion of methane metabolism in the Archaea. *BioRxiv*, 312082.
- Wang, Y., Huang, Y., Wang, J., Cheng, C., Huang, W., Lu, P., Xu, Y.-N., Wang, P., Yan, N., & Shi, Y. (2009). Structure of the formate transporter FocA reveals a pentameric aquaporin-like channel. *Nature*, 462(7272), 467.
- Waters, E., Hohn, M. J., Ahel, I., Graham, D. E., Adams, M. D., Barnstead, M., Beeson, K. Y., Bibbs, L., Bolanos, R., & Keller, M. (2003). The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(22), 12984-12988.
- Watsuji, T.-o., Yamamoto, A., Takaki, Y., Ueda, K., Kawagucci, S., & Takai, K. (2014). Diversity and

- methane oxidation of active epibiotic methanotrophs on live *Shinkaia crosnieri*. *The ISME journal*, 8(5), 1020-1031.
- Weber, A., & Jørgensen, B. B. (2002). Bacterial sulfate reduction in hydrothermal sediments of the Guaymas Basin, Gulf of California, Mexico. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 49(5), 827-841.
- Weber, K. A., Achenbach, L. A., & Coates, J. D. (2006). Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology*, 4(10), 752-764.
- Webster, G., Newberry, C. J., Fry, J. C., & Weightman, A. J. (2003). Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale. *Journal of Microbiological Methods*, 55(1), 155-164.
- Welhan, J. A. (1988). Origins of methane in hydrothermal systems. *Chemical Geology*, 71(1-3), 183-198.
- Welte, C. U., Rasigraf, O., Vaksmaa, A., Versantvoort, W., Arshad, A., Op den Camp, H. J., Jetten, M. S., Lüke, C., & Reimann, J. (2016). Nitrate- and nitrite-dependent anaerobic oxidation of methane. *Environmental Microbiology Reports*, 8(6), 941-955.
- Wery, N., Lesongeur, F., Pignet, P., Derennes, V., Cambon-Bonavita, M.-A., Godfroy, A., & Barbier, G. (2001). *Marinitoga camini* gen. nov., sp. nov., a rod-shaped bacterium belonging to the order Thermotogales, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(2), 495-504.
- Whitman, W. B., Bowen, T. L., & Boone, D. R. (2006). The methanogenic bacteria. *Prokaryotes*, 3(Chapter 9), 165-207.
- Widdel, F., & Bak, F. (1992). Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In *The prokaryotes* (pp. 3352-3378). Springer.
- Wiechert, M., & Beitz, E. (2017). Mechanism of formate-nitrite transporters by dielectric shift of substrate acidity. *The EMBO journal*, 36(7), 949-958.
- Wiedenheft, B., Mosolf, J., Willits, D., Yeager, M., Dryden, K. A., Young, M., & Douglas, T. (2005). An archaeal antioxidant: characterization of a Dps-like protein from *Sulfolobus solfataricus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(30), 10551-10556.
- Winn, C. D., Karl, D. M., & Massoth, G. J. (1986). Microorganisms in deep-sea hydrothermal plumes. *Nature*, 320(6064), 744-746.
- Wirsen, C. O., Jannasch, H. W., & Molyneux, S. J. (1993). Chemosynthetic microbial activity at Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent sites. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 98(B6), 9693-9703.
- Wirsen, C. O., Sievert, S. M., Cavanaugh, C. M., Molyneux, S. J., Ahmad, A., Taylor, L., DeLong, E., & Taylor, C. D. (2002). Characterization of an autotrophic sulfide-oxidizing marine *Arcobacter* sp. that produces filamentous sulfur. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 316-325.
- Wirsen, C. O., Tuttle, J., & Jannasch, H. (1986). Activities of sulfur-oxidizing bacteria at the 21 N East Pacific Rise vent site. *Marine Biology*, 92(4), 449-456.
- Wirth, R. (2017). Colonization of black smokers by hyperthermophilic microorganisms. *Trends in microbiology*, 25(2), 92-99.
- Wirth, R., Luckner, M., & Wanner, G. (2018). Validation of a hypothesis: colonization of black smokers by hyperthermophilic microorganisms. *Frontiers in microbiology*, 9, 524.
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 5088-5090.
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4576-4579.
- Wolery, T. J., & Sleep, N. H. (1976). Hydrothermal circulation and geochemical flux at mid-ocean ridges. *The Journal of Geology*, 84(3), 249-275.
- Woods, D. D. (1936). Hydrogenlyases: The synthesis of formic acid by bacteria. *Biochemical Journal*, 30(3), 515.
- Wright, E. S., Yilmaz, L. S., & Noguera, D. R. (2012). DECIPHER, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. *Applied and environmental microbiology*, 78(3), 717-725.
- Wrighton, K. C., Castelle, C. J., Varaljay, V. A., Satagopan, S., Brown, C. T., Wilkins, M. J., Thomas, B. C., Sharon, I., Williams, K. H., & Tabita, F. R. (2016). RubisCO of a nucleoside pathway known from Archaea is found in diverse uncultivated phyla in bacteria. *The ISME journal*, 10(11), 2702-2714.

Wu, Y., Cao, Y., Wang, C., Wu, M., Aharon, O., & Xu, X. (2014). Microbial community structure and nitrogenase gene diversity of sediment from a deep-sea hydrothermal vent field on the Southwest Indian Ridge. *Acta Oceanologica Sinica*, 33(10), 94-104.

Wuchter, C., Abbas, B., Coolen, M. J., Herfort, L., van Bleijswijk, J., Timmers, P., Strous, M., Teira, E., Herndl, G. J., & Middelburg, J. J. (2006). Archaeal nitrification in the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(33), 12317-12322.

X

Xavier, K. B., da Costa, M. S., & Santos, H. (2000). Demonstration of a Novel Glycolytic Pathway in the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus zilligii* by ¹³C-Labeling Experiments and Nuclear Magnetic Resonance Analysis. *Journal of bacteriology*, 182(16), 4632-4636.

Xavier, K. B., Martins, L. O., Peist, R., Kossmann, M., Boos, W., & Santos, H. (1996). High-affinity maltose/trehalose transport system in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *Journal of Bacteriology*, 178(16), 4773-4777.

Xie, W., Wang, F., Guo, L., Chen, Z., Sievert, S. M., Meng, J., Huang, G., Li, Y., Yan, Q., & Wu, S. (2011). Comparative metagenomics of microbial communities inhabiting deep-sea hydrothermal vent chimneys with contrasting chemistries. *The ISME journal*, 5(3), 414-426.

Xu, W., Li, M., Ding, J.-F., Gu, J.-D., & Luo, Z.-H. (2014). Bacteria dominate the ammonia-oxidizing community in a hydrothermal vent site at the Mid-Atlantic Ridge of the South Atlantic Ocean. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(18), 7993-8004.

Y

Yamamoto, M., Nakamura, R., Kasaya, T., Kumagai, H., Suzuki, K., & Takai, K. (2017). Spontaneous and widespread electricity generation in natural deep-sea hydrothermal fields. *Angewandte Chemie*, 129(21), 5819-5822.

Yamamoto, M., & Takai, K. (2011). Sulfur metabolisms in epsilon- and gamma-Proteobacteria in deep-sea hydrothermal fields. *Frontiers in microbiology*, 2, 192.

Yang, H., Lipscomb, G. L., Keese, A. M., Schut, G. J., Thomm, M., Adams, M. W., Wang, B. C., & Scott, R. A. (2010). SurR regulates hydrogen production in *Pyrococcus furiosus* by a sulfur-dependent redox switch. *Molecular microbiology*, 77(5), 1111-1122.

Yayanos, A. A. (1986). Evolutional and ecological implications of the properties of deep-sea barophilic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(24), 9542-9546.

Yayanos, A. A., Dietz, A. S., & Van Boxtel, R. (1981). Obligately barophilic bacterium from the Mariana Trench. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(8), 5212-5215.

Yilmazel, Y. D., Zhu, X., Kim, K.-Y., Holmes, D. E., & Logan, B. E. (2018). Electrical current generation in microbial electrolysis cells by hyperthermophilic archaea *Ferroglobus placidus* and *Geoglobus ahangari*. *Bioelectrochemistry*, 119, 142-149.

Yoshida-Takashima, Y., Nunoura, T., Kazama, H., Noguchi, T., Inoue, K., Akashi, H., Yamanaka, T., Toki, T., Yamamoto, M., & Furushima, Y. (2012). Spatial distribution of viruses associated with planktonic and attached microbial communities in hydrothermal environments. *Applied and environmental microbiology*, 78(5), 1311-1320.

Yun, S.-H., Kwon, S. O., Park, G. W., Kim, J. Y., Kang, S. G., Lee, J.-H., Chung, Y.-H., Kim, S., Choi, J.-S., & Kim, S. I. (2011). Proteome analysis of *Thermococcus onnurineus* NA1 reveals the expression of hydrogen gene cluster under carboxydrotrophic growth. *Journal of proteomics*, 74(10), 1926-1933.

Yurkov, V. V., Krieger, S., Stackebrandt, E., & Beatty, J. T. (1999). *Citromicrobium bathyomarinum*, a novel aerobic bacterium isolated from deep-sea hydrothermal vent plume waters that contains photosynthetic pigment-protein complexes. *Journal of Bacteriology*, 181(15), 4517-4525.

Yücel, M., Gartman, A., Chan, C. S., & Luther, G. W. (2011). Hydrothermal vents as a kinetically stable source of iron-sulphide-bearing nanoparticles to the ocean. *Nature Geoscience*, 4(6), 367-371.

Z

Zal, F., Leize, E., Lallier, F. H., Toulmond, A., Van Dorsselaer, A., & Childress, J. J. (1998). S-Sulfohemoglobin and disulfide exchange: the mechanisms of sulfide binding by *Riftia pachytila* hemoglobins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(15), 8997-9002.

Zaremba-Niedzwiedzka, K., Caceres, E. F., Saw, J. H., Bäckström, D., Juzokaite, L., Vancaester, E., Seitz,

- K. W., Anantharaman, K., Starnawski, P., & Kjeldsen, K. U. (2017). Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature*, *541*(7637), 353-358.
- Zarzycki, J., Brecht, V., Müller, M., & Fuchs, G. (2009). Identifying the missing steps of the autotrophic 3-hydroxypropionate CO₂ fixation cycle in *Chloroflexus aurantiacus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(50), 21317-21322.
- Zbinden, M., Martinez, I., GUYOT, F. o., Cambon-Bonavita, M.-A., & Gaill, F. (2001). Zinc-iron sulphide mineralization in tubes of hydrothermal vent worms. *European Journal of Mineralogy*, *13*(4), 653-658.
- Zeng, X., Birrien, J.-L., Fouquet, Y., Cherkashov, G., Jebbar, M., Querellou, J., Oger, P., Cambon-Bonavita, M.-A., Xiao, X., & Prieur, D. (2009). *Pyrococcus* CH1, an obligate piezophilic hyperthermophile: extending the upper pressure-temperature limits for life. *The ISME journal*, *3*(7), 873-876.
- Zeppilli, D., Leduc, D., Fontanier, C., Fontaneto, D., Fuchs, S., Gooday, A. J., Goineau, A., Ingels, J., Ivanenko, V. N., & Kristensen, R. M. (2018). Characteristics of meiofauna in extreme marine ecosystems: a review. *Marine Biodiversity*, *48*(1), 35-71.
- Zhu, P., & Macdougall, J. D. (1998). Calcium isotopes in the marine environment and the oceanic calcium cycle. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *62*(10), 1691-1698.
- Zillig, W., Holz, I., Janekovic, D., Schäfer, W., & Reiter, W. (1983). The Archaeobacterium *Thermococcus celer* Represents, a Novel Genus within the Thermophilic Branch of the Archaeobacteria. *SYST APPL MICROBIOL*, *4*(1), 88-94.
- Zivanovic, Y., Armengaud, J., Lagorce, A., Leplat, C., Guérin, P., Dutertre, M., Anthouard, V., Forterre, P., Wincker, P., & Confalonieri, F. (2009). Genome analysis and genome-wide proteomics of *Thermococcus gammatolerans*, the most radioresistant organism known amongst the Archaea. *Genome biology*, *10*(6), 1-23.
- ZoBell, C. E., & Johnson, F. H. (1949). The influence of hydrostatic pressure on the growth and viability of terrestrial and marine bacteria. *Journal of bacteriology*, *57*(2), 179.
- Zuckerkandl, E., & Pauling, L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. In *Evolving genes and proteins* (pp. 97-166). Elsevier.

ANNEXE

ANNEXE 1 - Liste des génomes utilisés pour la réalisation de l'arbre phylogénomique des *Thermococcales*

Souche de <i>Thermococcales</i>	Numéro d'accension
<i>Thermococcus barophilus</i> MP ^T	CP002372
<i>Thermococcus barophilus</i> Ch5	CP013050
<i>Thermococcus barossii</i> SHCK-94 ^T	CP015101
<i>Thermococcus celer</i> Vu13 ^T	CP014854
<i>Thermococcus celericrescens</i> TS2 ^T	LLYW00000000
<i>Thermococcus chitonophagus</i> GC74	CP015193
<i>Thermococcus cleftensis</i> CL1 ^T	CP003651
<i>Thermococcus eurythermalis</i> A501 ^T	CP008887
<i>Thermococcus gammatolerans</i> EJ3 ^T	CP001398
<i>Thermococcus gorgonarius</i> W-12 ^T	CP014855
<i>Thermococcus guaymasensis</i> DSM11113 ^T	CP007140
<i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD1 ^T	AP006878
<i>Thermococcus litoralis</i> NS-C ^T	CP006670
<i>Thermococcus nautili</i> 30-1 ^T	CP007264
<i>Thermococcus onnurineus</i> NA1	CP000855
<i>Thermococcus pacificus</i> P-4 ^T	CP015102
<i>Thermococcus paralvinellae</i> ES1 ^T	CP006965
<i>Thermococcus peptonophilus</i> OG-1 ^T	CP014750
<i>Thermococcus piezophilus</i> CDGS ^T	CP015520
<i>Thermococcus profundus</i> DT5432 ^T	CP014862
<i>Thermococcus radiotolerans</i> EJ2	CP015106
<i>Thermococcus sibiricus</i> MM379 ^T	CP001463
<i>Thermococcus siculi</i> RG-20 ^T	CP015103
<i>Thermococcus thioreducens</i> OGL-20P ^T	CP015105
<i>Thermococcus zilligii</i> AN1	AJLF00000000
<i>Thermococcus</i> sp. AM4	CP002952
<i>Pyrococcus abyssi</i> GE5	AL096836
<i>Pyrococcus furiosus</i> DSM3638	AE009950
<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3 ^T	BA000001
<i>Pyrococcus kukulkanii</i> NCB100 ^T	CP010835
<i>Pyrococcus yayanosii</i> Ch1 ^T	CP002779
<i>Palaeococcus ferrophilus</i> DMJ ^T	LANF00000000
<i>Palaeococcus pacificus</i> DY20341 ^T	CP006019

ANNEXE 2 - Liste des protéines utilisées pour la réalisation de l'arbre phylogénomique des *Thermococcales*

PFAM ID	HMM name	Description of archaeal genes
PF00687	Ribosomal_L1	Ribosomal protein L1p/L10e family
PF00466	Ribosomal_L10	Ribosomal protein L10
PF00298	Ribosomal_L11	Ribosomal protein L11, RNA binding domain
PF03946	Ribosomal_L11_N	Ribosomal protein L11, N-terminal domain
PF00572	Ribosomal_L13	Ribosomal protein L13
PF00238	Ribosomal_L14	Ribosomal protein L14p/L23e
PF00827	Ribosomal_L15e	Ribosomal L15
PF00252	Ribosomal_L16	Ribosomal protein L16p/L10e
PF01280	Ribosomal_L19e	Ribosomal protein L19e
PF00181	Ribosomal_L2	Ribosomal Proteins L2, RNA binding domain
PF01157	Ribosomal_L21e	Ribosomal protein L21e
PF00237	Ribosomal_L22	Ribosomal protein L22p/L17e
PF00276	Ribosomal_L23	Ribosomal protein L23
PF00831	Ribosomal_L29	Ribosomal L29 protein
PF03947	Ribosomal_L2_C	Ribosomal Proteins L2, C-terminal domain
FF00297	Ribosomal_L3	Ribosomal protein L3
PF00327	Ribosomal_L30	Ribosomal protein L30p/L7e
PF01198	Ribosomal_L31e	Ribosomal protein L31e
PF01655	Ribosomal_L32e	Ribosomal protein L32
PF01780	Ribosomal_L37ae	Ribosomal L37ae protein family
PF00832	Ribosomal_L39	Ribosomal L39 protein
PF00573	Ribosomal_L4	Ribosomal protein L4/L1 family
PF00935	Ribosomal_L44	Ribosomal protein L44
PF00281	Ribosomal_L5	Ribosomal protein L5
PF00673	Ribosomal_L5_C	ribosomal L5P family C-terminus
PF00347	Ribosomal_L6	Ribosomal protein L6
PF00411	Ribosomal_S11	Ribosomal protein S11
PF00164	Ribosomal_S12	Ribosomal protein S12
PF00416	Ribosomal_S13	Ribosomal protein S13/S18
PF08069	Ribosomal_S13_N	Ribosomal S13/S15 N-terminal domain
PF00312	Ribosomal_S15	Ribosomal protein S15
PF00366	Ribosomal_S17	Ribosomal protein S17
PF00833	Ribosomal_S17e	Ribosomal S17
PF00203	Ribosomal_S19	Ribosomal protein S19
PF01090	Ribosomal_S19e	Ribosomal protein S19e
PF00318	Ribosomal_S2	Ribosomal protein S2
PF01282	Ribosomal_S24e	Ribosomal protein S24e
PF01599	Ribosomal_S27	Ribosomal protein S27a
PF01200	Ribosomal_S28e	Ribosomal protein S28e
PF01015	Ribosomal_S3Ae	Ribosomal S3Ae family

PF00189	Ribosomal_S3_C	Ribosomal protein S3, C-terminal domain
PF00900	Ribosomal_S4e	Ribosomal family S4e
PF00333	Ribosomal_S5	Ribosomal protein S5, N-terminal domain
PF03719	Ribosomal_S5_C	Ribosomal protein S5, C-terminal domain
PF01092	Ribosomal_S6e	Ribosomal protein S6e
PF00177	Ribosomal_S7	Ribosomal protein S7p/S5e
PF00410	Ribosomal_S8	Ribosomal protein S8
PF01201	Ribosomal_S8e	Ribosomal protein S8e
PF00380	Ribosomal_S9	Ribosomal protein S9/S16
PF01984	dsDNA_bind	Double-stranded DNA-binding domain
PF01912	eIF-6	eIF-6 family
PF09173	eIF2_C	Initiation factor eIF2 gamma, C terminal
PF00749	tRNA-synt_1c	tRNA synthetases class I (E and Q), catalytic domain
PF03950	tRNA-synt_1c_C	tRNA synthetases class I (E and Q), anti-codon binding domain
PF00750	tRNA-synt_1d	tRNA synthetases class I (R)
PF09249	tRNA_NucTransf2	tRNA nucleotidyltransferase, second domain
PF04414	tRNA_deacylase	D-aminoacyl-tRNA deacylase
PF00368	HMG-CoA_red	Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase
PF01351	RNase_HII	Ribonuclease HII

Titre : Identification et caractérisation fonctionnelle des communautés microbiennes en interaction avec les minéralisations hydrothermales

Mots clés : *Archaea*, hydrothermal, *Thermococcales*, géomicrobiologie, bioréacteur gas-lift, hydrogène

Résumé : Les sources hydrothermales océaniques sont caractérisées par la formation de dépôts de sulfure massif d'associations minéralogiques complexes autour de la zone d'émission du fluide hydrothermal. La base de la chaîne trophique de ces écosystèmes est assurée par la production primaire chimio-synthétique des micro-organismes spécifiques à ces écosystèmes. L'objectif de ce travail de thèse était d'identifier et de caractériser fonctionnellement ces communautés microbiennes en interaction à l'interface entre la biosphère et la géosphère. Afin de répondre à cet objectif, des approches innovantes de colonisation *ex situ* de substrats naturels de sulfures massifs ont été réalisées grâce à des incubations en mésocosmes. Cinq incubations en bioréacteur Gas-lift ont été réalisées à partir de cheminées et de fluides prélevés sur trois champs hydrothermaux de l'Atlantique (Lucky Strike, Snake Pit et TAG).

L'utilisation de fluide non filtré comme base minérale a permis l'enrichissement de micro-organismes originaux jusqu'alors non détectés dans les inventaires moléculaires. Dans l'ensemble, les minéraux associés à ces incubations ont été colonisés par des communautés d'hyperthermophiles dont la structure de population est similaire à celle des fractions liquides. De plus, un nouveau mécanisme de tolérance à l' H_2 considéré jusqu'alors comme inhibiteur de la croissance chez les *Thermococcales*, a été décrit. Ce trait métabolique original constitue un élément pour comprendre leur distribution ubiquiste dans les écosystèmes hydrothermaux. Ces travaux permettent d'étendre nos connaissances sur la diversité hyperthermophile de ces écosystèmes.

Title: Identification and functional characterization of microbial communities interacting with hydrothermal mineralizations

Keywords: *Archaea*, hydrothermal, *Thermococcales*, geomicrobiology, gas-lift bioreactor, hydrogen

Abstract: Deep-sea hydrothermal vents are characterized by massive sulphide deposits composed of complex mineralogical associations around the hydrothermal fluid venting zone. The trophic chain in these ecosystems mainly relies on chemosynthetic primary production carried out by specific microorganisms. The aim of this work was identification and metabolic characterization of the microbial communities at the geosphere-biosphere interface. In order to achieve this objective, microbial colonization of natural massive sulphide substrates was studied using innovative *ex situ* mesocosm incubations. Five incubations in a gas-lift bioreactor were performed using samples of hydrothermal chimneys and fluids from three Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields (Lucky Strike, Snake Pit and TAG).

The use of unfiltered hydrothermal fluid as a base medium has allowed the enrichment of original microorganisms previously undetected in molecular inventories. Population structures of hyperthermophilic communities in the liquid fractions and colonizing the mineral substrates were similar. Moreover, a new mechanism of tolerance to H_2 in *Thermococcales* was described. This new metabolic trait could help to understand the wide distribution of *Thermococcales* in deep marine ecosystems. These results extend our knowledge of the microbial hyperthermophilic diversity of these ecosystems.