

**THESE DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

**Spécialité : Microbiologie**

Présentée par

**Karine ALAIN**

en vue de l'obtention du grade de Docteur en Microbiologie

**APPROCHES CULTURALES ET MOLECULAIRES DES ASSEMBLAGES  
MICROBIENS ASSOCIES AUX POLYCHETES HYDROTHERMAUX DE LA  
FAMILLE ALVINELLIDAE**

Soutenue publiquement le 3 octobre 2003

Devant la commission d'examen composée de :

M. Pierre CAUMETTE, Professeur, Université de Pau	Rapporteur
M. Bernard OLLIVIER, Directeur de recherche, IRD Marseille	Rapporteur
M. Francis DUCHIRON, Professeur, Université de Reims (directeur de thèse)	Examineur
M. Georges BARBIER, Professeur, Université de Bretagne Occidentale	Examineur
M. Daniel PRIEUR, Professeur, Université de Bretagne Occidentale	Examineur
MM. Marie-Anne CAMBON-BONAVITA, chercheur IFREMER, Brest	Examineur

*« Un univers dans un grain de sable,  
Un paradis dans une fleur sauvage,  
L'infini dans la paume de la main. »*

William Blake (1757-1827)

## **Remerciements**

Au terme de ces trois années de thèse passées dans le laboratoire de Microbiologie et de Biotechnologie des Extrêmophiles de L'Ifremer Brest, le moment est venu de remercier tous ceux qui m'ont, à divers titres, aidée.

Avant toute chose, je tiens à témoigner ma gratitude et mes plus sincères remerciements aux membres du jury qui me font un immense honneur en acceptant de participer à l'évaluation de mon travail de thèse.

Merci à L'Ifremer et à la région Bretagne qui ont financé ce travail et m'ont permis de le réaliser dans de bonnes conditions.

Je tiens à remercier plus particulièrement Joël Quéréllou, directeur du laboratoire de Microbiologie et de Biotechnologie des Extrêmophiles de L'Ifremer, pour la confiance qu'il a placée en moi, sa disponibilité, ses conseils avisés, son exigence, son esprit critique lors de la correction de mes articles et de ma thèse, et pour son soutien dans les moments difficiles. Merci Joël, tu as toujours répondu présent lorsque j'avais besoin de toi et j'ai appris énormément à ton contact.

Un grand merci également à Francis Duchiron, professeur de l'université de Reims, qui a accepté de me faire confiance en acceptant de diriger cette thèse. Merci Francis d'avoir toujours été disponible pour répondre à mes questions, malgré la distance, et d'avoir partagé avec moi tes solides connaissances des métabolismes microbiens.

Je remercie Marie-Anne Cambon-Bonavita, chercheur à l'Ifremer, pour m'avoir donné l'opportunité de faire une thèse. Avec elle la thèse fut une grande aventure... Merci de m'avoir laissé toute initiative et d'avoir contribué ainsi à mon épanouissement scientifique.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à Georges Barbier, professeur de l'université de Bretagne Occidentale et ancien directeur de ce laboratoire, pour son soutien, sa disponibilité, son intérêt pour ce travail et pour les nombreux conseils avisés qu'il a pu me donner tout au long de la thèse.

Merci aux membres du laboratoire de Microbiologie des Extrêmophiles qui ont directement ou indirectement concouru à la réalisation de ce travail par leurs conseils, leur complicité ou leur bonne humeur. Je voudrais exprimer plus particulièrement ma reconnaissance à Françoise Lesongeur qui m'a fait bénéficier de son expérience des domaines de la microbiologie et de la biologie moléculaire ainsi que pour ses grandes qualités humaines. Un grand merci également à Patricia Pignet pour les analyses d'HPLC qu'elle a réalisées ainsi que pour sa gentillesse. Merci à mes étudiantes Morgane Quillévére et Sophie Rolland pour le travail de qualité qu'elles ont réalisé et pour leur bonne humeur. Merci à Jean-Paul Raffin pour nos petites discussions politiques, philosophiques ou délirantes du matin ainsi que pour son humour inégalable. Merci à Christophe Rouillon, l'artiste de l'équipe, pour sa joie de vivre, son enthousiasme inaltérable et sa générosité. Mes remerciements s'adressent également à Josiane Le Bars et Christine Lamy pour leur joie de vivre et leur aide logistique, à Anne Godfroy pour sa disponibilité, à Joëlle Jean le clown de service, à Valérie Cueff, Didier Flament, Laurence Gordon, Nicole Devauchelle, Ghislaine Henneke, Thierry Nadalig, Antoine Pagé, Anne Schmitt, Aurélie Letêtu, Audrey le Goaziou, et les autres...

Merci aussi aux collègues microbiologistes de l'IUEM, et en particulier à Jean-Louis Birrien (mon responsable de DEA), Marc Le Romancer, Daniel Prieur (qui m'a mise en relation avec mon directeur de thèse Francis Duchiron) et Laurent Toffin pour leur soutien, leurs encouragements et leurs conseils.

Merci également à mes collègues chimistes Anthony Courtois, Xavier Moppert et Benoît Queguineur pour leur bonne humeur permanente, leur naturel, leur gentillesse et pour nos délires.

Une mention toute particulière pour mes deux complices Laurent Urios et Anne Postec, co-galériens et amis, pour leurs précieux conseils scientifiques, leur soutien et leurs encouragements, nos discussions stimulantes, nos conversations littéraires et métaphysiques, les crocodiles Haribo et les soirées à bulles....merci pour tout !

Qu'il me soit permis de remercier :

Philippe Crassous, chercheur à l'Ifremer, pour son aide précieuse en microscopie électronique à balayage et en micro-analyse, ainsi que pour sa bonne humeur et pour la disponibilité dont il a toujours su faire preuve à mon égard.

Daniel Desbruyères, chercheur à l'Ifremer, pour avoir partagé avec moi sa passion pour la macrofaune des sources hydrothermales océaniques profondes et pour ses conseils précieux dans la rédaction de l'article sur la microflore associée à *Paralvinella palmiformis*.

Gérard Raguénès, chercheur à l'Ifremer, pour m'avoir formée aux mesures de G+C% ainsi que pour son soutien et sa gentillesse.

Jean Guézennec, directeur du laboratoire Biotechnologie et Molécules Marines de l'Ifremer-Brest, pour les analyses de la composition du polymère sécrété par *Desulfurobacterium crinifex* ainsi que pour ses encouragements et ses précieux conseils.

Yves Fouquet, directeur du laboratoire Géochimie-Métallogénie de l'Ifremer-Brest, pour les travaux de diffraction X et pour sa collaboration à l'article sur les macrostructures formées par *Desulfurobacterium crinifex*.

Jean-Pierre Donval, technicien du laboratoire Géochimie-Métallogénie de l'Ifremer-Brest, pour les analyses de chromatographie gazeuse qu'il a effectuées dans le cadre de la caractérisation de *Caminicella sporogenes*.

Michel Olagnon, chercheur à l'Ifremer-Brest, pour avoir adapté à nos logiciels de phylogénie le programme de statistiques Libshuff.

Kim Juniper, chercheur au Geotop et au département des Sciences biologiques de l'université du Québec, pour m'avoir procuré des échantillons de Juan de Fuca et pour sa collaboration à deux articles.

Magali Zbinden, pour les travaux de microscopie électronique à transmission qu'elle a été amenée à effectuer sur différentes souches.

A ma famille, merci ... Je vous dois tout... Je vous dédie cette thèse.

Je voudrais aussi remercier les chercheurs passionnés et passionnants que j'ai été amenée à rencontrer au cours de colloques ou de campagnes océanographiques et qui m'ont particulièrement touchée par leur enthousiasme à faire partager leur passion, leur gentillesse, leur simplicité et leur grande humilité : merci à Franck Zal, Purificacion Lopez-Garcia, Gilles Ravot, Rudi Amann, Fritz Widdel, Elisaveta Bonch-Osmolovskaya et Erko Stackebrandt. Vous faites partie de cette catégorie de personnes qui donnent des rêves...

Merci à tous ceux qui donnent des rêves et qui contribuent à rendre la recherche plus passionnante chaque jour...

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>1</b>
------------------------------	----------

---

<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>4</b>
------------------------------	----------

---

<b>1. Les sources hydrothermales océaniques profondes : "une explosion de vie en milieu extrême et instable"</b>	<b>4</b>
1.1. Les systèmes hydrothermaux abyssaux	4
1.1.1. Nature et structure des émissions hydrothermales	4
1.1.2. Position géographique des sites hydrothermaux abyssaux	6
1.2. La faune associée à l'écosystème hydrothermal	7
1.2.1. Les consommateurs primaires ou producteurs secondaires	7
1.2.2. Les consommateurs secondaires	10
1.2.3. L'exemple d'une famille de polychètes inféodée aux sources hydrothermales profondes : les Alvinellidae	10
1.2.3.1. Le genre <i>Paralvinella</i>	12
1.2.3.2. Le genre <i>Alvinella</i>	14
1.3. La microflore des sources hydrothermales océaniques profondes	18
1.3.1. Les micro-organismes à la base de la chaîne trophique hydrothermale	18
1.3.2. Les types d'habitats microbiens et les communautés microbiennes associées	19
1.3.3. Les types de métabolisme microbiens attendus dans cet écosystème	19
1.3.4. Distribution des micro-organismes et ordres de grandeurs de leur abondance	21
1.3.5. La diversité microbienne	22
1.3.6. Les micro-organismes isolés des sources hydrothermales océaniques profondes	26
1.4. Place et rôle des micro-organismes dans l'écosystème hydrothermal et interrelations qui les régissent : état de l'art	35
1.4.1. Interrelations habitat/micro-organismes	36
1.4.2. Interrelations micro-organismes/eucaryotes	37
1.4.3. Interrelations micro-organismes/micro-organismes et micro-organismes/virus	38

<b>2. Les techniques d'écologie microbienne</b>	40
<b>2.1. Le concept d'espèce</b>	40
<b>2.2. Les méthodes non moléculaires d'écologie microbienne</b>	42
<b>2.2.1. Les techniques culturelles traditionnelles d'enrichissement-isolément et la taxinomie</b>	42
<b>2.2.2. Des stratégies culturelles élaborées</b>	43
2.2.2.1. Quelques exemples de méthodes de cultures originales	43
2.2.2.2. Les nouvelles techniques d'isolément de cellules individuelles	45
<b>2.2.3. Les techniques de quantification</b>	45
2.2.3.1. Les comptages cellulaires	45
2.2.3.2. La cytométrie en flux	46
2.2.3.3. Les techniques culturelles	46
2.2.3.4. Les mesures de biomarqueurs cellulaires	46
<b>2.2.4. Les mesures d'activité microbienne</b>	47
2.2.4.1. Incorporation d'isotopes stables ou radioactifs	47
2.2.4.2. Mesure des ratios isotopiques	47
2.2.4.3. Mesures d'activités spécifiques	48
<b>2.3. Les techniques moléculaires d'écologie microbienne</b>	48
<b>2.3.1. Le clonage et le séquençage des ADNr 16S</b>	48
<b>2.3.2. L'ARDRA</b>	49
<b>2.3.3. La DGGE et ses variantes</b>	49
<b>2.3.4. La SSCP</b>	50
<b>2.3.5. La T-RFLP</b>	50
<b>2.3.6. Les techniques d'hybridation</b>	51
2.3.6.1. L'utilisation des sondes en dot blot	51
2.3.6.2. L'hybridation <i>in situ</i>	51
2.3.6.3. La technique de FISH-microautoradiographie	52
<b>2.3.7. Les puces à ADN</b>	52
<b>2.3.8. Les techniques de détection des cellules métaboliquement actives</b>	53
<b>2.4. L'apport de la génomique et de la protéomique en écologie microbienne</b>	54
<b>2.4.1. Génomique et écogénomique</b>	54
<b>2.4.2. Protéomique</b>	55
<b>2.5. L'analyse phylogénétique</b>	56
<b>2.5.1. Le principe fondamental : l'évolution hiérarchique des génomes</b>	56
<b>2.5.2. L'alignement</b>	57

<b>2.5.3. Méthodes de reconstruction</b>	57
2.5.3.1. Les méthodes de distance	57
2.5.3.2. Les méthodes fondées sur les caractères	58
2.5.3.3. Estimation de la robustesse des arbres	59

<b>2.6. Impact des techniques culturelles et moléculaires sur notre vision de la diversité microbienne</b>	60
--	----

---

<b>RESULTATS</b>	<b>63</b>
------------------	-----------

---

<b>Chapitre I. Analyses moléculaires des assemblages microbiens associés aux Alvinellidae</b>	67
---	----

<b>I.1. Caractérisation phylogénétique de l'assemblage microbien associé aux cocons muqueux de <i>Paralvinella palmiformis</i></b>	67
--	----

Article 1 : **Karine Alain**, Michel Olagnon, Daniel Desbruyères, Antoine Pagé, Georges Barbier, S. Kim Juniper, Joël Quérellou et Marie-Anne Cambon-Bonavita. Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with mucous secretions of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis* (2002). FEMS Microbiology Ecology, 42 :463-476.

Article publié également dans le journal : Virtual Journal of Geobiology (2002), 1(4).

<b>I.2. Caractérisation phylogénétique de l'assemblage microbien associé au tube de <i>Paralvinella pandorae</i></b>	82
--	----

<b>I.3. Caractérisation phylogénétique de l'assemblage microbien associé au tube de <i>Paralvinella sulfincola</i></b>	86
--	----

Article 2 : Antoine Pagé, S. Kim Juniper, Michel Olagnon, **Karine Alain**, Gaston Desrosiers, Joël Quérellou et Marie-Anne Cambon-Bonavita. Microbial diversity associated with mineral and biogenic samples from an active deep-sea hydrothermal vent chimney. FEMS Microbiology Ecology, soumis.

<b>I.4. Conclusion des analyses moléculaires de la microflore associée aux polychètes Alvinellidae de la dorsale Juan de Fuca</b>	89
---	----

## **Chapitre II. Etudes taxinomiques** 91

### **II.1. *Caminicella sporogenes*, nouvelle espèce d'un nouveau genre du phylum des Firmicutes (description de l'isolat AM1114<sup>T</sup>).** 92

Article 3: **Karine Alain**, Patricia Pignet, Magali Zbinden, Morgane Quillévéré, Francis Duchiron, Jean-Pierre Donval, Françoise Lesongeur, Gérard Raguénès, Philippe Crassous, Joël Quéréllou et Marie-Anne Cambon-Bonavita. *Caminicella sporogenes* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic spore-forming bacterium isolated from an East-Pacific Rise hydrothermal vent (2002). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52 : 1621-1628.

### **II.2. *Caminibacter hydrogeniphilus*, nouvelle espèce d'un nouveau genre de la sous-classe $\epsilon$ des *Proteobacteria* (description de l'isolat AM1116<sup>T</sup>).** 102

Article 4: **Karine Alain**, Joël Quéréllou, Françoise Lesongeur, Patricia Pignet, Philippe Crassous, Gérard Raguénès, Valérie Cueff et Marie-Anne Cambon-Bonavita. *Caminibacter hydrogeniphilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an East-Pacific Rise hydrothermal vent (2002). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52 : 1317-1323.

### **II.3. *Desulfurobacterium crinifex*, une nouvelle espèce productrice de polymère formant des macrostructures atypiques *in vitro* (description de l'isolat NE1206<sup>T</sup>).** 110

Article 5: **Karine Alain**, Sophie Rolland, Philippe Crassous, Françoise Lesongeur, Magali Zbinden, Christian Le Gall, Anne Godfroy, Antoine Pagé, S. Kim Juniper, Marie-Anne Cambon-Bonavita, Francis Duchiron et Joël Quéréllou (2003). *Desulfurobacterium crinifex* sp. nov., a novel thermophilic, pinkish-streamer forming, chemolithoautotrophic bacterium isolated from a Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent and amendment of the genus *Desulfurobacterium*. *Extremophiles*, 7 : 361-370.

### **II.4. Conclusion des études taxinomiques** 121

## **Chapitre III. De la description d'un environnement à des hypothèses sur son écologie** 123

### **III.1. Description des macrostructures formées par *Desulfurobacterium crinifex* et de leurs propriétés : implications écologiques.** 123

Article 6: **Karine Alain**, Philippe Crassous, Jean Guézennec, Yves Fouquet, Magali Zbinden, Marie-Anne Cambon-Bonavita et Joël Quéréllou. Conspicuous filamentous networks of the thermophilic hydrothermal vent



species *Desulfurobacterium crinifex* : spatial arrangement of cells *in vitro*, polymer production and mineral precipitation capabilities. Extremophiles, en préparation.

**III.2. Expériences de colonisation *in situ* : caractérisation de la microflore précédant l'installation des Alvinellidae** 143

Article 7 : **Karine Alain**, Magali Zbinden, Nadine Le Bris, Françoise Lesongeur, Françoise Gaill et Marie-Anne Cambon-Bonavita. Early steps of microbial colonisation processes at deep-sea hydrothermal vents. Environmental Microbiology, sous presse.

**III.3. Conclusion du chapitre III** 176

**CONCLUSION GENERALE** 177

---

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** 180

---

**ANNEXES** 191

---

## *Introduction générale*

La diversité biologique se rencontre à tous les niveaux d'organisation du vivant. Elle est présente du niveau moléculaire au stade cellulaire, depuis l'individu jusqu'à l'écosystème en passant par la population. Elle se manifeste aussi aux niveaux infraspécifique, intraspécifique ou interspécifique. Le vocable "biodiversité" a été créé en 1988 pour qualifier cette diversité biologique. Derrière ce terme relativement vague, d'aucuns reconnaissent divers concepts aux définitions multiples.

Pour les uns, la biodiversité est un tout indivisible et abstrait, synonyme de "variété dans la vie", que l'on peut découper en champs thématiques. Cependant, son spectre est si étendu qu'il ne pourra jamais être appréhendé dans sa globalité ni réduit à un indice mathématique. L'hypothèse Gaïa (James Lovelock, 1969), selon laquelle la Terre constituerait un super-organisme qui s'autorégulerait (régulation du climat, de la chimie des océans...) au bénéfice de l'ensemble de la biosphère, constitue l'archétype de cette vision holistique de la biodiversité.

Pour d'autres, la biodiversité est un ensemble d'entités mesurables selon différentes échelles d'espace et de temps. Elle est quantifiable aux différents niveaux d'organisation du vivant, depuis le gène, en passant par l'espèce et la population, jusqu'à l'écosystème. Selon cette conception, la biodiversité se manifeste non seulement dans l'inventaire des entités mais plus encore dans ses variations quantitatives et qualitatives dans le temps et l'espace.

Selon la Commission Scientifique de l'Institut Français de Biodiversité (IFB), ces deux conceptions de la biodiversité sont non exclusives et paraissent acceptables.

Ces dernières années, les études relevant, à des degrés divers, du concept de biodiversité se sont multipliées. Les analyses de diversité microbienne, *sensu* inventaire des espèces et sous-espèces d'un environnement, se sont notamment considérablement développées. En effet, l'étude des micro-organismes habitant les environnements naturels avait longtemps consisté en une approche culturelle puis une caractérisation des isolats purs selon des critères définis par la taxinomie. La classification des isolats était alors réalisée sur la base de caractères phénotypiques et biochimiques. Seulement, une majorité considérable des micro-organismes observés typiquement dans la nature, et estimée à plus de

99%, ne serait pas cultivable par des techniques culturales standards (Amann *et al.*, 1995). Depuis une dizaine d'années, les études de diversité microbienne ont connu un nouvel essor grâce au développement des méthodes de biologie moléculaire et en particulier des techniques basées sur les molécules d'ARN ribosomiaux. Elles permettent la description de la composition des communautés microbiennes en s'affranchissant des étapes culturales. Désormais, les cultures et la nomenclature ne constituent plus un préalable incontournable aux études de diversité.

Le travail présenté dans ce mémoire a pour objet la description des communautés microbiennes associées aux polychètes hydrothermaux de la famille des *Alvinellidae* en utilisant à la fois des techniques culturales et moléculaires. Les *Alvinellidae* ont été découverts en 1979, au niveau des fumeurs noirs et blancs des sites actifs de la dorsale du Pacifique oriental (EPR 21°N) (Spiess *et al.*, 1980). Les tubes agglomérés de ces polychètes formaient des massifs denses autour des zones d'émission du fluide hydrothermal. Ils semblaient dominer la faune de cet environnement considéré, d'un point de vue anthropocentrique, comme inhospitalier. Ces alvinelles vivant sous une pluie constante de particules de sulfures métalliques à la limite des événements des cheminées, ou au pôle "tiède" des édifices hydrothermaux actifs, comptent parmi les métazoaires les plus thermotolérants. Les tubes qu'ils sécrètent, riches en matière organique, représentent un substrat de qualité pour une colonisation microbienne importante. Cette colonisation microbienne est visible macroscopiquement sous la forme d'un voile blanchâtre qui recouvre de manière systématique les tubes de ces animaux. Jusqu'à aujourd'hui, seule l'espèce *Alvinella pompejana*, ou "ver de Pompéi", qui présente une association obligatoire avec des bactéries filamenteuses, avait fait l'objet d'études de microbiologie. Par contre, les tubes sécrétés par les polychètes *Alvinellidae* avaient fait l'objet d'études limitées. Ils représentaient donc un modèle de choix pour étendre nos connaissances des cortèges microbiens accompagnant ces animaux, et d'une façon plus générale des populations microbiennes résidant sur les édifices hydrothermaux actifs.

Par des approches culturales et moléculaires, je me suis attachée à analyser la diversité microbienne associée à quelques espèces d'*Alvinellidae* provenant de différents sites hydrothermaux.

L'ensemble des études entreprises au cours de ce travail ont été menées avec des objectifs multiples:

- appréhender la diversité microbienne associée aux tubes de différentes espèces d'alvinelles habitant des sites hydrothermaux dont la microflore est peu ou pas connue, et la caractériser d'un point de vue phylogénétique.
- constituer une collection d'isolats microbiens à partir de ces tubes. Ces derniers, riches en matière organique et en contact permanent avec les gaz dissous et les métaux présents dans le fluide hydrothermal, sont susceptibles de comporter une large de diversité de micro-organismes.
- caractériser les isolats taxinomiquement originaux.

En plus des objectifs précédemment énumérés, cette approche polyphasique devrait aboutir à une meilleure connaissance de la diversité microbienne. En outre, des hypothèses quant aux relations entre les communautés microbiennes présentes et leur environnement pourraient être émises.

Les travaux effectués sont présentés de la manière suivante: un premier chapitre introductif est consacré à la présentation des sources hydrothermales océaniques profondes et notamment à celle des polychètes *Alvinellidae* et des communautés microbiennes abyssales. Il se poursuit par un inventaire des techniques culturales et moléculaires utilisées en écologie microbienne. Dans une deuxième partie du mémoire, les résultats de ce travail sont présentés et discutés sous la forme d'articles publiés, soumis ou en préparation. Enfin, ces résultats sont synthétisés dans un chapitre de conclusion et perspectives.

*Revue bibliographique*

# 1. Les sources hydrothermales océaniques profondes : "une explosion de vie en milieu extrême et instable"

## 1.1. Les systèmes hydrothermaux abyssaux

L'écosystème abyssal où règne une obscurité totale, une température d'environ 2°C et une forte pression hydrostatique, a longtemps été considéré comme dépourvu de vie car dénué de production primaire photosynthétique. Ainsi, au milieu du XIX<sup>e</sup> siècle, Forbes avait établi la limite de la vie à 550 m de profondeur. Bien que l'existence de la vie dans les grandes profondeurs fut rapportée quelques années plus tard, c'est en 1977 qu'une plongée du sous-marin américain *Alvin* a permis la découverte surprenante et inattendue de populations animales luxuriantes à 2500 m de profondeur sur la ride des Galapagos (Corliss et Ballard, 1977). Cette découverte de ce que l'on appellera plus tard les sources hydrothermales océaniques profondes constitue certainement l'événement le plus important de ces trente dernières années en océanographie biologique et l'un des plus importants dans le domaine des écosystèmes.

### 1.1.1. Nature et structure des émissions hydrothermales

Les sources hydrothermales océaniques profondes sont localisées au niveau des bassins arrière-arcs et le long des dorsales médio-océaniques de l'Atlantique, du Pacifique et de l'océan Indien.

Leur présence est liée à l'activité volcanique et aux mouvements tectoniques (Edmond *et al.*, 1982). La remontée du magma est observée dans les zones d'étirement tectonique de la croûte océanique. Ce magma, en se refroidissant, se solidifie et se rétracte générant des anfractuosités au niveau de la croûte océanique. L'eau de mer, dense et froide, peut alors pénétrer cette croûte océanique jusqu'à une profondeur de plusieurs kilomètres. A l'approche de la chambre magmatique et au contact des roches en surfusion, elle s'échauffe et voit sa densité diminuer au-delà de son point critique. On parle alors de fluide supercritique. Sous cet état, sa capacité calorifique, son pouvoir solvant et sa fluidité augmentent. Ce fluide surchauffé remonte du fait de sa pression, et, en lessivant les roches basaltiques, se charge en éléments métalliques (Zn, Mn, Fe, Si) et en gaz dissous (H<sub>2</sub>S, H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CO, CO<sub>2</sub>), s'acidifie, et perd certains de ses éléments (Mg<sup>2+</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). Ainsi, au contact du fer, les sulfates de l'eau de mer forment des oxydes de fer ou du sulfure d'hydrogène. Le fluide hydrothermal ainsi formé rejaillit au niveau du plancher océanique, sous l'effet de la pression, en des points focalisés: les sources hydrothermales (Jannasch et Mottl, 1985; Grassle, 1986) (Fig. 1.1). La composition du fluide hydrothermal, son débit et sa température sont variables d'un site à l'autre et même d'un point d'émission à l'autre en fonction du degré de mélange à l'eau de mer. La composition de ce fluide, anoxique, de salinité variable (de 0,1 à 2 fois celle de l'eau de mer), riche en ions métalliques et en gaz dissous, et généralement acide, contraste fortement avec la composition de l'eau de mer environnante.

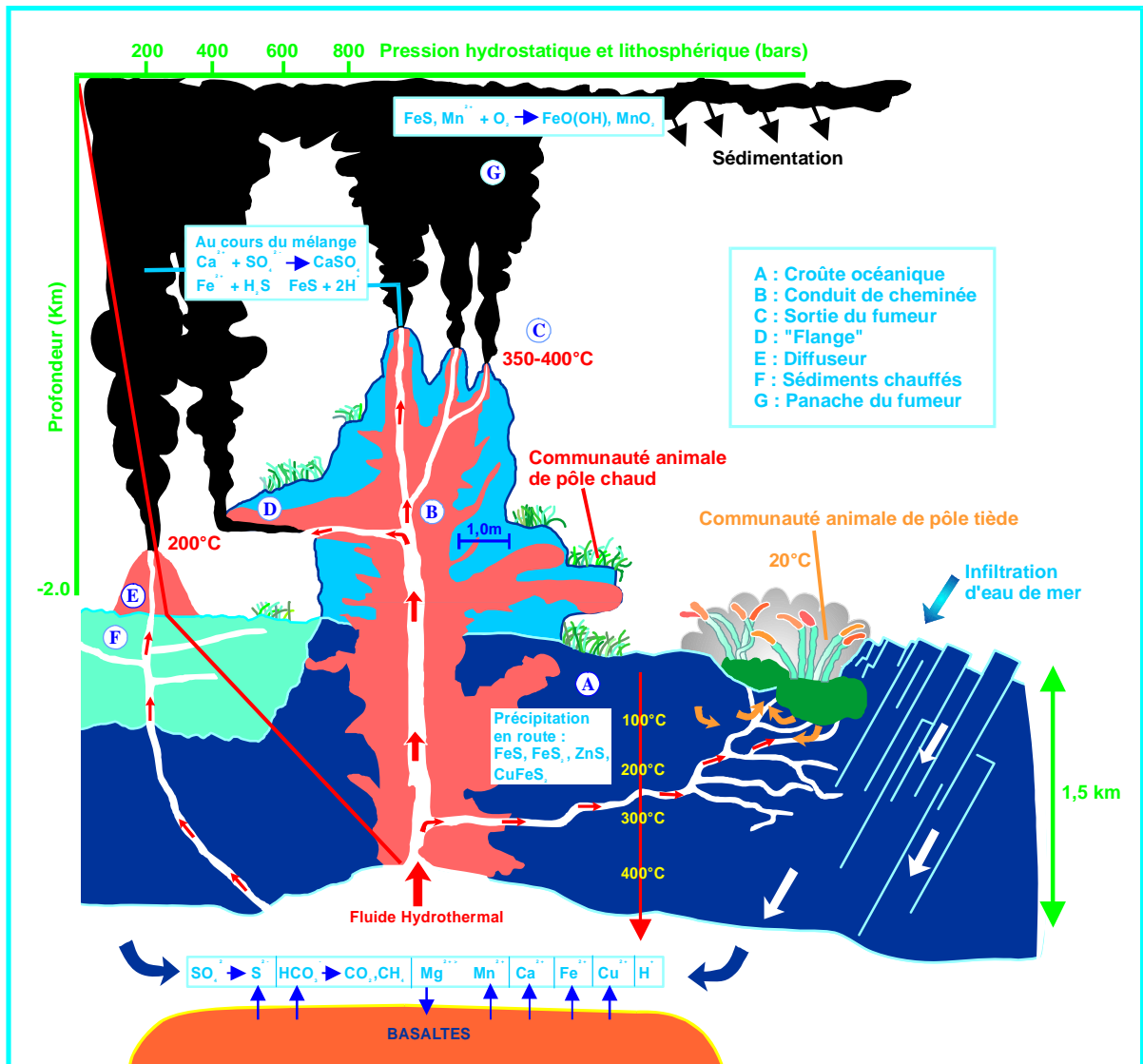


Fig. 1.1 : Représentation schématique des sources hydrothermales océaniques (Jannasch et Mottl, 1985; Baross et Deming, 1993; Erauso, 1994)

Au contact avec l'eau de mer froide et légèrement alcaline, les fluides hydrothermaux surchauffés et hautement réduits forment des précipités de sulfures polymétalliques et des sulfates de calcium qui constituent des édifices minéraux. Le type d'édifices formé dépend du degré de dilution du fluide avec l'eau de mer froide.

Lorsque le fluide hydrothermal ne subit pas de dilution avant son émission, il est émis rapidement ( $0,7\text{-}2,4 \text{ m s}^{-1}$ ) et à des températures très élevées (350-400°C). Son mélange avec l'eau de mer froide provoque la précipitation des minéraux en solution dans l'un et/ou l'autre de ces fluides, qui forment les cheminées hydrothermales ou "fumeurs". Schématiquement, les cheminées sont présentées comme des structures coniques pourvues d'un conduit central. En réalité, ce sont plutôt des structures irrégulières, présentant de nombreux canaux et cavités, qui répondent de manière dynamique aux changements des conditions de température, de débit et de composition chimique du fluide par des modifications de minéralogie et de forme. L'édification d'une cheminée hydrothermale



se déroule en plusieurs étapes (Haymon, 1983; Fouquet *et al.*, 1988). La croissance d'une cheminée hydrothermale débute par la précipitation à très haute température d'une matrice poreuse de sulfates. Cette paroi poreuse, composée de barytine ( $\text{BaSO}_4$ ) ou le plus souvent d'anhydrite ( $\text{CaSO}_4$ ) est mélangée au niveau de sa croûte externe à du cuivre, du zinc et du fer (chalcopryrite, pyrrhotite, pyrite et sphalérite) et croît verticalement. Au cours du temps, la porosité de cette paroi diminue par précipitation au centre de la cheminée de sulfures de fer et de cuivre (pyrite, marcassite, pyrrhotite, chalcopryrite, isocubanite), conduisant à la formation d'un conduit interne. Alors que la cheminée croît latéralement, de nouveaux sulfures (chalcopryrite) plus stables aux nouvelles conditions de températures de la cheminée remplacent l'anhydrite, et des oxydes de fer ou de manganèse se déposent sur la paroi externe. Des expansions latérales ou "flanges" (= rebords ou surplombs) peuvent également se former. Dans le gradient de température ainsi créé, les minéraux s'arrangent de manière concentrique, stabilisant ainsi la structure de la cheminée. De manière générale, les fumeurs noirs sont des édifices minéraux riches en cuivre.

Lorsque le fluide est légèrement dilué avant son émission et que sa température est un peu moins élevée ( $< 280^\circ\text{C}$ ), des édifices appelés diffuseurs ou "fumeurs blancs" peuvent se former (Fouquet *et al.*, 1988). Ces édifices ne possèdent pas de conduit interne. Le fluide diffuse ici à faible vitesse ( $10\text{-}15 \text{ cm s}^{-1}$ ) directement à travers la paroi au travers d'un réseau complexe de petits canaux. Les diffuseurs sont des édifices minéraux riches en zinc.

Un troisième type d'édifice a été découvert récemment dans une région de la croûte océanique (croûte océanique de 1,5 millions d'années) située à 15 km de l'axe d'expansion de la dorsale médio-Atlantique, dans un champ hydrothermal nommé 'Lost City' (Kelley *et al.*, 2001). Ces cheminées sont composées de carbonates (aragonite  $\text{CaCO}_3$  et calcite  $\text{CaCO}_3$ ) et d'hydroxydes de magnésium (brucite  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ).

Par ailleurs, au niveau des laves en coussinets ou "pillow lava", le fluide peut également diffuser à très faible vitesse ( $0,5 \text{ à } 2 \text{ cm s}^{-1}$ ) à une température comprise entre 6 et  $23^\circ\text{C}$ .

### **1.1.2. Position géographique des sites hydrothermaux abyssaux**

Avec une longueur totale de 60 000 km pour une profondeur moyenne de 2600 m, les dorsales océaniques constituent le système volcanique le plus important sur Terre. Leur vitesse d'ouverture, lente dans l'océan Atlantique et très rapide dans le Pacifique, varie entre 0,25 et 20 cm par an. L'équivalent du volume des océans transite à travers ce système tous les 10 millions d'années. La durée d'activité d'une cheminée hydrothermale peut atteindre plusieurs dizaines d'années, mais peut également ne pas dépasser un an sur des zones très actives telles que la dorsale du Pacifique oriental (Edmond et Von Damm, 1983). A ce jour, seules quelques centaines de kilomètres de dorsales océaniques ont été explorées. A l'image des sites hydrothermaux de l'océan Indien récemment découverts (Van Dover *et al.*, 2001), de nombreux sites hydrothermaux restent encore à découvrir.

La figure 1.2 présente la localisation de sites hydrothermaux abyssaux, situés le long des dorsales médio-océaniques ou au niveau des bassins arrière-arcs, et pour lesquels une faune associée a été observée.

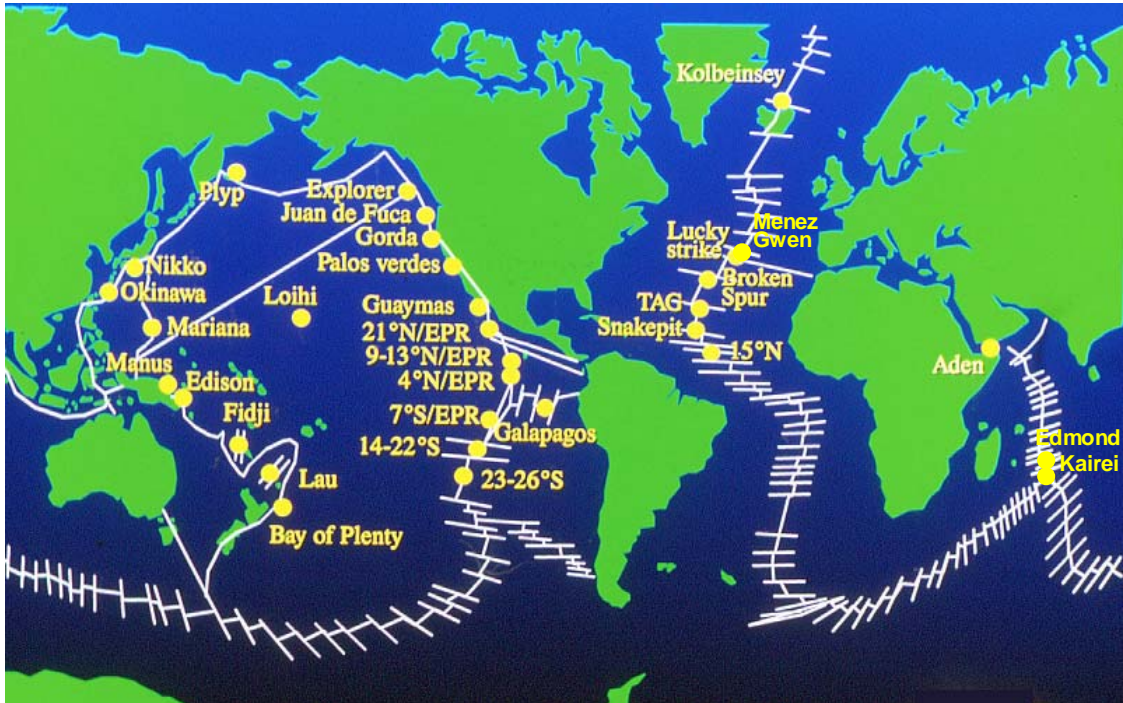


Fig. 1.2 : Localisation géographique des sites hydrothermaux océaniques profonds présentant une faune associée

## 1.2. La faune associée à l'écosystème hydrothermal

Les bactéries forment le premier maillon de la chaîne trophique hydrothermale. La production primaire chimiosynthétique alimente une faune dense, composée d'espèces pour la plupart endémiques, dont la biomasse peut atteindre près de 50 kg de matière vivante par m<sup>2</sup> mais dont la diversité spécifique est relativement faible (Prieur, 1998). La vie hydrothermale se concentre dans la zone de mélange entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer, où les conditions sont extrêmement fluctuantes. La faune est souvent distribuée en auréoles concentriques autour des points d'émission du fluide. Les espèces hydrothermales, appartenant à de nouveaux taxons pour 97% d'entre elles (du genre jusqu'à l'embranchement), présentent des caractéristiques inusitées et peuvent atteindre, pour certaines espèces, des tailles gigantesques. Schématiquement, les espèces hydrothermales peuvent être classées dans 2 catégories suivant leur position dans le réseau trophique hydrothermal, le compartiment microbien étant à la base (le compartiment microbien fera l'objet du chapitre 1.3.).

### 1.2.1. Les consommateurs primaires ou producteurs secondaires

Au 2<sup>nd</sup> niveau du réseau trophique de cet écosystème exubérant, se trouvent les producteurs secondaires ou consommateurs primaires qui se nourrissent de la production primaire chimiosynthétique.

Les associations symbiotiques appartiennent à cette catégorie. De très nombreuses relations de ce type ont été recensées au sein de cet écosystème particulier et plusieurs de ces symbioses ont été étudiées. Dans la plupart des cas, l'hôte tire son énergie de l'association avec un endosymbiote bactérien sulfo-oxydant. Les métazoaires suivants, impliqués dans des relations symbiotiques, ont fait l'objet d'études: le vestimentifère *Riftia pachyptila*, les mollusques bivalves *Bathymodiolus thermophilus* et *Calyptogena magnifica*, les annélides polychètes du genre *Alvinella*, les crustacés *Rimicaris exoculata* et *Rimicaris chacei*, et les gastéropodes *Alviniconcha hessleri* et *Neomphalus fretterae* (Nealson et Fisher, 1995).

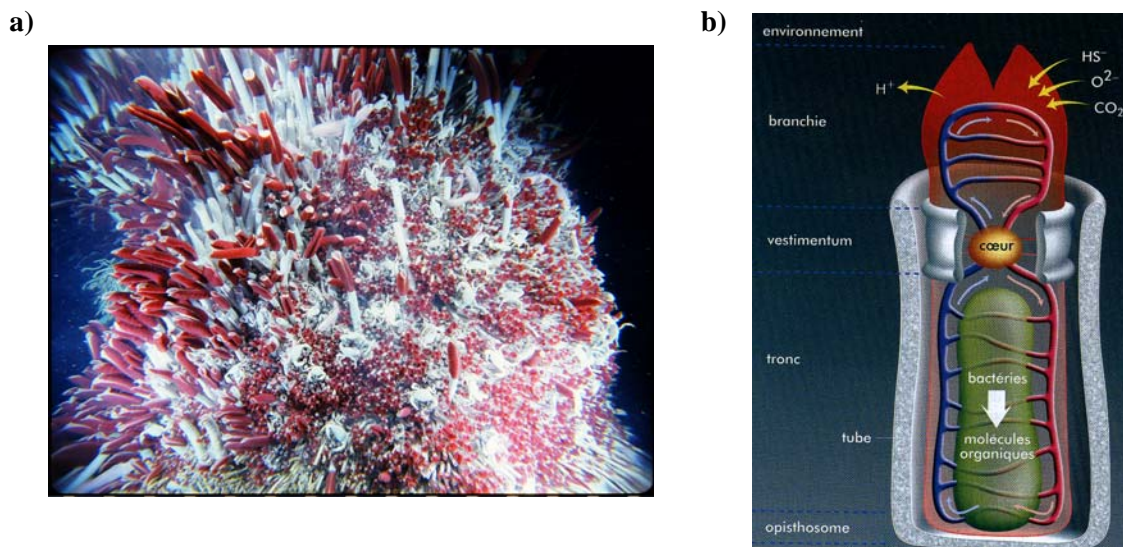


Fig. 1.3 : (a) Colonie de *Riftia pachyptila* (Photographie Ifremer).  
(b) Représentation schématique du métabolisme de *Riftia pachyptila* (Zal, 1999)

L'association symbiotique du vestimentifère *Riftia pachyptila* avec des symbiotes sulfo-oxydant est certainement la plus connue. *Riftia pachyptila* est un ver tubicole géant surmonté d'un panache branchial rouge vif, très efficace dans les échanges respiratoires (Fig. 1.3.). Ce ver de grande taille forme des groupes de plusieurs dizaines à plusieurs centaines d'individus à la base des cheminées hydrothermales actives de la ride du Pacifique oriental. Il est dépourvu de bouche, de tube digestif et d'anus, et peut atteindre 2 m de long pour un diamètre de 4 à 5 cm. Son tronc contient un organe appelé trophosome renfermant des cellules spécialisées ou bactériocytes dans lesquelles se trouvent des symbiotes bactériens. Le vestimentifère absorbe les molécules nutritives ( $H_2S$ ,  $CO_2$  et  $O_2$ ) par ses branchies et les transfère aux bactéries *via* son système sanguin. Ce sont ses hémoglobines extra-cellulaires qui assurent le transport de ces molécules jusqu'au trophosome et les libèrent au voisinage des bactéries symbiotes. Ces molécules vont permettre la croissance et la survie de ces bactéries. En retour, les bactéries vont alimenter leur hôte en transformant ces molécules inorganiques en sucres assimilables par le vestimentifère. Cette association symbiotique assure donc la nutrition des 2 partenaires. En outre, l'hémoglobine particulière de *Riftia*, en fixant le sulfure d'hydrogène, permet de protéger les 2 espèces symbiotiques contre ses effets toxiques (Zal, 1999).

Par ailleurs, d'autres espèces présentent des associations trophiques avec des bactéries recouvrant totalement la surface de leur corps. C'est le cas notamment de l'annélide polychète *Alvinella pompejana* qui présente une association obligatoire avec les bactéries recouvrant les expansions de son tégument dorsal (Desbruyères *et al.*, 1998). Cette relation sera détaillée dans le paragraphe 1.2.3.



Fig. 1.3 : Population de *Rimicaris exoculata* recouvrant une cheminée de la dorsale médio-Atlantique (Photographie Ifremer)

La crevette *Rimicaris exoculata* présente également une association obligatoire avec des bactéries. Ces bactéries, qui recouvrent l'intérieur de sa carapace, toutes ses extrémités et les bordures de son orifice buccal, appartiennent aux  $\epsilon$ -*Proteobacteria* (Polz et Cavanaugh, 1995). Des densités considérables de cette crevette, pouvant représenter jusqu'à 2500 individus par m<sup>3</sup>, ont été observées sur les édifices hydrothermaux actifs de la dorsale médio-Atlantique (Ségonzac, 1992) (Fig. 1.3.). Le mode de nutrition de ces crevettes a été discuté à de nombreuses reprises (Van Dover *et al.*, 1988 ; Ségonzac, 1992; Ségonzac *et al.*, 1993; Rieley *et al.*, 1999). Il semblerait que la crevette "cultive" des bactéries dans sa chambre branchiale en y maintenant des conditions favorables, bactéries qu'elle pourrait ingérer par la suite.

En outre, parmi les consommateurs primaires et les producteurs secondaires de l'écosystème hydrothermal, se trouvent un certain nombre d'espèces dépositives ou de brouteurs qui se nourrissent en grande partie des bactéries se développant sur les cheminées. Au même étage de la pyramide trophique, on compte également des espèces suspensivores se nourrissant de particules en suspension (dérivant de la surface ou du panache hydrothermal), ainsi que des espèces détritivores.



### 1.2.2. Les consommateurs secondaires

Les consommateurs primaires et les bactéries elles-mêmes alimentent toute une faune de prédateurs (crustacés, poissons, pieuvres, etc.) qui vivent autour des sources hydrothermales sans participer à la synthèse primaire de la matière organique. Ces prédateurs appartiennent soit à des espèces inféodées aux sources hydrothermales, soit à des espèces abyssales attirées par la présence de grandes quantités de nourriture.

Plus loin, dans des zones qui ne sont plus directement influencées par le fluide, se développe une faune d'animaux filtreurs (vers serpulidés, anémones de mer, éponges, etc.) qui se développent grâce aux retombées des particules émises par la source hydrothermale.

Ce schéma du réseau trophique hydrothermal avec d'une part les producteurs primaires bactériens, d'autre part les consommateurs primaires et les producteurs secondaires, et enfin les consommateurs secondaires, est purement théorique. Le concept même de réseau trophique est théorique et simplificateur, car en pratique les interactions sont complexes. Dans un système ouvert tel que le système hydrothermal de nombreux paramètres influent sur les relations trophiques. Ainsi, des études récentes ont montré qu'il y avait un lien entre la distribution des communautés faunistiques des sources hydrothermales et la diffusion du fluide, le type de substrat et les conditions physico-chimiques (Sarrazin *et al.*, 1997; Sarrazin et Juniper, 1999). De plus, la dichotomie entre producteurs primaires et producteurs secondaires apparaît difficile à établir pour les espèces hydrothermales. En effet, les études indiquent que plusieurs espèces inféodées aux sources hydrothermales seraient des espèces généralistes et ne se restreindraient pas à une seule source de nourriture. Enfin, il pourrait y avoir des variations entre les sites hydrothermaux et selon le stade de vieillissement du champ hydrothermal.

### 1.2.3. L'exemple d'une famille de polychètes inféodée aux sources hydrothermales profondes : les Alvinellidae

Les Alvinellidae (Desbruyères et Laubier, 1986) sont des annélides polychètes tubicoles qui forment des massifs denses sur les parois des cheminées hydrothermales actives (Fig. 1.4). A l'exception des édifices actifs du bassin de Lau, ils sont inféodés à toutes les principales zones actives du Pacifique où ils ont été retrouvés à des profondeurs comprises entre 700 m (dépression Okinawa) et 3700 m (fosse des Mariannes) (Chevaldonné, 1996). Ces polychètes constituent une famille bien individualisée au sein des Terebellida, mais présentent toutefois des caractères proches des membres de la famille des Ampharetidae (tentacules rétractables, morphologie identique des soies et des uncini). Ce sont des polychètes au prostomium réduit, possédant quatre paires de branchies dorsales et un nombre très variable de segments courts. Ces vers tubicoles ont un mode de vie sédentaire même s'ils sont capables de se déplacer hors de leur tube. Ce sont des mangeurs de dépôt. Ainsi, leur appareil buccal est pourvu de dents cuticulaires en forme de râteaux, caractéristiques de ce mode de

nutrition (Desbruyères *et al.*, 1991). Le système circulatoire des Alvinellidae est très développé, avec une surface branchiale considérable et un nombre très important de mitochondries (Jouin et Gaill, 1990; Chevaldonné, 1996). Le transport des gaz respiratoires est assuré par les hémoglobines extracellulaires du sang et par les érythrocytes du liquide coelomique (Chevaldonné, 1996).

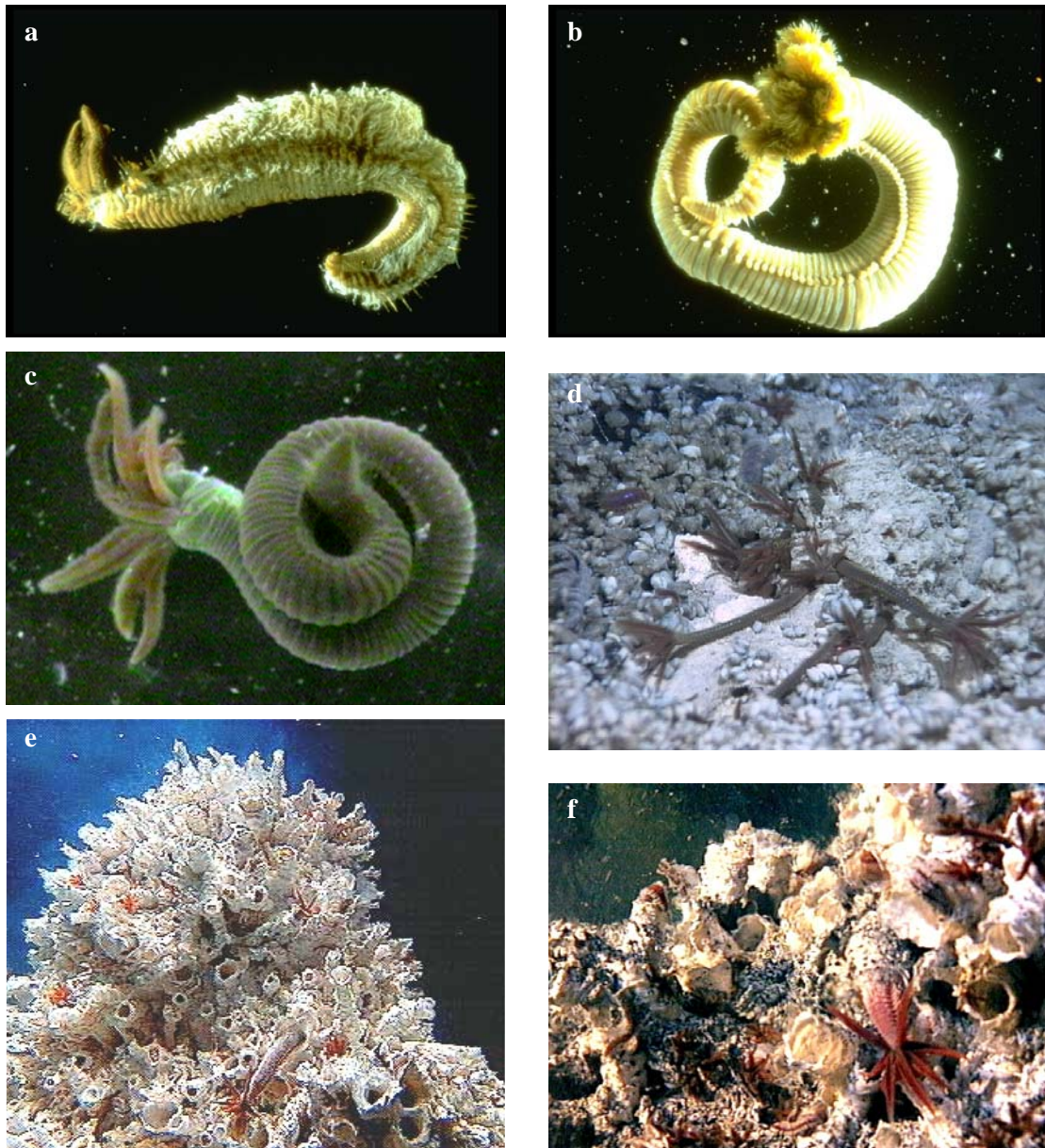


Fig. 1.4 : Alvinellidae et leurs tubes. (a) *Alvinella pompejana*. (b) *Paralvinella grasslei*. (c, d) *Paralvinella palmiformis*. (e, f) Massifs de tubes d'Alvinellidae de l'EPR 13°N. (f) *Alvinella pompejana in situ* sortant d'un tube (Photographies Ifremer)

Les espèces d'Alvinellidae sont réparties en 2 genres, *Alvinella* et *Paralvinella* (Desbruyères et Laubier, 1986).

1.2.3.1. Le genre *Paralvinella* (Desbruyères et Laubier, 1982)

Actuellement, 9 espèces et 2 sous-espèces ont été décrites au sein du genre *Paralvinella*. Ces espèces ont elles-mêmes été regroupées en trois sous-genres sur la base de critères morphologiques : *Paralvinella*, *Miralvinella* et *Nautalvinella* (Desbruyères et Laubier, 1993). Le sous-genre *Paralvinella* comporte respectivement les espèces *Paralvinella (Paralvinella) grasslei*, *Paralvinella (Paralvinella) palmiformis*, *Paralvinella (Paralvinella) fijiensis* et *Paralvinella (Paralvinella) sulfincola*. Le sous-genre *Miralvinella* comprend les espèces *Paralvinella (Miralvinella) dela*, *Paralvinella (Miralvinella) hessleri* et *Paralvinella (Miralvinella) bactericola*. Enfin, le sous-genre *Nautalvinella* comprend les espèces et sous-espèces *Paralvinella (Nautalvinella) pandorae pandorae*, *Paralvinella (Nautalvinella) pandorae irlandei* et *Paralvinella (Nautalvinella) unidentata*. Les espèces du genre *Paralvinella* sont relativement petites, avec une taille comprise entre 1 et 8 cm de long. Elles colonisent des habitats variés sur les cheminées actives depuis la proximité immédiate des événements hydrothermaux chauds jusqu'aux sorties à basse température. Les tubes sécrétés par les *Paralvinella* sont généralement moins élaborés que ceux des *Alvinella*, et consistent la plupart du temps en une sorte de cocon muqueux.

Pour cette étude, nous avons travaillé avec des échantillons de tubes de 3 espèces de *Paralvinella*: *Paralvinella (Paralvinella) palmiformis*, *Paralvinella (Paralvinella) sulfincola* et *Paralvinella (Nautalvinella) pandorae pandorae*.

- *Paralvinella (Paralvinella) palmiformis* (Desbruyères et Laubier, 1986) (Fig. 1.5)



Fig. 1.5 : *Paralvinella palmiformis* (Photographie Université du Texas, USA)

Le "ver palmier" *P. palmiformis* est une espèce endémique des cheminées actives des dorsales Juan de Fuca, Gorda et Explorer du Nord-Est Pacifique (Tunnicliffe et al., 1993). Cette espèce présente la particularité de sécréter de très grandes quantités de mucus et de former une sorte de cocon muqueux peu différencié. Ce mucus protège l'épiderme du polychète de la pluie de particules métalliques émises par les sources hydrothermales et pourrait également jouer un rôle dans le transport des matières toxiques accumulées par le ver (Juniper, 1988). Au cours de leurs fréquents déplacements, les individus abandonnent leur enveloppe muqueuse et le mucus s'accumule alors à la surface des cheminées. *P. palmiformis* occupe des habitats variés et l'on le retrouve aussi bien au niveau des émissions à basse température associé à des vestimentifères tels que *Ridgeia piscesae*, qu'installé sur les diffuseurs à température intermédiaire, ou formant un revêtement à proximité immédiate des orifices des fumeurs noirs à haute température en mélange avec l'espèce confamiliale *P. sulfincola* (Desbruyères et al., 1985; Desbruyères et Laubier, 1986). *P. palmiformis* est considéré comme l'homologue ou l'espèce jumelle de l'espèce *P. grasslei* qui est endémique des sources hydrothermales du Pacifique oriental (Chevaldonné, 1996).

- *Paralvinella (Paralvinella) sulfincola* (Desbruyères et Laubier, 1993) (Fig. 1.6)



Fig. 1.6 : *Paralvinella sulfincola*

(Photographie Centre GEOTOP-UQAM, Montréal, Canada)

Cette espèce, appelée le "ver sulfure", colonise la majeure partie des sites actifs du Nord-Est Pacifique. Elle est présente au niveau des dorsales Juan de Fuca (44°38'-48°27'N), Gorda (41°N) et Explorer (50°N) (Chevaldonné, 1996). Parmi les différentes espèces du genre *Paralvinella*, *P. sulfincola* est celle qui construit le tube le plus structuré. Cependant, son tube est moins structuré que celui des espèces du genre *Alvinella*. *P. sulfincola* colonise la zone des cheminées à la limite des événements d'où jaillit le fluide surchauffé et migre vers le haut de la cheminée à mesure que celle-ci croît en hauteur (Tunnicliffe et al., 1993). Cette espèce est considérée comme l'équivalent écologique des *Alvinella* de la dorsale du Pacifique oriental (Chevaldonné, 1996).



- *Paralvinella (Nautalvinella) pandorae pandorae* (Desbruyères et Laubier, 1986) (Fig. 1.7)



Fig. 1.7 : *Paralvinella pandorae pandorae*  
(Photographie Centre GEOTOP-UQAM, Montréal, Canada)

Cette sous-espèce a été observée sur des édifices actifs du Nord-Est Pacifique au niveau des dorsales Explorer et Juan de Fuca. Elle vit dans des habitats à moyenne ou basse température dans des tubes muqueux très fins qu'elle construit sur les tubes parcheminés du vestimentifère *Ridgeia piscesae* (Desbruyères *et al.*, 1985; Desbruyères et Laubier, 1986). *Paralvinella pandorae pandorae* a une sous-espèce sœur, *Paralvinella pandorae irlandei*, qui se développe à la latitude 13°N dans le Pacifique oriental.

#### 1.2.3.2. Le genre *Alvinella*

Le genre *Alvinella* comprend 2 espèces, *Alvinella caudata* et *Alvinella pompejana*.

*Alvinella pompejana* ou "ver de Pompéi" (Fig. 1.8) représente la première espèce décrite de ce genre de polychètes et vit à proximité immédiate du fluide surchauffé et de la pluie de particules. Contrairement au genre *Paralvinella*, le genre *Alvinella* est strictement inféodé au pôle chaud des écosystème hydrothermaux. Des spécimens ont été observés sur tous les sites actifs du Pacifique oriental à l'exception du bassin de Guaymas et du Rift des Galapagos. *A. caudata* et *A. pompejana* construisent des massifs de tubes à la limite des événements hydrothermaux, dans lesquels les 2 espèces sont généralement associées.



Fig. 1.8 : *Alvinella pompejana* (Photographie Ifremer)

Le genre *Alvinella* diffère du genre *Paralvinella* par de nombreux caractères phénotypiques: une taille nettement supérieure, des tubes parcheminés mieux structurés, la présence d'un segment modifié supplémentaire, des branchies lamelleuses plutôt que filamenteuses, une fusion des quatre premiers segments achètes de la région céphalique et une association obligatoire au stade adulte avec des bactéries épibiontes (Desbruyères et Laubier, 1980; Chevaldonné, 1996; Desbruyères *et al.*, 1998).

- Les épibioses bactériennes

Chez les stades adultes, les 2 espèces d'*Alvinella* présentent de manière systématique une association avec des bactéries épibiontes. Ces bactéries épibiontes recouvrent les expansions dorsales intersegmentaires d'*A. pompejana* et les digitations des parapodes postérieurs d'*A. caudata*. Elles sont également plus ou moins réparties sur tout le corps des animaux. Parmi les épibiontes, les morphotypes filamenteux dominant très clairement, représentant de 60 à 80% de la biomasse de l'épibiose, et sont particulièrement localisés au niveau des expansions des téguments dorsaux (Gaill et Bouligand, 1987; Desbruyères *et al.*, 1998). Les autres morphotypes, répartis sur tout le corps des animaux, incluent des bacilles, des prosthécates, des spirilles et des coques.

Diverses tentatives de culture des épibiontes réalisées en conditions d'autotrophie, d'hétérotrophie, en aérobiose, en anaérobiose, en gradients semi-solides de sulfures, ou en présence de différents accepteurs d'électrons, ont été réalisées (Durand *et al.*, 1990; Jeanthon et Prieur, 1990; Prieur *et al.*, 1990; Campbell *et al.*, 2001). Ces cultures, effectuées en laboratoire à partir des filaments bactériens couvrant les téguments dorsaux des animaux ou à partir de la microflore des tubes, ont conduit à l'isolement d'un grand nombre d'hétérotrophes et de quelques autotrophes, mais aucun de

ces isolats ne possédait la morphologie filamenteuse des épibiontes (Durand *et al.*, 1990; Jeanthon et Prieur, 1990; Prieur *et al.*, 1990). Parmi les isolats, un grand nombre de mésophiles et quelques thermophiles ont été isolés, la majeure partie d'entre eux étant résistants aux métaux lourds (Jeanthon et Prieur, 1990 ; Campbell *et al.*, 2001). Cependant, à ce jour, toutes les tentatives de culture des épibiontes filamenteux d'*Alvinella* ont échoué (Prieur *et al.*, 1990).

Des études moléculaires menées par le groupe de Craig Cary, ont permis d'identifier certains de ces épibiontes (Haddad *et al.*, 1995; Cary *et al.*, 1997; Campbell *et al.*, 2001). Sur la base d'analyses de longueur de fragments de restriction (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*), d'analyses par DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) et d'analyses de séquences d'ADNr 16S de bibliothèques de clones, la position phylogénétique de certains des épibiontes d'*A. pompejana* a été déterminée (Haddad *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 2001). Ces études ont démontré que la communauté épibiotique d'*Alvinella* est dominée par 4 phylotypes. Ces phylotypes forment un groupe distinct et bien individualisé au sein de la sous-division epsilon des *Proteobacteria*. Des résultats d'hybridation *in situ* (FISH, *Fluorescent In Situ Hybridization*) réalisées avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques de ces phylotypes, ont indiqué que ces clones dominants correspondent au morphotype filamenteux (Cary *et al.*, 1997). En outre, une séquence affiliée aux Spirochètes (spirochète B) et représentant environ 1% de la communauté épibiotique associée à *A. pompejana*, a été détectée dans toutes les communautés étudiées (provenant des latitudes 13°N à 32°S de l'EPR) (Campbell *et al.*, 2001). Par ailleurs, des analyses du gène codant pour la bisulfite réductase (enzyme clé intervenant dans la réduction dissimilative des sulfates) menées sur des ADNs issus de la communauté épibiotique d'*Alvinella* ont démontré la présence de 11 familles de clones, suggérant ainsi qu'une partie des épibiontes pourraient pratiquer la respiration anaérobie des sulfates (Cottrell et Cary, 1999).

Jusqu'à très récemment, le métabolisme des épibiontes appartenant aux phylotypes principaux faisait l'objet d'hypothèses très controversées. En effet, les expériences qui avaient été réalisées jusqu'à présent afin de tenter de répondre à cette question avaient parfois conduit à des résultats contradictoires. Ainsi, une étude réalisée en 1985 à partir d'un broyat de tissus d'*Alvinella* avait mis en évidence une activité importante de la Ribulose 1,5-biphosphate Carboxylase Oxygenase (RubisCO) (Tuttle, 1985), mais cette expérience n'avait jamais pu être répétée avec succès. Par ailleurs, des incubations réalisées en présence de bicarbonates marqués (<sup>14</sup>C) et de thymidine tritiée, négatives dans le premier cas et positives dans le second, tendaient à indiquer que les morphotypes filamenteux ne seraient pas impliqués dans des mécanismes de fixation autotrophe du CO<sub>2</sub> (Alayse-Danet *et al.*, 1986; Alayse-Danet *et al.*, 1987) et que, par conséquent, les métabolismes hétérotrophes seraient prédominants. Cependant, plusieurs auteurs plaident plutôt pour une dominance des métabolismes

autotrophes (Tuttle, 1985; Alayse-Danet *et al.*, 1986). Par ailleurs, Desbruyères *et al.* (1998) avaient émis l'hypothèse que les bactéries filamenteuses dominant la biomasse des expansions dorsales seraient des bactéries mixotrophes oxydant les sulfures.

Les travaux d'écogénomique réalisés très récemment par Campbell *et al.* (2003) ont apporté quelques éclaircissements sur le métabolisme des épibiontes. Cette équipe américaine a construit une banque de fosmides à partir de l'ADN de haut poids moléculaire provenant de la biomasse des épibiontes associés à *A. pompejana*, puis a totalement séquencé 2 fosmides de 35.2 et 38 kb contenant les séquences d'ADNr 16S des 2 principaux phylotypes APG 5A et APG 13B. Ces travaux ont ainsi démontré que chacun des fosmides comportait le gène codant pour l'ATP citrate lyase, l'enzyme terminale de la voie inverse des acides tricarboxyliques (rTCA), une voie de fixation du dioxyde de carbone (Campbell *et al.*, 2003). En outre, l'analyse d'une autre banque génomique a démontré que tous les gènes de la voie des acides tricarboxyliques étaient présents dans l'ADN extrait de la communauté épibiotique (Campbell et Cary, résultats non publiés).

De plus, des travaux ont démontré que les ARN messagers codant pour 2 enzymes clés de la voie inverse des acides tricarboxyliques, l'ATP citrate lyase et la 2-oxoglutarate oxidoréductase, étaient exprimés au sein de toutes les communautés épibiotiques d'*A. pompejana* analysées (Campbell *et al.*, 2003). Cependant, ces études n'ont pas permis de déterminer leur niveau d'expression.

Par ailleurs, des mesures de ratios isotopiques ( $\delta^{13}\text{C}$ ) ont été effectuées sur la biomasse épibiotique de plusieurs échantillons. Des valeurs comprises entre -8,9 et -9,3‰ ont été obtenues, ce qui est compatible avec la gamme des ratios isotopiques du carbone des micro-organismes utilisant la voie rTCA (-8 à -12‰) (Campbell *et al.*, 2003).

Ces différents résultats suggèrent fortement qu'au moins une partie de la communauté épibiotique est capable, notamment, mais pas forcément exclusivement, de croissance par autotrophie.

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour tenter d'expliquer l'association des *Alvinella* spp. avec leurs épibiontes bactériens. Il a ainsi été suggéré que les épibiontes pourraient fournir une source de nourriture au polychète (Cary *et al.*, 1997). Les hypothèses d'une éventuelle intervention dans la détoxification de l'environnement immédiat du ver ou d'un rôle dans la protection contre la chaleur ont également été proposées (Prieur et Jeanthon, 1987; Desbruyères *et al.*, 1998). Des études ultérieures seront nécessaires pour élucider le rôle de cette association particulière entre les *Alvinella* et leurs épibiontes bactériens.

### 1.3. La microflore des sources hydrothermales océaniques profondes

#### 1.3.1. Les micro-organismes à la base de la chaîne trophique hydrothermale

La majeure partie des écosystèmes de la planète est basée sur l'utilisation directe ou indirecte de l'énergie lumineuse. Les organismes photosynthétiques y constituent le premier maillon de la chaîne trophique et leur production primaire bénéficie aux autres compartiments biotiques.

La lumière ne pénétrant que les quelques 200 premiers mètres de la colonne d'eau, l'écosystème hydrothermal profond dépend donc d'un autre type d'énergie. Moins de 5% du carbone issu de la photosynthèse atteint les eaux situées au-delà de 2000 m de profondeur (Suess, 1980) et la majeure partie du carbone organique dissout présent à ces profondeurs est constituée de composés organiques peu labiles et difficilement assimilables (Karl, 1995). Les biomasses importantes observées dans les systèmes hydrothermaux ne s'expliquent donc pas par la seule sédimentation des particules issues de la zone euphotique. Bien que situées au sein de l'environnement marin profond aux conditions *a priori* limitantes en carbone et en énergie, les sources hydrothermales sont habitées par des populations animales luxuriantes. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer l'existence d'une telle biomasse.

La première est que l'émission de fluide chaud et de faible densité créerait un mécanisme physique qui augmenterait les flux autour des champs hydrothermaux, et par conséquent les flux de particules (Lonsdale, 1977). Ce flux de matière particulaire permettrait le développement d'espèces suspensivores. Cette hypothèse a été rejetée car les concentrations en particules organiques sont très faibles dans les eaux environnant les sources hydrothermales abyssales (Karl, 1995).

La seconde hypothèse, beaucoup plus vraisemblable, est que cet écosystème exubérant serait basé sur la chimiosynthèse bactérienne (Jannasch et Wirsen, 1979). Le terme chimiosynthèse a été créé par analogie au terme photosynthèse, pour désigner la fixation du dioxyde de carbone à l'obscurité (Jannasch et Wirsen, 1979). Le terme de chimiolithoautotrophie apparaît en fait plus adéquat pour décrire les voies énergétiques et de fixation du carbone incluses implicitement dans le terme de chimiosynthèse (Karl, 1995). Selon cette hypothèse, les micro-organismes chimiolithoautotrophes, pour assurer la synthèse de leurs constituants cellulaires, utiliseraient l'énergie chimique provenant de l'oxydation des composés réduits (notamment les sulfures) présents dans le fluide émis. Cette production primaire bénéficierait aux autres organismes, soit directement par le biais d'associations étroites avec des invertébrés, soit lors de l'utilisation par les consommateurs primaires. Contrairement à une idée reçue, cette hypothèse n'a pour l'instant pas été validée formellement *in situ* avec des échantillons suffisamment représentatifs et un nombre satisfaisant de répétitions des analyses (Karl, 1995). En effet, du fait des difficultés expérimentales importantes, les études d'écologie fonctionnelle de l'écosystème hydrothermal n'en sont qu'à leur début. Cependant, l'hypothèse d'un rôle majeur des micro-organismes chimiolithoautotrophes en tant que producteurs primaires semble très probable compte-tenu des connaissances actuelles de cet écosystème et de l'isolement d'un

nombre croissant de micro-organismes chimiolithoautotrophes aux exigences et aux préférences très diversifiées. Les résultats de mesures d'activités et de concentrations d'ATP réalisées sur un nombre limité d'échantillons, si l'on les extrapole à la biomasse vivante totale, corroborent également cette hypothèse (Karl, 1980, 1995). Par ailleurs, il est nécessaire de garder à l'esprit que la production microbienne autotrophe issue de respirations aérobies ou microaérophiles n'est pas ce que l'on peut appeler à proprement parler une production primaire, car l'oxygène utilisé comme accepteur terminal d'électrons pour ces métabolismes est un produit de la photosynthèse.

Des hypothèses alternatives à celle d'une production primaire bactérienne par chimiolithoautotrophie sont également plausibles (Karl, 1995) et pourraient expliquer, pour tout ou partie, les densités animales observées au niveau des sources hydrothermales abyssales.

La première de ces hypothèses serait celle d'une synthèse chimique thermocatalytique de matière organique et de son utilisation à basse température par des micro-organismes chimioorganohétérotrophes. Des réactions abiogéniques susceptibles de se réaliser dans l'environnement hydrothermal pourraient conduire à la formation de composés organiques tels que des acides gras ou des hydrocarbures (ex. réactions de Fischer-Tropsch (Holm *et al.*, 2001; Charlou *et al.*, 2002)). En outre, plusieurs expériences ont démontré qu'à partir de molécules organiques simples on peut en synthétiser d'autres par thermocatalyse. Ainsi, la synthèse de sucres et d'acides aminés à partir de molécules simples telles que le paraformaldéhyde et l'urée a pu être réalisée sur des roches dépourvues de matière organique provenant de la dorsale médio-Atlantique (Degens, 1974). Les molécules organiques synthétisées pourraient, soit être utilisées directement par des micro-organismes chimioorganohétérotrophes, soit se polymériser en composés plus complexes et être consommées par la microflore sous cette forme polymérisée.

D'autre part, l'hypothèse d'une altération par la température de la matière organique dissoute et de la matière organique ayant sédimenté à partir de la surface, en des formes non réfractaires et utilisables par la microflore, pourrait être avancée. Ce phénomène serait plus important au niveau des bassins sédimentaires (bassin de Guaymas...).

Ainsi, il est possible que la synthèse de matière organique résulte d'une contribution simultanée, en proportions différentes et variables d'un site à l'autre, des mécanismes liés à ces différentes hypothèses (chimiolithoautotrophie, synthèse chimique et pluie sédimentaire de carbone organique). Les contributions respectives de ces différentes voies restent à déterminer. Dans toutes les hypothèses, les bactéries constituent le premier maillon de la chaîne trophique hydrothermale. Plusieurs processus parallèles pourraient coexister à la base de l'écosystème et permettre le développement de communautés microbiennes diverses, pas forcément exclusivement chimiolithoautotrophes, puis l'installation de communautés animales luxuriantes.

### 1.3.2. Les types d'habitats microbiens et les communautés microbiennes associées

L'écosystème hydrothermal est un biotope dynamique caractérisé par une variabilité spatiale et temporelle très importante. Ainsi, cet environnement particulier présente des gradients thermiques et chimiques très marqués à l'échelle du centimètre. En outre, d'un site à l'autre, les conditions physico-chimiques et géologiques rencontrées diffèrent. Il n'est donc pas surprenant que la microflore qui colonise cet écosystème soit très diversifiée et couvre une gamme importante de métabolismes et de préférendums.

Malgré ce caractère de variabilité inhérent à l'écosystème hydrothermal profond, l'on peut tout de même y définir six types d'habitats génériques avec des communautés microbiennes types (d'après Karl, 1995), incluant:

1. Les micro-organismes vivant sous une forme libre dans le fluide hydrothermal ou attachés à des particules émises (Karl, 1995; Huber *et al.*, 2002b, 2003). Cette microflore serait issue d'une biosphère souterraine (Gold, 1992; Deming et Baross, 1993). De récentes études semblent corroborer ce concept de l'existence d'une biosphère souterraine sous-jacente aux cheminées hydrothermales où les micro-organismes pourraient se développer (Summit et Baross, 1998, 2001; Huber *et al.*, 2002b, 2003; Cowen *et al.*, 2003).
2. Les micro-organismes se développant au sein de biofilms bactériens ou de façon libre à la surface des fumeurs, des animaux ou des sédiments et qui seraient exposés au fluide.
3. Les micro-organismes impliqués dans des associations endosymbiotiques ou ectosymbiotiques avec des métazoaires hydrothermaux tels que les vestimentifères, les mollusques, les crustacés ou les polychètes.
4. Les micro-organismes se multipliant dans les panaches ("plume") de fluides hydrothermaux.
5. Les micro-organismes fixés dans les roches poreuses.
6. Enfin, les micro-organismes vivant dans les sédiments des champs hydrothermaux où le fluide percole.

Cette classification est intéressante pour décrire la structure spatiale des peuplements microbiens et orienter les stratégies d'échantillonnage. En pratique, elle demeure théorique, les micro-organismes isolés n'étant pas nécessairement inféodés à un type d'habitat.

### 1.3.3. Les types de métabolisme microbiens attendus dans cet écosystème

D'après nos connaissances actuelles des métabolismes microbiens et de l'environnement hydrothermal, et notamment des espèces chimiques présentes dans l'eau de mer ou dans le fluide hydrothermal, il est possible de lister les voies métaboliques susceptibles d'être utilisées par les micro-organismes des sources hydrothermales océaniques profondes (Tableau 1.1.). La liste présentée ci-

dessous n'est pas exhaustive et est susceptible de s'allonger en fonction de l'évolution de nos connaissances au sujet des voies métaboliques et de la physiologie microbienne ou encore des flux de carbone et d'énergie au sein de l'environnement.

Des isolats ont été obtenus pour chacune des voies métaboliques listées dans le tableau ci-dessous, à l'exception de l'oxydation anaérobie du méthane, de l'oxydation anaérobie de l'ammoniac et de l'oxydation aérobie de l'ammoniac.

Tableau 1.1. : Types de métabolismes microbiens observables au niveau des sources hydrothermales océaniques profondes (adapté de Karl, 1995)

Conditions	Donneur d'électrons	Accepteur d'électrons	Source de carbone	Processus métabolique
<b>Aérobiose</b>	H <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	Oxydation de l'hydrogène
	HS <sup>-</sup> , S <sup>0</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	Oxydation des composés soufrés
	Fe <sup>2+</sup>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	Oxydation du fer
	Mn <sup>2+</sup>	O <sub>2</sub>	[CH <sub>2</sub> O]	Oxydation du manganèse
	NH <sub>3</sub> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	Nitrification
	CH <sub>4</sub> , CO (et autres composés en C1) [CH <sub>2</sub> O]	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> [CH <sub>2</sub> O]	Méthanotrophie et méthylothrophie Hétérotrophie aérobie
<b>Anaérobiose</b>	H <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CO <sub>2</sub>	Dénitrification
	H <sub>2</sub>	S <sup>0</sup>	CO <sub>2</sub>	Sulfo-réduction
	H <sub>2</sub>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>	Sulfato-réduction
	H <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	Méthanogénèse
	CH <sub>4</sub>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub> ou CH <sub>4</sub>	Oxydation anaérobie du méthane
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , Fe <sup>3+</sup> )	?	Oxydation anaérobie de l'ammoniac
	S <sup>2-</sup> , S <sup>0</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CO <sub>2</sub>	Dénitrification, sulfo-oxydation
	[CH <sub>2</sub> O]	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	[CH <sub>2</sub> O]	Dénitrification
	[CH <sub>2</sub> O]	S <sup>0</sup>	[CH <sub>2</sub> O]	Hétérotrophie, réduction du soufre
	[CH <sub>2</sub> O]	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	[CH <sub>2</sub> O]	Hétérotrophie, sulfato-réduction
[CH <sub>2</sub> O]	[CH <sub>2</sub> O]	[CH <sub>2</sub> O]	Fermentation	

#### 1.3.4. La distribution des micro-organismes et les ordres de grandeur de leur abondance

L'analyse de la distribution des micro-organismes au sein des différentes niches de l'écosystème hydrothermal et leur quantification a fait l'objet d'un nombre d'études relativement limité (Chevaldonné et Godfroy, 1997; Harmsen *et al.*, 1997; Takai *et al.*, 2001), bien que ces paramètres soient particulièrement importants dans l'étude d'un écosystème. Différentes techniques de numération ont été employées pour étudier cette question. Les techniques de comptage qui ont été



utilisées étaient basées sur des comptages sur boîtes de Pétri, sur la technique du nombre le plus probable (NPP), sur l'analyse des lipides ou sur des comptages directs au microscope à épifluorescence après marquage des ADNs au moyen d'un agent intercalant (acridine orange ou 4'-6'-diaminidino-2-phenylindole: DAPI) ou en utilisant des sondes oligonucléotidiques fluorescentes (Fluorescent *In Situ* Hybridisation: FISH) (Jannasch et Wirsén, 1979; Hedrick *et al.*, 1992; Baross et Deming, 1993; Chevaldonné et Godfroy, 1997; Harmsen *et al.*, 1997; Takai *et al.*, 2001; Schrenk *et al.*, 2003). Selon la méthode de numération employée, les estimations ont donné des valeurs très variables. En outre, les écart-types des valeurs obtenues lors de ces études n'ont pas été calculés. Ce sont donc plutôt des ordres de grandeurs qui ont été mesurés au cours de ces différents travaux. Ainsi, l'abondance des micro-organismes vivant dans les parois des cheminées serait comprise entre  $10^4$  et  $10^9$  cellules par gramme de cheminée (Prieur *et al.*, 2001). Il est probable que l'hétérogénéité spatiale soit la règle, et que l'on ait un système en mosaïque au niveau des cheminées. D'après les estimations effectuées, l'abondance des micro-organismes au sein des fluides à basse température ( $< 50^\circ\text{C}$ ) serait comprise entre  $10^6$  et  $10^9$  cellules par ml, et elle serait d'environ  $10^5$ - $5 \cdot 10^5$  cellules par ml dans les fluides à haute température (Corre, 2000). Les analyses de la distribution des micro-organismes sur les cheminées ont montré que l'extérieur des parois était dominé par des micro-organismes appartenant aux *Bacteria* et que l'on y retrouvait les plus fortes densités cellulaires, alors que l'intérieur était très largement dominé par des *Archaea* (Harmsen *et al.*, 1997; Schrenk *et al.*, 2003).

### 1.3.5. La diversité microbienne

En dehors des travaux menés avec des approches culturales (cf. paragraphe 1.3.6.), les premières études d'écologie microbienne des sources hydrothermales océaniques profondes qui ont tenté d'estimer et d'identifier dans sa globalité la diversité microbienne datent du début des années quatre-vingt dix. En 1992, des analyses de lipides ont été réalisées à partir de divers échantillons de cheminées provenant des dorsales Juan de Fuca et Endeavour (Hedrick *et al.*, 1992). Elles ont permis la mise en évidence d'éthers de lipides, signatures des *Archaea*, au milieu d'une excroissance latérale de cheminée (au niveau d'une "flange"). En outre, cette étude a montré l'existence d'une très grande hétérogénéité dans les quantités de cellules et dans leur composition lipidique en fonction de la localisation spatiale au sein de cette structure, et du contact ou de l'absence de contact avec l'eau de mer ou avec le fluide.

Suite à l'émergence des techniques moléculaires basées sur les ARN ribosomiaux et aux progrès réalisés en écologie moléculaire, plusieurs études ont été menées, ces dernières années, pour analyser la diversité de la microflore des sources hydrothermales océaniques profondes. Les premières études moléculaires menées sur des échantillons hydrothermaux profonds dataient du milieu des années 80. Ces études avaient permis d'affilier les symbiotes du vestimentifère *Riftia pachyptila*, et

des mollusques *Calyptogena magnifica* et *Bathymodiolus thermophilus* à la sous-division  $\gamma$  des *Proteobacteria*, à partir de l'analyse de leurs ARNr 5S (Stahl *et al.*, 1984; Lane *et al.*, 1985). Les techniques d'écologie moléculaire, basées sur l'analyse des ADNr 16S, ne seront ensuite appliquées à d'autres types d'échantillons hydrothermaux profonds qu'au milieu des années 90 (Moyer *et al.*, 1994, 1995; Polz et Cavanaugh, 1995).

Ces dix dernières années, des inventaires moléculaires ont été effectués à partir d'échantillons hydrothermaux de différentes provenances et de natures diverses afin d'étudier la microflore qui leur est associée. Ainsi, la microflore ayant colonisé des échantillonneurs déployés sur des cheminées hydrothermales (Reysenbach *et al.*, 2000; Corre *et al.*, 2001; Nercessian *et al.*, 2003), la microflore des tapis microbiens (Moyer *et al.*, 1994, 1995, 1998; Longnecker et Reysenbach, 2001), des cheminées hydrothermales (Muyzer *et al.*, 1995; Takai et Horikoshi, 1999; Takai *et al.*, 2001; Schrenk *et al.*, 2003), des sédiments hydrothermaux (Teske *et al.*, 2002), la microflore associée à des échantillons animaux (Polz et Cavanaugh, 1995; Alain *et al.*, 2002b; Lopez-Garcia *et al.*, 2002) ou encore celle associée au fluide hydrothermal (Huber *et al.*, 2002b, 2003) ont été étudiées.

Reysenbach *et al.* (2000) et Corre *et al.* (2001) se sont intéressés à la microflore d'un module de colonisation, appelé Vent cap, qui a été déployé durant 5 jours sur 2 cheminées du champ hydrothermal Snake Pit de la dorsale médio-Atlantique (MAR). Dans la première expérience, des séquences bactériennes et des séquences archéennes ont été obtenues. Les séquences bactériennes détectées étaient affiliées aux *Aquificales* (18%), aux  $\epsilon$ -*Proteobacteria* (40%) et au genre *Desulfurobacterium* (25%). La majeure partie des séquences archéennes appartenait aux ordres des *Thermococcales* (71%) et des *Archaeoglobales* (22%), bien connus dans ces environnements. Une séquence de *Thermoplasmale* a également été mise en évidence dans cette étude, ce qui indique que les thermoacidophiles de cet ordre sont capables de coloniser cet environnement bien qu'ils n'aient jamais été obtenus en culture. Dans la seconde étude, la banque de clones était également dominée par des séquences affiliées aux  $\epsilon$ -*Proteobacteria* (66%) et comportait des séquences appartenant aux *Aquificales*. Dans une étude récente, Nercessian *et al.* (2003) se sont intéressés à la microflore archéenne colonisant différents modules de colonisation déposés sur la paroi de cheminées actives de la dorsale du Pacifique oriental (EPR 13°N). Grâce à des expériences d'hybridation *in situ*, ils ont estimé que la population archéenne représentait entre 14 et 33% de la communauté procaryotique ayant colonisé les différents échantillonneurs. La microflore de tous les modules de colonisation était largement dominée par des *Thermococcales*. Des séquences affiliées aux *Methanopyrales*, *Methanococcales*, *Archaeoglobales*, *Desulfurococcales* ainsi que des séquences affiliées à des groupes ne possédant pas de représentants cultivés ('Marine group I' des *Crenarchaeota*, aux *Korarchaeota* et au groupe DHVE des *Euryarchaeota*) ont également été détectées.

Des inventaires moléculaires ont également été réalisés à partir d'échantillons de tapis microbiens présents sur des cheminées hydrothermales du Pacifique situées à Loihi Seamount (Hawaii) (Moyer *et al.*, 1994, 1995, 1998) et au niveau de l'EPR 17°S (Longnecker et Reysenbach, 2001). La majorité des séquences bactériennes détectées sur une cheminée active de Loihi Seamount appartenaient aux  $\epsilon$ -*Proteobacteria* (60.5%) et aux  $\gamma$ -*Proteobacteria* (27.1%) (Moyer *et al.*, 1994, 1995). Dans cette étude, de nouvelles séquences d'*Archaea* affiliées aux *Crenarchaeota* et aux *Euryarchaeota* ont également été identifiées (Moyer *et al.*, 1998). Sur un tapis microbien couvrant une cheminée récemment éteinte et située près d'une cheminée active de l'EPR 17°S, Longnecker et Reysenbach (Longnecker et Reysenbach, 2001) ont détecté une grande diversité de séquences d' $\epsilon$ -*Proteobacteria* (98%) et quelques séquences de  $\gamma$ -*Proteobacteria*.

Des analyses phylogénétiques des assemblages archéens présents au niveau des cheminées hydrothermales du bassin de Manus et de la dépression d'Okinawa dans le Pacifique, ont révélé la présence d'une très importante diversité d'*Archaea* appartenant aux *Methanococcales*, aux *Igniococcales*, aux *Thermococcales*, aux *Archaeoglobales*, mais aussi à de nouvelles lignées de *Crenarchaeota*, d'*Euryarchaeota* et de *Korarchaeota* (Takai et Horikoshi, 1999; Takai *et al.*, 2001). Dans l'une de ces études, de nombreuses séquences affiliées au groupe des *Archaea* halophiles, *Halobacteriales*, ont également été observées (Takai *et al.*, 2001). Cependant, d'après l'auteur, rien ne prouve que ces populations d'*Archaea* halophiles détectées à l'intérieur de la cheminée s'y soient développées. Selon lui, elles pourraient provenir d'une biosphère souterraine et avoir été transportées par le fluide hydrothermal. Une analyse de diversité a également été réalisée récemment sur différentes portions d'une cheminée de la dorsale Juan de Fuca (Schrenk *et al.*, 2003). L'utilisation de la sonde universelle bactérienne EUB338 a montré que 53% des micro-organismes situés sur la partie externe de la cheminée s'hybridaient avec cette sonde, mais que le pourcentage de micro-organismes reconnu diminuait fortement pour des échantillons situés plus à l'intérieur de la cheminée. La majorité des séquences archéennes détectées à l'extérieur de la cheminée étaient affiliées au 'Marine group I' des *Crenarchaeota* et à des *Euryarchaeota* d'environnements marins benthiques. Par contre, les séquences d'ADNr 16S de zones situées à l'intérieur de la cheminée appartenaient aux méthanogènes, *Thermococcales*, *Archaeoglobales* et à des phylotypes crenarchéens détectés dans des environnements souterrains profonds.

Très récemment, les populations microbiennes des sédiments actifs du bassin de Guaymas ont été étudiées par une analyse phylogénétique des ADNr 16S combinée à une analyse isotopique des lipides (Teske *et al.*, 2002). Les banques de clones bactériens étaient dominées par des séquences d' $\epsilon$ -*Proteobacteria*, de  $\gamma$ -*Proteobacteria*, de bactéries vertes non-sulfureuses et de la division candidate OP11. Les banques de séquences archéennes étaient, quant à elles, dominées par des séquences de 2

lignées d'*Archaea* incultivées, les groupes ANME-1 et ANME-2, groupes présumés impliqués dans les réactions d'oxydation anaérobie du méthane (Boetius *et al.*, 2000; Orphan *et al.*, 2001). En outre, les valeurs des ratios isotopiques  $\delta$ -<sup>13</sup>C des lipides qui ont été mesurées correspondaient à celles des *Archaea* impliquées dans les processus d'oxydation anaérobie du méthane. Cette étude indique que des groupes de micro-organismes présents dans les sédiments du bassin de Guaymas pourraient être impliqués dans des processus de méthanotrophie anaérobie.

Deux analyses moléculaires de la diversité ont été réalisées à partir d'échantillons animaux (Polz et Cavanaugh, 1995; Lopez-Garcia *et al.*, 2002). En 1995, Polz et Cavanaugh se sont intéressés à la microflore associée de manière obligatoire aux organes buccaux et à la carapace de la crevette *Rimicaris exoculata*, un crustacé endémique des sources hydrothermales profondes de l'Atlantique (Polz et Cavanaugh, 1995). Ils ont démontré que la microflore épibionte était dominée par un phylotype affilié aux  $\epsilon$ -*Proteobacteria* et que ce phylotype semblait également être la composante majoritaire de la microflore présente à la surface des roches situées dans l'environnement direct des crustacés. En 2002, Lopez-Garcia *et al.* ont étudié la diversité procaryotique associée aux tubes chitineux du vestimentifère *Riftia pachyptila* inféodé à l'hydrothermalisme profond du Pacifique oriental (Lopez-Garcia *et al.*, 2002). Ils ont observé que les banques de séquences étaient dominées par des phylotypes appartenant aux  $\epsilon$ -*Proteobacteria* (68%). Au sein de cette classe, la diversité observée était également considérable. En outre, des séquences affiliées aux  $\delta$ -,  $\alpha$ - et  $\gamma$ -*Proteobacteria*, aux Verrucomicrobia, au groupe des *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB), et à la division candidate OP8 ont été recensées. Par contre, la séquence de l'endosymbionte de *Riftia pachyptila*, lequel est affilié aux  $\gamma$ -*Proteobacteria* et serait selon plusieurs auteurs (Cary, 1993; Laue et Nelson, 1997) acquis à chaque génération, n'a pas été détectée.

Enfin, très récemment, les premiers travaux de suivi de l'évolution de populations microbiennes hydrothermales ont été publiés. A partir d'échantillons collectés sur 3 années, Huber *et al.* (2002b, 2003) ont analysé l'évolution temporelle de la diversité des micro-organismes du fluide hydrothermal de différentes cheminées du volcan Axial de la dorsale Juan de Fuca, vivant soit sous une forme libre, soit attachés à des particules. Le but de leur travail était d'étudier la microflore souterraine sous-jacente des cheminées en étudiant la fraction émise lors de l'émission du fluide hydrothermal, ceci directement après une éruption volcanique du volcan Axial, puis, sur les 2 années suivantes. Dans cette étude, la microflore indigène au fluide et par extrapolation à la biosphère souterraine a été déduite par soustraction de la microflore détectée dans l'eau de mer environnante. Les auteurs ont ainsi mis en évidence que la diversité microbienne qui était attachée à des particules était supérieure à celle vivant sous une forme libre. Au sein des bactéries, une très grande diversité indigène d' $\epsilon$ -*Proteobacteria* ainsi que des séquences affiliées au genre *Desulfurobacterium*, aux

bactéries Gram-positives et aux nouvelles divisions WS6 et ABY1 ont été mises en évidence. La microflore indigène archéenne comportait des séquences affiliées aux *Methanococcales*, ainsi qu'un grand nombre de séquences d'*Euryarchaeota* incultivés.

Les méthodes moléculaires ont permis la mise en évidence d'une très grande diversité au sein des *Bacteria* et des *Archaea*. Cette diversité procaryotique est répartie dans quasiment tous les phyla identifiés à ce jour. D'une manière remarquable, au sein de ces phyla, les séquences détectées de sources hydrothermales profondes forment, pour certaines, des lignées bien individualisées qui semblent être inféodées à cet écosystème profond. En outre, une grande proportion des séquences détectées correspondent à de nouvelles lignées ne possédant aucun représentant cultivé. L'un des résultats majeurs qui se dégage de ces études est que la microflore des sources hydrothermales océaniques profondes présente une diversité absolument considérable de micro-organismes de la sous-classe  $\epsilon$  des *Proteobacteria*. Ces  $\epsilon$ -*Proteobacteria* dominent tous les inventaires moléculaires de la diversité microbienne qui ont été réalisés, que ce soit à partir d'échantillons de fluide, d'échantillons animaux ou de tapis microbiens couvrant les cheminées, que ces échantillons proviennent du Pacifique ou de l'Atlantique. Le peu d'études ayant permis une quantification de ces  $\epsilon$ -*Proteobacteria* dans les échantillons hydrothermaux, par des méthodes telles que le dot blot ou l'hybridation *in situ*, ont montré que ces  $\epsilon$ -*Proteobacteria* dominaient la microflore des échantillons étudiés (Polz et Cavanaugh, 1995; Longnecker et Reysenbach, 2001). Au vu de ces résultats, les  $\epsilon$ -*Proteobacteria* auraient un rôle important dans l'écosystème hydrothermal.

### 1.3.6. Les micro-organismes isolés des sources hydrothermales océaniques profondes

Les sources hydrothermales océaniques profondes constituent des environnements extrêmes du fait des conditions physico-chimiques qui y règnent. Ces écosystèmes sont notamment caractérisés par d'importants gradients thermiques qui se forment entre le fluide hydrothermal surchauffé (350-400°C) et l'eau de mer froide environnante (~ 2°C). Du fait de ces caractéristiques thermiques, de nombreux microbiologistes ont axé leurs travaux sur la recherche de micro-organismes thermophiles ( $T_{opt.} > 60^{\circ}\text{C}$ ) et hyperthermophiles ( $T_{opt.} > 80^{\circ}\text{C}$ ). Outre l'aspect fondamental présenté par la description de nouvelles souches thermophiles et hyperthermophiles, ces micro-organismes sont en effet susceptibles de renfermer des molécules d'intérêt biotechnologique pour les procédés se déroulant à haute température. Le marché des enzymes et des composés organiques issus d'organismes extrêmophiles est estimé à 17 milliards de dollars. Au premier rang des molécules d'intérêt biotechnologique se trouvent les enzymes thermostables. Ainsi, alors que l'exploitation d'enzymes issues de micro-organismes thermophiles ou hyperthermophiles tarde à s'intégrer au sein des procédés industriels, certainement parce que les enzymes thermostables isolées ne correspondent pas

précisément ou pas suffisamment à leurs besoins ou que leur substitution aux enzymes classiques n'est pas financièrement intéressante, elle est largement employée en biologie moléculaire. Plusieurs ADN polymérase (emploi dans les réactions de polymérisation en chaîne), une phosphatase alcaline (utilisation en immuno-marquage) et une ADN ligase issues de souches des sources hydrothermales profondes font aujourd'hui l'objet de brevets et sont commercialisées. Cet engouement des microbiologistes pour les thermophiles explique certainement que la majeure partie des micro-organismes isolés à ce jour des sources hydrothermales abyssales ne soient pas mésophiles mais thermophiles ou hyperthermophiles.

Le nombre d'espèces bactériennes et archéennes isolées d'environnements hydrothermaux profonds est relativement limité. Celles-ci sont recensées dans les tableaux 1.2 et 1.3.

La plupart des micro-organismes décrits sont des hétérotrophes anaérobies réduisant le soufre. Ils incluent notamment plusieurs représentants de l'ordre bactérien des *Thermotogales* (Antoine *et al.*, 1997; Wery *et al.*, 2001a; Alain *et al.*, 2002a; etc) et de l'ordre archéen des *Thermococcales* (Erauso *et al.*, 1993; Godfroy *et al.*, 1996, 1997; Canganella *et al.*, 1998; Marteinson *et al.*, 1999b; Cambon-Bonavita *et al.*, 2003; etc). Au sein des *Bacteria*, plusieurs  $\gamma$ -*Proteobacteria* ont été décrites. Elles correspondent à des bactéries autotrophes soufre- et sulfures-oxydantes du genre *Thiomicrospira* (Ruby et Jannasch, 1982; Jannasch *et al.*, 1985; Wirsén *et al.*, 1998) ou à des bactéries hétérotrophes productrices de polysaccharides appartenant aux genres *Vibrio* et *Alteromonas* (Raguénès *et al.*, 1996, 1997a, 1997b, sous presse; Cambon-Bonavita *et al.*, 2002). Au sein des *Archaea*, un fort pourcentage des isolats obtenus sont des anaérobies hyperthermophiles appartenant à l'ordre des *Methanococcales* méthanogènes (Jones *et al.*, 1983; Jeanthon *et al.*, 1998, 1999; Takai *et al.*, 2002) et à l'ordre des *Archaeoglobales* (Burggraf *et al.*, 1990; Huber *et al.*, 1997; Kashefi *et al.*, 2002).

Récemment, le groupe de Karl Stetter a cultivé à partir d'échantillons hydrothermaux profonds une *Archaea* coccoïde de 400 nm de diamètre qui se développe exclusivement en coculture avec un hôte actif du genre *Ignicoccus* auquel elle est attachée (Huber *et al.*, 2002a). Cette *Archaea* de très petite taille possède le plus petit génome archéen connu (0.5 Mb). Elle a été appelée '*Nanoarchaeum equitans*'. La divergence phylogénétique observée entre la petite sous-unité ribosomale de cette *Archaea* et celle de représentants des 2 phyla archéens Crenarchaeota et Euryarchaeota, ainsi qu'avec des séquences du phylum 'Korarchaeota' connu uniquement au travers de séquences environnementales, font que ses découvreurs ont proposé la définition d'un nouveau phylum. Ils ont appelé ce phylum 'Nanoarchaeota'.

Tableau 1.2. : *Bacteria* isolées des sources hydrothermales océaniques profondes

Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
<b>Aquificae</b> <i>Persephonella</i>	<i>P. marina</i>	microaérophile, autotrophe, sulfo-thiosulfato- et hydrogène-oxydante, dénitrifiante	Pacifique (EPR 9°N 104°W)	70	(Gotz <i>et al.</i> , 2002)
	<i>P. guaymasensis</i>	microaérophile, autotrophe, sulfo-thiosulfato- et hydrogène-oxydante, dénitrifiante	Bassin de Guaymas, Pacifique	70	(Gotz <i>et al.</i> , 2002)
	<i>P. hydrogeniphila</i>	microaérophile, autotrophe, hydrogène-oxydante, dénitrifiante	Suiyo Seamount, Pacifique	70	(Nakagawa <i>et al.</i> , 2003)
<b>'Desulfurobacterales'</b> <i>Desulfurobacterium</i>	<i>D. thermolithotrophum</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfo-réductrice	Snake Pit, Atlantique (MAR)	70	(L'Haridon <i>et al.</i> , 1998)
	<i>D. crinifex</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfo-réductrice et dénitrifiante	CASM, Pacifique (JdFR)	60-65	Ce travail (Alain <i>et al.</i> , 2003)
<b>Thermotogae</b> <i>Marinitoga</i>	<i>M. camini</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réductrice	Ménez-Gwen, Atlantique (MAR)	55	(Wery <i>et al.</i> , 2001)
	<i>M. piezophila</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réductrice	Grandbonum, Pacifique (EPR 13°N)	65	(Alain <i>et al.</i> , 2002a)
<i>Thermotoga</i>	<i>Thermotoga</i> sp.	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réductrice	Snake Pit, Atlantique (MAR)	80	(Marteinsson <i>et al.</i> , 1997b)
<i>Thermosipho</i>	<i>T. melanesiensis</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réductrice	Bassin de Lau, Pacifique	70	(Antoine <i>et al.</i> , 1997)
	<i>T. japonicus</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo- et thiosulfato-réductrice	Bassin de Iheya (Okinawa), Pacifique	72	(Takai et Horikoshi, 2000)

Tableau 1.2. : *Bacteria* isolées des sources hydrothermales océaniques profondes (suite)

Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
<b>Thermodesulfobacteria</b> <i>Thermodesulfobacterium</i>	<i>T. hydrogeniphilum</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfato-réductrice	Bassin de Guaymas, Pacifique	75	(Jeanthon <i>et al.</i> , 2002)
<b>Nouvelle lignée</b> <i>Caldithrix</i>	<i>C. abyssi</i>	Anaérobie, mixotrophe, fermentaire, dénitrification couplée à oxydation d'hydrogène ou d'acétate	Logatchev, Atlantique (MAR)	60	(Miroshnichenko <i>et al.</i> , 2003a)
<b>Groupe des <i>Thermus-Deinococcus</i></b> <i>Thermus</i>	<i>T. thermophilus</i> GY1211	Aérobie, hétérotrophe	Bassin de Guaymas, Pacifique	75	(Marteinsson <i>et al.</i> , 1999a)
	<i>Thermus</i> sp.	Aérobie, hétérotrophe	Bassin de Guaymas, Pacifique et Snake Pit, Atlantique (MAR)	70-80	(Marteinsson <i>et al.</i> , 1995)
<i>Marinithermus</i>	<i>M. hydrothermalis</i>	Aérobie, hétérotrophe	Suiyo Seamount, Pacifique	67	(Sako <i>et al.</i> , 2003)
<i>Oceanithermus</i>	<i>O. profundus</i>	Microaérophile, lithotrophe facultative oxydant l'hydrogène, organohétérotrophe,	Pacifique (EPR 13°N)	60	(Miroshnichenko <i>et al.</i> , 2003b)
<i>Vulcanithermus</i>	<i>V. mediatlanticus</i>	Microaérophile, lithohétérotrophe réduisant O <sub>2</sub> et NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Rainbow, Atlantique (MAR)	70	(Miroshnichenko <i>et al.</i> , 2003c)



Tableau 1.2. : *Bacteria* isolées des sources hydrothermales océaniques profondes (suite)

Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
<b>Deferribacteres</b> <i>Deferribacter</i>	<i>D. desulfuricans</i>	Anaérobie, hétérotrophe, réduisant le soufre, les nitrates et l'arsenate	Suiyo Seamount, Pacifique	60-65	(Takai <i>et al.</i> , 2003b)
	<i>D. abyssi</i>	Anaérobie, litho ou organo-autotrophe, réduisant S <sup>0</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> et Fe <sup>3+</sup>	Rainbow et Ménez-Gwen, Atlantique (MAR)	60	(Miroshnichenko <i>et al.</i> , 2003d)
<b>Firmicutes</b>					
<i>Caloranaerobacter</i>	<i>C. azorensis</i>	Anaérobie, fermentaire	Lucky Strike, Atlantique (MAR)	65	(Wery <i>et al.</i> , 2001b)
<i>Caminicella</i>	<i>C. sporogenes</i>	Anaérobie, fermentaire	Elsa, Pacifique (EPR 13°N)	55-60	Ce travail (Alain <i>et al.</i> , 2002c)
<i>Clostridium</i>	<i>C. caminithermale</i>	Anaérobie, fermentaire, capable de réaliser la réaction de Stickland	Ménez-Gwen, Atlantique (MAR)	45	(Brisbarre <i>et al.</i> , 2003)
<i>Tepidibacter</i>	<i>T. thalassicus</i>	Anaérobie, fermentaire, réduisant S <sup>0</sup>	Pacifique (EPR 13°N)	50	(Slobodkin <i>et al.</i> , 2003)
<i>Carboxydobrachium</i>	<i>C. pacificum</i>	Anaérobie, fermentaire. Capable de croissance par lithotrophie sur CO	Pacifique (Okinawa)	70	(Sokolova <i>et al.</i> , 2001)
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Aérobie, hétérotrophe	Bassins de Guaymas et de Lau, Pacifique et Snake Pit, Atlantique (MAR)	60-80	(Marteinsson <i>et al.</i> , 1996)

Tableau 1.2. : *Bacteria* isolées des sources hydrothermales océaniques profondes (suite)

Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
<b><i>Proteobacteria</i></b>					
<b><i>α-Proteobacteria</i></b> Indéterminé	Souche JF-1	Aérobic pratiquant la photosynthèse anoxygénique !	Pacifique (JdFR)	30	(Yurkov et Beatty, 1998)
<b><i>β-Proteobacteria</i></b> <i>Thiobacillus</i>	<i>T. hydrothermalis</i>	Aérobic, autotrophe, oxydant le thiosulfate, le tetrathionate, le soufre et le sulfure d'hydrogène en sulfates	Bassin Nord Fidjien, Pacifique	35	(Durand <i>et al.</i> , 1993)
<b><i>δ-Proteobacteria</i></b> <i>Geothermobacter</i>	<i>G. ehrlichii</i>	Anaérobic, réduisant le fer ferrique et les nitrates	'Bag city', Pacifique (JdFR)	55	(Kashefi <i>et al.</i> , 2003)
<i>Desulfonauticus</i>	<i>D. submarinus</i>	Anaérobic, oxydant l'hydrogène et le formate et réduisant les sulfates, les sulfites, le thiosulfate et le soufre élémentaire	Grandbonum, Pacifique (EPR 13°N)	45	(Audiffren <i>et al.</i> , 2003)
<i>Desulfovibrio</i>	<i>D. hydrothermalis</i>	Anaérobic, mixotrophe, sulfato-, sulfito-, thiosulfato-réductrice	Grandbonum, Pacifique (EPR 13°N)	35	(Alazard <i>et al.</i> , 2003)

Tableau 1.2. : *Bacteria* isolées des sources hydrothermales océaniques profondes (fin)

Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
<b>Proteobacteria (suite)</b>					
<b><i>γ-Proteobacteria</i></b>					
<i>Thiomicrospira</i>	<i>T. crunogena</i>	Aérobie, autotrophe, oxydant le thiosulfate, le soufre et le sulfure d'hydrogène en sulfates et soufre élémentaire	Pacifique (EPR 21°N)	28-32	(Jannasch <i>et al.</i> , 1985)
	<i>Thiomicrospira</i> sp., strain MA-3	Aérobie, autotrophe, oxydant le thiosulfate, le soufre et le sulfure d'hydrogène en sulfates et soufre élémentaire	TAG, Atlantique (MAR)	28-32	(Wirsen <i>et al.</i> , 1998)
	<i>Thiomicrospira</i> sp., strain L-12	Aérobie, autotrophe, oxydant le thiosulfate, le soufre et le sulfure d'hydrogène en sulfates et soufre élémentaire	Galapagos, Pacifique	25	(Ruby et Jannasch, 1982)
<i>Vibrio</i>	<i>V. diabolicus</i>	Anaérobie facultatif, hétérotrophe	Pacifique (EPR 13°N)	30-45	(Raguénès <i>et al.</i> , 1997a)
<i>Alteromonas</i>	<i>A. macleodii</i> subsp. <i>fijiensis</i>	Aérobie, hétérotrophe	Bassin Nord Fidjien, Pacifique	25-35	(Raguénès <i>et al.</i> , 1996)
	<i>A. infernus</i>	Aérobie, hétérotrophe	Bassin de Guaymas, Pacifique	25-35	(Raguénès <i>et al.</i> , 1997b)
	<i>A. macleodii</i> subsp. <i>fijiensis</i> biovar <i>deepsane</i>	Aérobie, hétérotrophe	Pacifique (EPR 13°N)	30-35	(Cambon-Bonavita <i>et al.</i> , 2002)
	<i>A. macleodii</i> subsp. <i>fijiensis</i> biovar <i>medioatlantica</i>	Aérobie, hétérotrophe	Snake Pit, Atlantique (MAR)	35-40	(Raguénès <i>et al.</i> , 2003)
<b><i>ε-Proteobacteria</i></b>					
<i>Caminiibacter</i>	<i>C. hydrogeniphilus</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfo-réductrice, dénitrifiante	Elsa, Pacifique (EPR 13°N)	60	Ce travail (Alain <i>et al.</i> , 2002d)
<i>Nautilia</i>	<i>N. lithotrophica</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfo-réductrice	Pacifique (EPR 13°N)	53	(Miroshnichenko <i>et al.</i> , 2002)
<i>Sulfurospirillum</i>	<i>Sulfurospirillum</i> sp. Am-N	Anaérobie, hétérotrophe	Pacifique (EPR 13°N)	41	(Campbell <i>et al.</i> , 2001)
	N.B. : très récemment, de nombreuses souches d' <i>ε-Proteobacteria</i> ont été isolées de sources hydrothermales océaniques profondes. Elles sont actuellement en cours de caractérisation.				(Takai <i>et al.</i> , 2003a)

Tableau 1.3. : *Archaea* isolées des sources hydrothermales océaniques abyssales

Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
<b>'Nanoarchaeota'</b>					
<i>Nanoarchaeum</i>	<i>N. equitans</i>	Enrichie en conditions d'anaérobiose et d'autotrophie	Pacifique (EPR 9°N 104°W)	90	(Huber <i>et al.</i> , 2002a)
<b>Crenarchaeota</b>					
<b><i>Desulfurococcales</i></b>					
<i>Ignicoccus</i>	<i>I. pacificus</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfo-réducteur	Pacifique (EPR 9°N 104°W)	90	(Huber <i>et al.</i> , 2000b)
<i>Staphylothermus</i>	<i>S. marinus</i>	Anaérobie, hétérotrophe, sulfo-réducteur	Pacifique (EPR 11°N)	85-92°C	(Fiala <i>et al.</i> , 1986)
<i>Pyrodictium</i>	<i>P. abyssi</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Bassin de Guaymas, Pacifique	97	(Pley <i>et al.</i> , 1991)
	Souche 121	Réalise l'oxydation du formate couplée à la réduction du fer ferrique (formation magnétite)	Mothra (Finn), Pacifique (JdFR)	Gamme t° : 85-121°C	(Kashefi et Lovley, 2003)
<i>Pyrolobus</i>	<i>P. fumarii</i>	Anaérobie facultatif, autotrophe oxydant l'hydrogène et réduisant les nitrates, le thiosulfate et les faibles concentrations d'oxygène	TAG, Atlantique (MAR)	106	(Blöchl <i>et al.</i> , 1997)
<b>Euryarchaeota</b>					
<b><i>Methanococcales</i></b>					
<i>Methanocaldococcus</i>	<i>M. jannaschii</i>	Anaérobie, méthanogène	Pacifique (EPR 21°N)	85	(Jones <i>et al.</i> , 1983)
	<i>M. infernus</i>	Anaérobie, méthanogène	Logatchev, Atlantique (MAR)	85	(Jeanthon <i>et al.</i> , 1998)
	<i>M. vulcanius</i>	Anaérobie, méthanogène	Pacifique (EPR 13°N)	80	(Jeanthon <i>et al.</i> , 1999)
<i>Methanothermococcus</i>	<i>M. okinawensis</i>	Anaérobie, méthanogène	Iheya Ridge, Pacifique (Okinawa)	60-65	(Takai <i>et al.</i> , 2002)

Tableau 1.3. : *Archaea* isolées des sources hydrothermales océaniques abyssales (suite et fin)

Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
<b><i>Thermococcales</i></b>					
<i>Thermococcus</i>	<i>T. guaymensis</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Bassin de Guaymas, Pacifique	88	(Canganella <i>et al.</i> , 1998)
	<i>T. aggregans</i>	"	Bassin de Guaymas, Pacifique	88	(Canganella <i>et al.</i> , 1998)
	<i>T. barossi</i>	"	Pacifique (JdFR)	82	(Duffaud <i>et al.</i> , 1998)
	<i>T. fumicolans</i>	"	Bassin Nord Fidjien (Pacifique)	85	(Godfroy <i>et al.</i> , 1996)
	<i>T. hydrothermalis</i>	"	Pacifique (EPR 21°N)	85	(Godfroy <i>et al.</i> , 1997)
	<i>T. peptonophilus</i>	"	Pacifique (fosse des Mariannes)	85-90	(Gonzalez <i>et al.</i> , 1995)
	<i>T. siculi</i>	"	Pacifique (Okinawa)	85	(Grote <i>et al.</i> , 1999)
	<i>T. chitonophagus</i>	"	Bassin de Guaymas, Pacifique	85	(Huber <i>et al.</i> , 1995)
	<i>T. barophilus</i>	"	Snake Pit, Atlantique (MAR)	85	(Marteinsson <i>et al.</i> , 1999b)
	<i>T. atlanticus</i>	"	TAG, Atlantique (MAR)	85	(Cambon-Bonavita <i>et al.</i> , 2003)
	<i>T. gammatolerans</i>	"	Bassin de Guaymas, Pacifique	88	(Jolivet <i>et al.</i> , 2003)
<i>Pyrococcus</i>	<i>P. abyssi</i>	"	Bassin Nord-Fidjien, Pacifique	96	(Erauso <i>et al.</i> , 1993)
	<i>P. glycovorans</i>	"	Pacifique (EPR 13°N)	95	(Barbier <i>et al.</i> , 1999)
	<i>P. horikoshii</i>	"	Pacifique (Okinawa)	98	(Gonzalez <i>et al.</i> , 1998)
<i>Palaeococcus</i>	<i>P. ferrophilus</i>	Anaérobie, hétérotrophe, réduisant le soufre (fer nécessaire comme cofacteur pour sa croissance)	Pacifique (Ogasawara)	83	(Takai <i>et al.</i> , 2000)
<b><i>Archaeoglobales</i></b>					
<i>Archaeoglobus</i>	<i>A. profundus</i>	Anaérobie, mixotrophe, sulfato-réducteur	Bassin de Guaymas, Pacifique	82	(Burggraf <i>et al.</i> , 1990)
	<i>A. veneficus</i>	Anaérobie, croissance en lithoautotrophie avec les sulfites ou le thiosulfate comme accepteurs ou respiration organotrophe des sulfites	Snake Pit, Atlantique (MAR)	75-80	(Huber <i>et al.</i> , 1997)
<i>Geoglobus</i>	<i>G. ahangari</i>	Anaérobie, mixotrophe, croissance en lithoautotrophie ou en organohétérotrophie avec le fer ferrique comme accepteur d'électrons	Bassin de Guaymas, Pacifique	88	(Kashefi <i>et al.</i> , 2002)
<b><i>Methanopyrales</i></b>					
<i>Methanopyrus</i>	<i>M. kandleri</i>	Anaérobie, méthanogène, sulfo-réducteur (la production d'H <sub>2</sub> S provoque une lyse cellulaire), réduisant le CO <sub>2</sub> ou le CH <sub>4</sub>	Bassin de Guaymas, Pacifique	98	(Kurr <i>et al.</i> , 1991)

Ces deux dernières années, plusieurs espèces d' $\epsilon$ -*Proteobacteria*, une classe à priori bien représentée et importante au niveau de l'écosystème hydrothermal, ont été isolées de sources abyssales (Alain *et al.*, 2002d: ce travail; Miroshnichenko *et al.*, 2002; Takai *et al.*, 2003a). Des bactéries thermophiles autotrophes réduisant le soufre et/ou les nitrates, et représentant les nouveaux genres bactériens *Caminibacter* (Alain *et al.*, 2002d) et *Nautilia* (Miroshnichenko *et al.*, 2002) ont ainsi été décrites. De nombreux autres genres nouveaux, isolés d'échantillons hydrothermaux profonds du Pacifique ou de l'océan Indien, sont actuellement en cours de description (Takai *et al.*, 2003a). La caractérisation préliminaire de ces isolats a démontré qu'il s'agit d'espèces mésophiles ou thermophiles réduisant les nitrates et/ou le soufre, et/ou se développant en microaérophilie.

#### **1.4. Place et rôle des micro-organismes dans l'écosystème hydrothermal et interrelations qui les régissent : état de l'art**

L'écologie microbienne est une discipline visant à aborder la place et la fonction des micro-organismes au sein d'un habitat ainsi que les interrelations avec les autres organismes et avec l'environnement, les régissant. Jusqu'à présent, les études réalisées ont été principalement menées au niveau des espèces. Comme cela a été détaillé dans le paragraphe précédent (cf. paragraphe 1.3.6.), les travaux de microbiologie réalisés jusqu'à présent sur la microflore des sources hydrothermales abyssales ont essentiellement conduit à la description de nouvelles espèces et de nouveaux genres microbiens et par conséquent à la caractérisation de leur métabolisme. Par ailleurs, plusieurs études se sont intéressées à la physiologie des micro-organismes hydrothermaux (Blumentals *et al.*, 1990; Schafer et Schönheit, 1991; Raven *et al.*, 1992; Kengen et Stams, 1994; Godfroy *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 2001; etc). D'autres travaux ont porté sur l'étude de leur adaptation aux conditions environnementales et notamment aux conditions de température (Stetter, 1999) et de pression (Marteinsson *et al.*, 1997a, 1999b, 1999c; Prieur et Marteinsson, 1998)(L'analyse du protéome de *P. glycovorans* cultivé sous pression a été réalisée récemment – Georges Barbier, communication personnelle). En outre, au cours de ces dix dernières années, d'autres études ont commencé à aborder l'écologie microbienne des sources hydrothermales profondes, non plus à l'échelle des espèces mais à l'échelle des populations microbiennes, au travers d'analyses de la diversité et de quelques analyses de distribution et d'abondance des micro-organismes au sein de cet écosystème (cf. paragraphes 1.3.4 et 1.3.5). Toutefois, les études visant à comprendre le rôle et la place des micro-organismes dans leur habitat demeurent à ce jour limitées. L'inventaire des connaissances des interrelations micro-organismes/habitat, micro-organismes/eucaryotes et micro-organismes/micro-organismes sont détaillées ci-après.

#### 1.4.1. Interrelations habitat/micro-organismes

Même si cela n'a pas été démontré formellement, l'écosystème hydrothermal abyssal est sans doute principalement basé sur la production primaire chimiolithoautotrophe. Les réactions d'oxydo-réduction gouvernent les processus chimiosynthétiques. L'hydrosphère est relativement oxydée et riche en accepteurs d'électrons potentiels ( $O_2$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ). A l'inverse, les roches basaltiques formant la croûte océanique sont relativement réduites du fait de leur richesse en fer ferreux. Le lessivage des roches par le fluide hydrothermal surchauffé conduit à la formation de gaz réduits ( $H_2S$ ,  $CH_4$  et  $H_2$ ) qui sont dissous dans le fluide hydrothermal. De ce fait, un large éventail de métaux, de composés chimiques et de gaz avec différents niveaux d'oxydation sont disponibles au niveau de l'écosystème hydrothermal et sont donc susceptibles d'être utilisés comme donneurs ou accepteurs d'électrons, ou comme sources de carbone.

Les réactions de serpentinisation pourraient également être importantes pour les réactions de chimiosynthèse (Zierenberg *et al.*, 2000). Durant les processus de serpentinisation, certains minéraux constituant les roches du manteau (olivine et/ou pyroxène) sont oxydés de manière exothermique en présence d'eau. Lors de ces processus, l'eau est réduite à l'état d'hydrogène moléculaire, le fer ferreux (Fer(II)) est oxydé en fer ferrique (Fer(III)), et le dioxyde de carbone contenu dans les minéraux est libéré. L'hydrogène produit en grandes quantités lors de la serpentinisation réagit avec le dioxyde de carbone pour générer des composés organiques (hydrocarbures à chaîne linéaire, acides gras, méthane...) par un processus de type Fischer-Tropsch (Holm et Charlou, 2001). L'hydrogène et/ou le fer ferrique produit par les réactions de serpentinisation sont facilement métabolisables par de nombreux micro-organismes, et les molécules organiques produites indirectement par ce processus sont également susceptibles d'être utilisées par la microflore.

D'autre part, l'hypothèse d'une intervention de micro-organismes dans les processus de minéralisation au niveau des sources hydrothermales océaniques profondes, est partagée par un nombre grandissant de microbiologistes et de géochimistes. Ainsi, plusieurs études ont rapporté l'observation d'accumulations minérales d'oxydes de fer et de silice amorphe (opale A) au niveau de structures filamenteuses qui ont été observées au niveau de dépôts ou de parois de cheminées hydrothermales de différents sites hydrothermaux (Baross et Deming, 1985; Juniper et Fouquet, 1988). Aucune explication minéralogique évidente ne peut être avancée pour expliquer cette récurrence de la morphologie filamenteuse (Juniper et Fouquet, 1988). Les tailles de ces filaments et, dans certains cas, un marquage positif à l'acridine orange, suggèrent fortement que les structures filamenteuses observées aient une origine microbienne (Juniper et Fouquet, 1988). En outre, une étude récente a rapporté que la plupart des tapis microbiens observés à Loihi Seamount (Pacifique) ont une structure gélatineuse et sont fortement incrustés d'oxydes de fer couleur rouille (Emerson et Moyer, 2002). Des bactéries capables d'oxyder le fer, telles que *Leptothrix ochracea*, possèdent des signatures morphologiques caractéristiques, telles que des enveloppes, qui constituent des matrices sur lesquelles

les oxydes de fer ferriques se déposent (Ghiorse, 1984). De telles morphologies ainsi que des morphologies filamenteuses sont abondantes parmi les oxydes de fer observés à Loihi Seamount et des cultures de bactéries oxydant le fer ont pu être obtenues à partir de ces échantillons (Ghiorse, 1984). Ces différents travaux suggèrent fortement que les micro-organismes jouent un rôle important dans les processus d'oxydation du fer au niveau des sources hydrothermales abyssales. Les travaux de Edwards *et al.* (Edwards *et al.*, 2003) publiés très récemment confirment que certains micro-organismes sont capables d'intervenir sur les dépôts minéraux observés au niveau des sources hydrothermales. En effet, à partir d'échantillons hydrothermaux des dorsales Endeavour et Juan de Fuca, ils ont isolé des  $\gamma$ - et des  $\alpha$ -*Proteobacteria* oxydant le fer et capables de se développer sur des substrats minéraux et des roches solides synthétiques constitutives des cheminées, telles que la pyrite ( $\text{FeS}_2$ ) ou la sidérite ( $\text{FeCO}_3$ ), en les utilisant comme source d'énergie unique. Ces travaux tendent à prouver que les micro-organismes oxydant le fer jouent un rôle géomicrobiologique dans les processus d'altération des roches hydrothermales.

Si les travaux de géomicrobiologie commencent à mettre en évidence l'existence d'une interrelation entre les édifices minéraux hydrothermaux et les micro-organismes, une tâche considérable reste à accomplir pour comprendre l'influence réciproque de la microflore et de la composition, voire de la structure des édifices hydrothermaux. D'autre part, l'étude de l'influence des conditions physico-chimiques sur les populations microbiennes n'a pas été réalisée pour l'instant. Des études intégrées réalisées à micro-échelle (analyses le long des gradients physico-chimiques) et à macro-échelle (analyses intra- et inter-champs hydrothermaux) et couplant l'analyse des populations microbiennes et la caractérisation de leur habitat (minéralogie, conditions physico-chimiques) s'avéreront nécessaires, dans le futur, pour comprendre les interrelations entre les micro-organismes et leur habitat.

#### **1.4.2. Interrelations micro-organismes/eucaryotes**

La microflore est à la base d'un réseau trophique (dont les différents constituants ne sont pas totalement identifiés pour l'instant) qui permet le développement de communautés animales denses et également de pico-eucaryotes. Différents types et niveaux d'interactions entre les populations, incluant des relations directes et indirectes (telles que l'altération ou la destruction de l'habitat d'une espèce par une autre espèce) et notamment des relations trophiques directes ou indirectes (prédation, broutage, compétition, symbiose, syntrophie, commensalisme, parasitisme, ou simplement la consommation de métabolites produits par une autre espèce) ont sans aucun doute lieu dans ce type d'environnement. Cependant, tous les échelons de cette cascade de réactions intriquées d'une manière complexe, ne sont pas identifiés à ce jour.



Les interrelations entre les micro-organismes et les métazoaires ont été largement abordées au travers des nombreuses études qui ont été menées sur les associations symbiotiques de vestimentifères, de mollusques, de crustacés et de gastéropodes avec des endo- ou epi-symbiotes bactériens. Ces associations symbiotiques ont été abordées dans les paragraphes 1.2.1. et 1.2.3.

#### **1.4.3. Interrelations micro-organismes/micro-organismes et micro-organismes/virus**

Les interrelations entre micro-organismes n'ont pas fait l'objet de beaucoup d'études. Quelques données les concernant ont tout de même été obtenues directement et indirectement.

L'analyse de l'association obligatoire de *Nanoarchaeum equitans* avec une espèce du genre *Ignicoccus* constitue l'une des premières études véritables sur les interrelations entre micro-organismes hydrothermaux (Huber *et al.*, 2002a) (cf. 1.3.6.). Seule l'analyse descriptive préliminaire de cette association a été publiée jusqu'à présent et la caractérisation complète de cette association obligatoire est actuellement en cours.

Récemment, quelques équipes ont entrepris des recherches sur les relations virus/micro-organismes (*Bacteria*, *Archaea*). Des études réalisées en microscopie électronique à transmission sur des échantillons hydrothermaux profonds provenant de la dorsale médio-Atlantique et de la dorsale du Pacifique oriental ont mis en évidence une grande diversité morphologique de particules ressemblant à des virus et dont les hôtes appartiendraient à l'ordre archéen des *Thermococcales* (Geslin *et al.*, 2003a). En outre, la première particule virale hydrothermale a été isolée, récemment, d'une souche de '*Pyrococcus abyssi*' provenant d'une cheminée hydrothermale du bassin Nord-Fidjien (Geslin *et al.*, 2003b). Cette particule virale, nommée PAV1, a une forme de citron (120 nm x 80 nm) et semble pourvue de fibres caudales. D'un point de vue morphologique, elle semblerait apparentée à la famille des *Fuselloviridae*. Elle possède un ADN circulaire double brin de 18 kb. Un grand nombre de copies de l'ADN de cette particule a été détecté sous une forme extra-chromosomique libre au sein du cytoplasme de l'hôte, mais aucune forme intégrée du génome de PAV1 n'a pu être mise en évidence dans le chromosome de l'hôte. Les études menées suggèrent que PAV1 persiste au sein de son hôte sous un état porteur ('carrier state'), état qui correspond à une situation d'équilibre entre la multiplication cellulaire et la production virale.

Les plasmides, tout comme les bactériophages et les transposons, sont des vecteurs importants des transferts intra- et inter-spécifiques de gènes. Ils constituent donc des éléments importants dans l'étude des interrelations entre micro-organismes et ont un impact évolutif conséquent sur l'adaptation des micro-organismes à leur environnement. Une étude a notamment rapporté l'existence d'une grande diversité de plasmides de *Thermococcales* d'origine hydrothermale (Benbouzid-Rollet *et al.*, 1997).

Les transferts de gènes latéraux (ou horizontaux) sont particulièrement importants au sein et entre les micro-organismes des deux domaines procaryotiques (*Archaea* et *Bacteria*). Ils constituent une force évolutive importante qui pourrait être à l'origine de l'adaptation des micro-organismes à leur environnement (Lawrence, 1999). Au sein des *Bacteria* dont le génome a été séquencé, les hyperthermophiles *Thermotoga maritima* et *Aquifex aeolicus* sont les espèces qui possèdent le plus fort pourcentage de cadres ouverts de lecture (respectivement 24 et 16,2%) similaires à des gènes archéens (Aravind *et al.*, 1998; Nelson *et al.*, 1999). Ces observations semblent indiquer que des transferts importants de gènes ont été effectués entre les *Bacteria* et les *Archaea* hyperthermophiles et ont conduit à l'hypothèse que ce processus aurait facilité l'acquisition de la thermophilie chez l'un ou chez ces 2 groupes (Aravind *et al.*, 1998; Nelson *et al.*, 1999). Cette hypothèse d'acquisition de la thermophilie chez les *Aquificales* et les *Thermotogales* est controversée du fait de la position phylogénétique profonde de ces *Bacteria* qui pourrait laisser supposer que certains de ces gènes communs aux hyperthermophiles archéens et bactériens sont en fait des gènes ancestraux primitifs qui auraient été perdus chez la plupart des *Bacteria* lors de leur adaptation à des environnements mésophiles (Kyrpides et Olsen, 1999). Toutefois, les résultats d'analyses phylogénétiques récentes pourraient conduire à reconsidérer cette question. Ces études, basées sur l'analyse phylogénétique des ARN ribosomiaux des *Aquificales* et des *Thermococcales* et réalisées en utilisant la méthode 'slow-fast' indiquent que ces micro-organismes ne représenteraient pas les branches les plus profondes des *Bacteria*, mais que ce seraient les *Planctomycetales* (Brochier et Philippe, 2002).

## 2. Les techniques d'écologie microbienne

### 2.1. Le concept d'espèce

Dès lors que l'on aborde les problèmes d'écologie microbienne et de taxinomie, la question de la définition de l'espèce se pose inévitablement. Cette vaste question, sujette à controverse, préoccupe les biologistes et les microbiologistes depuis qu'existe la volonté de réaliser une classification du vivant. Historiquement, divers concepts ont été proposés pour établir une classification des organismes supérieurs (Mayr, 1942)(revue: Le Guyader, 2002). De ces différents concepts, il est apparu, qu'en biologie, les 2 critères importants pour la définition d'une espèce sont ceux de la ressemblance mutuelle et de l'interfécondité. En microbiologie, par contre, le critère d'interfécondité est inapplicable, la reproduction des procaryotes étant végétative et asexuée. Ainsi, le critère de ressemblance mutuelle est l'unique critère qui ait été appliqué en classification bactérienne pendant de nombreuses années. Les premières classifications bactériennes, basées sur la comparaison de critères morphologiques, datent de la fin du XIX<sup>e</sup> siècle. A la fin des années 1950, suite au développement des techniques biochimiques analytiques, ces classifications ont été progressivement modifiées en introduisant de nouveaux critères phénotypiques de comparaison. La taxinomie numérique se développait. Celle-ci permettait de comparer les micro-organismes sur la base de caractères morphologiques, chimiques et physiologiques informatifs et de représenter leurs degrés de similitude sous la forme de dendrogrammes (Sneath, 1989).

La détermination des caractères phénotypiques importants pour la définition d'une ressemblance, est difficile et subjective. Les critères morphologiques sont difficilement utilisables en taxinomie car les morphologies cellulaires des micro-organismes et les aspects des colonies ne sont pas suffisamment discriminants. D'autre part, les caractères métaboliques et physiologiques sont largement employés mais l'on sait que des souches appartenant à la même espèce n'ont pas forcément le même métabolisme ni la même physiologie. D'ailleurs, les échanges de plasmides et les transferts de gènes existent, et l'on sait qu'ils passent la barrière des espèces, voire même des domaines (Nelson *et al.*, 1999). Ainsi, des cas d'échanges de gènes métaboliques ou de gènes impliqués dans des processus de protection contre des éléments de l'environnement ont été rapportés. Dans son ouvrage majeur, "*De l'origine des espèces*", Darwin insistait déjà sur la nécessité d'établir des relations de parenté pour réaliser une systématique pertinente. Le développement de la phylogénie moléculaire, intégrant le critère d'évolution, va donc donner un nouvel élan à cette discipline en apportant un critère de classification supplémentaire. La phylogénie tente d'établir les relations de parenté par comparaison de gènes. Elle vise donc à retrouver les groupes frères, mais en aucun cas l'ancêtre commun.

Un problème de terminologie, source de confusion, peut surgir dès lors que l'on essaie de définir l'espèce en mêlant à la fois des notions de systématique et de phylogénie moléculaire. Le terme *taxon* fait référence à un groupe d'organismes réels. Le terme *catégorie* correspond à une unité systématique permettant la hiérarchisation des taxons en espèce, genre, famille, ordre, classe, phylum, domaine,

règne. Il convient d'utiliser une terminologie appropriée et surtout de séparer la phylogénie des processus biologiques, car les arbres phylogénétiques construits pour arranger les taxons sont hypothétiques et susceptibles d'évoluer en fonction de l'avancée des connaissances (Le Guyader, 2002).

Le problème de la dénomination des catégories d'organismes procaryotiques s'avère particulièrement épineux. En 1987, le comité *Ad Hoc* en systématique a proposé une définition de l'espèce microbienne basée sur les propriétés de dénaturation et de renaturation de l'ADN génomique (Wayne *et al.*, 1987). Ayant considéré les résultats de nombreuses études menées avec des espèces bien définies, il a déclaré que des valeurs d'hybridation ADN-ADN supérieures ou égales à 70% et des valeurs de  $\Delta T_m^1$  inférieures ou égales à 5°C constituaient des bornes raisonnables de l'espèce microbienne, les espèces répondant à ces critères génotypiques partageant également de nombreuses similitudes phénotypiques. En l'absence de meilleur critère, cette délimitation artificielle permettait de structurer le monde procaryotique d'une manière cohérente au niveau l'espèce. Des études ultérieures ont mis en évidence que des similitudes d'ADNr 16S inférieures à 97% ne correspondaient jamais à des pourcentages de réassociation ADN-ADN supérieurs à 60% (Stackebrandt et Goebel, 1994; Rossello-Mora et Amann, 2000). Par extension on considère que des isolats dont les séquences ont un pourcentage de similitude inférieur à 97% n'appartiennent pas à la même espèce.

Aujourd'hui, l'intérêt d'une approche polyphasique intégrant les données génotypiques et des données phénotypiques dans les descriptions d'espèces nouvelles est largement acceptée au sein de la communauté des microbiologistes (Vandamme *et al.*, 1996; Rossello-Mora et Amann, 2000). En effet, aucun critère n'est suffisamment discriminant pour classer les taxons les uns par rapport aux autres. Les limites des caractères phénotypiques ont été abordées précédemment dans ce paragraphe. L'ADNr 16S utilisé d'une façon généralisée en taxinomie moléculaire présente lui aussi ses limites. Tout d'abord, il est relativement stable et, s'il est *a priori* suffisamment discriminant pour séparer des espèces différentes, il ne permet pas de regrouper des espèces identiques. En outre, le nombre de copies de l'opéron *rrn* est variable d'un organisme à l'autre et les gènes codant pour les ARNr 16S peuvent présenter une micro-hétérogénéité au sein des différents opérons *rrn* et même au sein d'un même opéron (il a été démontré qu'une cellule isolée de *Haloarcula marismortui* possédait 2 gènes d'ARNr 16S présentant 5% de différences ! (Amann *et al.*, 2000)).

---

<sup>1</sup>  $T_m$  : melting temperature. C'est la température de demi-dénaturation d'un homo ou d'un hétéroduplex d'ADNs.

Le  $\Delta T_m$  est la différence de  $T_m$  entre l'hybride homologue et l'hybride hétérologue

Une étude récente a, ainsi, démontré que le nombre de copies des opérons *rrn* et l'hétérogénéité des séquences biaisait quantitativement les inventaires moléculaires vers les organismes présentant le plus grand nombre de copies (Crosby et Criddle, 2003).

Dans une revue récente, Rossello-Mora a proposé de définir l'espèce comme "un cluster monophylétique et génomiquement cohérent d'organismes individuels présentant un niveau de similitude globalement élevé pour de nombreuses caractéristiques indépendantes, et détectable par une propriété phénotypique discriminante" (*the species could be described as a monophyletic et genomically coherent cluster of individual organisms that show a high degree of overall similarity in many independent characteristics, et is diagnosable by a discriminative phenotypic property*) (Rossello-Mora et Amann, 2000). Le comité *Ad Hoc* en systématique, dans un rapport d'évaluation de la définition de l'espèce bactérienne insistait sur le fait qu'une approche polyphasique demeurerait appropriée en classification. Il a insisté sur l'importance des critères phénotypiques et déclaré qu'il serait indispensable dans le futur de trouver différents gènes pour vérifier la cohérence génomique d'un cluster (Stackebrandt *et al.*, 2002; Stackebrandt, 2003).

En conclusion, les microbiologistes disposent à ce jour d'un très large éventail de techniques classiques et modernes leur permettant d'appréhender les caractères phénotypiques et génotypiques d'un isolat. En couplant ces différentes approches, il leur est possible de différencier des taxons. Avec le développement des méthodes de typage, les moyens de discriminer des taxons différents vont se multiplier. Donner une définition de l'espèce bactérienne applicable à tous les micro-organismes semble impossible, il faudrait pour cela trouver suffisamment de critères à la fois stables et discriminants qui soient universels et vérifiables. Par conséquent, il semble difficile de définir l'espèce en tant que catégorie. L'espèce microbienne semblerait plutôt être un concept (Stackebrandt, 2003). Cela ne veut pas dire que tous les travaux faits jusqu'ici en nomenclature soient caduques. Même si des ordres, tel que celui des *Clostridiales* par exemple, nécessitent un remaniement complet car beaucoup de ses représentants ont été décrits uniquement à partir de critères phénotypiques, on se rend compte que la classification actuelle (basée notamment sur les hybridations ADN/ADN) semble, malgré tout, cohérente. L'essentiel c'est qu'en utilisant une approche polyphasique, les observations phylo-phénétiques permettent de classer les taxons les uns par rapport aux autres, d'une manière qui semble convenable compte-tenu de l'état actuel de nos connaissances. En outre, il semble primordial d'employer un vocabulaire approprié.

## **2.2. Les méthodes non moléculaires d'écologie microbienne**

### **2.2.1. Les techniques culturelles traditionnelles d'enrichissement-isolément et la taxinomie**

Les micro-organismes ont été découverts au milieu du XVII<sup>e</sup> siècle par le hollandais Antonie Van Leeuwenhoek, opticien par passion, qui construisit les premiers microscopes. Dans des lettres

adressées à la *Royal Society* de Londres, il décrit les premières formes de bactéries, levures et protozoaires. La microbiologie était née. Les premières études de microbiologie ont principalement consisté en la description des morphologies observées. La microbiologie moderne remonte aux années 1870 et verra le développement de nouvelles techniques. L'isolement et la croissance sur milieu solide de clones issus d'une cellule unique, et la démonstration que ces cultures pures possèdent des caractéristiques héréditaires et des propriétés métaboliques constitue un progrès crucial en microbiologie.

Pendant de nombreuses années, la microbiologie sera basée sur le principe de l'enrichissement des micro-organismes, puis sur leur isolement. Les cultures d'enrichissement favorisent le développement des micro-organismes en fonction des conditions physico-chimiques et nutritionnelles du milieu. En intervenant sur la composition d'un milieu on peut lui donner un caractère électif ou sélectif.

Différentes techniques d'isolement "classiques" sont couramment utilisées. Elles consistent en un étalement sur milieu solide ou en des dilutions successives en milieu liquide ou dans de l'agar.

Grâce au développement des techniques d'isolement, le phénotype de nombreuses bactéries sera décrit au fil des années, et plusieurs classifications parallèles basées sur des critères morphologiques seront établies. Il faudra attendre 1923 pour qu'apparaisse la première clé bactérienne, le *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* compilant les résultats de toutes les études menées auparavant, et comportant de nombreuses redondances du fait du manque d'échanges entre les microbiologistes. A la fin des années 1950, la taxinomie numérique va se développer (Sneath, 1989). Basée sur la comparaison de caractères phénotypiques informatifs, cette technique apparaîtra dans la période dans laquelle les techniques analytiques biochimiques vont se développer, et permettront d'étudier les constituants chimiques des bactéries tels que les acides aminés, les protéines, les sucres et les lipides. Suite à l'amélioration des connaissances de l'ADN et au développement de la biologie moléculaire, la taxinomie polyphasique et la taxinomie moléculaire vont s'imposer (cf. paragraphe 2.1).

## **2.2.2. Des stratégies culturales élaborées**

### **2.2.2.1. Quelques exemples de méthodes de cultures originales**

Certains micro-organismes sont extrêmement sensibles aux conditions environnementales. Afin de cultiver ces types de micro-organismes, diverses stratégies culturales peuvent être développées. Quelques exemples de stratégies originales sont détaillés ci-dessous :

- Les techniques de culture en gradient d'opposition semi-solides sont généralement utilisées pour cultiver les micro-organismes oxydant les sulfures (Nelson et Jannasch, 1983) ou le fer (Edwards

et al., 2003). Ces gradients opposent l'oxygène, d'une part, et les sulfures ou le fer ferreux, d'autre part. Les micro-organismes vont se développer dans la zone du gradient où les concentrations des donneurs et accepteurs d'électrons sont optimales pour leur croissance.

- Les bactéries syntrophes se cultivent en consortium. A titre d'exemple, une co-culture d'une bactérie dégradant le glutamate, *Caloramator coolhaasii* (souche Z), avec des méthanogènes hydrogénotrophes et acétoclastiques *Methanobacterium thermoautotrophicum* (souche R43) et *Methanosaeta thermophila* (souche A) a pu être réalisée (Plugge et Stams, 2002). La dégradation du glutamate produit du méthane, de l'acétate, de l'ammonium et du dioxyde de carbone. Ces souches ont un temps de génération très long et leur croissance est inhibée par les fortes concentrations d'hydrogène et d'ammonium. Dans ce cas de figure, le développement du consortium a nécessité l'utilisation d'un système de dialyse qui a permis d'évacuer les produits finaux du métabolisme.
- Une publication récente a rapporté l'utilisation d'une méthode efficace dans la culture des micro-organismes issus d'écosystèmes marins oligotrophes (Connon et Giovannoni, 2002). Cette procédure était simplement basée sur la réalisation d'un très grand nombre de cultures dans des milieux de culture très pauvres en nutriments (aux concentrations *in situ* des substrats) et avec un inoculum très dilué. Les auteurs estiment que les micro-organismes cultivés grâce à cette technique sont de 14 à 1400 fois plus nombreux que ceux obtenus grâce à des techniques culturales classiques.
- Des micro-organismes se développant dans les sédiments marins intertidaux et considérés comme incultivables, ont pu être obtenus en culture pure en simulant l'environnement naturel (Kaeberlein et al., 2002). Un échantillon de sédiment sableux a été dilué dans de l'agar et de l'eau de mer et placé dans une chambre de diffusion fermée par des membranes autorisant les échanges chimiques mais empêchant les cellules de passer. Cette chambre de diffusion a été placée à la surface de sédiments collectés *in situ*, ceci à l'intérieur d'un aquarium incubé dans les conditions de l'environnement naturel. Après une incubation d'une semaine, de nombreuses petites colonies de morphologies variées ont été obtenues. Elles ont été purifiées par transferts successifs dans d'autres chambres de diffusion.

A l'avenir, la mise au point de nouveaux milieux de culture et le développement de méthodes innovantes devrait permettre de cultiver un nombre exponentiel de micro-organismes incultivés à ce jour. Les essais de cultures de bactéries syntrophes sur des milieux comportant des extraits cellulaires ou les cultures d'enrichissement effectuées dans des réacteurs simulant les conditions *in situ* pourraient notamment s'avérer fructueux car il est fort probable que les relations synergiques aient une place importante dans les environnements naturels.

### 2.2.2.2. Les nouvelles techniques d'isolement de cellules individuelles

L'unique façon de garantir la pureté d'une culture microbienne est de s'assurer qu'elle dérive d'une cellule unique. Jusqu'à récemment, avec les techniques traditionnelles d'isolement, il était totalement impossible de certifier qu'une culture provenait de la division d'une seule cellule. Par ailleurs, les microbiologistes étaient très souvent confrontés au problème de l'isolement de certaines souches issues de communautés microbiennes complexes. Deux techniques d'isolement ont été récemment développées afin de permettre l'isolement de cellules individuelles.

- Les pinces optiques

Les pinces optiques sont constituées d'un microscope inversé contrôlé par ordinateur et équipé d'un laser infra-rouge neodymium émettant à 1064 nm. Une cellule peut être immobilisée grâce au faisceau laser et isolée du mélange cellulaire en déplaçant la platine du microscope. Elle peut ainsi être transférée dans un milieu de culture (Frohlich et König, 2000; Huber *et al.*, 2000a). Cette technique a permis d'isoler avec succès des bactéries et des archées hyperthermophiles (Ashkin *et al.*, 1987; Huber *et al.*, 2000b).

- Les micromanipulateurs

Il existe plusieurs types de micromanipulateurs (Frohlich et König, 2000). Ils sont constitués d'un microscope inversé pouvant grossir 1000 fois. Ces systèmes sont équipés de capillaires stériles, qui vont servir au prélèvement, et dont le diamètre d'ouverture peut être ajusté à la taille de la bactérie d'intérêt. Ces capillaires peuvent être positionnés rapidement et précisément grâce à un système pneumatique ou hydraulique. Une fois le capillaire placé au-dessus de la cellule d'intérêt, il va déverser une goutte de solution stérile pour la mettre en suspension, puis l'aspirer. En outre, il existe des enceintes à atmosphère contrôlée (COY chamber), adaptées à ce type d'équipements, qui permettent l'isolement de micro-organismes anaérobies.

### 2.2.3. Les techniques de quantification

Dans sa thèse, E. Corre (Corre, 2000) propose une revue très complète des différentes techniques de quantification utilisées en microbiologie.

#### 2.2.3.1. Les comptages cellulaires

La quantification des micro-organismes peut se faire soit directement, soit indirectement après marquage d'un constituant cellulaire donné par un chromophore et observation en microscopie à épifluorescence ou comptage par cytométrie en flux.

Les comptages cellulaires directs à partir d'échantillons naturels sont réalisés sous le microscope en utilisant des cellules de comptage dont le volume est parfaitement défini (cellule de



Thoma, cellule de Malassez, cellule de Petroff-Hausser). A partir de mesures répétées réalisées sur plusieurs sous-échantillons, on déduit les concentrations cellulaires au sein de l'échantillon naturel.

Des comptages cellulaires peuvent également être effectués après marquage direct des acides nucléiques ou des constituants cellulaires à l'aide d'un fluorophore (DAPI, acridine orange, SYBR™ Green, PicoGreen, etc.), ou marquage indirect à l'aide d'un anticorps marqué ou d'une sonde nucléique fluorescente qui se fixera de façon spécifique sur la cible.

#### 2.2.3.2. La cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique analytique et préparative qui permet d'analyser, de compter et éventuellement de trier des cellules en suspension. Après incubation des cellules en présence de marqueurs spécifiques de molécules choisies ou de colorants des acides nucléiques, la suspension cellulaire est injectée devant un faisceau laser. Les cellules vont passer en file indienne devant ce faisceau laser, diffracter la lumière et émettre alors une fluorescence. Cette émission de lumière varie selon la taille et la granulosité des cellules et selon la nature du marqueur fixé. Les données lumineuses vont être converties en données numériques et analysées par ordinateur. Le cas échéant, un module de tri permet de séparer les cellules selon leurs marquages respectifs. L'application de la cytométrie en flux à des échantillons naturels n'est toutefois pas aisée et elle nécessite que les cellules aient des morphologies relativement homogènes et qu'elles soient en suspension. Ainsi, il est impossible de compter les cellules formant des amas ou des chaînettes, ou les cellules attachées à des particules.

#### 2.2.3.3. Les techniques culturales

Des techniques culturales sont classiquement utilisées en quantification. La technique de NPP (Nombre le Plus Probable) en milieu liquide et la méthode UFC (Unité Formant Colonie) sur milieu solide, basées sur un principe de dilutions successives, permettent de déterminer la dilution maximale pour laquelle des micro-organismes vont se développer. En fonction du milieu de culture utilisé, ces méthodes permettent de dénombrer les bactéries cultivables d'un type métabolique donné.

#### 2.2.3.4. Les mesures de biomarqueurs cellulaires

En dehors des acides nucléiques, les micro-organismes comportent d'autres molécules pouvant servir de biomarqueurs de taxons donnés ou pouvant renseigner sur le mode de nutrition de l'assemblage microbien. Les biomarqueurs incluent des composés intracellulaires de réserve (ATP, ...), des pigments, des transporteurs de la chaîne respiratoire (quinones, ...), des constituants de la paroi microbienne (acide muramique) et un grand nombre de lipides, particulièrement ceux présents dans les membranes cellulaires (Karl, 1995). Les acides gras phospholipidiques peuvent être d'un grand intérêt dans l'analyse de la structure d'une communauté microbienne. Ainsi, les acides gras des *Archaea* sont liés par des liaisons éther alors que ceux des *Bacteria* sont liés par des liaisons ester. En

outre, certains lipides sont strictement inféodés à un groupe de micro-organismes: l'analyse de ces marqueurs spécifiques pourra renseigner sur la présence de tel ou tel groupe de micro-organismes au sein de la communauté.

L'analyse de ces différents biomarqueurs, permettra de renseigner sur la structure de la population et sur son état physiologique. La quantification de certains d'entre eux permet théoriquement d'estimer la biomasse microbienne totale.

#### 2.2.4. Les mesures d'activité microbienne

##### 2.2.4.1. Incorporation d'isotopes stables ou radioactifs

L'une des questions-clés en écologie microbienne, est d'identifier les micro-organismes impliqués dans des processus spécifiques au sein de l'environnement. Les isotopes radioactifs sont utilisés depuis longtemps en microbiologie. L'utilisation d'isotopes stables de substrats-clés (par ex.  $^{13}\text{CO}_2$ ,  $^{13}\text{CH}_4$ ,  $^{13}\text{C}$ -glucose, etc.), par contre, connaît une application plus récente. L'emploi de molécules d'intérêt marquées va permettre d'étudier leur devenir et d'identifier les voies métaboliques ainsi que les acteurs impliqués dans leur transformation. L'ADN marqué avec un isotope lourd du carbone ( $^{13}\text{C}$ ) ou de l'azote ( $^{15}\text{N}$ ), peut être séparé de l'ADN non marqué, par extraction des acides nucléiques et centrifugation sur gradient de chlorure de césium (Radajewski *et al.*, 2000). Les marqueurs isotopiques stables ne sont pas soumis aux mêmes restrictions légales d'utilisation que les isotopes radioactifs et leur utilisation n'est pas dangereuse. Les transformations du carbone et de l'azote peuvent donc être étudiées au sein d'une communauté complexe sans les artefacts associés à l'incubation d'échantillons (Pelz *et al.*, 2001; Boschker et Middelburg, 2002; Morris *et al.*, 2002). Récemment, une étude a même couplé l'incorporation d'un isotope stable du phénol ( $^{13}\text{C}$ -phénol), à l'extraction des ARN (marqueur plus sensible que l'ADN car synthétisé dans les cellules actives), et à une analyse phylogénétique, ce qui a permis d'identifier les micro-organismes impliqués activement dans la dégradation du phénol d'un bioréacteur (Manefield *et al.*, 2002).

##### 2.2.4.2. Mesure des ratios isotopiques

Du fait des progrès récents des techniques analytiques, et avec le développement de la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-c-IRMS : Gas Chromatography-combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry), l'analyse des ratios isotopiques de composés spécifiques et de biomarqueurs s'est développée. Traditionnellement, la GC-c-IRMS est utilisée pour analyser les variations naturelles des ratios isotopiques de composés isolés en fonction de leur mode d'assimilation (fractionnement isotopique). Ceci permet notamment d'étudier le mode de fixation du carbone et les voies métaboliques impliquées chez les micro-organismes (Boschker et Middelburg, 2002). Les valeurs de fractionnement isotopique du carbone ont récemment été mesurées chez plusieurs *Archaea* et *Bacteria* d'origine hydrothermale et corrélées à la voie de fixation du carbone utilisée (House *et al.*, 2003).

#### 2.2.4.3. Mesures d'activités spécifiques

Une grande variété de techniques peut être utilisée pour détecter des cellules métaboliquement actives. En dehors des techniques récentes basées notamment sur la détection des ARN (qui seront traitées dans le paragraphe 2.3.8.), il existe un éventail de techniques utilisées classiquement en écologie microbienne. Elles incluent notamment les techniques d'incorporation de substrats radioactifs et leur révélation par radiographie (cf. paragraphe 2.2.3.2.), ainsi que les tests réalisés en présence d'un inhibiteur de la réplication de l'ADN (acide nalidixique) qui chez les cellules actives conduit à un allongement des cellules (Kogura et Simidu, 1979).

L'activité respiratoire peut être détectée en utilisant des composés tels que le CTC (5-cyano-2,3-dotolyl tetrazolium chloride) ou l'INT (2 (*p*-iodo-pheny)-3-(*p*-nitropheny)-5-phenyl tetrazolium chloride) qui lors de leur passage dans la chaîne respiratoire vont être réduits en des composés facilement détectables (coloration, fluorescence).

Diverses activités enzymatiques spécifiques peuvent aussi être mesurées en utilisant des techniques colorimétriques.

### 2.3. Les techniques moléculaires d'écologie microbienne

Notre connaissance de la diversité microbienne s'est considérablement améliorée ces dernières années grâce aux apports de la biologie moléculaire et de la phylogénie. Les analyses comparatives de la petite sous-unité du ribosome et d'autres gènes ont démontré que le monde du vivant était découpé en 3 domaines: *Bacteria*, *Eucarya* et *Archaea* (Woese, 1987). Alors que l'on estime que plus de 99% des micro-organismes présents dans la nature ne sont pas accessibles par des techniques culturales standard (Amann *et al.*, 1995), les méthodes moléculaires donnent un élan considérable aux études de diversité microbienne en s'affranchissant de l'étape culturale. Les ARN ribosomiaux (5S, 16-18S, 23-28S), dont la présence est universelle et la fonction conservée, et qui sont constitués d'une alternance de domaines variables et de domaines conservés sont rapidement apparus comme des marqueurs de choix en phylogénie (Fox *et al.*, 1977; Woese et Fox, 1977). Les ARNr 16-18S se sont rapidement imposés comme molécules de référence et sont désormais employés couramment en phylogénie. Ils sont très largement représentés dans les banques de gènes. Ces marqueurs (ainsi que d'autres gènes) sont employés dans diverses techniques d'écologie microbienne qui sont détaillées dans ce chapitre.

#### 2.3.1. Le clonage et le séquençage des ADNr 16S

La technique de clonage-séquençage est largement utilisée en écologie microbienne. L'une des étapes-clés de cette méthode est l'extraction des acides nucléiques. Différentes techniques d'extraction et de purification de l'ADN ont été testées sur différents types d'échantillons d'environnements naturels. Elles combinent généralement des méthodes de lyse chimique (détergents, phénol...), et/ou de lyse enzymatique (protéinase K, lysozyme...), et/ou de lyse physique (pilon et

mortier, 'bead-beater', cycles de congélation-décongélation, choc thermique...). Des traitements sont ensuite appliqués pour purifier les acides nucléiques des matériaux contaminants (métaux, polymères, acides humiques...) susceptibles d'inhiber par la suite les réactions d'amplification. Les ADNr 16S de la communauté sont ensuite amplifiés sélectivement *in vitro* à l'aide d'amorces universelles et d'une ADN polymérase thermostable. On utilise généralement des amorces universelles bactériennes et des amorces universelles archéennes. Ces ADNr 16S sont ensuite séparés par clonage en utilisant des méthodes standards (Giovannoni *et al.*, 1990). Du fait de leur petite taille (environ 1500 pb), les ADNr 16S amplifiés sont généralement clonés dans des plasmides. Différents kits très efficaces et d'emploi facile sont commercialisés (TOPO TA cloning Kit (Invitrogen)...). Les inserts de bonne taille pourront ensuite être séquencés, soit directement après extraction du plasmide, soit après réamplification de l'insert à partir d'amorces du plasmide flanquant les sites de clonage.

### **2.3.2. L'ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)**

Un préalable au séquençage, onéreux, de tous les gènes clonés est d'utiliser des enzymes de restriction pour cibler les travaux ultérieurs. Les gènes soumis à ce traitement enzymatique, après migration sur gel d'agarose, vont présenter un profil de restriction. La comparaison des différents profils permettra de décrire grossièrement la diversité de la population et sa structure (Moyer *et al.*, 1994). Cette technique, d'une façon générale et quel que soit le gène auquel elle est appliquée, est appelée analyse des longueurs des fragments de restriction ou RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Lorsqu'elle est appliquée à des ADN ribosomiaux, on parle d'analyse de restriction d'ADN ribosomiaux amplifiés ou d'ARDRA. Une étude a démontré que l'utilisation de 2 endonucléases reconnaissant des sites de restriction à 4 nucléotides permettait de discriminer la majeure partie des ADNr 16S présents au sein d'un mélange complexe (Moyer *et al.*, 1994).

### **2.3.3. La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) et ses variantes**

La DGGE est une méthode utilisée en écologie microbienne qui permet de discriminer par électrophorèse des fragments d'ADN de taille identique ou quasi-identique mais de composition différente. Elle est couramment utilisée pour comparer les ADNr 16S d'échantillons naturels (Muyzer *et al.*, 1993, 1995, 1996). La séparation est basée sur les changements de mobilité électrophorétique des fragments amplifiés migrant dans un gel vertical de polyacrylamide et contenant un gradient de dénaturants (formamide et/ou urée). Lorsque les fragments d'ADN migrent au sein de ce gel d'électrophorèse, une fusion partielle du double brin d'ADN se produit dans des régions discrètes de celui-ci, retardant sa migration. Pour éviter la dénaturation totale du double brin, une structure à très haute température de fusion (le 'GC clamp' comportant une succession de 40 GC) est associée à l'ADN lors de l'amplification. Les variations de séquences dans les zones à faibles température de fusion font que des séquences différentes stopperont leur migrations dans des zones différentes du gradient dénaturant (Theron et Cloete, 2000). L'un des avantages de cette méthode très sensible est

que les bandes individuelles d'ADN peuvent être excisées du gel, réamplifiées puis séquencées. Un fragment de 560 pb de l'ADNr 16S situé dans une région hypervariable (région V<sub>3</sub>) du gène est couramment utilisé (Muyzer *et al.*, 1993, 1995). Cette méthode est particulièrement intéressante pour l'analyse de dynamique de populations ou d'évolution d'une population au cours du temps.

Des variantes de la DGGE, différant par leur type de gradient, existent également :

- La TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis). Dans cette technique, la séparation des fragments d'ADN se fait grâce à un gradient de température (Muyzer, 1999).
- La CDGE (Constant Denaturant Gel Electrophoresis). Dans cette technique, la concentration d'agent dénaturant est uniforme dans le gel et est équivalente à la température de la plus basse zone de fusion.
- La TTGE (Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis). En TTGE, la migration des fragments d'ADN se fait dans un gel possédant une concentration uniforme d'agent dénaturant et la température augmente graduellement durant la migration (Farnleitner *et al.*, 2000; Ogier *et al.*, 2002).

#### **2.3.4. La SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)**

La technique d'analyse de polymorphisme de conformation d'acides nucléiques simple brin ou SSCP, développée pour détecter des mutations dans des gènes humains, est fréquemment utilisée en écologie microbienne (Hayashi, 1991; Schwieger et Tebbe, 1998). Après extraction des acides nucléiques totaux et amplification par PCR d'une zone variable des ADNr 16S, ceux-ci vont être dénaturés en ADN simple brin puis déposés sur un gel de polyacrylamide. Dans des conditions non-dénaturantes, la structure secondaire de l'ADN simple brin est affectée par des interactions intramoléculaires. La mobilité électrophorétique des ADNs simple brin se fera donc en fonction de leur masse moléculaire et de leur structure secondaire. Ainsi, une communauté microbienne sera représentée par un profil de pics où chaque pic correspond à une séquence, l'aire de chaque pic donnant une indication sur l'abondance du micro-organisme au sein de la communauté. La séquence de l'ADNr 16S correspondant à chaque pic peut être déterminée en comparant la migration de séquences préalablement isolées par clonage à la migration du profil total. Cette technique est particulièrement appropriée pour effectuer des suivis de populations (Godon *et al.*, 2001).

#### **2.3.5. La T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)**

La T-RFLP est une méthode qui a été développée pour analyser rapidement la diversité microbienne de différents environnements (Liu *et al.*, 1997; Moeseneder *et al.*, 1999; Lueders et Friedrich, 2003). A partir d'un extrait d'acides nucléiques environnementaux, une PCR est réalisée sur une région de l'ADNr 16S, en utilisant une amorce marquée en 5' par un fluorochrome. Après amplification, le produit PCR est digéré avec une ou plusieurs enzymes de restriction, générant des

fragments de diverses longueurs selon la séquence de l'ADN et la spécificité de l'enzyme. Seuls les fragments de restriction terminaux marqués avec le fluorochrome seront visualisés et mesurés par un séquenceur automatique. Cette technique permet d'avoir rapidement une 'empreinte' d'une communauté microbienne.

### 2.3.6. Les techniques d'hybridation

L'analyse de la structure d'une communauté microbienne peut s'effectuer grâce à des techniques d'hybridation. L'alternance de domaines conservés, variables et hypervariables, observée sur l'ARNr permet de dessiner des sondes au spectre de spécificité plus ou moins large, depuis l'espèce jusqu'au domaine. Ces sondes, complémentaires de l'ARN ribosomal, peuvent être oligonucléotidiques (environ 20 nucléotides) ou polynucléotidiques (plus de 50 nucléotides). Elles sont marquées en 5' par des enzymes ou des fluorochromes.

#### 2.3.6.1. L'utilisation des sondes en dot blot

L'étape d'extraction d'ADN est cruciale en hybridation quantitative et un maximum de précautions doivent être prises pour l'optimiser. L'ADN extrait d'un échantillon environnemental est fixé sur membrane puis hybridé avec une sonde donnée. La quantification du groupe reconnu par la sonde se fait par comparaison avec les résultats d'hybridation obtenus avec une sonde à spectre plus large (universelle).

#### 2.3.6.2. L'hybridation *in situ*

Le principe de l'hybridation *in situ* est connu depuis une trentaine d'années, mais cette technique ne s'est réellement développée que depuis un peu plus d'une dizaine d'années, du fait de l'enrichissement en séquences des banques de données et du développement de logiciels de détermination de sondes performants (Amann et Ludwig, 2000; Pernthaler *et al.*, 2000, 2002). Elle constitue aujourd'hui un outil majeur en écologie microbienne pour réaliser des quantifications spatio-temporelles de micro-organismes. Comme toute hybridation moléculaire, cette technique est basée sur l'appariement par liaison hydrogène de séquences complémentaires de la sonde et d'acides nucléiques recherchés. Des hybrides ADN-ADN, ADN-ARN et ARN-ARN peuvent ainsi être formés, les premiers étant les plus stables. Les différents paramètres de l'hybridation doivent être optimisés de façon rigoureuse à chaque étape (Bouvier et del Giorgio, 2003). Après la détermination d'une sonde *in silico*, celle-ci doit être testée par dot blot sur des ADN et des ARN de souches pures, ciblées ou non par la sonde, puis sur des mélanges de souches pures (Harmsen *et al.*, 1997). L'accessibilité de la sonde à la molécule cible, en général l'ARNr 16S en écologie microbienne, constitue l'un des facteurs déterminants de la qualité d'une sonde (Fuchs *et al.*, 2000; Bouvier et del Giorgio, 2003). L'optimisation des conditions de stringence est également essentielle pour obtenir une hybridation de bonne qualité et empêcher les hybridations aspécifiques. La stringence d'une hybridation dépend de 2

paramètres clés: la température et la concentration en sels du tampon d'hybridation. Elle est proportionnelle à la température et inversement proportionnelle à la concentration en sels. La température correspondant à 50% d'hybrides est appelée température de fusion ou  $T_m$ . Empiriquement, la température d'hybridation est déterminée en fonction de la  $T_m$  et de la nature de la sonde (la  $T_m$  dépend de la teneur en G-C des brins). Pour une sonde oligonucléotidique de 20-30 mers, on choisit en général une température d'hybridation de 5°C en dessous de la  $T_m$ , ce qui permet d'obtenir une hybridation spécifique et un nombre convenable d'hybrides stables. Pour éviter de modifier la température d'hybridation lors de la mise au point d'une sonde, on peut modifier la concentration en formamide. Ainsi, la température peut être artificiellement augmentée par addition de formamide (l'addition de 1% de formamide abaisse la température d'hybridation de 0,65°C pour l'ADN et de 0,72°C pour l'ARN). La concentration en ions monovalents  $Na^+$  influence la stabilité des hybrides. La multiplication par un facteur 10 de cette concentration entraîne une augmentation de la  $T_m$  de 16,6°C (généralement on utilise une concentration de  $Na^+$  de 660 mM).

#### 2.3.6.3. La technique de FISH-microautoradiographie

Une technique extrêmement intéressante a été développée très récemment. Cette technique combine la technique d'hybridation *in situ* (FISH), réalisée avec des sondes oligonucléotidiques complémentaires d'ARN ribosomiaux, et la microautoradiographie réalisée avec des substrats radioactifs (Lee *et al.*, 1999). Elle permet de réaliser simultanément l'identification de micro-organismes et l'incorporation de substrats par des cellules individuelles au sein de communautés microbiennes complexes (Lee *et al.*, 1999; Ouverney et Fuhrman, 1999; Nielsen *et al.*, 2002).

#### 2.3.7. Les puces à ADN

La technologie des puces à ADN (DNA microarray ou microchip) constitue un outil puissant pour étudier l'expression des gènes et leur régulation à l'échelle d'un génome, et pour détecter des polymorphismes génétiques. Cette technologie a été introduite seulement récemment en écologie microbienne (Wu *et al.*, 2001; Peplies *et al.*, 2003; Taroncher-Oldenburg *et al.*, 2003). Si la mise en œuvre de la technique est assez compliquée, son principe est relativement simple. Des oligonucléotides ou des fragments d'ADN amplifiés par PCR (dénaturés juste avant l'hybridation pour être sous forme simple brin) sont déposés sur une lame recouverte de polylysine qui permet leur fixation grâce à des interactions électrostatiques (une fois les acides nucléiques fixés, la polylysine est saturée). Différents types de sondes peuvent être utilisées pour lesquelles il existe 2 types de fluorochromes si l'on désire tester 2 échantillons à la fois. Si l'on s'intéresse au niveau d'expression de gènes, on effectuera une extraction des ARN messagers d'une culture pure ou d'un échantillon environnemental puis une transcription inverse (RT-PCR), et l'on hybridera avec des ADN complémentaires. Les sondes peuvent également être constituées d'ARN ribosomiaux ou d'ADN, si l'on cherche à détecter leur présence dans un échantillon. Après l'hybridation sonde-cible, chaque spot

est excité par un laser et la fluorescence émise est récupérée par un photomultiplicateur (PMT) couplé à un microscope confocal. Des logiciels permettent d'analyser les données et de déterminer l'intensité d'hybridation sur chaque spot (si 2 échantillons sont testés en même temps, on peut définir leur différences d'expression en fonction des intensités respectives émises par chaque fluorochrome). Le principe de la technique est schématisé sur la figure 2.1.

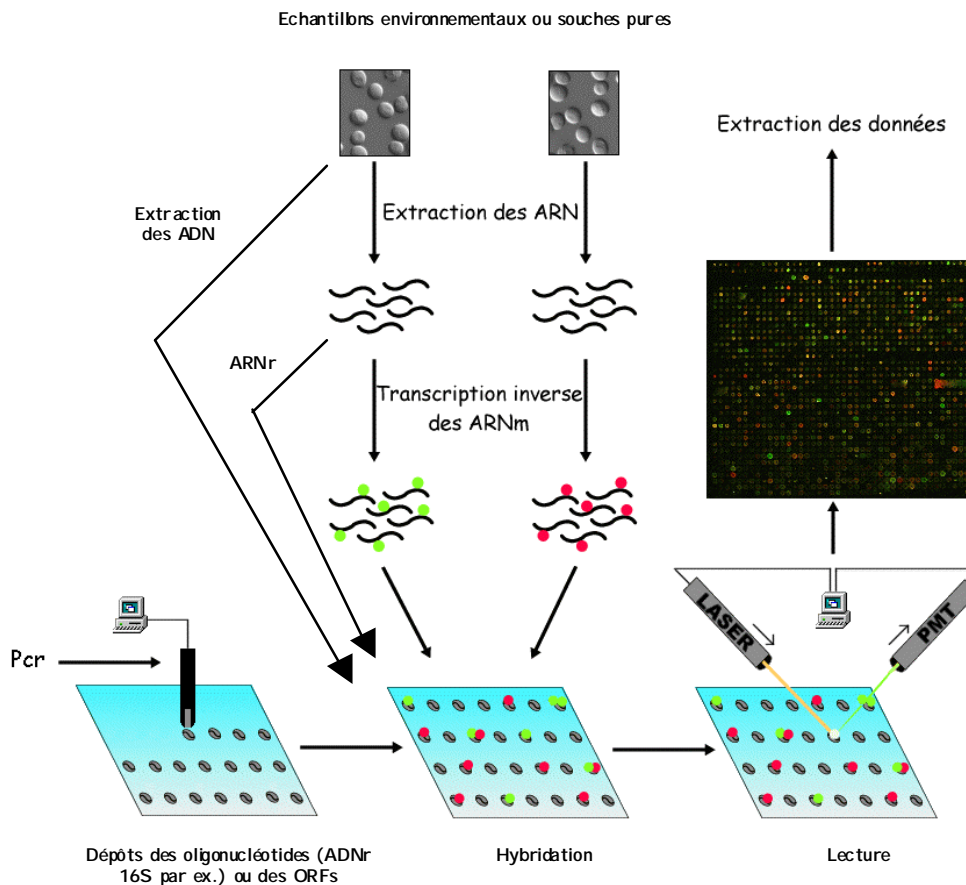


Fig. 2.1. : Schématisation du principe des puces à ADN (Figure P. Marc – ENS -1999)

L'utilisation des puces à ADN en écologie microbienne n'est pas aussi aisée que dans le cas d'un travail sur cultures pures car des échantillons naturels sont susceptibles de renfermer des composés pouvant affecter ou inhiber l'hybridation. De plus, la biomasse présente est généralement peu importante (Wu *et al.*, 2001). Quelques puces ont tout de même été mises au point et testées avec succès sur des échantillons environnementaux (Loy *et al.*, 2002; Taroncher-Oldenburg *et al.*, 2003).

### 2.3.8. Les techniques de détection des cellules métaboliquement actives

Certaines approches méthodologiques utilisées en écologie microbienne permettent de détecter des cellules métaboliquement actives. Une méthode couramment utilisée pour mettre en évidence la



productivité d'une communauté consiste à mesurer l'incorporation de thymidine marquée dans l'ADN (Fuhrman et Azam, 1980, 1982). Par ailleurs, l'incorporation de bromodéoxyuridine (BrdU), un analogue de la thymidine, peut être suivie chez les bactéries actives par méthode immunochimique (Urbach *et al.*, 1999).

L'analyse des ARN messagers (ARNm) en tant qu'indicateurs de l'expression des gènes se révèle particulièrement intéressante dans l'étude des groupes fonctionnels actifs d'un environnement (Wilson *et al.*, 1999; Nogales *et al.*, 1999, 2002). L'extraction des ARNm est une étape extrêmement sensible. Ces ARNm constituent d'excellents marqueurs de l'expression des gènes à un instant donné car ils ont un temps de demie-vie très court. On estime que les ARNm représentent entre 0 et 5% du contenu en ARN cellulaire total (Arraiano, 1993), et ils deviennent indétectables par RT-PCR après 2h à température ambiante dans des cellules mortes (alors que des ARNr sont toujours détectables dans les mêmes cellules après 16h) (Sheridan *et al.*, 1998; Bachoon *et al.*, 2001).

## **2.4. L'apport de la génomique et de la protéomique en écologie microbienne**

### **2.4.1. Génomique et écogénomique**

Discipline scientifique récente, la génomique est l'étude de l'ensemble des gènes d'un organisme vivant et consiste en la description de leur structure et de leur fonction. A ce jour, 140 génomes ont été séquencés entièrement et leur annotation publiée. 342 génomes procaryotiques sont en cours de séquençage. La bioinformatique joue un rôle absolument essentiel en génomique. La masse de données génomiques disponible étant considérable, les banques de données, les outils d'analyse en ligne et les logiciels dédiés à l'analyse des génomes se sont considérablement développés ces dernières années et présentent désormais des interfaces conviviales. D'une manière générale, la génomique contribue à mieux évaluer la biodiversité et aide à comprendre la régulation des gènes, la génétique, la phylogénie, la physiologie et le métabolisme des micro-organismes. Les séquences génomiques existantes ne suffisent généralement pas à conclure quant à une fonction, car un gène peut être présent au sein d'un génome mais non exprimé. Cependant, elles permettent d'émettre des hypothèses qui peuvent ensuite être testées et validées ou non. A titre d'exemple, l'analyse du génome de l'*Archaea* hyperthermophile *Pyrococcus abyssi* a permis de fournir une carte quasi-complète de ses voies métaboliques et a mis en évidence plusieurs gènes candidats qui pourraient coder pour des enzymes intervenant dans une variante de la voie d'Embden-Meyerhof (Cohen *et al.*, 2003). Cette étude servira de base à la construction de nouveaux programmes post-génomiques visant à comprendre et à tester en totalité les fonctions des diverses protéines codées par les différents gènes.

L'écogénomique est une discipline qui s'avère prometteuse pour l'analyse d'écosystèmes microbiens complexes et la compréhension de leur fonctionnement. Elle permet de s'affranchir de toute étape culturale. Cette technique est basée sur l'extraction d'ADN de haut poids moléculaire à partir d'échantillons naturels et sur leur clonage dans des cosmides, des fosmides ou des BACs

(Bacterial Artificial Chromosomes). En extrayant et en manipulant l'ADN avec beaucoup de précautions, de large portions contiguës de génomes microbiens vont pouvoir être clonées (clonage de 35-40 kilobases (kb) dans les cosmides et de plus de 200 kb dans les BACs). Les inserts seront alors séquencés en aveugle (technique du 'shotgun') ou par marche sur le chromosome, puis analysés par comparaison aux séquences présentes dans les banques de données. L'identification d'un gène conservé, tel qu'un ADNr 16S, est susceptible de permettre d'attribuer une identité phylogénétique au segment de génome.

Jusqu'à présent, le nombre d'études d'écogénomique qui a été réalisé est relativement restreint. L'un des résultats les plus importants qui en découle est celui de la découverte, chez une lignée marine de bactérioplancton affiliée aux *γ-Proteobacteria*, du gène codant pour la protéorhodopsine, une pompe à proton alimentée par l'énergie lumineuse (Beja *et al.*, 2000). Ce groupe de micro-organismes, appelé 'SAR86' et connu par ses seules séquences d'ADNr 16S, avait été détecté à de nombreuses reprises dans des inventaires moléculaires de micro-organismes d'habitats marins, mais aucune fonction n'avait pu lui être inférée. Cette découverte suggère que les micro-organismes de ce groupe se développent par photosynthèse.

#### **2.4.2. Protéomique**

La protéomique est une discipline visant à caractériser à grande échelle toutes les protéines d'un organisme afin d'obtenir une vision globale et intégrée de sa biologie. Elle offre aux biologistes les clés de portes que le séquençage des ADN et la génomique ne peuvent ouvrir. Cette discipline comprend l'étude des interactions protéine-protéine, de leur fonction, de leur modifications, et de leur localisation. Les études de protéomique se révèlent incontournables si l'on souhaite élucider les effets de l'environnement sur un micro-organisme et vice-versa. En effet, le protéome d'un organisme est dynamique: il reflète l'environnement immédiat et peut subir des modifications en réponse à des facteurs internes ou externes. A l'échelle de l'individu, cette technique s'avère donc très intéressante en écologie microbienne.

L'électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide ou 2D-PAGE est au centre des études du protéome. Elle permet de réaliser des profils d'expression de protéines. En électrophorèse bidimensionnelle, les protéines sont séparées par 2 propriétés distinctes: leur charge et leur masse moléculaire. Dans une première étape, appelée isofocalisation, les protéines sont déposées dans un gel présentant un gradient de pH continu et vont migrer jusqu'au point où la valeur de pH est égale à leur point isoélectrique, donc au point où la charge globale de la protéine est nulle. Ensuite, une 2<sup>nd</sup>e séparation, perpendiculaire à la première, est réalisée dans un gel réticulé de polyacrylamide en présence de dénaturant (SDS: Sodium Dodécyl Sulfate) et va permettre de séparer les molécules en fonction de leur masse relative. Cette technique permet de comparer quantitativement et qualitativement le profil d'expression protéique de 2 échantillons. L'apparition ou la disparition de

spots informe sur l'expression différentielle des protéines, alors que l'intensité des spots fournit une information quantitative au sujet des niveaux d'expression. Une fois une protéine d'intérêt repérée sur le gel, celle-ci va pouvoir être identifiée par microséquençage, en utilisant la méthode de la dégradation N-terminale d'Edman, ou par spectrométrie de masse.

Dans leur revue, Graves et Haystead (Graves et Haystead, 2002) présentent un inventaire et un descriptif très détaillé de toutes les techniques utilisées en protéomique.

## **2.5. L'analyse phylogénétique**

### **2.5.1. Le principe fondamental: l'évolution hiérarchique des génomes**

La vie est apparue sur Terre il y a environ 3,5 milliards d'années, et tous les organismes actuels dérivent d'ancêtres communs apparus à cette époque. Le processus de reproduction n'étant pas entièrement fidèle, de petites différences s'installent à chaque génération et permettent l'évolution des espèces, voire l'apparition de nouvelles espèces. Selon Lamarck (1744-1829), l'évolution serait due à une adaptation à l'environnement: en fonction des changements de son milieu ambiant, un organisme s'adapterait en modifiant son comportement et en utilisant certains organes plus que d'autres, lesquels se modifieraient en fonction des nouveaux besoins. Darwin (1809-1882) a défendu la théorie de l'évolution par sélection naturelle. Les individus les mieux adaptés se reproduiraient plus que les moins adaptés. Ainsi, la vie évoluerait perpétuellement vers un état de mieux en mieux adapté à l'environnement. Suite aux progrès de la biologie et à la connaissance des lois de la génétique, cette notion a été appliquée aux gènes et traduite en terme de mutations. Ainsi, selon la théorie sélectionniste, les seules mutations qui se fixeraient dans les génomes seraient celles qui seraient avantageuses pour les organismes porteurs de ces allèles. Les travaux menés par la suite par Kimura ont permis de démontrer que seules les mutations très défavorisantes ou létales pour un individu étaient éliminées et que la majeure partie des mutations fixées étaient sélectivement neutres ou presque neutres. Ainsi, selon la théorie neutraliste de l'évolution, le milieu n'a pas de rôle sélectif.

L'accumulation progressive des mutations au sein des génomes constitue une information cruciale sur l'histoire des espèces. Ainsi, Zuckerkandl et Pauling (Zuckerkandl et Pauling, 1965) ont comparé les génomes à des 'horloges moléculaires'. Chaque région du génome accumule des mutations à un rythme qui lui est propre et qui est dicté par l'intensité de la pression de sélection à laquelle elle est soumise. On définit par homologues des caractères dérivant d'un ancêtre commun. Le taux d'accumulation des mutations est du même ordre de grandeur dans des régions homologues: l'on peut donc comparer entre elles des régions homologues pour reconstruire une phylogénie des espèces. En outre, pour être comparables, les gènes doivent avoir conservé une fonction identique. Bien que certains auteurs contestent la théorie de l'horloge moléculaire car, selon eux, il y aurait des épisodes d'accumulation de mutations suivis d'arrêts évolutifs, il semble que l'horloge moléculaire fonctionne assez bien sur de longues périodes évolutives pour des gènes possédant un taux de mutation relativement faible.

Les caractères analysés en phylogénie moléculaire sont des séquences d'acides nucléiques ou des séquences d'acides aminés qui sont étudiés en tant que caractères discrets.

Les séquences d'ARN ribosomiaux 16S se sont rapidement imposées comme molécules marqueurs car leur présence est universelle, leur fonction conservée, la pression de sélection qui s'exerce sur elles est peu dépendante des conditions environnementales et elles possèdent une alternance de domaines conservés à hypervariables.

### **2.5.2. L'alignement**

La première étape de l'analyse phylogénétique va consister à aligner les séquences à comparer. Cette étape est décisive pour obtenir un alignement de bonne qualité. Elle consiste à mettre en regard des nucléotides homologues. Le travail d'alignement est particulièrement délicat à réaliser, et, même s'il existe des logiciels d'alignement automatique, les alignements nécessitent d'être réajustés manuellement. Deux nucléotides pourront être homologues et informatifs pour deux espèces proches alors qu'ils ne le seront pas pour deux espèces lointaines. En outre, les phénomènes d'homoplasie compliquent l'analyse des séquences dans les zones hypervariables. Une homoplasie est une similarité ne dérivant pas d'un caractère ancestral. Les homoplasies sont consécutives à des événements de type réversion (changement dans une séquence annulé par un second changement G→C→G), parallélisme (changements parallèles dans deux séquences conduisant à des nucléotides identiques) ou convergence (séquences ancestrales différentes qui évoluent vers des séquences identiques). En fonction des séquences à analyser, il convient donc de déterminer quelles sont les positions informatives et de délimiter les zones réellement comparables au moyen de masques. Pour évaluer la confiance que l'on peut avoir dans un alignement, l'on peut également s'assurer que les séquences signatures d'un groupe phylogénétique sont bien en regard les unes des autres. L'analyse des structures secondaires s'avère, également, très souvent nécessaire.

### **2.5.3. Méthodes de reconstruction**

Après avoir aligné les séquences, il faut en déduire la phylogénie. L'analyse phylogénétique repose sur des hypothèses quant à la nature de l'évolution des gènes. Ces hypothèses ont été modélisées en utilisant des méthodes mathématiques et l'analyse phylogénétique est désormais réalisable grâce à un ensemble de programmes informatiques relativement conviviaux (packages ARB, PHYLO\_WIN, GCG, PHYLIP).

#### **2.5.3.1. Les méthodes de distances**

Les méthodes de distances sont basées sur l'analyse du nombre de substitutions de nucléotides ou d'acides aminés entre des séquences prises deux à deux. Ce sont des méthodes rapides qui donnent de bons résultats pour des séquences très proches. Les plus couramment utilisées sont détaillées ci-dessous.

① la méthode UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic mean): cette méthode utilise un algorithme de clusterisation séquentiel dans lequel les relations sont traitées dans l'ordre de leur similarité. Les deux séquences les plus proches seront identifiées et comparées puis l'on ajoutera la séquence la plus proche de ce doublet, et ainsi, pas à pas, jusqu'à reconstruction de la matrice générale. Cette méthode est sensible à l'ordre dans lequel les séquences sont introduites et à des taux de mutations différents sur les différentes branches. Elle n'est utilisable que pour des comparaisons de séquences ayant une forte similarité.

② la méthode du Neighbor-Joining (NJ) (Saitou et Nei, 1987): cette méthode, dérivée de la méthode UPGMA, autorise un taux de mutation différent sur les différentes branches. Une matrice initiale est construite en groupant deux à deux les espèces les plus proches, puis cette matrice de distances est corrigée afin de prendre en compte la divergence moyenne de chacune des espèces avec les autres. C'est cette nouvelle matrice de distances qui servira de base à la construction de l'arbre phylogénétique. Cet algorithme permet de construire rapidement un arbre selon l'évolution minimale. Les inconvénients majeurs de cette technique sont qu'elle est non applicable à des séquences très éloignées et qu'elle traite tous les sites de manière équivalente, ce qui induit une perte d'informations.

Dans les méthodes de distances, le nombre d'évènements mutationnels est sous-estimé car les substitutions sont simplement dénombrées, et ne sont pas pondérées. Or, des phénomènes de mutations reverses et de mutations multiples peuvent se produire. Différentes corrections ont été proposées pour tenter de corriger ce biais en faisant des hypothèses sur la façon dont les bases ou les acides aminés se sont substitués à un locus donné.

- La correction de Jukes et Cantor (Jukes et Cantor, 1969) fait l'hypothèse que toutes les mutations ont une probabilité égale [les transitions (purine↔purine ou pyrimidine↔pyrimidine) et les transversions (purine↔pyrimidine) ont le même poids] mais qu'elle varie au cours du temps, et qu'il n'y a eu ni insertions, ni délétions. C'est l'hypothèse la plus simple mais pas forcément la plus correcte.
- La correction de Kimura (Kimura, 1980) fait l'hypothèse que le poids des transversions est double par rapport à celui des transitions car les transitions sont beaucoup plus fréquentes que les transversions.

#### 2.5.3.2. Les méthodes fondées sur les caractères

Les méthodes fondées sur les caractères sont des méthodes dont les calculs sont longs mais relativement précis. Elles s'intéressent au nombre d'évènements mutationnels (substitutions / insertions / délétions) qui affectent chacun des sites.

① La méthode du maximum de parcimonie (Fitch, 1971): cette méthode vise, comme son nom l'indique, à construire l'arbre le plus parcimonieux possible en minimisant le nombre de mutations nécessaires pour passer d'une séquence à une autre. Cette méthode implique que la vitesse d'évolution soit constante et lente, et que les sites évoluent indépendamment les uns des autres, ce qui n'est pas forcément le cas. Tous les sites présentant des nucléotides identiques sont considérés comme non-informatifs et ne sont pas pris en compte dans les calculs. Les calculs sont, par conséquent, réalisés sur un nombre restreint de sites, dits informatifs. Le logiciel va rechercher toutes les topologies d'arbres possibles et, par conséquent, la durée nécessaire à cette analyse va croître de façon exponentielle avec le nombre de séquences. Au final, seul l'arbre le plus parcimonieux sera conservé.

La méthode du maximum de parcimonie pouvant conduire à plusieurs arbres aussi parcimonieux les uns que les autres, un arbre consensus va pouvoir être construit. Il comportera les nœuds les plus fréquemment rencontrés sur les différents arbres possibles.

Les inconvénients de cette méthode sont multiples: elle ne s'intéresse qu'aux positions informatives et ne prend donc en compte qu'une partie de l'information, elle ne pondère pas les substitutions multiples par rapport aux substitutions simples, elle ne donne aucune information sur les distances relatives entre les différents groupes et elle est sensible au biais des codons. En outre, cette technique est inutilisable lorsqu'il y a un grand nombre de séquences.

② La méthode du maximum de vraisemblance (Felsenstein, 1973, 1981): cette méthode de reconstruction phylogénétique est une méthode probabiliste basée sur des théories statistiques élaborées. Elle va calculer la probabilité qu'à chaque branche de se trouver à une position donnée dans l'arbre phylogénétique et estimer sa longueur sous un modèle évolutif donné. Cette méthode pondère de manière différente des événements de transitions ou de transversions. L'arbre qui résultera de l'analyse sera celui possédant la vraisemblance la plus élevée. Cette méthode est robuste et permet de comparer des séquences très éloignées. Elle devient inutilisable lorsque le nombre de séquences est important.

#### 2.5.3.3. Estimation de la robustesse des arbres

Toutes les méthodes d'analyse phylogénétique possèdent des avantages et des inconvénients, mais aucune n'incorpore tous les aspects des mécanismes biologiques de l'évolution des séquences. Aucune de ces méthodes n'est donc susceptible de fournir un arbre phylogénétique 'vrai'. Les différentes méthodes phylogénétiques appliquées sur un même jeu de séquences sont donc susceptibles de fournir des topologies différentes. On estime généralement que seules les branches retrouvées par les 3 méthodes (maximum de vraisemblance, maximum de parcimonie et Neighbor-Joining) sont susceptibles d'être une bonne image de la réalité (Huelsenbeck et Hillis, 1993). Actuellement, pour reconstruire une bonne phylogénie, une analyse de la robustesse de l'arbre est

généralement réalisée. Différentes méthodes d'évaluation existent: l'analyse de bootstrap, le delete-half-Jackknifing et la méthode de permutation. L'analyse de bootstrap est sans doute la plus utilisée en phylogénie (Felsenstein, 1985). C'est une méthode d'échantillonnage qui permet d'examiner comment la stabilité de l'arbre est influencée par la suppression de certaines informations. Des arbres phylogénétiques sont construits à partir de la matrice de données initiale dans laquelle des tirages aléatoires avec remise sont réalisés. Cette opération est réalisée entre 100 et 1000 fois et un arbre est calculé pour chaque échantillonnage. Les différentes topologies d'arbre sont ensuite comparées et compilées en un arbre consensus et un pourcentage de robustesse est attribué à chacun des nœuds de l'arbre en fonction du nombre de fois où celui-ci a été retrouvé à cette position. Les pourcentages inférieurs à 50% ne sont généralement pas pris en considération. La topologie de l'arbre est particulièrement sensible à la qualité du ou des groupe(s) extérieur(s) ('outgroup') choisi(s) pour la reconstruction phylogénétique. L' "outgroup" doit être suffisamment distant des autres séquences pour permettre de les discriminer et de les positionner les unes par rapport aux autres sans toutefois l'être de trop au risque de ne plus être discriminant du tout et de conduire à une topologie d'arbre "écrasée" (biais lié au phénomène d'attraction des longues branches (Philippe, 2000)).

## **2.6. Impact des techniques culturelles et moléculaires sur notre vision de la diversité microbienne**

Toutes les techniques d'analyse de la diversité microbienne, qu'elles soient culturelles ou moléculaires, présentent des biais qui influent sur notre vision du monde microbien. Ainsi, contrairement à une idée reçue largement répandue, les micro-organismes isolés d'échantillons naturels par des techniques culturelles traditionnelles sont rarement ceux qui dominent la biomasse ou qui sont les plus importants d'un point de vue fonctionnel. Leur isolement est en fait une conséquence de leur capacité à se développer rapidement dans les conditions testées. Ainsi, Hugenholtz (Hugenholtz, 2002) a souligné que 65% des travaux de microbiologie menés de 1991 à 1997 ont concerné des micro-organismes faciles à cultiver sur milieu solide. Cependant, de nombreux exemples témoignent du fait qu'en utilisant des techniques culturelles appropriées ou qu'en multipliant les conditions de cultures (cf. paragraphe 2.3.1.), l'on parvient à cultiver un plus grand nombre de micro-organismes. Les nombreux travaux d'écologie moléculaire menés ces dernières années dans des environnements très divers ont mis en évidence un très grand nombre de nouvelles lignées. Actuellement, on dénombre un total de 35 phyla, dont 22 (63%) possèdent au moins un représentant cultivé et 13 (37%) ne sont connus qu'au travers d'un grand nombre de séquences environnementales (Hugenholtz, 2002) (Fig. 2.2.). En outre, au moins 10 autres phyla potentiels seraient recensés si l'on tenait compte des séquences partielles ou des groupes de séquences très faiblement représentés dans les banques.

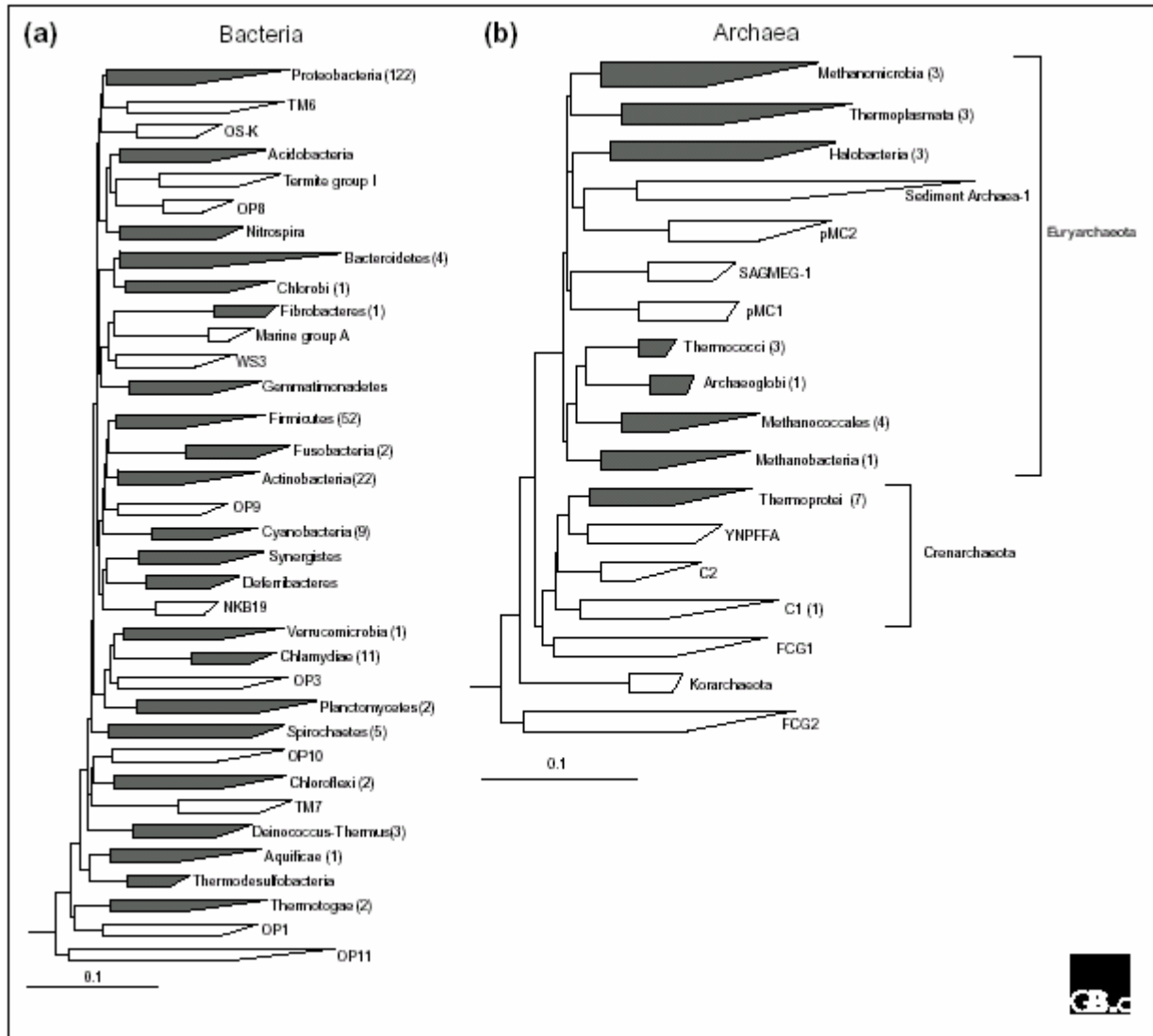


Fig. 2.2 : Position phylogénétique des différents phyla bactériens (a) et archéens (b). Ces dendrogrammes de distance (Neighbor-Joining) ont été construits d'après l'analyse de séquences d'ADNr 16S en utilisant le package ARB (extrait de (Hugenholtz, 2002)). Les phyla possédant des représentants cultivés sont représentés en noir et ceux connus uniquement au travers de séquences environnementales sont en blanc. Le nombre de génomes séquencés ou en cours de séquençage pour chaque phylum est inscrit entre parenthèses.

La barre d'échelle représente 0.1 changement par nucléotide.

La quasi-totalité des études de diversité est effectuée en amplifiant par PCR les ADNr 16S présents dans des échantillons naturels à partir desquels l'ADN a été extrait. La question de la fidélité de la représentativité de la microflore peut donc également se poser car cette approche possède ses propres limites et ses biais. Selon la procédure d'extraction suivie, la lyse pourra être plus ou moins sélective et la qualité des acides nucléiques plus ou moins bonne (Theron et Cloete, 2000). Par conséquent la diversité microbienne pourra être plus ou moins correctement estimée. Les artefacts liés à la PCR peuvent également biaiser l'évaluation de la diversité. En effet, les amplifications



différentielles de différents ADN-matrices (Reysenbach *et al.*, 1992; Suzuki et Giovannoni, 1996), l'influence du nombre de copies des gènes d'ARNr 16S et leur microhétérogénéité (Farrelly *et al.*, 1995; Amann *et al.*, 2000; Crosby et Criddle, 2003), l'effet de la concentration de l'ADN-matrice, la spécificité des amorces (Weisburg *et al.*, 1991) et la formation de séquences chimériques (Kopczynski *et al.*, 1994) sont des phénomènes qui sont bien connus en PCR. Outre leurs biais inhérents, les méthodes moléculaires d'analyse de la diversité les plus couramment employées ne permettent pas d'attribuer une physiologie et un métabolisme à partir des séquences détectées. Les approches culturales et moléculaires, permettant chacune de répondre à des questions différentes et bien précises, s'avèrent donc complémentaires. L'émergence de techniques culturales nouvelles et le développement de techniques permettant d'inférer à la fois une fonction et une position phylogénétique (FISH-microautoradiographie, écogénomique) devraient considérablement améliorer notre connaissance de la diversité microbienne.

## *Résultats*

Ce travail de thèse, mené durant 3 années, a porté sur l'étude de la microflore associée aux tubes des polychètes hydrothermaux de la famille Alvinellidae, en utilisant des techniques culturales et moléculaires. Auparavant, à l'exception de la relation épisymbiotique d'*Alvinella pompejana*, la microflore associée à ces animaux avait fait l'objet d'études très limitées. En effet, la majeure partie des études de microbiologie antérieures avaient porté sur l'analyse de la microflore du pôle chaud des sources hydrothermales océaniques profondes. Les habitats des alvinelles étant situés dans la zone de mélange du fluide hydrothermal avec l'eau de mer environnante, et leurs tubes étant, par ailleurs, riches en matière organique, ces substrats étaient *à priori* susceptibles d'abriter un large éventail de micro-organismes aux métabolismes divers.

L'une des difficultés inhérentes aux études des écosystèmes hydrothermaux profonds est liée à l'obtention d'échantillons adaptés aux études envisagées. Cette obtention est soumise à l'accessibilité aux campagnes océanographiques et aux difficultés de prélever des échantillons par plus de 2000 mètres de profondeur. Ainsi, l'ensemble des travaux entrepris au cours de ce travail ont été conditionnés par la disponibilité des différents types d'échantillons et par leur mode de conditionnement.

Pour la première partie du travail, nous avons bénéficié d'échantillons de tubes et de mucus de polychètes Alvinellidae provenant de la dorsale Juan de Fuca. Ces échantillons avaient été collectés par des biologistes de l'équipe de Kim Juniper lors de la campagne américo-canadienne NeMO (New Millenium Observatory). L'accession à ces échantillons a constitué une véritable opportunité car les populations des sources hydrothermales profondes de cette dorsale n'avaient fait l'objet d'aucune étude microbiologique antérieure. La première étape du travail a consisté à réaliser un inventaire phylogénétique de la microflore associée à différents échantillons de tubes et de mucus sécrétés par deux alvinelles endémiques des dorsales du Pacifique Nord-Est, *Paralvinella palmiformis* et *Paralvinella pandorae*, et à effectuer une analyse statistique des résultats. En parallèle, une étude de la microflore associée au tube d'une autre espèce d'alvinelle habitant sur les mêmes édifices, *Paralvinella sulfincola*, a été réalisée au laboratoire par Antoine Pagé, un étudiant canadien. Ces études ont révélé la présence d'une très grande diversité de micro-organismes au sein des différents échantillons.

Du fait de la grande diversité microbienne incultivée mise en évidence, l'emploi d'une approche culturale a semblé pertinente pour la poursuite du travail. La seconde partie du travail a donc consisté en l'enrichissement et en l'isolement de micro-organismes, dans différentes conditions physico-chimiques et nutritionnelles, à partir de tubes de différentes espèces d'alvinelles provenant de la dorsale Juan de Fuca et de la dorsale du Pacifique oriental (EPR 13°N) dont nous disposons et qui

avaient été conditionnés convenablement pour réaliser des cultures. Au sein de la collection de micro-organismes qui a été constituée, certaines souches se sont révélées taxinomiquement intéressantes. Trois isolats bactériens représentant deux nouveaux genres et une nouvelle espèce ont ainsi fait l'objet d'une caractérisation complète.

Les résultats obtenus lors des 2 premières étapes de ce travail nous ont conduits à ouvrir le sujet sur des questions d'écologie microbienne. Ainsi, *Desulfurobacterium crinifex*, l'une des souches isolées à partir d'un tube de *Paralvinella sulfincola*, présentait l'originalité de former *in vitro*, des macrostructures atypiques que nous avons décrites et qui, du fait de leurs propriétés, nous ont amené à nous poser des questions quant à leur fonction. Enfin, dans une dernière partie du travail réalisée en collaboration avec des biologistes et des chimistes, nous nous sommes intéressés à la colonisation microbienne précédant l'installation des Alvinellidae. Pour cela, des expérimentations de colonisation *in situ* ont été menées sur différentes cheminées de la dorsale du Pacifique oriental (EPR 13°N). Cette analyse des premiers cortèges microbiens s'installant sur des modules de colonisation a été réalisée en combinant des approches moléculaires et culturales, tout en intégrant un suivi des conditions physico-chimiques *in situ*, des études microscopiques et une identification de la macrofaune présente.

Les résultats obtenus sont rassemblés en 3 chapitres et présentés sous la forme d'articles publiés ou soumis.

---

## Chapitre 1. Analyses moléculaires des assemblages microbiens associés aux Alvinellidae

---

Caractérisation phylogénétique de la microflore associée aux tubes des polychètes hydrothermaux *Paralvinella palmiformis* et *Paralvinella pandorae*

Article 1 : **Karine Alain**, Michel Olagnon, Daniel Desbruyères, Antoine Pagé, Georges Barbier, S. Kim Juniper, Joël Quéréllou et Marie-Anne Cambon-Bonavita. Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with mucous secretions of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis* (2002). FEMS Microbiology Ecology, 42 :463-476.

Article publié également dans le journal : Virtual Journal of Geobiology (2002), 1(4).

Article 2 : Antoine Pagé, S. Kim Juniper, Michel Olagnon, **Karine Alain**, Gaston Desrosiers, Joël Quéréllou et Marie-Anne Cambon-Bonavita. Microbial diversity associated with mineral and biogenic samples from an active deep-sea hydrothermal vent chimney. FEMS Microbiology Ecology, soumis.

---

## Chapitre 2. Etudes taxinomiques

---

Description de deux nouveaux genres bactériens et d'une nouvelle espèce bactérienne isolés à partir de tubes de polychètes Alvinellidae.

Article 3 : **Karine Alain**, Patricia Pignet, Magali Zbinden, Morgane Quillévéré, Francis Duchiron, Jean-Pierre Donval, Françoise Lesongeur, Gérard Raguénès, Philippe Crassous, Joël Quéréllou et Marie-Anne Cambon-Bonavita. *Caminicella sporogenes* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic spore-forming bacterium isolated from an East-Pacific Rise hydrothermal vent (2002). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52 : 1621-1628.

Article 4 : **Karine Alain**, Joël Quéréllou, Françoise Lesongeur, Patricia Pignet, Philippe Crassous, Gérard Raguénès, Valérie Cueff et Marie-Anne Cambon-Bonavita. *Caminiobacter hydrogeniphilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an East-Pacific Rise hydrothermal vent (2002). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52 : 1317-1323.

Article 5 : **Karine Alain**, Sophie Rolland, Philippe Crassous, Françoise Lesongeur, Magali Zbinden, Christian Le Gall, Anne Godfroy, Antoine Pagé, S. Kim Juniper, Marie-Anne Cambon-Bonavita, Francis Duchiron et Joël Quéréllou (2003). *Desulfurobacterium crinifex* sp. nov., a novel thermophilic, pinkish-streamer forming, chemolithoautotrophic bacterium isolated from a Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent and amendment of the genus *Desulfurobacterium*. Extremophiles, 7 :361-370.

### Chapitre 3. De la description d'un environnement à des hypothèses sur son écologie

---

- Description des macrostructures formées par *Desulfurobacterium crinifex* et de leurs propriétés : implications écologiques.

Article 6 : **Karine Alain**, Philippe Crassous, Jean Guézennec, Yves Fouquet, Magali Zbinden, Marie-Anne Cambon-Bonavita et Joël Quérellou. Conspicuous filamentous networks of the thermophilic hydrothermal vent species *Desulfurobacterium crinifex* : spatial arrangement of cells *in vitro*, polymer production and mineral precipitation capabilities. *Extremophiles*, en préparation.

- Expériences de colonisation *in situ* réalisées dans le but de caractériser la microflore précédant l'installation des Alvinellidae. Approche pluridisciplinaire intégrant des analyses moléculaires, microbiologiques, biologiques et chimiques.

Article 7 : **Karine Alain**, Magali Zbinden, Nadine Le Bris, Françoise Lesongeur, Françoise Gaill et Marie-Anne Cambon-Bonavita. Early steps of microbial colonisation processes at deep-sea hydrothermal vents. *Environmental Microbiology*, sous presse.

## Chapitre I. Analyses moléculaires des assemblages microbiens associés aux Alvinellidae

La diversité microbienne associée aux tubes ou aux cocons muqueux sécrétés par les trois espèces d'Alvinellidae habitant les parois des cheminées actives de la dorsale Juan de Fuca (*Paralvinella palmiformis*, *Paralvinella pandorae* et *Paralvinella sulfincola*) a été analysée par une approche moléculaire. Dans le but d'accéder à la majeure partie de la microflore présente dans les échantillons, une procédure d'extraction d'ADN permettant de minimiser un maximum de biais a été suivie. Une démarche expérimentale totalement identique a été suivie pour les différents échantillons afin de rendre les résultats comparables. Ces résultats ont été comparés statistiquement suivant la méthode décrite par Singleton (Singleton *et al.*, 2001). Le principe de la méthode statistique est décrit en annexe (Annexe 1).

### I.1. Caractérisation phylogénétique de l'assemblage microbien associé aux cocons muqueux de *Paralvinella palmiformis*

Article 1 : **Karine Alain**, Michel Olagnon, Daniel Desbruyères, Antoine Pagé, Georges Barbier, S. Kim Juniper, Joël Quérellou et Marie-Anne Cambon-Bonavita. Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with mucous secretions of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis* (2002). FEMS Microbiology Ecology, 42 :463-476.

Article publié également dans le journal : Virtual Journal of Geobiology (2002), 1(4).

---

## Article 1

### **Caractérisation phylogénétique de l'assemblage bactérien associé aux sécrétions de mucus du polychète hydrothermal *Paralvinella palmiformis***

Karine Alain, Michel Olagnon, Daniel Desbruyères, Antoine Pagé, Georges Barbier, S. Kim Juniper,  
Joël Quérellou et Marie-Anne Cambon-Bonavita.

FEMS Microbiology Ecology (2002), 42 :463-476.

Virtual Journal of Geobiology (2002), 1(4).

---



**FEMS Microbiology Ecology**

December 2002; 42(3) : 463-476

[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6496\(02\)00390-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00390-2)

© 2002 Federation of European Microbiological Societies.

Published by Elsevier Science B.V.

Archimer <http://www.ifremer.fr/docelec/>

Archive Institutionnelle de l'Ifremer

---

**Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with mucous secretions of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis***

**Karine Alain<sup>a\*</sup>, Michel Olagnon<sup>b</sup>, Daniel Desbruyères<sup>c</sup>, Antoine Pagé<sup>a,d</sup>, Georges Barbier<sup>a</sup>, S. Kim Juniper<sup>d</sup>, Joël Quéréllou<sup>a</sup> and Marie-Anne Cambon-Bonavita<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Laboratoire de Microbiologie et de Biotechnologie des Extrêmophiles, Département de Valorisation des Produits, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280, Plouzané, France

<sup>b</sup> Cellule Océano-Météo, Département TMSI, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280, Plouzané, France

<sup>c</sup> Département Environnement Profond, Direction des Recherches Océaniques, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280, Plouzané, France

<sup>d</sup> Geotop and Département des Sciences Biologiques, Université du Québec, C.P. 8888, succ. A., Montréal, QC, Canada H3C 3P8

\*[karine.alain@ifremer.fr](mailto:karine.alain@ifremer.fr) Tel.: +33 (2) 98 22 45 53; Fax: +33 (2) 98 22 47 57

---

**Abstract:** As part of an ongoing examination of microbial diversity associated with hydrothermal vent polychaetes of the family Alvinellidae, we undertook a culture-independent molecular analysis of the bacterial assemblage associated with mucous secretions of the Northeastern Pacific vent polychaete *Paralvinella palmiformis*. Using a molecular 16S rDNA-based phylogenetic approach, clone libraries were constructed from two samples collected from active sulfide edifices in two hydrothermal vent fields. In both cases, clone libraries were largely dominated by small epsilon, Greek-Proteobacteria. Phylotypes belonging to the Cytophaga-Flavobacteria and to the Verrucomicrobia were also largely represented within the libraries. The remaining sequences were related to the taxonomic groups Fusobacteria, Green non-sulfur bacteria, Firmicutes,  $\gamma$ - and  $\delta$ -Proteobacteria. To our knowledge, this is the first report of the presence of Verrucomicrobia, Fusobacteria and green non-sulfur bacteria on hydrothermal edifices. The potential functions of the detected bacteria are discussed in terms of productivity, recycling of organic matter and detoxification within the *P. palmiformis* microhabitat.

**Keywords:** *Paralvinella palmiformis*; Hydrothermal vent; Phylogeny; Microbial diversity; 16S rRNA; Proteobacteria

## 1. INTRODUCTION

Over the past decade, our knowledge of the diversity and role of hydrothermal vents micro-organisms and fauna has considerably expanded. Representative species of both the *Bacteria* and *Archaea* domains, including chemolithoautotrophs, chemoorganoheterotrophs and mixotrophs, have been isolated [1-2]. The emergence of molecular methods, independent of traditional microbiological culturing techniques, has improved and accelerated our comprehension of the structure and composition of deep-sea hydrothermal vent microbial communities [e.g. 3-8]. Concurrent with microbiological investigations, more than 500 macro-faunal species from deep-sea vents have been described and their biology, systematic, physiology and ecology investigated [9-14]. Associations between vent metazoans, including vesicomyid clams, mytilid mussels, provannid gastropods, vestimentiferan tube worms, and their sulphide-oxidising bacterial endosymbionts have been the subject of many studies [e.g. 15-18]. However, despite of extensive work on the physiology of these invertebrate/sulphide-oxidising bacteria symbiosis, relatively little is known about other microbe/vent animal associations or interactions between micro-organisms, animals and mineralisation processes.

The work presented here is part of an ongoing project aiming at describing microbial assemblages associated with polychaete worms of the family *Alvinellidae*. The *Alvinellidae*, comprising the two genera *Alvinella* and *Paralvinella*, is a group of terebellomorph polychaetes endemic to deep-sea hydrothermal vents in the Pacific Ocean [19]. *Alvinellidae* species found at modern Eastern and Northeastern Pacific vents differ, but probably evolved from common ancestors that colonised Pacific spreading ridges more than 30 millions years ago, before the separation of the two Eastern Pacific ridge systems [20-21]. Among the alvinellids, *Alvinella* spp. inhabiting walls of actively venting high-temperature chimneys along the East-Pacific rise have been the most studied [22]. They differ from the confamilial genus *Paralvinella* by their obligate association with an epibiotic bacterial community thriving on their integument [9, 11]. The functional role of this obligate association remains unclear, mainly because the dominant filamentous epibiotic bacteria of these worms, which belong to the  $\epsilon$ -*Proteobacteria* [3, 23] have yet to be cultured, and because *in vivo* experimentation is difficult with these polychaetes [11]. On the other hand, studies of other *Alvinellidae* species suggest that there are obviously novel microbial associations and that polychaetes-microbes combinations could affect the mineralogy of sulphide edifice structures [24].

This study focused on the microbial assemblage associated with the organic-rich mucous secretions of another *Alvinellidae*, *Paralvinella palmiformis* [19]. This alvinellid species, the so-called “palm-worm”, is found only at hydrothermal vent sites along the Gorda, Juan de Fuca and Explorer Ridges in the Northeast Pacific ocean. One of the characteristic feature of this worm is its continual secretion of mucus, presumably as a way of clearing its bodywall of particulate debris. The presence of metallothioneines and high quantities of elemental sulphur in the mucus have led to the suggestion that mucous secretion may also allow the worm to eliminate accumulated toxins [25]. Secreted mucus is colonised by numerous bacteria, unidentified up to now, and by a diversified meiofauna [25]. Mucous secretions often form a loose sheath around the body of individual *P. palmiformis*, and shed mucus accumulates in the vent environment. These organic-rich secretions, in direct contact with hydrothermal fluid, represent *a priori* a high-quality substratum for microbial colonisation. We used molecular characterisation to evaluate the diversity and phylogenetic relationships of the organisms comprising the mucous microbial assemblage, and to consider their potential physiological nature.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Sample collection and processing

Material was collected from two deep-sea hydrothermal vent fields located at Axial Volcano on the Juan de Fuca Ridge, during the NeMO (New Millennium Observatory) cruise. Collection of samples was performed on sulphide chimneys of CASM vent field (on T&S chimney, 130°01'W 45°59'N; depth, 1546 m) and ASHES vent field (on Hell chimney, 130°01'W 45°56'N; depth, 1580 m) on dives R626 and R632 (24 and 31 July 2001) of the ROV *Ropos*. These two vent fields are 6.2 kilometres apart. Mucus secretions of the annelid polychaete *Paralvinella palmiformis* were collected in areas containing patches of palm worms (*P. palmiformis*) on a substratum of marcasite (FeS<sub>2</sub>) irregularly colonised by sulphide worms *Paralvinella sulfincola*.

Once aboard the ship, mucus secretions still attached to individual *P. palmiformis* were aseptically placed into sterile tubes containing sterile water, and frozen at –80 °C. Samples were transported frozen to the laboratory and thawed just before DNA extraction.

### 2.2 DNA extraction and purification

For each sample, DNA was extracted from approximately 4 g of thawed mucus (wet weight, corresponding to approximately 1 g dry weight) following a modified version of the extraction protocol of Juniper *et al.* [26]. Both detergent-based and enzymatic lysis extraction procedure were combined. These relatively gentle methods without physical disruption steps avoid excessive shearing of DNA and reduce the risk of chimera formation during PCR [27].

For DNA extraction, samples were aseptically transferred into sterile centrifuge tubes, suspended in 10 ml TE-Na-1x lysis buffer (100 mM Tris, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0) and shaken during 30 seconds to remove cells from the mucus. This was followed by successive additions of 1 ml Sarkosyl (10%), 1 ml SDS (10%) and 200 µl proteinase K (20 mg/ml; Eurobio). Preparations were briefly vortexed, then incubated at 45 °C. After 1.5 h incubation, samples were centrifuged for 30 min at 6000 g and the supernatants were collected. The pellets were then resuspended in lysis buffer and the same volumes detergents and enzymes used previously were added. The samples were re-incubated at 45 °C and centrifuged after 2.5 h longer incubation (after a total of 4 h lysis, intact cells could not be observed by microscopy). Supernatants from the 1.5 h and 4 h lysis treatments were pooled and extracted with equal volumes of buffered (pH 8.0) PCI (Phenol/Chloroform/Isoamyl Alcohol: 25/24/1). After centrifugation 20 min at 14000 g, the upper aqueous phase containing nucleic acids was removed and extracted again with equal volumes of 100% chloroform (centrifugation 20 min at 14000 g). After centrifugation for 20 min at 14000 g, the final aqueous phase containing DNA was collected. To assure the precipitation of extracted DNA and its visualisation after centrifugation, samples were supplemented with 45 µl of eukaryotic DNA (herring sperm DNA solution at 6 mg/ml). DNA was then precipitated by addition of a 0.7 volume of 100% isopropanol and incubation overnight at -20 °C. After centrifugation at 14000 g for 40 min, the supernatants were poured off and the DNA pellets were air dried before being redissolved in 500 µl TE-1X buffer (10mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, pH 7.5). Absorbance was determined at 230, 260, 280 and 320 nm, on a GenQuantII spectrophotometer (Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Sweden) to check the purity of the nucleic acids obtained and to determine their concentration.

DNA was then purified by cesium chloride (CsCl) density gradient centrifugation as described by Juniper *et al.* [26].

### 2.3 Amplification and cloning of 16S rDNA genes

Community 16S rDNAs were selectively amplified by PCR with universal oligonucleotide primers designed to anneal to conserved positions in the 3' and 5' regions of the 16S rRNA genes. The bacterial forward primer was SAdir (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTCA GA-3') corresponding to positions 8-28 in the *Escherichia coli* 16S rRNA and the bacterial reverse primer was S17rev (5'-GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3'), corresponding to positions 1493-1509. 16S rDNAs, intergenic sequences and part of the 23S rDNA of the *Archaea* were amplified with the specific forward primer 21Fa (5'-TTC CGG TTG ATC CTG CCG GA-3') and a specific reverse primer 23SA-REV (5'-CTT TCG GTC GCC CCT ACT-3') (position 257-234 on *Thermococcus celer* 23S rDNA sequence). Libraries were produced from community rDNA by amplifying approximately 100 ng of bulk DNA in 50 µl reaction mixtures containing (final concentrations) 1X PCR buffer (QBIogene, France), 200 µM of each deoxyribonucleoside triphosphate, 100 µM of each forward and reverse primer and 2.5 U of *Taq* polymerase (QBIogene). Reaction mixtures were incubated in a Robocycler Gradient 96 (Stratagene, La Jolla, CA.). The cycling program was as follows: 94 °C for 3 min, 30 cycles of 94 °C for 1 min, 48 °C for 1.5 min, 72 °C for 2 min and a final extension period of 6 min 72 °C.

After verification of the quality of the amplifications on a 0.8% (w/v) agarose gel, the PCR products were cloned directly to separate them from each other, by the TA cloning method, using a TOPO TA Cloning<sup>®</sup> kit (pCR2.1 vector), according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Clone libraries were constructed by transforming *E. coli* TOP10F' cells. For each *Paralvinella palmiformis* mucous sample, three bacterial clones libraries were constructed from three independent PCR amplifications and cloning experiments.

#### 2.4 Screening of 16S rDNA clones by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA).

Each recombinant colony was suspended in 100 µl of sterile deionized water. Ribosomal DNA inserts from recombinant clones were amplified by PCR from 5 µl of colony suspension, using the same reaction mixtures as described above. The PCR program was the same as that for the initial amplification of the rDNA (see above), except that the initial step lasted 10 minutes (for cell lysis). Insert-containing clones of the six libraries were then screened by Amplified Ribosomal DNA restriction Analysis (ARDRA) using 5 U of the restriction endonucleases *HhaI* and *RsaI* according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs). The DNA fragments were separated by gel electrophoresis on a 2% agarose (agarose type XI,

Sigma) gel run in TAE-1x (Tris-Acetate-EDTA) buffer. The clones were separated into different phlotypes based on the ARDRA banding patterns.

### *2.5 16S rDNA sequencing and phylogenetic analysis.*

At least one gene representative of each unique phlotype was completely sequenced using fluorescent dideoxy terminators (Sanger method [28]). For dominant patterns (more than 20 clones per pattern), five clones were partially sequenced to check for the homogeneity of the group. Sequencing procedures were as described previously [29] and the work was carried out by Genome Express S.A. (Grenoble, France) with automatic DNA sequencers (Perkin Elmer). Sequences were assembled with the SeqMan program (DNASTAR software; Madison, Wis., USA). These sequences were checked for the presence of chimeras using the Ribosomal Database Project's (RDP) CHIMERA\_CHECK program [30] and by using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [31] program to compare 16S rDNA partial sequences.

Sequences were compared to those in available databases using the BLAST [31] network service to determine approximate phylogenetic affiliations. Partial sequences were compiled and aligned with the rDNA sequences from the Ribosomal Database Project, using the GCG CLUSTALW program [32]. Alignments were refined manually, using the SEAVIEW program [33]. All the trees presented were constructed by the PHYLO-WIN program [33], on the basis of evolutionary distance [34] and maximum likelihood [35] methods. The robustness of inferred topologies was tested by the bootstrap resampling [36] of trees calculated on the basis of evolutionary distance (neighbor-joining algorithm with Kimura two-parameters correction [37]) and maximum likelihood. If ARDRA patterns were not identical but related sequences displayed over 97% sequence similarity, only one of the sequences was retained for phylogenetic analysis.

The EMBL accession numbers of the 51 sequences used in this study are AJ441198 to AJ441248.

### *2.6 Accumulation curves and comparison of diversity in the two environments*

To determine if the clones libraries were representative of the microbial diversity of the samples, accumulation curves were constructed for the different ARDRA banding patterns of 16S rDNA clones of each sample of *P. palmiformis* mucus secretions. Numbers of different ARDRA patterns in clone libraries were determined after digestion with the two restriction endonucleases (the accumulation curve of each

sample comprised cumulative ARDRA patterns of the three bacterial clones libraries constructed for each sample). The 16S rDNA clonal libraries of the *P. palmiformis* mucous samples from the two vent fields (CASM and ASHES), were compared statistically by determining differences between homologous coverage curves and heterologous coverage curves [38] as in Singleton [39]. The homologous coverage ( $C_y$ ) of the library of 16S rRNA genes called Y, by a sample from Y, is calculated by the following formula:

$$C_y = 1 - (N_y / n)$$

where  $N_y$  is the number of unique sequences in the sample and  $n$  is the total number of sequences. The heterologous coverage ( $C_{yx}$ ) of Y, by a sample from X from another collection of sequences, is defined by the formula:

$$C_{yx} = 1 - (N_{yx} / n)$$

where  $N_{yx}$  is the number of sequences in a sample of Y that are not found in a sample of X and  $n$  is the number of sequences in the sample of Y.  $N_y$  and  $N_{yx}$  were calculated for different levels of phylogenetic distance (D) to generate coverage curves  $C_y(D)$  and  $C_{yx}(D)$ . Differences between the homo- and heterologous coverage curves were determined by the Cramér-von Mises test [40] and compared by a Monte-Carlo test procedure [41]. The compared sample clones libraries were constructed following the same procedure: each was generated by pooling of libraries obtained from three independent amplifications. The two libraries comprised nearly the same number of clones (141 clones in one case against 143 in the other case). The CLUSTALW program [32] was used to create an alignment containing all of the sequences in the two libraries, and to calculate their phylogenetic distances (the sequences of all phylotypes were copied the same number of times that they occurred in the sample). Then, phylogenetic distances data were transferred to a program, written in Fortran, that calculated homo- and heterologous coverage curves [40] and compared these values [41] using the formula of Singleton [39] (for detail on the statistical method, please refer to this article). Because of the large variability of p-values with the seed of the random number generator used, the number of Monte-Carlo simulations was increased tenfold as per Singleton [39]. This assured stability of the p-values whatever the random number generator seed used, even though the coverage curves quickly approach 1 when phylogenetic distance increases.

### 3. RESULTS

#### 3.1. General microbial rDNA composition of the clone libraries from *Paralvinella palmiformis* mucus.

In this study, bacterial clone libraries were constructed from mucus secretions of *Paralvinella palmiformis* from CASM (T&S chimney) and ASHES (Hell chimney) vent fields, collected during the NeMO oceanographic cruise. Mucous cocoons were collected in areas of medium to high temperature where patches of *P. palmiformis* mixed to patches of *P. sulfincola*. The studied samples represent composition of bacterial assemblages associated with mucous cocoons of *P. palmiformis* from Juan de Fuca faunal assemblages of type II [14, 42].

All attempts to amplify archaeal 16S rDNA from these samples failed, whatever the approach used, while the same procedure applied to hydrothermal samples from hotter areas allowed a good amplification of archaeal 16S rDNAs. For this study, only bacterial 16S rDNA products were obtained. To represent for the best the bacterial diversity of the samples, the CASM and ASHES libraries were both constructed by the compilation of three clone libraries stemmed from three independent PCR amplifications and cloning experiments. A total of 141 insert-containing clones for the CASM library and of 143 for the ASHES one were screened by ARDRA using two restriction enzymes with tetra-nucleotide recognition sequences. As demonstrated by a precedent study [43], RFLP (and consequently ARDRA) patterns created by the use of tandem restriction endonucleases, with tetra-nucleotide recognition sequences, allow the detection of the wide majority of the taxa present in a library. The use of two restriction enzymes significantly decreases the probability to retrieve different sequences types within a given phylotype. For the CASM and the ASHES libraries, sixty-four and fifty-nine phlotypes (unique RFLP profiles, called OTUs) were respectively detected, thirty of which were shared by both libraries. The 16S rDNA of at least one representative of each phylotype was partially sequenced. It has been observed that micro-organisms displaying DNA-DNA hybridisation above 70%, and belonging therefore to the same species, share usually more than 97% 16S rRNA sequence similarity [44]. Consequently, sequences differing less than 3% were considered as related groups for phylogenetic analysis and only fifty-one 16S rDNA genes were completely sequenced. Chimeric sequences accounted for only 0.7% (n=1) of the CASM clone library and 1.4% (n=2) of the ASHES clone library. They were excluded from the phylogenetic analysis. Chimeras recombination sites (breakpoints) were detected. In other respects, the phylogenetic position of two sequences (*P. palm. C 70* and *P. palm. C*



72) of the CASM library, unlikely to be chimeras, was unresolved. BLAST analysis did not provide any evidence that these sequences were related to any other sequence. Highly-conserved regions characteristic of bacterial sequences were retrieved within these sequences. Almost the same phyla were represented in the populations from both vent fields. Sequences belonging to the  $\epsilon$ -*Proteobacteria*, the  $\delta$ -*Proteobacteria*, the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) group, the *Verrucomicrobia*, the Green non-sulfur bacteria, the *Fusobacteria* and the Firmicutes were detected in both libraries and few sequences belonging to the  $\gamma$ -*Proteobacteria* were moreover detected in the sample from ASHES.

### 3.2. Accumulation curves and statistical analysis

It is highly probable that the diversity in the samples might not be fully covered. However, the decrease in the rate of phylotype detection of accumulation curves (Fig. 1), indicated that the major part of the diversity in the libraries was detected.

The two clonal libraries were statistically analysed to determine if differences between the samples could have been detected. For statistical calculations, the CASM and ASHES libraries were respectively called X and Y, the homologous coverage of Y by a sample from Y was defined as  $C_y$  and the heterologous coverage of Y by a sample of X was defined as  $C_{yx}$ . To compare and determine if the ASHES and CASM libraries were significantly different, the heterologous coverage of the ASHES library by the CASM library ( $C_{yx}$ ) has been calculated. The ASHES clones were found to be significantly different from the CASM clones ( $P_{yx}=0.003$ ). More information on the nature of this difference was obtained by examination of the distribution of  $(C_y - C_{yx})^2$  as a function of the evolutionary distance D (Fig. 2). At low phylogenetic distance ( $D < 0.22$ ), the libraries differed. On the other hand, they shared many groups of deep relatedness. The typical 16S rRNA sequence difference between microbial divisions or phyla is 20 to 25% [45]. Based on this principle, we can conclude that the populations of CASM and ASHES differed at the species and genera levels but were comparable at high taxonomic level (phylum or division). Comparison of the p-values calculated for both libraries has demonstrated that the ASHES population was more diverse than the CASM one ( $P_{xy}=0.090$  and  $P_{yx}=0.003$ ).

### 3.3. Phylogenetic analysis of the bacterial assemblages.

Phylogenetic analysis of the Juan de Fuca samples clustered the phylotypes into twenty-six groups: six within the  $\epsilon$ -*Proteobacteria*, one within the  $\gamma$ -*Proteobacteria*, three within the  $\delta$ -*Proteobacteria*, five within the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group, five within the *Verrucomicrobia*, two within the Green non-sulfur bacteria, two within the *Fusobacteria* and two within the Firmicutes (Fig. 3 and 4). None of the phylotypes corresponded to published 16S rRNA sequences. Within both clone libraries, sequences distribution was approximately the same in terms of phyla and divisions. No sequence was affiliated with the deep-rooted branches *Thermotogales* and *Aquificales* (Fig. 4) of which all members are, to date, thermophiles or hyperthermophiles.

- **$\epsilon$ -*Proteobacteria*.** The majority of the sequences were assigned to the  $\epsilon$ -*Proteobacteria*, accounting for 55.3% of the CASM library and for 41.2% of the ASHES one (Fig. 3). Phylogenetic analysis clustered the sequences of  $\epsilon$ -*Proteobacteria* into six groups within which four (groups I, III, V and VI) have already been described for Atlantic and/or Southern-East Pacific hydrothermal vent sequences [4, 8]. 16S rRNA secondary structural features [8] characteristics of these four groups were retrieved in our clone sequences. The majority of the  $\epsilon$ -*Proteobacteria* were part of a new clade, the group IV, accounting for 37.6% of the CASM library and 36.4% of the ASHES one. These sequences differed from those of the other groups of  $\epsilon$ -*Proteobacteria* by the nucleotide signature GCGCGC at the beginning of the domain II of the 16S rRNA secondary structure (positions 575 to 480 of *Escherichia coli* 16S rRNA sequence numbering). Among this group, some sequences were closely related to the Mid-Atlantic Ridge sequence VC2.1-Bac1 identified from an *in situ* growth chamber deployed on an hydrothermal chimney (91–92% sequence similarity) (Table 1) [7]. Some other sequences were closely related to sequence NKB9 detected in cold seeps of the Nankai Trough (94 to 96% similarity). No sequences belonging to the Atlantic clone groups C or D (Atlantic clone group D corresponds to the South Pacific clone group I [4]) described by Corre *et al.* [8] were detected in our samples. Group II and III were related to 16S rRNA sequences associated with hydrothermal vent animals. In that way, group III sequences were related to the sequence of the ectosymbiont of *Rimicaris exoculata* (90-94% similarity) [6], a shrimp endemic to Atlantic and Indian oceans. Group II was distantly related to the sequence of one of the episymbiont of the East-Pacific polychaete *Alvinella pompejana* [3, 23].

- **Cytophaga–Flavobacterium–Bacteroides (CFB) group.** A significant part of the sequences accounting for 17.2% of the CASM library and for 27.3% of the ASHES library was assigned to the CFB (*Cytophaga–Flavobacterium–Bacteroides*) division (Fig. 4). All the sequences detected in this study could be assigned to five phylogenetic clades, the groups XI to XV. Within this CFB division, clone sequences were related to the *Cytophaga-Flavobacteria* cluster. CFB have already been detected from an Atlantic hydrothermal vent [7]. Clones of the group XIII, accounting respectively for 2.8% and for 7.7% of the CASM and ASHES libraries, were closely related (93% similarity) to the Atlantic clone VC2.1-Bac22. Most notably, the majority of the CFB sequences belonged to the group XIV and were distantly related (percent similarity below the approximate genus threshold value of 93%) to the marine species *Marinilabilia salmonicolor* [46] or to the Guaymas basin sediment clone SB-5 [47].
- **Verrucomicrobia.** Numerous sequences were assigned to five groups (groups XVI to XX) within the recently described division *Verrucomicrobia* [48] (Fig. 4). These sequences represented, respectively, 13.5% and 9.8% of the libraries from CASM and ASHES. All the sequences from this study were very distantly related to sequences of published strains and published environmental sequences (79 to 89% similarity).
- **Minor groups within the clone libraries: Firmicutes, Fusobacteria, Green non-sulfur bacteria (GNS), δ-Proteobacteria and γ-Proteobacteria.** Sequences belonging to other taxonomic groups and accounting for 0.7 to 7% of the libraries, were retrieved in the samples. They belonged to the Firmicutes, the *Fusobacteria*, the Green non-sulfur bacteria, the *δ-Proteobacteria* and the *γ-Proteobacteria* (for detail of their respective proportions, see Fig. 3-5). Several Firmicutes, *δ-Proteobacteria* and *γ-Proteobacteria* have been isolated from hydrothermal chimney samples [29, 49-50] and from the microflora associated with *Alvinella pompejana* [51-52]. One phylotype of group VII of *γ-Proteobacteria* was affiliated (91% sequence similarity) with the endosymbiont [18] of the Northeast Pacific vent vestimentifer *Ridgeia piscesae* inhabiting the same chimneys as *P. palmiformis*. In other respects, one sequence of group VIII of *δ-Proteobacteria* could be assigned to the genus *Desulfuromusa* (96% 16S rDNA similarity with *Desulfuromusa succinoxidans*). Members of this genus are obligate anaerobic, mesophilic, heterotrophic sulphur-reducing bacteria inhabiting Denmark Fjord mud and Guaymas basin sediments [53]. Clones of the Green non-sulfur bacterial group have distant

relatives in Guaymas sediments [47]. Finally, several sequences from the mucous cocoons of *P. palmiformis* were affiliated to *Fusobacteria*.

## 4. DISCUSSION

The mucous secretions of *Paralvinella palmiformis* were colonised by a highly diverse microflora. In the following sections we consider results from both samples in order to identify trends and highlight possible ecological significance.

### 4.1. Methodological considerations.

rDNA sequences are efficient molecular markers for phylogeny at genus and species level. Using molecular data to infer physiology and biogeochemical activity of microbes in the ecosystem is considerably more challenging. Physiological predictions based only on the phylogenetic position of a sequence must be made with caution. However, if a phylogenetic analysis places, with high bootstrap value, a sequence within a monophyletic group where all known organisms share a particular trait, then it is reasonable to propose that this trait occurs in the organism detected by its sequence.

Since only two *P. palmiformis* mucous samples were analysed, it is important to consider the representativeness of the data. The molecular phylogenetic approach followed in this study has inherent limitations. The extraction of nucleic acids from environmental samples can introduce biases through selective cell lysis efficiency and nucleic acid extraction quality. The extraction step can be sensitive to the presence of abundant polysaccharides and minerals in samples such as those extracted in this study. Measures employed here to reduce extraction bias included the use of both detergent-based and enzymatic cellular lysis, combining the products of repeated cell lyses treatments, the checking of lysis efficiency through microscopic examination and the purification step using cesium chloride density gradient centrifugation. Potential bias introduced during PCR amplification is more difficult to assess and control. Clone abundance in the library does not necessarily reflect rDNA sequence abundance in the nucleic acid extracts because saturation during the later cycles of amplifications can modify sequences ratios [54]. Biases can also be caused by primer selectivity and PCR-mediated chimeric gene amplification. Finally, the cloning step is also subject to bias.

In addition to methodological artifacts, the genomic properties of the natural microbial communities themselves constitute a source of bias [55]. It has been demonstrated that the quantities of PCR-generated

16S rDNA fragments are correlated to the genome size and the number of 16S rRNA genes (the number of 16S rDNA genes can vary for a strain from 1 to 14 copies) [55]. This level of genomic detail has not been documented in natural microbial communities. Finally, 16S rRNA genes operon microheterogeneity, and even macroheterogeneity, as reported for *Haloarcula marismortui* (5% difference between two expressed 16S rRNA genes) [56], can lead to a misinterpretation and an overestimation of community diversity. These genomic properties need to be taken into account when drawing conclusions from molecular ecological studies.

The sequence richness of the libraries developed in this study suggests that they were not subject to major methodological selectivity. Statistical analysis demonstrated that the CASM and ASHES sample libraries were significantly different. It seems probable that the most important ecological roles played by the microorganisms are conserved in both environments even if these roles are not played by exactly the same populations. If the two libraries had had a quantitatively similar molecular composition, this would have been evidence that the relationship between *P. palmiformis* and the bacterial lineages associated with its mucus secretions was obligatory, implying a symbiotic or a consortium relationship. Hypercomplex consortia composed of many taxonomic groups have already been described [47]. However, even if the two sampled bacterial populations had yielded similar clone libraries, it could not be concluded that their similarity was stable. In the present case, it seems probable that the bacterial community is not exclusively structured by biotic factors and notably by the relationship with the polychaete, but also by abiotic factors. Even if the two studied microbial communities were sampled from the same type of faunal assemblage, they both came from areas where physico-chemical conditions were variable. In this type of habitat, it is likely there are populations successions. The molecular approach used here theoretically allows the detection of slow growing or dormant micro-organisms, in addition to those whose growth and abundance were favoured by physico-chemical and biotic conditions that predominated at the time of sampling. The resulting clone libraries would therefore tend to reflect the absolute genetic diversity of the sampled populations, and not just quantitative dominance by particular organisms.

#### **4.2. Phylogenetic analysis of the bacterial assemblages and metabolic hypotheses.**

The libraries from the CASM and ASHES samples contained a very broad bacterial diversity both at high and low taxonomic levels (from phylum to infraspecific diversity). Most sequences from both libraries were

affiliated with the  $\epsilon$ -*Proteobacteria* subclass. The second and third most represented taxonomic groups were the *Cytophaga-Flavobacteria* and the *Verrucomicrobia* while remaining sequences were distributed among the Firmicutes, the *Fusobacteria*, the Green non-sulfur bacteria (GNS), the  $\delta$ - and the  $\gamma$ -*Proteobacteria*. In most cases, sequences were closely related to environmental sequences that were detected only by molecular methods. It seems reasonable to think that the three taxonomic groups represented by numerous sequences, i. e. the  $\epsilon$ -*Proteobacteria*, the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* and the *Verrucomicrobia*, play a significant role within this ecosystem.

- **$\epsilon$ -*Proteobacteria*.** The subclass  $\epsilon$ -*Proteobacteria* comprises a complex group of Gram-negative, microaerophilic and/or anaerobic, chemoorganoheterotrophic or chemolithotrophic bacteria that are found in a variety of habitats [57]. Many members of this subclass are eukaryotic pathogens. Although this group is very heterogeneous, microaerophily and sulphur metabolism are very common features. In all the deep-sea vent microbial communities studied to date,  $\epsilon$ -*Proteobacteria* phylotypes have been found to be dominant, accounting for 40 to 98% of the bacterial clone libraries [4-8]. This study expands the geographic distribution of the  $\epsilon$ -*Proteobacteria* to the deep-sea hydrothermal vents of the Juan de Fuca Ridge and increases the number of representative sequences. While the functional ecology of this dominant group has not been studied, there have been some measurements of RuBPCase (Ribulose Biphosphate Carboxylase) activity and labelled substrate uptake in samples of the episymbionts of *Alvinella pompejana*, where  $\epsilon$ -*Proteobacteria* predominate [58-59]. Contradictory results, some of which have never be reproduced, argue for overall heterotrophic or autotrophic metabolism (or perhaps mixotrophy) among the *A. pompejana*  $\epsilon$ -*Proteobacteria* [11, 58-59]. Several strains belonging to the Atlantic clone group D have been recently isolated from Guaymas hydrothermal chimney samples and from *Alvinella pompejana* samples (from tubes of polychaetes or episymbiont biomass) [57, 60]. These strains, referenced as *Caminibacter hydrogeniphilus* and strain Ex-18.2 (and strain Am-H not placed on the phylogenetic tree) grew chemolithoautotrophically using H<sub>2</sub>, formate or pyruvate as electron donor and sulphur or nitrate as terminal electron acceptor. The absence of representative of this group in our samples could be explained by the moderate thermophilic to thermophilic nature (Topt. 45-60 °C) characterising all the strains isolated to date. Physiological and metabolic inferences based only on the phylogenetic position must be made with caution, especially in a heterogeneous division such as the  $\epsilon$ -*Proteobacteria*. Nonetheless, considering the ubiquity and

prevalence of this group at deep-sea vents, it is reasonable to propose that at least some of the populations sampled here were chemolithoautotrophs that contributed new organic matter to the vent ecosystem.

- ***Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (CFB) group.*** The label CFB was originally used for *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* [61]. *Cytophaga-Flavobacteria* are mainly aerobic, although some microaerophilic, capnophilic or anaerobic strains are also classified within this group [62]. Known *Cytophaga-Flavobacteria* are all chemoorganoheterotrophs and especially proficient at degrading macromolecules such as protein, chitin, pectin, agar, starch and cellulose. These bacteria are ubiquitous, abundant in organic-rich habitats and probably play a major role in the turn-over of organic matter in nature [62].
- ***Verrucomicrobia.*** This is the first report of *Verrucomicrobia* from deep-sea hydrothermal vents. This division has few cultivated members and is represented by an ever-increasing number of environmental sequences from diverse habitats including forest and agricultural soils, marine deep-sea sediments, freshwater environments and the pelagic marine environment [45]. Some members of this division are prosthecate bacteria [63]. A remarkable feature is that all of the isolates from this division preferentially use sugars as substrates for growth [48].
- **Minor groups within the clone libraries: Firmicutes, *Fusobacteria*, Green non-sulfur bacteria (GNS),  $\delta$ -*Proteobacteria* and  $\gamma$ -*Proteobacteria*.** To our knowledge, this study is the first to attest the presence of representatives of the *Fusobacteria* and the Green non-sulphur taxonomic groups on hydrothermal edifices. Although heterotrophy is a very common feature within the Firmicutes phylum, the diversity of metabolic types among isolated strains makes it difficult to hypothesise about the metabolic properties of the sequences present in our samples. Similarly, while the  $\delta$ -*Proteobacteria* includes the sulphur-oxidising endosymbionts of vent and seep-associated metazoans [18], there are also many dissimilatory sulfate-reducing  $\delta$ -*Proteobacteria* and function cannot be inferred from phylogenetic data alone when environmental sequences have no close cultured relatives. The GNS bacteria, recognised in 1987 as a division-level group [64], are still poorly represented by sequences from cultured organisms even though the number of environmental sequences continues to increase [45]. The cultured GNS representatives isolated to date display a wide range of phenotypes making difficult any metabolic inference from phylogeny. Finally, several sequences from the mucous

secretions of *P. palmiformis* were affiliated with the *Fusobacteria*. Representative of this taxonomic group are obligately anaerobic mesophilic bacteria fermenting proteinaceous substrates.

Many of the detected sequences grouped robustly within assemblages of micro-organisms that all displayed heterotrophic properties. The second and the third most represented groups within the clone libraries, affiliated with the *Cytophaga-Flavobacteria* and the *Verrucomicrobia* groups, comprise exclusively organoheterotrophs capable of degrading proteinaceous or saccharidic substrates. As discussed above, the *Cytophaga-Flavobacteria* are known for their proficiency in degrading biomacromolecules. Members of these two groups, and perhaps some members of the minor lineages detected in the samples, are most probably decomposers involved in the degradation of mucus secretions and other organic debris that accumulates within the *P. palmiformis* microenvironment. The biochemical composition of the mucus of *P. palmiformis* has not been analysed. The organic portion (10% of total dry weight) of the mucus of a related species from Eastern Pacific vents, *P. grasslei*, was found to consist of 60% sugars and 40% proteins [65].

#### **4.3. Possible implication of bacteria in the detoxification of the ecological niche of *P. palmiformis*.**

The ecological niche of *P. palmiformis* is submitted to a constant rain of mineral particles and to toxic gases, calling for special adaptations. The mucus secreted continually by this worm is one of these adaptive responses. Mucus secretions play several roles: (i) they protect the epidermis of the worm from mineral particles and predation; (ii) they detoxify the direct environment of the animal by trapping some mineral particles like iron sulphur, copper sulphur, zinc sulphur and by concentrating trace elements such as uranium; (iii) they would perhaps act also as a transport system for toxic particles absorbed by the worm [25]. The mucus secreted by the animals is colonised by bacteria. As demonstrated by this study, this colonising microflora is genetically widely diverse. There is evidence that some bacteria detected in the mucus samples detoxify the environment by using some mineral particles as electron donors or acceptors for their metabolism. Thermodynamic models indicate that mixing environments, like the ecological niche of *P. palmiformis*, are favourable for chemosynthetic reactions of sulphide oxidation below 38 °C [66]. Moreover, the oxidation of sulphide and elemental sulphur are widely accepted as the principal chemosynthetic reactions leading to production of primary biomass in ridge ecosystems [66-67]. Consequently, it is highly probable that sulphide-oxidisers occur within the microbial communities



associated to the worm. Among the three major taxonomic groups detected are the  $\epsilon$ -*Proteobacteria* the unique taxonomic group, to date, with representatives involved in sulphur cycling. Among the cultivated  $\epsilon$ -*Proteobacteria* from diverse habitats occur sulphur-reducers as well as sulphide-oxidisers. Hydrogen sulphide is notably oxidised by the marine species of the genera *Arcobacter* and *Thiovulum* [68]. Our environmental sequences are distantly related to these species and it is presently impossible to infer that an organism with a given sequence belongs without doubt to a sulphide-oxidising group. However, there is evidence that some  $\epsilon$ -*Proteobacteria* from deep-sea vents are involved in sulphur cycling. This hypothesis is supported by the isolation from this ecosystem of strains which are all sulphur-reducers [57, 60] and by the white sulphur-like coloration of some uncultured  $\epsilon$ -*Proteobacteria* [4]. Further investigations will be necessary to identify the metabolic capabilities of the micro-organisms detected by their sole sequence and to determine whether or not some are sulphide-oxidisers. On the other hand, some sequences could be assigned to bacterial groups in which detoxifying activities bacterial are common features. It is quite possible that sequences of group XXIII related to the *Fusobacteria* species *Propionigenium maris* (93% similarity) would be involved in detoxification phenomenon. It has been demonstrated that two strains of this species, isolated from marine hemichordate and polychaete burrows, were able to detoxify the environment of these animals by debrominating the bromoaromatic compounds produced by these animals [69].

#### **4. 4. Conclusion.**

The bacterial assemblages associated with the mucous secretions of *Paralvinella palmiformis* were mainly composed of  $\epsilon$ -*Proteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria* and *Verrucomicrobia* and to a lesser extent of *Fusobacteria*, Firmicutes,  $\delta$ -*Proteobacteria*,  $\gamma$ -*Proteobacteria* and Green non-sulfur bacteria. The presence of *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria* and Green non-sulfur bacteria is a first-time report for the hydrothermal vent ecosystem. Although metabolic characteristics cannot be assumed from phylogeny, when a sequence groups robustly within a group of organisms sharing identical properties, physiology can be cautiously inferred. A specialised heterotrophic microflora, including bacteria of the groups *Cytophaga-Flavobacteria* and *Verrucomicrobia*, may be decomposing the mucus secretions and other organic debris in the *Paralvinella palmiformis* habitat. As well, we hypothesise that some of the  $\epsilon$ -*Proteobacteria* sequences identified in the two samples represent sulphide oxidising primary producers.

**Note.** While this paper was under review, the presence of  $\epsilon$ -,  $\delta$ -,  $\gamma$ -,  $\alpha$ -*Proteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* and *Verrucomicrobia* was reported from a molecular survey of the bacterial diversity of the East-Pacific Rise giant vent tubeworm *Riftia pachyptila* [70].

## ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the officers and crew of the R/V *Brown* and the ROV *Ropos* operations team. We are grateful to Dr. Whitman and Dr. Singleton for their helpful informations about their statistical program. We also thank Didier Flament, Josiane Le Bars, Françoise Lesongeur, Patricia Pignet, and others in the MBE team for laboratory support. This work was supported by Ifremer, Programme Dorsales, Région Bretagne and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

## REFERENCES

- [1] Jeannot, C. (2000). Molecular ecology of hydrothermal vent microbial communities. *Antonie van Leeuwenhoek* 77, 117-133.
- [2] Quérellou, J., Alain, K., Cambon-Bonavita, M.-A. (2001). Thermophiles from deep-sea hydrothermal vents. *Vie Milieu* 51, 161-172.
- [3] Haddad, A., Camacho, F., Durand, P. and Cary, S. C. (1995). Phylogenetic association of the epibiotic bacteria associated with the hydrothermal vent polychaete *Alvinella pompejana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1679-1687.
- [4] Longnecker, K. and Reysenbach, A. L. (2001). Expansion of the geographic distribution of a novel lineage of  $\epsilon$ -*Proteobacteria* to a hydrothermal vent site on the Southern East Pacific Rise. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35, 287-293.
- [5] Moyer, C. L., Dobbs, F. C. and Karl, D. M. (1995). Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1555-1562.
- [6] Polz, M. F. and Cavanaugh, C. M. (1995). Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7232-7236.

- [7] Reysenbach, A. L., Longnecker, K. and Kirshtein, J. (2000). Novel bacterial and archaeal lineages from an *in situ* growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3798-3806.
- [8] Corre, E., Reysenbach, A.-L. and Prieur, D. (2001).  $\epsilon$ -Proteobacterial diversity from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. *FEMS Microbiol. Let.* 205, 329-335.
- [9] Desbruyères, D., Gaill, F., Laubier, L. and Fouquet, Y. (1985). Polychaetous annelids from hydrothermal vent ecosystems: an ecological overview. *Biol. Soc. Wash. Bull.* 6, 103-116.
- [10] Desbruyères, D. and Ségonzac, M. (1997). Handbook of deep-sea hydrothermal vent fauna (Desbruyères, D. and Ségonzac, M., Eds.), pp 1-279. IFREMER editions, Plouzané.
- [11] Desbruyères, D., Chevalloné, P., Alayse, A. -M., Jollivet, D., Lallier, F. H., Jouin-Toulmond, C., Zal, F., Sarradin, P. -M., Cosson, R., Caprais, J. -C., Arndt, C., O'Brien, J., Guezennec, J., Hourdez, S., Riso, R., Gaill, F., Laubier, L., Toulmond, A. (1998). Biology and ecology of the "Pompeii worm" (*Alvinella pompejana* Desbruyères and Laubier), a normal dweller of an extreme deep-sea environment: a synthesis of current knowledge and recent developments. *Deep-sea Res Part II* 45, 383-422.
- [12] Tunnicliffe, V., McArthur, A. G. and McHugh, D. (1998). A biogeographical perspective of the deep-sea hydrothermal vent fauna. *Adv. Mar. Biol.* 34, 353-426.
- [13] Desbruyères, D., Biscoito, M., Caprais, J. -C., Colaço, A., Comtet, T., Crassous, P., Fouquet, Y., Khripounoff, A., Le Bris, N., Olu, K., Riso, R., Sarradin, P. -M., Segonzac, M., Vangriesheim, A. (2001). Variations in deep-sea hydrothermal vent communities on the mid-Atlantic ridge near the Azores plateau. *Deep-sea Res. Part I* 48, 1325-1346.
- [14] Sarrazin, J., Robigou, V., Juniper, K. M., 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. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 153, 5-24.
- [15] Cavanaugh, C. M. (1985). Symbiosis of chemoautotrophic bacteria and marine invertebrates from hydrothermal vents and reducing sediments. *Bull. Biol. Soc. Wash.* 6, 373-388.
- [16] Distel, D. L., Lane, D. J., Olsen, G. J., Giovannoni, S. J., Pace, B., Pace, N. R., Stahl, D. A. and Felbeck, H. (1988). Sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts: analysis of phylogeny and specificity by 16S rRNA sequences. *J. Bacteriol.* 170, 2506-2510.

- [17] Felbeck, H. and Childress, J. J. (1988). *Riftia pachyptila*: a highly integrated symbiosis. *Oceanol. Acta* 8, 131-138.
- [18] Feldman, R. A., Black, M. B., Cary, C. S., Lutz, R. A. and Vrijenhoek, R. C. (1997). Molecular phylogenetics of bacterial endosymbionts and their vestimentiferan hosts. *Mol. Marine Biol. Biotechnol.* 6), 268-277.
- [19] Desbruyères, D. and Laubier, L. (1986). Les *Alvinellidae*, une famille nouvelle d'annélides polychètes inféodées aux sources hydrothermales sous-marines: systématique, biologie et écologie. *Can. J. Zool.* 64, 2227-2245.
- [20] Tunnicliffe, V., Desbruyères, D., Jolivet, D. and Laubier, L. (1993). Systematic and ecological characteristics of *Paralvinella sulfincola* Desbruyères and Laubier, a new polychaete (family *Alvinellidae*) from northeast Pacific hydrothermal vents. *Can. J. Zool.* 71, 286-297.
- [21] Juniper, S. K. (1994). Ecology and biogeochemistry of *Paralvinella sulfincola* at Northeast Pacific hydrothermal vents: review and comparison with *Alvinella* spp. of the East Pacific rise. In J. -C. Dauvin, Laubier, L. & Reish, D.H. (eds), Actes de la 4<sup>e</sup> conférence internationale des polychètes. *Mem. Mus. Natl. Hist. Nat.* 162, 453-462. Paris.
- [22] Desbruyères, D. and Laubier, L. (1980). *Alvinella pompejana* gen. sp. nov., aberrant Ampharetidae From east pacific rise hydrothermal vents. *Oceanol. Acta* 3, 267-274.
- [23] Cary, S. C., Cottrell, M. T., Stein, J. L., Camacho, F. and Desbruyères, D. (1997). Molecular identification and localization of filamentous symbiotic bacteria associated with the hydrothermal vent annelid *Alvinella pompejana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1124-1130.
- [24] Juniper, S. K., Jonasson, I.R., Tunnicliffe, V. and Southward, A. (1992). Influence of a tube-building polychaete on hydrothermal chimney mineralization. *Geology* 20, 895-898.
- [25] Juniper, K. (1988). Géochimie et écologie d'un microenvironnement hydrothermal: les sécrétions de mucus de *Paralvinella palmiformis*. *Oceanol. Acta* n° sp., 167-172.
- [26] Juniper, S. K., Cambon, M. -A., Lesongeur, F. and Barbier, G. (2001). Extraction and purification of DNA from organic rich subsurface sediments (ODP Leg 169S). *Marine Geol.* 174, 241-247.
- [27] Leff, L. G., Dana, J. R., McArthur, J. V. and Shimkets, L. J. (1995). Comparisons of methods of DNA extraction from stream sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1141-1143.

- [28] Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5467-5473.
- [29] Raguénès, G., Pignet, P., Gauthier, G., Peres, A., Christen, R., Rougeaux, H., Barbier, G. & Guezennec, J. (1997). Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 67-73.
- [30] Maidak, B. L., Cole, J. R., Lilburn, T. G., Parker, C. T., Saxman, P. R., Stredwick, J. M., Garrity, G. M., Li, B., Olsen, G. J., Pramanik, S., Schmidt, T. M. and Tiedje, J. M. (2000). The RDP (Ribosomal Database Project) continues. *Nucleic Acids Res.* 28, 173-174.
- [31] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- [32] Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- [33] Galtier, N., Gouy, M. and Gautier, C. (1996). SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *CABIOS* 12, 543-548.
- [34] Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- [35] Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17, 368-376.
- [36] Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 30, 783-791.
- [37] Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *J. Mol. Evol.* 16, 111-120.
- [38] Good, I. J. (1953). The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40, 237-264.
- [39] Singleton, D. R., Furlong, M. A., Rathbun, S. L. and Whitman, W. B. (2001). Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4374-4376.

- [40] Pettitt, A. N. (1982). Cramér-von Mises statistic, p. 220-221. *In* S. Kotz and N. L. Johnson (Ed.), encyclopedia of statistical sciences. Wiley-Interscience, New-york, N. Y.
- [41] Hope, A. C. A. (1968). A simplified Monte Carlo significance test procedure. *J. Royal Statist. Soc. B*, 30, 582-598.
- [42] Sarrazin, J. and Juniper, S. K. (1999). Biological characteristics of a hydrothermal edifice mosaic community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 185, 1-19.
- [43] Moyer, C. L., Dobbs, F. C. and Karl, D. M. (1994). Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 871-879.
- [44] Rossello-Mora, R. and Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 39-67.
- [45] Hugenholtz, P., Goebel, B. M. and Pace, N. R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180, 4765-4774.
- [46] Nakagawa, Y. and Yamamoto, S. (1996). Emendation of the genus *Cytophaga* and transfer of *Cytophaga agarovorans* and *Cytophaga salmonicolor* to *Marinilabilia* gen. nov.: phylogenetic analysis of the *Flavobacterium-Cytophaga* complex. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 599-603.
- [47] Phelps, C. D., Kerkhof, L. J. and Young, L. Y. (1998). Molecular characterization of a sulfate-reducing consortium which mineralizes benzene. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27, 269-279.
- [48] Hedlund, B. P., Gosink, J. J. and Stanley, J. T. (1997). Verrucomicrobia div. nov., a new division of the Bacteria containing three new species of *Prostheco bacter*. *Antonie van Leeuwenhoek* 72, 29-38.
- [49] Wery, N., Moricet, J.M., Cueff, V., Jean, J., Pignet, P., Lesongeur, F., Cambon-Bonavita, M.A. & Barbier, G. (2001). *Caloranaerobacter azorensis* gen. nov., sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1789-1796.
- [50] Miroshnichenko, M. L., Rainey, F. A., Rhode, M. and Bonch-Osmolovskaya, E. A. (1999). *Hippea maritima* gen. nov., sp. nov., a new genus of thermophilic, sulfur-reducing bacterium from submarine hot vents. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1033-1038.

- [51] Raguénès, G., Christen, R., Guézennec, J., Pignet, P. & Barbier, G. (1997). *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 989-995.
- [52] Alain, K., Pignet, P., Zbinden, M., Quillévéré, M., Duchiron, F., Donval, J.-P., Lesongeur, F., Raguénès, G., Crassous, P., Quérellou, J. and Cambon-Bonavita, M.-A. (2002). *Caminicella sporogenes*, gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic spore-forming bacterium isolated from an East-pacific rise hydrothermal vent. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (in press).
- [53] Lieasck, W. and Finster, K. (1994). Phylogenetic analysis of five strains of Gram-negative, obligately anaerobic, sulfur-reducing bacteria and description of *Desulfuromusa* gen. nov., including *Desulfuromusa kysingii* sp. nov., *Desulfuromusa bakii* sp. nov., and *Desulfuromusa succinoxidans* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 44, 753-758.
- [54] Suzuki, M. T. and Giovanonni, S. J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 62, 625-630.
- [55] Farrelly, V., Rainey, F. A. and Stackebrandt, E. (1995). Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. Appl. Environ. Microbiol. 61, 2798-2801.
- [56] Amann, G., Stetter, K. O., Llobet-Brossa, E., Amann, R. and Anton, J. (2000). Direct proof for the presence and expression of two 5% different 16S rRNA genes in individual cells of *Haloarcula marismortui*. Extremophiles 4, 373-376.
- [57] Alain, K., Quérellou, J., Lesongeur, F., Pignet, P., Crassous, P., Raguénès, G., Cuffe, V. and Cambon-Bonavita, M.A. (2002). *Caminibacter hydrogeniphilus*, gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic hydrogen-oxidising bacterium isolated from an East-Pacific rise hydrothermal vent. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 1317-1323.
- [58] Tuttle, J. H. (1985). The role of sulfur-oxidizing bacteria at deep-sea hydrothermal vents. Biol. Soc. Wash. Bull. 6, 335-343.
- [59] Alayse-Danet, A.M., Gaill, F. and Desbruyères, D. (1986). *In situ* bicarbonate uptake by bacteria-*Alvinella* associations. Mar. Ecol. 7, 233-240.
- [60] Campbell, B. J., Jeanthon, C., Kostka, J. E., Luther III, G. W. and Cary, C. (2001). Growth and phylogenetic properties of novel bacteria belonging to the epsilon subdivision of the *Proteobacteria*

enriched from *Alvinella pompejana* and deep-sea hydrothermal vents. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4566-4572.

[61] Olsen, G. J., Woese, C. R. and Overbeek, R. (1994). The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.* 176, 1-6.

[62] Reichenbach, H. (1992). The order Cytophagales. *In: The prokaryotes* (Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H., Eds.), vol. IV, chapter 199 pp. 3631-3675. Springer-Verlag New York, Inc.

[63] Schlesner, H. (1992). The genus *Verrucomicrobium*. *In: The prokaryotes* (Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H., Eds.), vol. IV, chapter 210 pp. 3806-3808. Springer-Verlag New York, Inc.

[64] Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271.

[65] Talmont, F. and Fournet, B. (1990). Chemical composition of mucins from deep-sea hydrothermal vent tubicolous annelids worms. *Comp. Biochem. Physiol.* 96B, 753-759.

[66] Mc Collom, T. M. and Shock, E. L. (1997). Geochemical constraints on chemolithoautotrophic metabolism by microorganisms in seafloor hydrothermal systems. *Geochim. Cosmochim. Acta* 61, 4375-4391.

[67] Jannasch, H. W. and Mottl, J. O. (1985). Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents. *Science* 229, 717-725.

[68] Wirsen, C. O., Sievert, S. M., Cavanaugh, C. M., Molyneaux, S. J., Ahmad, A., Taylor, L. T., DeLong, E. F. and Taylor, C. D. (2002). Characterization of an autotrophic sulfide-oxidizing marine *Arcobacter* sp. that produces filamentous sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 316-325.

[69] Watson, J. W., Matsui, G. Y., Leaphart, A., Wiegel, J., Rainey, F. A. and Lovell, C. R. (2000). Reductively debrominating strains of *Propionigenium maris* from burrows of bromophenol-producing marine infauna. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1035-1042.

[70] López-García, P., Gaill, F. and Moreira, D. (2002). Wide bacterial diversity associated with tubes of the vent worm *Riftia pachyptila*. *Environ. Microbiol.* 4, 204-215.



## Figures and tables

**Table 1.** Distribution and phylogenetic affiliations of bacterial 16S rDNA sequences associated with mucus secretions of *Paralvinella palmiformis* from Axial Volcano (CASM and ASHES), Juan de Fuca.

**Fig. 1. Accumulation curves of the diversity detected in the two bacterial clone libraries.** Accumulation curves (CASM ( $\sigma$ ) and ASHES ( $\lambda$ ) vent fields) represent the sequential detection of cumulative phylotypes following ARDRA patterns (determined after digestion with two restriction endonucleases) after grouping of phylotypes with sequences sharing more than 97% similarity (sequences differing less than 3% were considered as related groups for phylogenetic analysis, and this criterion was used for the accumulation curves. Thus grouped, the number of phylotypes decreased from 59 to 43 for CASM and from 59 to 46 for ASHES).

**Fig. 2. Statistical comparisons of the CASM and ASHES libraries.** X and Y are the 16S rRNA gene sequence libraries from CASM and ASHES, respectively. Homologous Cy and heterologous Cyx coverage curves were calculated. Coverage curves versus phylogenetic distance (D) are plotted with the following symbols : squares ( $\nu$ ) for Cy(D) and triangles ( $\sigma$ ) for Cyx(D). The grey line ( $\lambda$ ) indicates the value of  $(\text{Cy} - \text{Cyx})^2$  at each value of phylogenetic distance. The phylogenetic distance D was calculated using the clustalW program of GCG [32].

**Fig. 3. Phylogenetic position and relative representation of *Proteobacteria* 16S rDNA sequences from the CASM and ASHES bacterial clone libraries.** The tree topology shown was developed by the neighbor-joining method, using *Bacillus subtilis* as the outgroup. 16S rRNA reference sequences were obtained from GenBank (accession numbers are indicated in the figure). The letters C (CASM) and A (ASHES) within clone names refer to sample origin. For the analysis, 984 sites were used, with 500 bootstrap replicates. Scale bar indicates the expected number of changes per sequence position. The figure on the right represents the relative proportion of each group of clones as a percentage of the total clones in each library.

**Fig. 4. Phylogenetic position and relative representation of bacterial 16S rDNA sequences (without the *Proteobacteria*) from the CASM and ASHES bacterial clone libraries.** The tree topology shown was obtained by the neighbor-joining method, using *Methanococcus vulcanus* as outgroup. 16S rRNA reference sequences were obtained from GenBank (accession numbers are indicated in the figure). The letters C (CASM) and A (ASHES) within clone names refer to sample origin. For the analysis, 1049 sites were used, with 500 bootstrap replicates. Scale bar indicates the expected number of changes per sequence position. The figure on the right represents the relative proportion of each group of clones as a percentage of the total clones in each library.

Table 1

Phylogenetic affiliation	Type sequence	Accession number	Clone number in CASM library	Clone number in ASHES library	Closest relative in the phylogenetic tree	Sequence similarity*
<b><i>ε-Proteobacteria</i></b>						
Group I	<i>P. palm.</i> C 43	AJ441198	2	0	Atlantic clone VC1.2-CI26	94 %
	<i>P. palm.</i> C/A 78	AJ441199	2	2	Pele's vent clone PVB OTU6	93 %
	<b><i>P. palm.</i> C</b>	AJ441200	2	0	Atlantic clone VC1.2-CI26	90 %
		AJ4412	3	0	Atlantic clone VC1.2-CI26	89 %
Group II			3	0	<i>Alvinella pompejana</i> APG44B	88 %
Group III	<b>92</b>		3	2	<i>Rimicaris</i> ectosymbiont	94 %
		01AJ44	1	0	<i>Rimicaris</i> ectosymbiont	90 %
Group IV	<i>P. palm.</i> C 73		14	12	Deep-sea sediment clone NKB9	95 %
	<i>P. palm.</i> C 140	1202	3	4	Deep-sea sediment clone NKB9	94 %
	<i>P. palm.</i> C/A 13		13	7	Deep-sea sediment clone NKB9	96 %
	<i>P. palm.</i> C 84		17	19	Deep-sea sediment clone BD2-1	96 %
	<i>P. palm.</i> C/A 114	AJ4412	1	5	Deep-sea sediment clone NKB9	94 %
	<i>P. palm.</i> C/A 113		2	4	Atlantic clone VC2.1-Bac1	91 %
	<i>P. palm.</i> C/A 18		3	1	Atlantic clone VC2.1-Bac1	92 %
Group V	<i>P. palm.</i> C/A 55	03	2	1	Atlantic clone VC1.2-CI10	95 %
	<i>P. palm.</i> C/A 64		1	1	Atlantic clone VC1.2-CI10	91 %
Group VI	<i>P. palm.</i> C/A 220	AJ4412	6	1	Guaymas strain Ex-18.1	90 %
<b><i>γ-Proteobacteria</i></b>	<i>P. palm.</i> C/A 89		0	1	<i>Ridgeia piscesae</i> endosymbiont	91 %
Group VII	<i>P. palm.</i> C/A 138		0	1		
<b><i>δ-Proteobacteria</i></b>	<i>P. palm.</i> C/A 26	04AJ44	1	1	<i>Desulfuromusa succinoxidans</i>	96 %
Group VIII	<i>P. palm.</i> C/A 39		0	5	<i>Desulfonema magnum</i>	85 %
Group IX		1205	0	1	<i>Geobacter brementis</i>	83 %
Group X	<i>P. palm.</i> A 79		0	1		
<b>CFB</b>						
Group XI	<i>P. palm.</i> C/A 79	AJ4412	0	2	<b>Flexibacter flexilis</b>	82 %
Group XII	<i>P. palm.</i> A 205		1	1		82 %
Group XIII	<i>P. palm.</i> A 229		4	11		93 %
Group XIV		06	1	7	<b>Cellulophaga lytica</b>	86 %
	<i>P. palm.</i> A 21		4	3		86 %
	<i>P. palm.</i> C/A 100	AJ4412	1	1	Atlantic clone VC2.1-Bac22	86 %
	<i>P. palm.</i> C/A 20		1	0	<b>Marinilabilia</b>	86 %
	<i>P. palm.</i> C/A 221		12	9		85 %
	<i>P. palm.</i> C/A 42	07	0	1		87 %
	<i>P. palm.</i> A/C 22		0	2	<b>salmonicolor</b>	87 %
	<i>P. palm.</i> C 67		0	1		90 %
	<i>P. palm.</i> C/A 33	AJ4412	0	1		87 %
Group XV	<i>P. palm.</i> A 53		1	0	<i>Marinilabilia salmonicolor</i>	
Verrucomicrobia	<i>P. palm.</i> A 10	08	0	3	Guaymas sediment clone SB-5	86 %
	<i>P. palm.</i> A 249		8	5	Guaymas sediment clone SB-5	82 %
	<i>P. palm.</i> A 12		0	1	Guaymas sediment clone SB-5	79 %
Group XVI	<i>P. palm.</i> C 85	AJ4412	1	0	Guaymas sediment clone SB-5	86 %
	<i>P. palm.</i> A 54		2	0	Guaymas sediment clone SB-5	80 %
Group XVII	<i>P. palm.</i> C/A 139	09	2	2	Guaymas sediment clone SB-5	81 %
Group XVIII	<i>P. palm.</i> A 228		5	1	Yellowstone clone OPB56	81 %
	<i>P. palm.</i> C 136		0	2	<b>Verrucomicrobium spinosum</b>	89 %
Group XIX	<i>P. palm.</i> C 41	AJ4412	0	2		86 %
Group XX	<i>P. palm.</i> A/C 285		1	0	<b>Verrucomicrobium spinosum</b>	88 %
	<i>P. palm.</i> C/A 24	10	1	5	<b>Verrucomicrobium spinosum</b>	79 %
	<i>P. palm.</i> A 24		0	1	<b>Verrucomicrobium spinosum</b>	82 %
<b>Green non-sulfur</b>						
	<i>P. palm.</i> C 37	AJ4412	2	2	Deep-sea sediment clone	93 %
	<i>P. palm.</i> C/A 25		0	6		82 %
	<i>P. palm.</i> A 17	11AJ44	5	4		
Group XXI			5	3	BD2-18	83 %
Group XXII	<i>P. palm.</i> C/A 63	1212	5	3		86 %
	<i>P. palm.</i> A 11		2	0	Deep-sea sediment clone	
Fusobacteria	<i>P. palm.</i> C/A 51		2	0		

Group XXIII Group XXIV <b>Firmicutes</b> Group XXV Group XXVI <b>Unresolved</b>  <b>Chimeras</b>	<i>P. palm. C/A 17</i>  <i>P. palm. C 70</i> <i>P. palm. C 72</i>	AJ4412 13AJ44 1214  AJ441234  AJ441215 AJ441235 AJ441236  AJ441237 AJ441216 AJ441217 AJ441218 AJ441219 AJ441238 AJ441220 AJ441221 AJ441239 AJ441240 AJ441241 AJ441242  AJ441222 AJ441243 AJ441223 AJ441244 AJ441224  AJ441225  AJ441245  AJ441226  AJ441246  AJ441227 AJ441228 AJ441247  AJ441229 AJ441248  AJ441230 AJ441231  AJ441232 AJ441233	1	2	BD2-18  Deep-sea sediment clone  BD2-3  Deep-sea sediment clone  BD2-3  Deep-sea sediment clone  BD2-3  Deep-sea sediment clone  BD2-3  Guaymas sediment clone  SB-34  Guaymas sediment clone  SB-34  Guaymas sediment clone  SB-34  <i>Propionigenium maris</i>  <i>Propionigenium maris</i>  <i>Syntrophomonas wolfei</i>  <i>Clostridium litorale</i>	
---	--	--	---	---	--	--

Figure 1

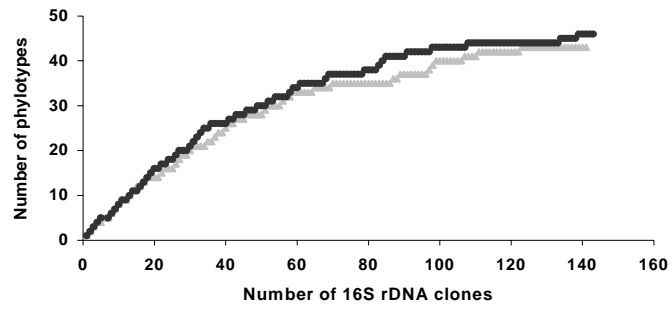
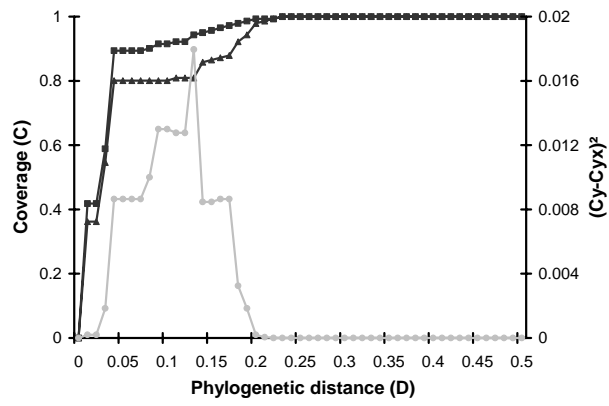
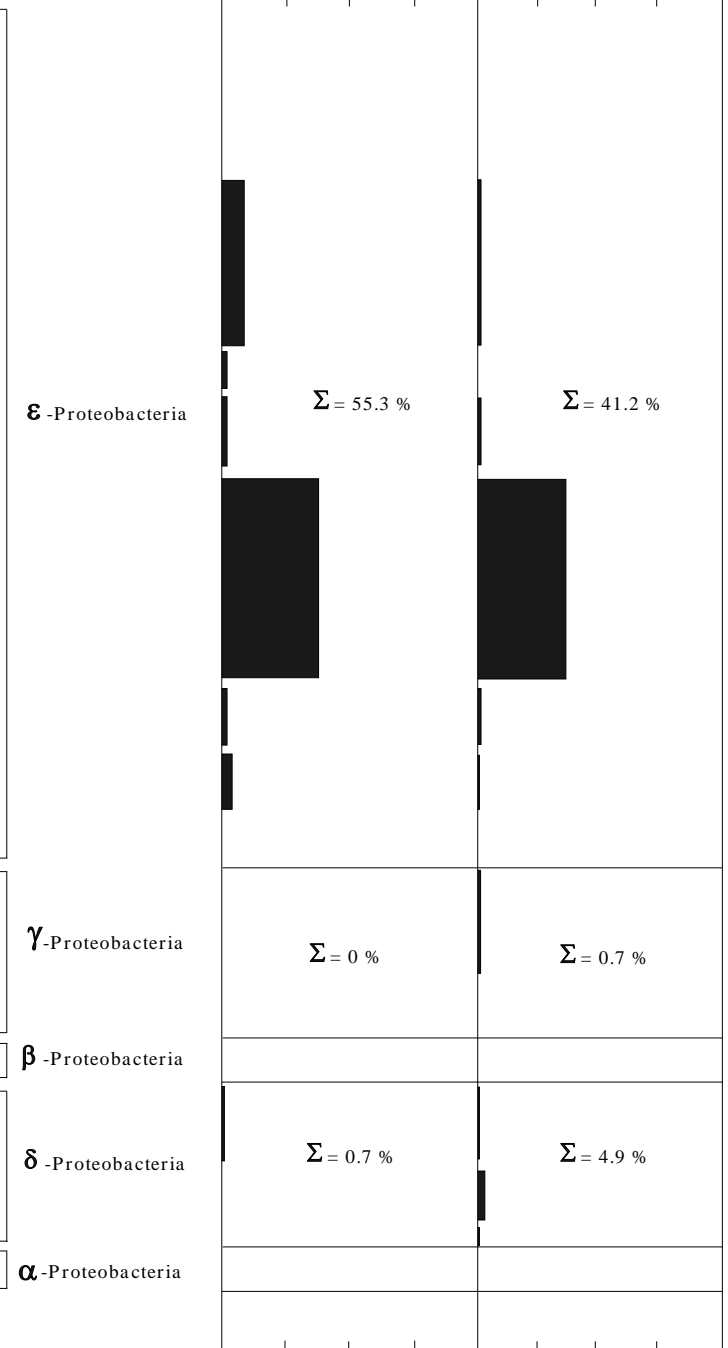
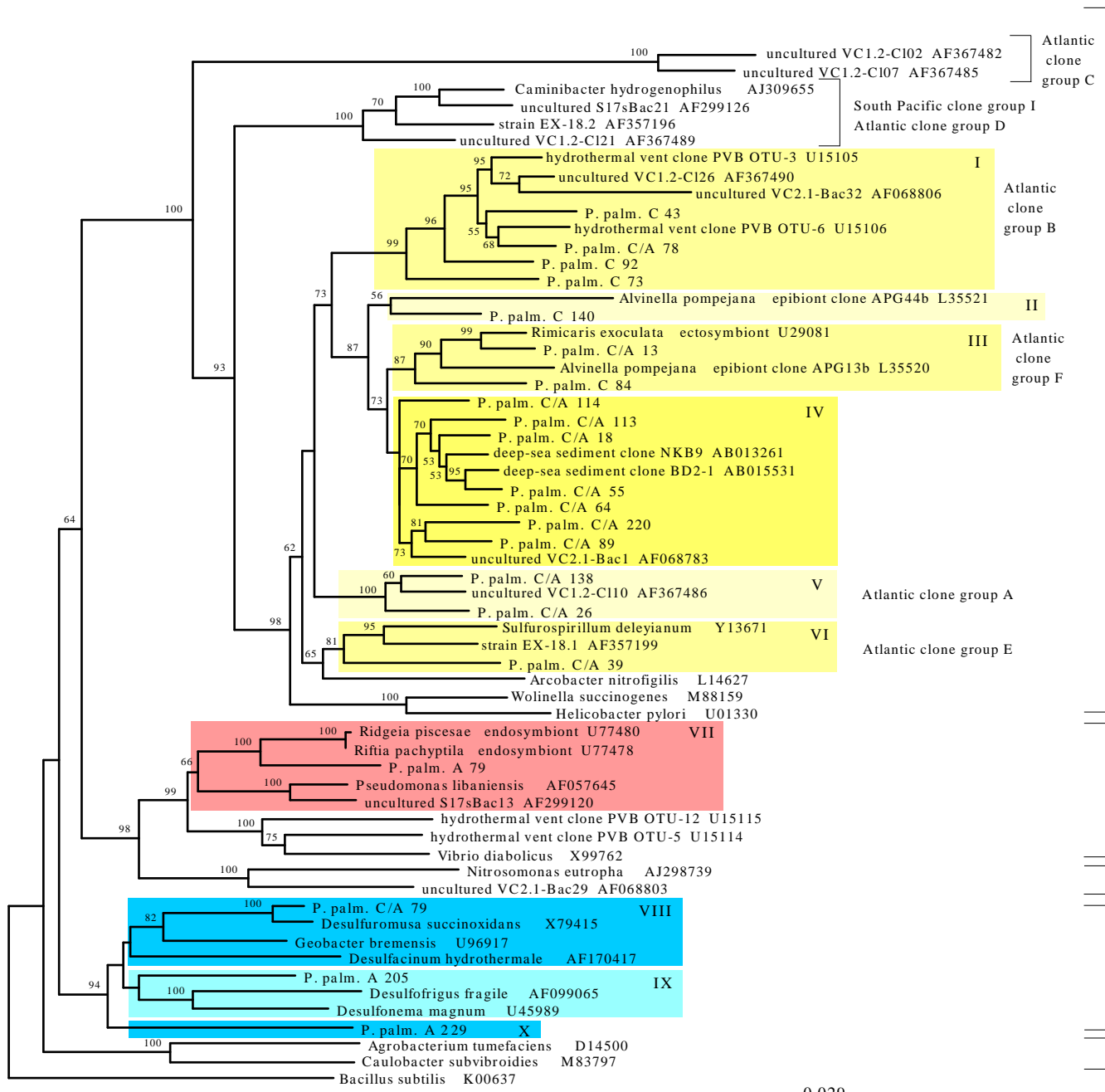
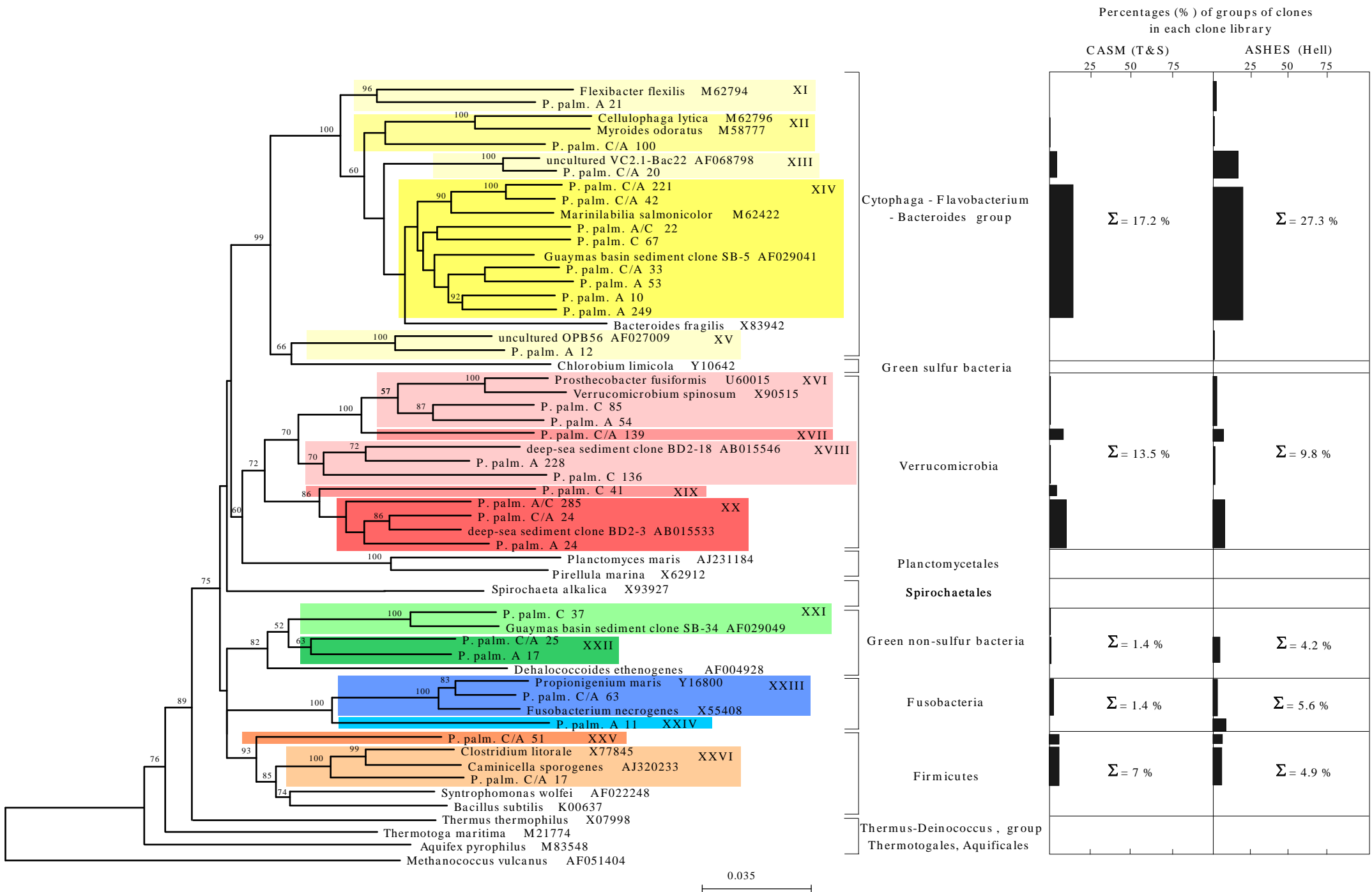


Figure 2







## I.2. Caractérisation phylogénétique de l'assemblage microbien associé au tube de *Paralvinella pandorae*.

Un travail identique à celui qui a été effectué à partir des cocons muqueux de *P. palmiformis* a été réalisé sur un échantillon de tube de *P. pandorae pandorae*, collecté également lors de la campagne océanographique NeMO. L'échantillonnage a été réalisé sur la cheminée T&S du champ hydrothermal CASM, au niveau de la dorsale Juan de Fuca. La faune de la cheminée T&S était essentiellement composée d'alvinelles appartenant aux espèces *P. sulfincola* et *P. palmiformis* (l'analyse de la microflore d'un cocon muqueux prélevé sur cette même cheminée a fait l'objet de l'étude précédente), de patelles et de vestimentifères. Le tube de *P. pandorae* qui a été étudié était attaché à un tube du vestimentifère *Ridgeia piscesae*.

L'extraction des acides nucléiques, la construction des banques de clones d'ADNr 16S ainsi que leur analyse ont été réalisées selon la procédure décrite précédemment (Alain *et al.*, 2002b). Malgré les nombreux essais faits dans différentes conditions avec des amorces universelles archéennes, seules des amplifications d'ADNr 16S bactériens ont pu être obtenues. Ces produits d'amplification ont été séparés par clonage. Une librairie de clones a ensuite été construite en assemblant 3 librairies de clones construites à partir de 3 produits d'amplification différents et de clonages indépendants. Un total de 142 inserts d'ADNr 16S de taille attendue ont pu être obtenus. Ils ont été classés en phylotypes par ARDRA en utilisant les endonucléases *HhaI* et *RsaI*. 53 profils de restriction différents ont été obtenus et au moins un ADNr 16S de chaque groupe a été entièrement séquencé. Etant donné que les micro-organismes appartenant à la même espèce présentent en général des pourcentages de similitudes d'ADNr 16S supérieurs à 97% (Rossello-Mora et Amann, 2000), les séquences présentant moins de 3% de différence ont été regroupées. 3 chimères ont pu être détectées et ont été exclues des analyses phylogénétiques. Par conséquent, suite à une analyse phylogénétique préliminaire, un total de 33 ADNr 16S représentatifs de la population ont été retenus pour l'analyse phylogénétique finale.

L'analyse phylogénétique des séquences a montré que toutes les séquences appartenaient aux *Proteobacteria* ou au groupe des *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB). La diversité était particulièrement importante au sein des  $\epsilon$ -*Proteobacteria* et ces séquences représentaient 79.6% des séquences de la librairie d'ADNr 16S (Fig. I.1.). Les autres séquences étaient réparties entre la sous-classe  $\delta$  des *Proteobacteria* et le groupe des CFB, représentant respectivement 13.4% et 4.9% des séquences de la librairie (Fig. I.2.).





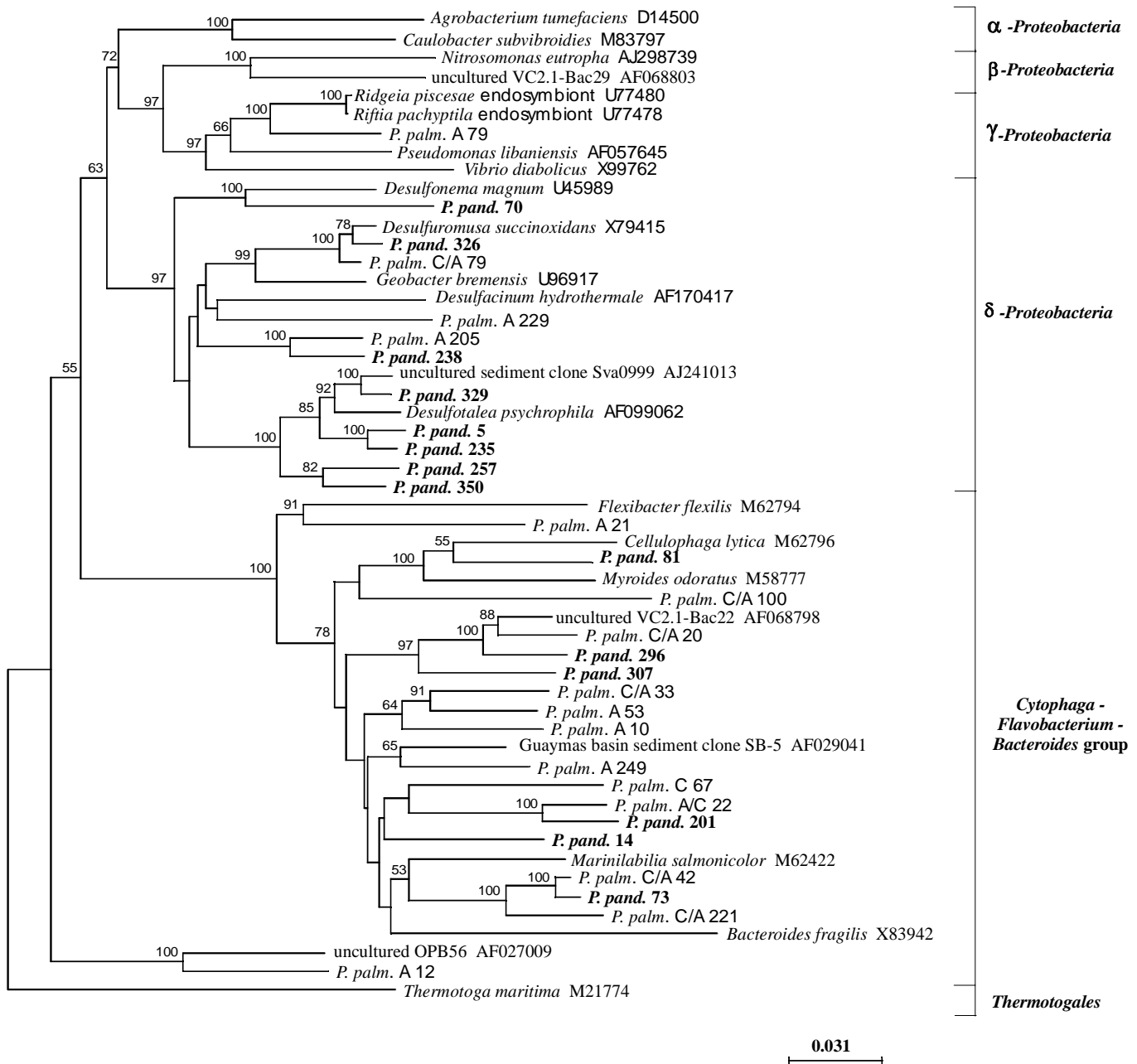


Fig. I.2 : Position phylogénétique des séquences d'ADNr 16S détectées dans l'échantillon de tube de *P. pandorae*.

La topologie ci-dessus a été obtenue avec la méthode du Neighbor-Joining, en utilisant *Thermotoga maritima* comme outgroup. Les différentes séquences proviennent de GenBank (les numéros d'accès sont indiqués à la suite du nom d'espèce). 1038 sites ont été pris en compte pour l'analyse phylogénétique.

Une analyse statistique a été réalisée pour comparer la diversité microbienne présente dans le tube de *P. pandorae* à celle du cocon muqueux de *P. palmiformis* prélevé sur la même cheminée. Les bibliothèques de clones ont été comparées selon la méthode décrite par Singleton (Singleton *et al.*, 2001), dont le principe est résumé en annexe (Annexe 1).

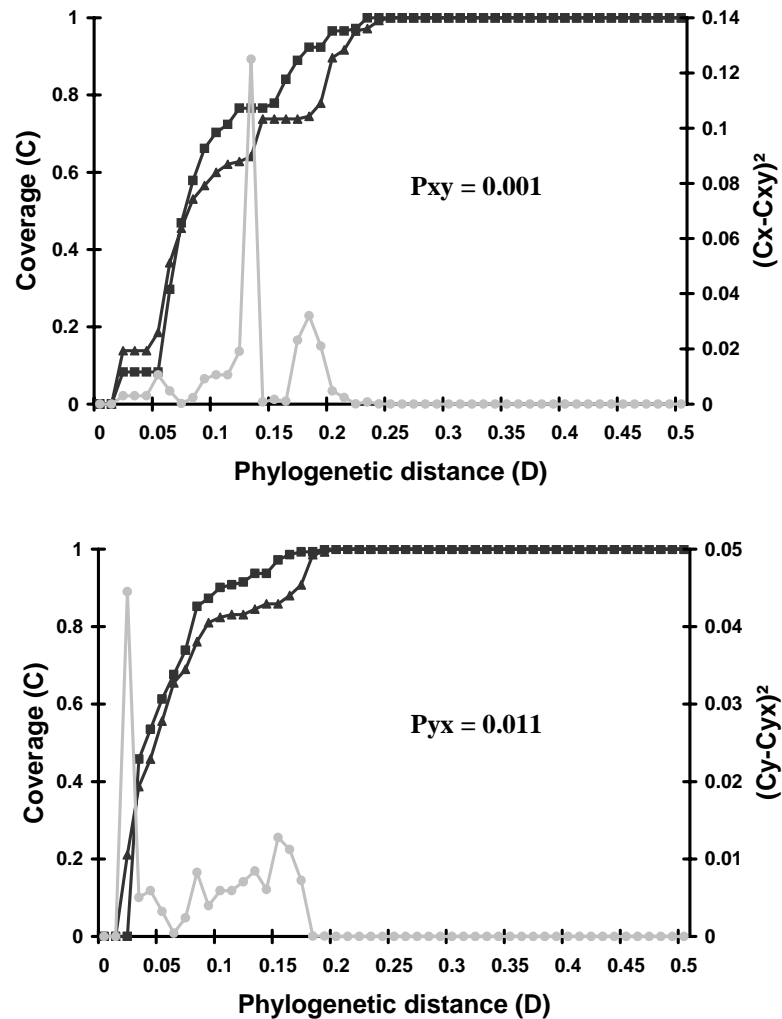


Fig. I.3 : Résultats de l'analyse statistique ayant comparé les bibliothèques de clones des tubes de *P. palmiformis* et de *P. pandorae* prélevés sur la même cheminée hydrothermale. X et Y correspondent, respectivement, aux bibliothèques de clones de *P. palmiformis* et de *P. pandorae*. Les recouvrements homologues ( $C_x$  et  $C_y$ ) et hétérologues ( $C_{xy}$  et  $C_{yx}$ ) ont été calculés. Les courbes de recouvrement en fonction de la distance phylogénétique ( $D$ ) sont représentées avec les symboles suivants : + pour  $C_x(D)$  et  $C_y(D)$ ,  $\sigma$  pour  $C_{xy}(D)$  et  $C_{yx}(D)$ . La courbe grise ( $\Delta$ ) indique les valeurs de  $(C_x - C_{xy})^2$  et de  $(C_y - C_{yx})^2$  en fonction de la distance phylogénétique. La distance phylogénétique  $D$  a été calculée en utilisant le programme CLUSTALW de GCG.

L'analyse statistique a indiqué que les 2 librairies de clones étaient significativement différentes ( $P_{xy} = 0.001$  et  $P_{yx} = 0.011 < 0.05$ ). En outre, elle a indiqué que la microflore associée au cocon muqueux de *P. palmiformis* était beaucoup plus importante que celle associée au tube de *P. pandorae*. Ainsi que l'indique la valeur  $(C_y - C_{yx})^2$ , un grand nombre d'espèces (valeurs entre deux ADNr 16S > 97% de similitude, soit  $D < 0.03$  (Rossello-Mora et Amann, 2000)) et de genres (valeurs entre deux ADNr 16S > 93% de similitude, soit  $D < 0.07$  (Rossello-Mora et Amann, 2000)), la majeure partie des genres et des espèces détectées dans le tube de *P. pandorae* étaient également présentes dans le cocon de *P. palmiformis*. D'autre part, comme l'indique la courbe des valeurs de  $(C_x - C_{xy})^2$  en fonction de la distance phylogénétique, le nombre d'espèces et de genres présents dans l'échantillon de *P. palmiformis* est beaucoup plus important que celui de l'échantillon de *P. pandorae*: la valeur de recouvrement hétérologue est inférieure à 40%. En outre, le recouvrement entre les populations des 2 échantillons est fort à des niveaux taxinomiques plus élevés ( $D > 0.20-0.25$ , échelon taxinomique correspondant aux phyla (Hugenholtz *et al.*, 1998)).

L'analyse phylogénétique a montré que la différence majeure entre les populations détectées dans les tubes de *P. pandorae* et de *P. palmiformis* concernait le groupe des *Verrucomicrobia*. De nombreuses séquences différentes (13.5% des séquences de la librairie) ont été détectées dans l'échantillon de cocon muqueux de *P. palmiformis* alors qu'aucune séquence de *Verrucomicrobia* n'a été détectée dans le tube de *P. pandorae*. Toutes les *Verrucomicrobia* cultivées à ce jour utilisent de façon préférentielle des substrats glucidiques pour leur croissance (Hedlund *et al.*, 1997). L'absence ou la présence de séquences appartenant à cet ordre pourrait s'expliquer par la différence de composition entre le mucus de *P. palmiformis* et le tube de *P. pandorae*.

### **I.3. Caractérisation phylogénétique de l'assemblage microbien associé au tube de *Paralvinella sulfincola*.**

Au cours de ma thèse, j'ai également participé à l'analyse de la microflore associée au tube du polychète *Paralvinella sulfincola* qui colonise le pôle chaud des cheminées hydrothermales des dorsales du Nord-Est Pacifique. Ce travail est décrit dans l'article 2 (seul le résumé de cet article est publié dans la thèse afin d'éviter d'éventuels problèmes de publication de l'article pour raison de publication antérieure des résultats).

Article 2: Antoine Pagé, S. Kim Juniper, Michel Olagnon, **Karine Alain**, Gaston Desrosiers, Joël Quérellou et Marie-Anne Cambon-Bonavita. Microbial diversity associated with mineral and biogenic samples from an active deep-sea hydrothermal vent chimney. FEMS Microbiology Ecology, soumis.

---

## Article 2

### **Influence du polychète *Paralvinella sulfincola* sur les communautés microbiennes colonisant les parois externes d'une cheminée hydrothermale océanique profonde**

Antoine Pagé, S. Kim Juniper, Michel Olgnon, Karine Alain, Gaston Desrosiers,  
Joël Quérellou et Marie-Anne Cambon-Bonavita.

FEMS Microbiology Ecology, soumis.

---

Article 2

**Microbial Diversity Associated with Mineral and Biogenic Samples from an Active Deep-Sea Hydrothermal Vent Chimney**

Antoine Pagé<sup>1,4\*</sup>, S. Kim Juniper<sup>2</sup>, Michel Olagnon<sup>3</sup>, Karine Alain<sup>4</sup>, Gaston Desrosiers<sup>5</sup>,  
Joël Quérellou<sup>4</sup> and Marie-Anne Cambon-Bonavita<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Centre GEOTOP-UQAM-McGill, C.P. 8888, succursale Centre-Ville, Montréal (Canada), H3C 3P8 and Institut des Sciences de la Mer (UQAR), C.P. 3300, Rimouski (Canada), G5L 3A1.

<sup>2</sup>Centre GEOTOP-UQAM-McGill and Département des Sciences Biologiques (UQAM), C.P. 8888, succursale Centre-Ville, Montréal (Canada) H3C 3P8.

<sup>3</sup>Cellule Océano-Météo, Département TMSI, IFREMER Centre de Brest, BP 70, Plouzané (France) 29280.

<sup>4</sup>Laboratoire de Microbiologie et de Biotechnologie des Extrêmophiles, Département Valorisation des produits, IFREMER Centre de Brest, BP 70, Plouzané (France) 29280.

<sup>5</sup>Institut des Sciences de la Mer (UQAR), C.P. 3300, Rimouski (Canada), G5L 3A1.

\*Corresponding author, present address: Department of Biology, Portland State University, P.O. Box 751, Portland, Oregon (USA), 97201. Phone: 503-725-3855. Fax: 503-725-8570. apage@pdx.edu

Running Title: MICROBIAL DIVERSITY IN HYDROTHERMAL VENT CHIMNEY MINERAL/BIOGENIC SAMPLES

Keywords: hydrothermal vent, *Paralvinella sulfincola*, sulfide chimney, microbial diversity, DHVEG, epsilon-*Proteobacteria*

**ABSTRACT**

A mucous tube from the alvinellid polychaete *Paralvinella sulfincola* and a mineral sample from the adjacent chimney surface were collected on an active deep-sea hydrothermal vent chimney (Axial Volcano, Juan de Fuca Ridge). Bacterial and archaeal 16S rRNA gene (rRNA SSU) clone libraries were constructed from genomic DNA extracted from each sample. Phylotypes detected in the chimney libraries belonged to groups mostly constituted of aerobic mesophiles ( $\epsilon$ -group II) and anaerobic thermophiles (*Thermococcaceae*, *Thermofilaceae*, *Caldithrix abyssi*, *Nautiliaceae*, *Thermotogales*), indicating that physiologically diverse microbial communities can simultaneously colonize the outside of active chimneys. Although they presented the same major components, the 16S rRNA libraries constructed with DNA extracted from the *P. sulfincola* were significantly different than the libraries of the chimney sample. Several groups representing different proportions of each sample's libraries were responsible for these differences (DHVEG I, II, *Thermofilaceae*, *Desulfurococcales/Sulfolobales*,  $\epsilon$ -group II, *Campylobacteraceae*, *Thermotogales*, *Firmicutes*). These results suggest that *P. sulfincola* locally might influence the microbial communities on the surface of active deep-sea vent chimneys. Such microbial succession triggered by macrofaunal colonization could have important effects on the biogeochemical cycles of this environment.

#### I.4. Conclusion des analyses moléculaires de la microflore associée aux polychètes Alvinellidae de la dorsale Juan de Fuca.

Les caractérisations phylogénétiques de la microflore associée aux tubes des polychètes Alvinellidae *Paralvinella palmiformis*, *Paralvinella pandorae* et *Paralvinella sulfincola*, provenant de cheminées actives de la dorsale Juan de Fuca, ont mis en évidence la présence d'une diversité bactérienne très importante. Des séquences d'ADNr 16S appartenant aux  $\epsilon$ -,  $\delta$ - et  $\gamma$ -*Proteobacteria*, au groupe des *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB), aux *Verrucomicrobia*, aux *Fusobacteria*, aux bactéries vertes non sulfureuses et aux Firmicutes ont ainsi été détectées. Bien que la procédure d'extraction des acides nucléiques ait été totalement identique pour les différents échantillons, seul l'ADN extrait de tubes de *Paralvinella sulfincola* a permis l'amplification d'ADNr 16S archéens, et ce en dépit des multiples tentatives effectuées à partir de l'ADN extrait des autres échantillons. Au vu de ces résultats différents, obtenus en suivant une procédure identique, la méthodologie employée ne semble pas être à incriminer pour justifier les absences d'amplifications observées dans 3 sur 5 des échantillons. Plusieurs explications peuvent être avancées pour tenter d'expliquer les échecs obtenus avec les ADNs extraits des tubes de *P. palmiformis* et *P. pandorae*. Ainsi, le défaut d'amplification pourrait s'expliquer par l'absence d'ADN archéen dans les échantillons considérés. Cependant, cette hypothèse semble peu probable car les *Archaea* sont ubiquistes et leur présence dans les environnements hydrothermaux a été démontrée à de multiples reprises (Reysenbach *et al.*, 2000; Takai *et al.*, 2001; Teske *et al.*, 2002; Schrenk *et al.*, 2003; Nercessian *et al.*, 2003). L'hypothèse d'une sous-représentation des *Archaea* dans l'échantillon semble plus plausible. En considérant, en sus, le fait que nous avons travaillé sur de très petites quantités d'échantillons, il est possible que l'ADN archéen extrait ait été très minoritaire par rapport à l'ADN bactérien. *P. sulfincola* habite dans des régions de cheminées actives dont les températures sont globalement plus élevées que celles dans lesquelles résident *P. palmiformis* ou *P. pandorae* (Desbruyères *et al.*, 1985). Les hybridations *in situ* réalisées, à ce jour, sur des fragments de paroi extérieure de fumeurs noirs, à l'aide de la sonde universelle archéenne ARCH-915, ont démontré que les *Archaea* représentaient environ 33% de la microflore présente au pôle chaud des cheminées (Schrenk *et al.*, 2003). Par contre, à notre connaissance, aucune étude visant à quantifier les populations archéennes des zones plus froides des cheminées n'a été menée. Il se pourrait que les *Archaea* habitant sur les cheminées actives soient plus largement représentées au niveau des régions où les températures sont élevées. D'ailleurs, toutes les *Archaea* isolées jusqu'à présent à partir de morceaux de cheminées hydrothermales sont thermophiles ou hyperthermophiles. En outre, plusieurs études de diversité réalisées à partir d'échantillons provenant de zones dont les températures sont relativement modérées (pôle tiède ou pôle froid) ont également montré une absence d'amplification d'ADN archéen (Longnecker et Reysenbach, 2001; Lopez-Garcia *et al.*, 2002), ce qui pourrait également plaider pour



une faible représentation des *Archaea* dans les zones de basse et moyenne températures des cheminées (bien qu'on ne puisse, bien entendu, pas exclure non plus l'hypothèse d'un problème méthodologique).

Les banques de clones bactériens, issues des tubes de *P. pandorae*, *P. sulfincola* et des cocons muqueux de *P. palmiformis*, étaient toutes très largement dominées par des séquences appartenant aux  $\epsilon$ -*Proteobacteria*. Elles ont confirmé les résultats d'études de diversité microbienne réalisées précédemment sur d'autres sites hydrothermaux qui avaient mis en évidence l'importance et la grande diversité des  $\epsilon$ -*Proteobacteria* au sein de l'écosystème hydrothermal (Moyer *et al.*, 1995; Polz et Cavanaugh, 1995; Reysenbach *et al.*, 2000; Longnecker et Reysenbach, 2001). En outre, elles ont permis de démontrer que cette classe de micro-organismes présentait également une très grande diversité au sein des sites hydrothermaux océaniques profonds de la dorsale Juan de Fuca. L'étude de la microflore associée aux cocons muqueux de *P. palmiformis* a, en sus, rapporté pour la première fois la présence de micro-organismes appartenant aux *Verrucomicrobia*, aux *Fusobacteria* et aux bactéries vertes non sulfureuses, au niveau des sources hydrothermales océaniques profondes. Les méthodes moléculaires d'analyse de la diversité utilisées ont permis d'identifier les micro-organismes présents dans le micro-environnement de ces polychètes. Des hypothèses ont, en outre, pu être émises quant aux rôles des micro-organismes affiliés à des groupes monophylétiques dont tous les représentants possèdent un caractère physiologique ou un métabolisme donné. Ainsi, une microflore hétérotrophe comprenant notamment des micro-organismes affiliés aux CFB et aux *Verrucomicrobia*, pourrait intervenir dans la décomposition et le recyclage de la matière organique et, au moins une partie des  $\epsilon$ -*Proteobacteria* détectées pourraient participer à la synthèse de cette matière organique à partir de composés inorganiques. Cependant, si l'on peut tenter d'inférer une physiologie à partir de données phylogénétiques pour les micro-organismes dont les séquences sont affiliées de façon robuste à un groupe de micro-organismes partageant un trait de caractère donné (par exemple pour des séquences affiliées aux méthanogènes), ceci s'avère totalement impossible pour ceux dont les séquences sont affiliées à des groupes de micro-organismes aux physiologies diverses ou pour les séquences appartenant à des groupes ne possédant aucun représentant cultivé. L'emploi d'une approche culturale est alors l'une des solutions envisageables pour tenter de répondre à cette question.

## Chapitre II. Etudes taxinomiques

Les caractérisations phylogénétiques réalisées ont, dans tous les cas, démontré la présence d'une très grande diversité microbienne au sein des échantillons de tubes de polychètes Alvinellidae. La majeure partie des séquences détectées appartenait à des groupes ne possédant aucun représentant cultivé. En outre, toutes les bibliothèques de séquences d'ADNr 16S qui ont été constituées au cours de ce travail étaient très largement dominées par des *ε-Proteobacteria*. Au moment où ces inventaires moléculaires ont été effectués, aucune *ε-Proteobacteria* n'avait été isolée des environnements hydrothermaux profonds.

Au vu de la richesse microbienne des échantillons de tubes d'alvinelles, l'utilisation de techniques culturales d'enrichissement-isolement a semblé appropriée pour la poursuite du travail. Un grand nombre de cultures a été réalisé en multipliant les conditions physico-chimiques et en utilisant une large gamme de sources de carbone et un éventail de donneurs et d'accepteurs d'électrons divers. La figure II.1 dresse un récapitulatif des différentes conditions qui ont été testées sur un ou plusieurs échantillons.

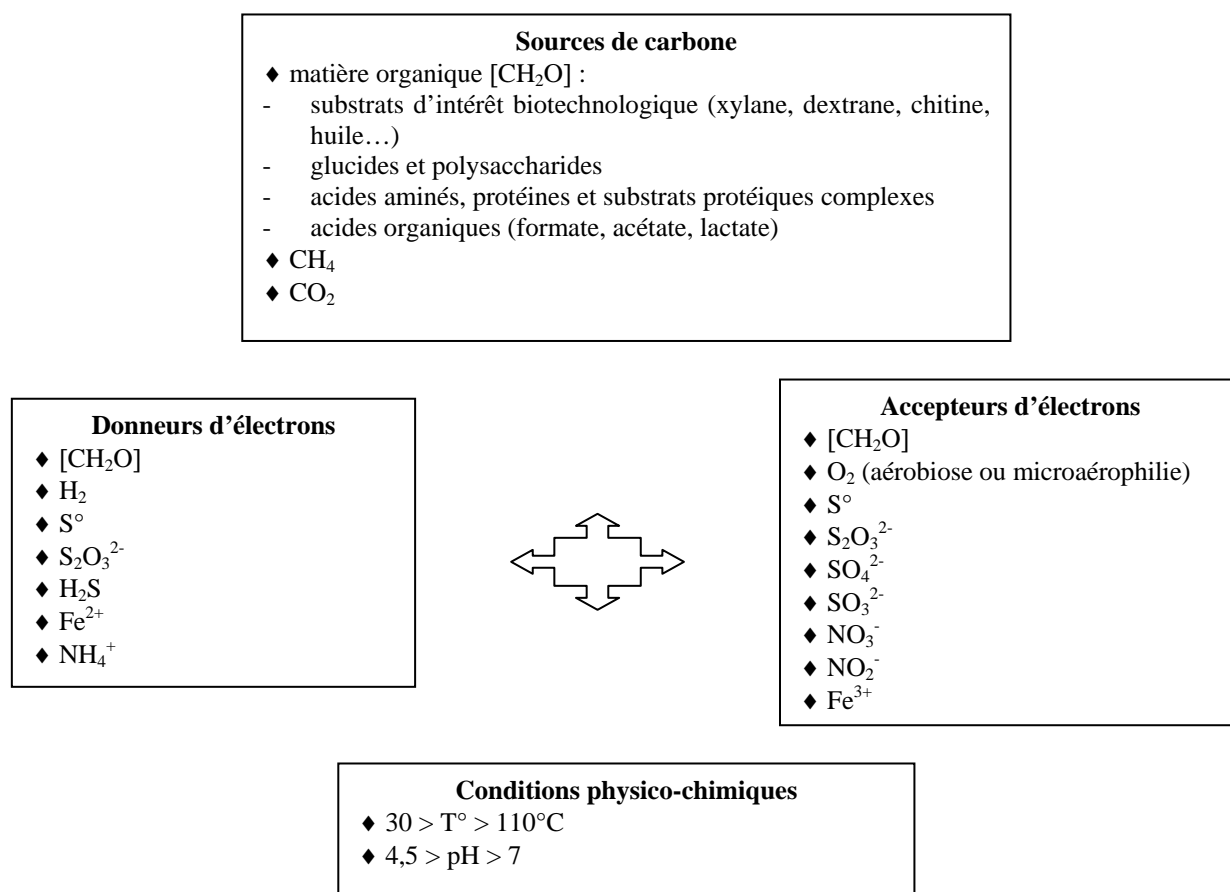


Fig. II.1 : Récapitulatif des différentes conditions utilisées lors des cultures d'enrichissement

Des cultures d'enrichissement ont été réalisées à partir de tubes de toutes les espèces d'Alvinellidae pour lesquelles nous disposons d'échantillons congelés conditionnés en présence d'un agent cryoprotecteur (glycérol ou diméthylsulfoxyde). Ainsi, des cultures d'enrichissement ont été réalisées à partir de tubes d'*Alvinella pompejana* et de *Paralvinella sulfincola*. Un grand nombre de souches ont ensuite été purifiées à partir de ces cultures d'enrichissement, en utilisant soit la technique de dilution jusqu'à extinction en milieu liquide, soit la technique d'étalement sur milieu solide. Des *Archaea* appartenant à l'ordre des *Thermococcales* (genre *Thermococcus*), ainsi que des *Bacteria* appartenant aux Firmicutes (sous-espèce de *Caloranaerobacter azorensis*, genre *Caminicella*), aux  $\epsilon$ -*Proteobacteria* (genres *Caminiibacter*, *Nautilia* et un genre non décrit à ce jour), aux *Thermotogales* (genre *Marinitoga*) ou à une lignée profonde du groupe des *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*, ont ainsi été isolées. Les souches ne présentant aucune originalité taxinomique ont été transférées à notre partenaire industriel (Protéus, Nîmes), alors que trois souches intéressantes d'un point de vue taxinomique ont fait l'objet d'une caractérisation plus complète.

### **II.1. *Caminicella sporogenes*, nouvelle espèce d'un nouveau genre du phylum des Firmicutes (description de l'isolat AM1114<sup>T</sup>).**

La première souche qui a été décrite a été isolée d'un tube d'*Alvinella pompejana* collecté sur la dorsale du Pacifique oriental (EPR 13°N). Elle représente un nouveau genre au sein de la classe des *Clostridia*. Cette caractérisation a fait l'objet d'une publication :

Article 3 : **Karine Alain**, Patricia Pignet, Magali Zbinden, Morgane Quillévéré, Francis Duchiron, Jean-Pierre Donval, Françoise Lesongeur, Gérard Raguénès, Philippe Crassous, Joël Quérellou et Marie-Anne Cambon-Bonavita. *Caminicella sporogenes* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic spore-forming bacterium isolated from an East-Pacific Rise hydrothermal vent (2002). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52 : 1621-1628.

---

## Article 3

### ***Caminicella sporogenes* gen. nov., sp. nov., une nouvelle bactérie thermophile sporulante isolée d'une source hydrothermale océanique profonde de la dorsale du Pacifique oriental**

Karine Alain, Patricia Pignet, Magali Zbinden, Morgane Quillévéré, Francis Duchiron, Jean-Pierre Donval,  
Françoise Lesongeur, Gérard Raguénès, Philippe Crassous, Joël Quérellou et Marie-Anne Cambon-Bonavita.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2002) 52 : 1621-1628.

---

## ***Caminicella sporogenes* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic spore-forming bacterium isolated from an East-Pacific Rise hydrothermal vent**

<sup>1,4,5</sup> Laboratoire de Microbiologie et de Biotechnologie des Extrémophiles, Département de Valorization des Produits<sup>1</sup>, Laboratoire de Géochimie et de Métallogénie, Département Géosciences Marines<sup>4</sup>, Laboratoire Biotechnologie et Molécules Marines<sup>5</sup>, Département de Valorization des Produits<sup>5</sup>, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France

<sup>2</sup> UMR 7622, Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Développement, 7 quai St Bernard, 75252 Paris Cédex 05, France

<sup>3</sup> Laboratoire de Microbiologie Industrielle, URCA, UFR Sciences, BP 1039, Moulin de la Housse, 51687 Reims Cedex 2, France

<sup>6</sup> Laboratoire Environnement Profond, Direction des Ressources Océaniques, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France

Karine Alain,<sup>1</sup> Patricia Pignet,<sup>1</sup> Magali Zbinden,<sup>2</sup> Morgane Quillevere,<sup>1</sup> Francis Duchiron,<sup>3</sup> Jean-Pierre Donval,<sup>4</sup> Françoise Lesongeur,<sup>1</sup> Gérard Ragueneas,<sup>5</sup> Philippe Crassous,<sup>6</sup> Joël Querellou<sup>1</sup> and Marie-Anne Cambon-Bonavita<sup>1</sup>

Author for correspondence: Karine Alain. Tel: +33 2 98 22 45 53. Fax: +33 2 98 22 47 57. e-mail: karine.alain@ifremer.fr

**A novel thermophilic, anaerobic, strictly chemoorganoheterotrophic bacterium, designated as AM1114<sup>T</sup>, was isolated from a deep-sea hydrothermal vent sample from the East-Pacific Rise (EPR 13° N). The cells were long (3–10 µm) rods, motile with peritrichous flagella, and exhibited a Gram-negative cell wall ultrastructure. In the late stationary phase of growth, cells formed an ovoid, refractile, terminal endospore. They grew at 45–65 °C inclusive (optimum 55–60 °C; doubling time approx. 45 min), at pH 4.5–8.0 inclusive (optimum pH 7.5–8.0) and at sea salt concentrations of 20–60 g l<sup>-1</sup> inclusive (optimum 25–30 g l<sup>-1</sup>). Strain AM1114<sup>T</sup> was an obligately heterotrophic bacterium able to ferment a mixture of 20 amino acids, complex proteinaceous substrates (such as yeast extract, brain-heart infusion or peptone), and carbohydrates such as glucose, galactose or maltose. The main fermentation products on glucose/yeast extract/peptone/sulfur medium were hydrogen, carbon dioxide, butyrate, ethanol, acetate, formate and L-alanine. The G+C content of the genomic DNA (determined by thermal denaturation) was 24.2±1 mol%. Phylogenetic analyses of the 16S rRNA gene located the strain within cluster XI of the lineage encompassing the genus *Clostridium* and related genera (*sensu* Collins *et al.*, 1994), in the bacterial domain. On the basis of 16S rDNA sequence comparisons and physiological and biochemical characteristics, it is proposed that the isolate should be described as a novel genus, namely *Caminicella* gen. nov., of which *Caminicella sporogenes* sp. nov. is the type species. The type strain is AM1114<sup>T</sup> (= DSM 14501<sup>T</sup> = CIP 107141<sup>T</sup>).**

**Keywords:** deep-sea hydrothermal vent, thermophile, *Clostridiales*, *Caminicella sporogenes*

### INTRODUCTION

Over the past decade, microbiological investigations of deep-sea hydrothermal vents from a number of geographically distant sites have revealed the presence of a

phylogenetically and physiologically diverse community of thermophilic and hyperthermophilic microorganisms thriving in the hottest part of the hydrothermal vent ecosystem. Representative species of both the *Bacteria* and the *Archaea* have been isolated from deep-sea vents. Physiological types isolated from this biotope include chemolithoautotrophs, chemoorganoheterotrophs and mixotrophs (Jeanthon, 2000). Recently, several molecular phylogenetic approaches conducted by means of the comparison of 16S rRNA gene sequences have revealed a plethora of novel

Published online ahead of print on 18 January 2002 as DOI 10.1099/ijs.0.02142-0.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the 16S rDNA sequence of strain AM1114<sup>T</sup> is AJ320233.

## K. Alain and others

microbial lineages previously unknown for deep-sea hydrothermal vents (Polz *et al.*, 1995; Moyer *et al.*, 1995, 1998; Takai *et al.*, 1999; Reysenbach *et al.*, 2000; Longnecker *et al.*, 2001). In this work, we report the isolation and characterization of a strain belonging to cluster XI of the 'Clostridia and relatives' group (according to the scheme of Collins *et al.*, 1994).

The *Clostridiales* constitute one of the largest of the eubacterial taxa. It encompasses a complex range of Gram-negative or Gram-positive, psychrophilic, mesophilic or thermophilic, spore-forming or non-spore-forming, chemoorganoheterotrophic or chemolithotrophic bacteria that can be found in a variety of habitats, and includes a large number of eukaryotic pathogens (Cato *et al.*, 1986). Among this group of micro-organisms, 19 clusters have been defined by Collins *et al.* within the genus *Clostridium* and related genera, on the basis of phylogenetic 16S rDNA sequence analysis (Collins *et al.*, 1994). However, the inability to identify clear-cut phenotypic discriminatory properties essential for circumscribing clusters defined only by phylogenetic analysis hinders the reclassification process and leads to 'artificial' clustering. Consequently, the genus *Clostridium*, as well as other genera placed in the *Clostridium* subphylum of the low-G+C Gram-positive bacteria, is always in revision in order to make the taxonomy consistent with the phylogeny (Rainey *et al.*, 1993; Stackebrandt *et al.*, 1999).

Members of cluster XI of the 'Clostridia and relatives' group exhibit a wide range of phenotypes (Andreesen *et al.*, 1970; Adamse, 1980; Braun *et al.*, 1981; Lux *et al.*, 1992; Jalava *et al.*, 1999; Ravot *et al.*, 1999). Notably, this cluster comprises few extreme micro-organisms such as alkaliphiles (Li *et al.*, 1993, 1994; Collins *et al.*, 1994; Kevbrin *et al.*, 1998; Takai *et al.*, 2001), moderate thermophiles (Li *et al.*, 1993, 1994) and halophiles (Fendrich *et al.*, 1990). Although this cluster encompasses an extremely diverse range of metabolic and physiological properties, this group is phylogenetically well defined (Collins *et al.*, 1994).

In 1999, hydrothermal samples were collected from a deep-sea vent located on the East-Pacific Rise (EPR 13° N). We describe the isolation (from one of these samples) and characterization of a thermophilic, spore-forming bacterium having phenotypic and phylogenetic characteristics consistent with its assignment to a new genus within the *Clostridiales*.

## METHODS

**Collection of samples.** In 1999, a deep-sea vent field located on the East-Pacific Rise [Elsa (HÖT 3) 103° 56' 326 W, 12° 48' 200 N] was explored during the 'Advanced Microbiological Studies of Thermophiles: Adaptations and Diversity' oceanographic cruise. White entire tube samples of the hydrothermal vent polychaete *Alvinella pompejana*, which inhabits the surface of active sulfide structures ('chimneys', 'smokers'), attached to small fragments of chimney rocks, were collected by the man-operated *Nautile*

submersible. After collection, the samples were immediately transferred into an anaerobic chamber and then, after removal of the tubes' inner contents, placed in 50 ml serum vials filled with a sterile solution of 3% sea salts (v/v) (Sigma). They were stored at 4 °C until enrichment in the laboratory.

**Enrichment and purification procedures.** Cultures were enriched and purified anaerobically in a medium containing the following (per l): 30 g sea salts (Sigma), 6.05 g PIPES buffer (Sigma), 0.2 g yeast extract (Difco), 0.2 g D(+)-glucose (Sigma), 0.2 g dextran (produced by *Leuconostoc mesenteroides* strain B-512, mol. wt 148 000; Sigma), 2 g sterile *A. pompejana* pulverized tubes, 0.5 ml vitamin mixture (Balch *et al.*, 1979), 10 ml trace-element solution (Balch *et al.*, 1979) and 1 mg resazurin (Sigma). The medium was adjusted to pH 7.0, at room temperature, before being autoclaved. All manipulations preceding the enrichment and isolation experiments were performed in an anaerobic chamber, under an atmosphere of N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> (90:5:5). The sterile medium was reduced using 0.5 g l<sup>-1</sup> sodium sulfide, then distributed into serum vials before inoculation. Enrichment cultures were performed at 60 °C without agitation by inoculating a 1 ml sample directly into each vial filled with 25 ml medium. After the enrichment experiments, positive cultures were subcultured and then purified by using the dilution-to-extinction technique (Baross, 1995). The purity of the strain was confirmed by microscopic observations and by cloning and sequencing of 10 16S rDNA clone genes.

**Culture medium and conditions.** The new isolate was grown on glucose/yeast extract/peptone/sulfur (GYPS) medium containing the following (per litre): 30 g sea salts (Sigma), 6.05 g PIPES buffer (Sigma), 0.5 g yeast extract (Difco), 1 g bacto-peptone (Difco), 5 g D(+)-glucose (Sigma), 12 g elemental sulfur (Prolabo) and 0.1% (v/v) resazurin solution. Its pH was adjusted to 7.5 before autoclaving, and the medium was reduced by 0.5 g sodium sulfide l<sup>-1</sup> before inoculation. Unless indicated otherwise, cultures were incubated at 60 °C under the anaerobic chamber gas mixture, at atmospheric pressure.

**Observation of the culture, and quantification.** Cells were observed under a light microscope (model BH2; Olympus) equipped with a phase-contrast oil-immersion objective (× 100 magnification). Cells were quantified by direct cell counting using a Thoma chamber (depth, 0.02 mm). Alternatively, cells were fixed with 1% glutaraldehyde (v/v) for 45 min at room temperature and stored at -20 °C before being counted in a Thoma chamber.

**Morphology.** The cells were Gram-stained by using the Bacto 3-step Gram stain Set-S (Difco). The Gram type was determined by using the Ryu non-staining KOH test (Ryu, 1940; Buck, 1982; Powers, 1995). The SpotTest flagella stain (Difco) was used for flagella detection.

For scanning electron microscopy, cells were fixed with 10% formaldehyde (v/v) for 1 h, displayed on filters (0.22 µm pore size; Nucleopore) and dried overnight at room temperature. Samples were then coated with gold (SCD040; Balzers) and examined with a scanning electron microscope (XL 30 LaB6; Philips).

For transmission electron microscopy, cultures were fixed at room temperature in a fixative solution containing 3% glutaraldehyde (v/v), 0.2 M cacodylate buffer, pH 7.4, and 0.35 M sucrose. After centrifugation at 2000 g for 20 min, the fixative was carefully removed and replaced with the

washing solution. Post-fixation in osmium tetroxide (1 vol. in 1 vol. of 0.2 M cacodylate buffer) was performed. After post-fixation and washing, the pellets were wrapped in agar (2% solution), according to Pottu-Boumendil (1989). Agar blocks containing the cells were cut into small cubes (1 mm<sup>3</sup>). These cubes were then dehydrated in ethanol and propylene oxide series and further embedded in Araldite CY212 (TAAB) according to a routine procedure. Ultrathin sections (50 nm) were obtained on a Reichert–Jung ultramicrotome. Transmission electron microscopy observations were performed on an LEO 912 electron microscope, operated at 120 kV with a LaB<sub>6</sub> source.

**Determination of growth parameters.** To determine the optimum temperature, pH and sea-salts concentration, cells were grown in Hungate tubes (15 ml; Bellco) containing 6 ml GYPS medium. Experiments were performed in thermostatic aluminium heating blocks (Bioblock) monitored with temperature probes placed in control tubes. To determine the effect of pH on the growth, the GYPS medium was modified with the following 10 mM buffers (Sigma): for pH 3.0, 4.0 and 4.5, no buffer; for pH 5.0, 5.5 and 6.0, MES buffer; for pH 6.5 and 7.0, PIPES buffer; for pH 7.5 and 8.0, HEPES buffer; and for pH 8.5 and 9.0, AMPSO [3-(1,1-dimethyl-2-hydroxyethyl)-amino-2-hydroxypropanesulfonic acid] buffer. Sodium sulfide was added in the anaerobic chamber and, if necessary, the pH was adjusted with 0.1 M HCl or 0.1 M NaOH. To determine the concentration of salts required for growth, the GYPS medium was prepared with different dilutions of sea salt. Cells were then incubated at the optimal temperature and pH for growth. The effects of temperature, pH and salinity were determined by measuring growth rates calculated using linear regression analysis from four to seven points along the logarithmic portions of the growth curves. All growth experiments were carried out in triplicate.

**Determination of growth requirements.** The ability of the new isolate to grow in the presence of different electron acceptors was investigated on GYPS medium in which elemental sulfur had been replaced with one of the following electron acceptors: L-cystine was tested at 50 mM, polysulfides (Blumentals *et al.*, 1990) and ferric iron were tested at 10 mM, and thiosulfate, sulfate, sulfite, nitrate and nitrite were tested at 20 mM. Growth in the absence of elemental sulfur was also tested.

The ability of strain AM1114<sup>T</sup> to use a single carbon source was investigated by adding one of the following organic compounds to the GYPS medium from which carbon sources had been omitted, and which was supplemented with 0.5 ml l<sup>-1</sup> vitamin solution (Balch *et al.*, 1979): 2 g l<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, 10 ml l<sup>-1</sup> trace-element solution (Balch *et al.*, 1979) and 1 ml l<sup>-1</sup> selenite/tungstate solution (6 mg l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O; 0.8 mg l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0.4 g l<sup>-1</sup> NaOH). D(+)-Glucose and maltose were added at a final concentration of 0.5% (w/v), while yeast extract and brain–heart infusion were tested at 0.2% (w/v). The ability of the strain to grow on pairs of amino acids (a wide range of amino acid pairs capable of being used via the Stickland reaction was tested) or on a mixture of 20 amino acids was also tested (for these experiments, the concentration of each amino acid was 0.1 g l<sup>-1</sup>). The following amino acids, which were rapidly consumed when the strain was cultivated on a mixture of 20 amino acids, were also tested singly at 0.2 g l<sup>-1</sup>: L-serine, L-proline, L-asparagine, L-tryptophan, L-cysteine, L-isoleucine, L-leucine and L-phenylalanine. For the other carbon sources tested, a small amount of yeast extract

(0.01% w/v) was used in GYPS basal medium for culture induction. The following carbon sources were tested: gelatin, glycogen (from oyster), maltose, D(+)-glucose, D(-)-fructose, D(+)-galactose, starch (soluble), dextran (from *L. mesenteroides* strain B-512, M<sub>r</sub> 148 000; Sigma), cellulose, xylan (from oat spelt), chitin, D(+)-cellobiose were tested to a final concentration of 0.5% (w/v), while peptone, tryptone, formate and acetate were added at a final concentration of 0.2% (w/v), and methanol at a final concentration of 0.5% (v/v).

The ability of the strain to grow by homoacetogenesis was tested on a medium that had the following composition: sea salts, 30 g l<sup>-1</sup>; PIPES buffer, 6.05 g l<sup>-1</sup>; NH<sub>4</sub>Cl, 1 g l<sup>-1</sup>; NaHCO<sub>3</sub>, 10 g l<sup>-1</sup>; yeast extract, 0.1 g l<sup>-1</sup>; resazurin solution, 0.1% (v/v); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.35 g l<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.35 g l<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O, 0.5 g l<sup>-1</sup>; selenite/tungstate solution, 1 ml l<sup>-1</sup>; trace-element solution (Balch *et al.*, 1979), 10 ml l<sup>-1</sup>; vitamin solution (Balch *et al.*, 1979), 0.5 ml l<sup>-1</sup>. This experiment was performed under an H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20; 200 kPa) gas phase.

All these tests were performed in duplicate, and positive cultures were transferred to confirm growth. Growth was determined by direct cell counting in a Thoma chamber (depth, 0.02 mm) with a phase-contrast microscope.

**Analytical techniques.** All of the analyses of the metabolic end-products were carried out in triplicate. The amino acid, organic acid and aromatic acid metabolic end-products were analysed by means of HPLC (Alliance 2690; Waters) as described by Wery *et al.* (2001b). Proteins from the supernatant of the culture were precipitated with a solution of 5-sulfosalicylic acid at 2% (w/v). Amino acids were studied after derivatization [with an ethanol/water/triethylamine/phenylisothiocyanate (7:1:1:1 by vol.) solution] under the conditions specified for the Waters Pico Tag method (WAT007360; Waters). Alcohols, glucose and linear organic acids were studied on an H<sup>+</sup> exclusion column (polyspher OAKC 1.51270; Merck) at 60 °C with a 18 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> elution (0.35 ml min<sup>-1</sup>) and with differential refractometer (refractometer 410; Waters) detection. For analysis of aromatic acids, the supernatant was eluted on an H<sup>+</sup> exclusion column (column 28352; Chrompack) at 65 °C by a 4.5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution (0.5 ml min<sup>-1</sup>) and detected by absorbance at 210 nm (UV detector 486; Waters).

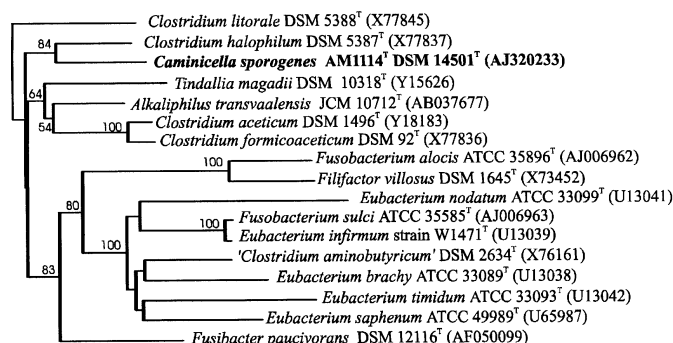
The gas composition was analysed using a AGILENT M200 gas microchromatograph equipped with two parallel analysis tracks [a molecular sieve-packed column (10 m) and a Poraplot U column (8 m)] and a thermal conductivity detector. Helium was used as the carrier gas.

**H<sub>2</sub>S determination.** H<sub>2</sub>S formation was detected by the addition of 500 µl 5 mM CuSO<sub>4</sub>/50 mM HCl to 0.2 ml culture. A brown precipitate demonstrated the presence of H<sub>2</sub>S.

**Susceptibility to antibiotics.** Sensitivity to antibiotics was estimated by using 25, 50, 75 and 100 µg ml<sup>-1</sup> solutions of the following antibiotics: chloramphenicol, kanamycin, penicillin G, rifampicin, streptomycin and vancomycin. Antibiotic solutions were added to GYPS medium just before inoculation. When the antibiotic was diluted in ethanol (chloramphenicol) or DMSO (rifampicin), the same volume of solvent was added to the control cultures.

**DNA extraction and purification.** Genomic DNA was extracted as described by Wery *et al.* (2001a). The concentration and purity of the genomic DNA obtained were estimated by using a GenQuant II spectrophotometer

## K. Alain and others



**Fig. 1.** Phylogenetic position of strain AM1114<sup>T</sup> within the *Clostridiales*. The alignment was performed with 16S rDNA sequences of related species of *Clostridium* cluster XI. *Clostridium litoreale* was used as an outgroup. Accession numbers are indicated in parentheses. The topology shown corresponds to an unrooted tree obtained using a neighbour-joining algorithm (Kimura corrections) established using PHYLO\_WIN and manually refined using SEAVIEW. Bootstrap values are displayed on their relative branches. The scale bar indicates 6.0 nt substitutions per 100 nt.

(Pharmacia) at 260, 280 and 320 nm. The quality of the extraction was checked on a 0.8% (w/v) agarose gel containing 0.5 µg ethidium bromide ml<sup>-1</sup>.

**DNA base content.** The DNA was purified by caesium chloride gradient centrifugation (Sambrook *et al.*, 1989), and its purity was checked spectrophotometrically. The G+C content of the genomic DNA was determined from the melting point, according to the methods of Marmur *et al.* (1962), under the conditions reported by Raguénès *et al.* (1997). A calibration curve was constructed by using ultrapure DNA, as described by Wery *et al.* (2001a).

**Amplification of the 16S rDNA.** The 16S rDNA was selectively amplified from purified genomic DNA by a PCR with oligonucleotide primers designed to anneal to conserved positions in the 3' and 5' regions of the 16S rRNA genes. The forward primer was SAdir (5'-AGAGTTTGATCATGGC-TCAGA-3', corresponding to positions 8–28 in the *Escherichia coli* 16S rRNA) and the reverse primer was S17rev (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3', corresponding to positions 1493–1509). The initial denaturation step consisted of heating of the reaction mixture to 94 °C for 3 min. This was followed by 30 cycles as follows: denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 48 °C for 1 min 30 s, and extension at 72 °C for 2 min. A final extension step was carried out at 72 °C for 6 min. The PCR products were analysed on 0.8% (w/v) agarose TAE gels (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA), containing 0.8 µg ethidium bromide ml<sup>-1</sup>, and recorded with a Fluor-S multiImager (Bio-Rad).

**16S rDNA sequence analysis.** The 16S rRNA gene was double-strand sequenced with the primers described by Raguénès *et al.* (1996). This work was done by Genome Express (Grenoble, France) with an automatic DNA-analysis system (Applied Biosystems); 1456 positions of the 16S rDNA sequence were determined. The CLUSTAL W method with weighted residues was used to align the sequences of representative *Clostridiales* and to calculate similarity levels (Thompson *et al.*, 1994). The 16S rDNA sequence alignment was refined manually by using the multiple sequence alignment editor SEAVIEW, and a phylogenetic reconstruction was produced using PHYLO\_WIN (Galtier *et al.*, 1996) with the following settings: neighbour-joining (Saitou *et al.*, 1987) with the correction of Kimura (1980), maximum-parsimony (Lake, 1987) and maximum-likelihood (Felsenstein, 1981) methods. Bootstrap values were determined according to Felsenstein (1985). The strains and 16S rDNA sequences used for phylogenetic analysis are given in Fig. 1.

## RESULTS AND DISCUSSION

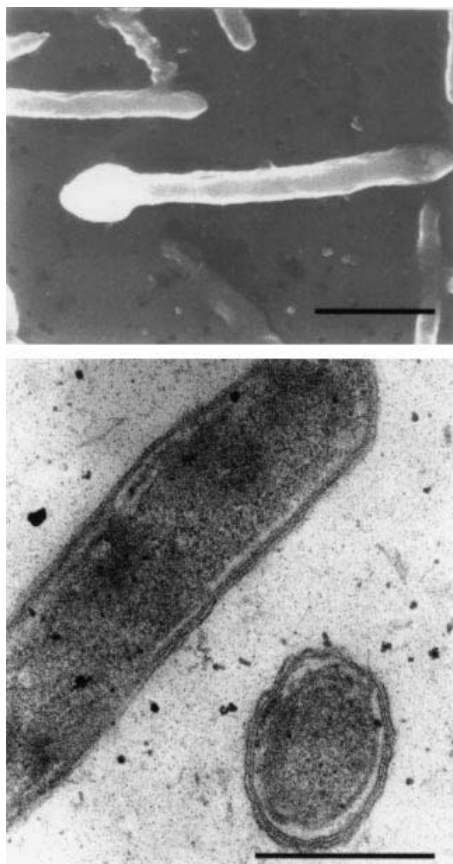
## Enrichment and isolation

Growth of motile, rod-shaped micro-organisms was observed in enrichment cultures after 37 h incubation at 60 °C. The enriched cultures were successfully subcultured, and one isolate was purified and referenced as strain AM1114<sup>T</sup> (= DSM 14501<sup>T</sup> = CIP 107141<sup>T</sup>).

## Phylogenetic analysis

The almost complete sequence (1456 bp) of the 16S rDNA gene of strain AM1114<sup>T</sup> was determined. The phylogenetic position of this organism was determined by comparing its 16S rDNA sequence with those of representative ones from the 19 *Clostridiales* clusters (according to the scheme of Collins *et al.*, 1994). For this phylogenetic reconstruction, *Bacillus subtilis* (GenBank/EMBL accession no. AB016721) was used as an outgroup. According to this first reconstruction, it was concluded that strain AM1114<sup>T</sup> belonged to cluster XI of the lineage encompassing the genus *Clostridium* and related genera. A second phylogenetic tree was constructed, performed with species of cluster XI and one species of cluster XII (*Caloranaerobacter azorensis* DSM 13643<sup>T</sup>, accession no. AJ272422; Wery *et al.*, 2001b) as an outgroup. It showed that the sequence of AM1114<sup>T</sup> was related to the *Clostridium halophilum* subcluster. Cluster XI is very large, and, consequently, the final phylogenetic reconstruction (Fig. 1) was performed only with closely related species among this cluster (with *Clostridium litoreale* as an outgroup). The pairwise evolutionary distances based on 1441 unambiguous nucleotides were computed using the Kimura two-parameter model (Kimura, 1980), and a dendrogram was constructed from these distances using the neighbour-joining method. The species most closely related to AM1114<sup>T</sup> was *Clostridium halophilum* (91% 16S rDNA sequence similarity). It was followed by *Clostridium formicoaceticum* (90%), *Clostridium aceticum* (90%), *Alkaliphilus transvaalensis* (90%) and *Tindallia magadii* (90%). The positioning of strain AM1114<sup>T</sup> was supported by the results of the three algorithms used: neighbour





**Fig. 2.** (top) Scanning electron micrograph of strain AM1114<sup>T</sup> in the mid-exponential phase of growth, showing a sporulated cell. Bar, 2  $\mu\text{m}$ . (bottom) Transmission electron micrograph of strain AM1114<sup>T</sup> in the mid-exponential phase of growth, showing a cell wall with (from the inside to the outside) a cytoplasmic membrane, a thin peptidoglycan layer and an outer membrane – the characteristic cell wall ultrastructure of Gram-negative bacteria. Bar, 1  $\mu\text{m}$ .

joining, maximum parsimony and maximum likelihood. The topology of the phylogenetic tree (Fig. 1) was also supported by the three algorithms used, except in the case of some branches (bootstraps < 50%). To our knowledge, this is the first report of the isolation of a member of cluster XI (*sensu* Collins *et al.*, 1994) within the lineage of the genus *Clostridium* and related genera from a deep-sea hydrothermal vent.

The genus *Clostridium* is intermixed with members of different genera, exhibiting – or not exhibiting – a combination of *Clostridium*-type properties. The taxonomic definition of the genus *Clostridium*, proposed by Prazmowski (Hippe *et al.*, 1992), comprised only four (combined) criteria, i.e (1) an ability to form endospores; (2) an anaerobic type of energy metabolism;

(3) an inability to carry out the dissimilatory reduction of sulfate; and (4) a Gram-positive cell wall ultrastructure. Strain AM1114<sup>T</sup> does not come close to meeting this definition.

#### Morphological and physiological characteristics

Scanning electron microscopy and phase-contrast microscopy indicated that cells of isolate AM1114<sup>T</sup> were thin, straight to slightly curved rods approximately 0.5–0.7  $\mu\text{m}$  wide and 3–10  $\mu\text{m}$  long (mean length, 6  $\mu\text{m}$ ) during the exponential phase of growth. They appeared as single cells (Fig. 2, top) or in pairs. Under unfavourable growth conditions and in the stationary phase of growth, cells elongated; occasionally, cells that were 17  $\mu\text{m}$  long were observed. The cells stained Gram-negative, and electron microscopy of thin sections of strain AM1114<sup>T</sup> revealed the presence, in the cell wall, of a thin peptidoglycan layer characteristic of Gram-negative bacteria (Fig. 2, bottom). Moreover, the KOH reaction was positive, confirming the Gram-negative type of AM1114<sup>T</sup> cells. In the late stationary phase of growth, cells formed an ovoid, refractile, terminal endospore (Fig. 2, top). Both non-sporulated and sporulated cells were motile by means of peritrichous flagella.

This isolate is not an exception among Gram-negative bacteria of the *Firmicutes*. In fact, the genus *Clostridium sensu lato* is polyphyletic and is related phylogenetically to several Gram-negative-staining taxa (for example Broda *et al.*, 2000; Wery *et al.*, 2001b).

Strain AM1114<sup>T</sup> grew at 45–65  $^{\circ}\text{C}$ , the optimum being around 55–60  $^{\circ}\text{C}$ . No growth was observed at 40 or 70  $^{\circ}\text{C}$ . The strain required NaCl for growth, and grew at sea-salt concentrations of between 20 and 60  $\text{g l}^{-1}$  (corresponding to 15–46  $\text{g NaCl l}^{-1}$ ). The optimum sea-salt concentration was approximately 25–30  $\text{g l}^{-1}$  (corresponding to 19–23  $\text{g NaCl l}^{-1}$ ). Growth occurred at pH 4.5–8.0, the optimum pH being around 7.5–8.0.

#### Metabolic properties

Strain AM1114<sup>T</sup> is an anaerobic, obligately heterotrophic bacterium unable to grow by homoacetogenesis. The isolate was able to grow on complex proteinaceous substrates and carbohydrates. Very active growth was observed on yeast extract as the sole energy and carbon source. Although weak growth occurred on a mixture of 20 amino acids, the strain was unable to grow on amino acid pairs via the Stickland reaction.

On the other hand, the other substrates tested as sole carbon sources did not allow growth. In the presence of 0.01% (w/v) yeast extract, growth on brain–heart infusion, D(+)-glucose and maltose was supported. Poor growth was observed on peptone and on D(+)-galactose (in the presence of 0.01%, w/v, yeast extract). None of the other organic acids, alcohols or

## K. Alain and others

carbohydrates tested in combination with 0.01 % (w/v) yeast extract supported growth. No requirement for an external electron acceptor was observed. Despite the fact that elemental sulfur, L-cystine and thiosulfate did not clearly enhance growth, they were reduced to hydrogen sulfide. Conversely, no growth was observed in the presence of nitrites, sulfites and polysulfides. Ferric iron, sulfates and nitrates did not enhance growth. These data suggest that the isolated strain is an obligately fermentative bacterium.

The lineage that encompasses the genus *Clostridium* and related genera is metabolically heterogeneous, containing a large proportion of fermentative micro-organisms (Hippe *et al.*, 1992; Rainey *et al.*, 1993; Takai *et al.*, 2001). The isolate does not stand out from the majority. It is a strictly chemoorganoheterotrophic bacterium able to ferment complex proteinaceous substrates and carbohydrates.

Under optimal growth conditions (with yeast extract as a carbon and energy source, sulfur as an external electron acceptor, and at optimal temperature, pH and salinity), the final concentration in vials was around  $8 \times 10^8$  cells ml<sup>-1</sup>, and the generation time was approximately 45 min.

During fermentation on GYPS medium, strong growth was observed. Notably, a high consumption of glucose (i.e. 2.3 g l<sup>-1</sup>) concomitant with high levels of production of hydrogen, carbon dioxide, acetate (7.50 mM), butyric acid (0.82 mM) and ethanol (10.7 mM) was observed (the values given above and below were performed at the end of the exponential phase of growth). Weak production of butanol was also observed (0.1 mM). Moreover, 0.05 mM succinate and the small amounts of free amino acids (aspartate, glutamate, asparagine, serine, histidine, methionine, cysteine, isoleucine, leucine, phenylalanine, tryptophan and lysine) available in the medium were consumed. At the same time, formate (3 mM) and L-alanine (0.08 mM) were produced. Weak increases in the hydroxyphenylacetate, phenylacetate, propionate, isobutyrate, isovalerate and pyruvate concentrations in the medium were also measured, together with small increases in the glycine and proline concentrations (probably obtained by degradation of the yeast-extract proteins). When the strain was cultivated in a medium containing a mixture of 20 amino acids (each at a concentration of 0.1 g l<sup>-1</sup>), weak growth was observed, and serine, proline, asparagine, tryptophan, cysteine, isoleucine, leucine and phenylalanine were partially consumed.

Thus, the results of the analysis of the metabolic end-products clearly indicated that the strain is a heterofermentative bacterium that degrades glucose via the butyric acid fermentation pathway. This fermentation pathway is widely distributed among the genus *Clostridium* and related genera. Catabolic end-products of glucose fermentation included the butyrate produced via the butyrate pathway, and acetate, ethanol, hydrogen and carbon dioxide produced via secondary

parallel pathways. However, acetone and 2-propanol were not produced, indicating that the acetone/2-propanol parallel pathway was not activated. The inhibition of this pathway could be due to the high concentrations of carbon dioxide produced in the medium, as has been described previously for many clostridia.

On the other hand, a significant amount of L-alanine was excreted into the medium during glucose fermentation. This phenomenon has been previously reported for some thermophilic micro-organisms belonging to the *Thermotogales* (Ravot *et al.*, 1996), the *Thermococcales* (Kengen *et al.*, 1994; Kobayashi *et al.*, 1995) and the *Clostridiales* (Fardeau *et al.*, 2001). It has been correlated, in most cases, with an increase in the H<sub>2</sub> partial pressure. The production of L-alanine could be a way of avoiding the possible 'toxic' or inhibiting effect of H<sub>2</sub> excesses, i.e. by attaching them to a carbon structure that would be secreted. Under cultivation in the presence of S<sup>0</sup>, an additional mechanism for preventing this inhibition could be the production of H<sub>2</sub>S, as has been observed in this work.

#### Susceptibility to antibiotics

Growth of isolate AM1114<sup>T</sup> was inhibited by vancomycin, chloramphenicol, rifampicin and penicillin G at the lowest concentrations tested (25 µg ml<sup>-1</sup>), and by streptomycin at 50 µg ml<sup>-1</sup>. The strain was resistant to 100 µg kanamycin ml<sup>-1</sup>.

#### DNA base composition

The G+C content of the genomic DNA of strain AM1114<sup>T</sup> was 24.2 ± 1 mol %.

#### Taxonomic position of the novel isolate

The closest phylogenetic relatives of strain AM1114<sup>T</sup> were *Clostridium halophilum* (Fendrich *et al.*, 1990) (91 % similarity) followed by *Clostridium formicoaceticum* (Andreesen *et al.*, 1970), *Clostridium aceticum* (Braun *et al.*, 1981), *Alkaliphilus transvaalensis* (Takai *et al.*, 2001) and *T. magadii* (Keybrin *et al.*, 1998) (mean similarity of 90 %). In addition to the phylogenetic distances (9–10 %), strain AM1114<sup>T</sup> exhibited significant genotypic and phenotypic differences from its nearest phylogenetic neighbours: (1) cells of strain AM1114<sup>T</sup> stain Gram-negative, whereas cells of *Clostridium halophilum*, *T. magadii* and *Alkaliphilus transvaalensis* stain Gram-positive; (2) *Clostridium aceticum* and *Clostridium formicoaceticum* are acetogens capable of chemolithoautotrophic and aromatic-dependent growth; (3) *T. magadii* and *Alkaliphilus transvaalensis* are true alkaliphilic micro-organisms; (4) *Clostridium halophilum* is halophilic; (5) the temperature ranges for growth are very different: the new isolate is thermophilic, and its closest phylogenetic relatives are mesophiles; (6) the G+C content of the genomic DNA of the isolate is 24.2 mol %, while those of the closest relatives range from 26.9 to 37.6 mol % (for

*Clostridium halophilum* and *T. magadii*, respectively). In addition, *T. magadii* was an asporogenous bacterium.

On the basis of the overall 16S rDNA dissimilarity value between strain AM1114<sup>T</sup> and the closest described relatives (9–10%) as well as the major phenotypic and genotypic differences, we propose that AM1114<sup>T</sup> should be assigned to a new genus within cluster XI of the *Clostridium* subphylum. Because of its origin in a hydrothermal vent, we name this genus *Caminiella*, and, because of its ability to form spores, we name the new species *Caminiella sporogenes*.

#### Description of *Caminiella* gen. nov.

*Caminiella* (Ca.mi'ni.cel'la. L. gen. n. *camini* of a chimney, relating to the hydrothermal chimney origin; L. fem. n. *cella* cell; N.L. fem. n. *caminiella* cell from a hydrothermal chimney).

Cells are rod-shaped, motile, and stain Gram-negative. Spore-forming thermophile, adapted to the pH and salinity of the ocean. Anaerobic and heterotrophic; able to ferment proteinaceous substrates and carbohydrates. 16S rDNA sequence comparisons locate the *Caminiella* genus in the domain *Bacteria*, within cluster XI of the lineage encompassing the genus *Clostridium* and related genera (Collins *et al.*, 1994).

#### Description of *Caminiella sporogenes* sp. nov.

*Caminiella sporogenes* (spo.rog.en'es. M.L. n. *spora* a spore; Gr. v. *gemmaio* produce; M.L. part. adj. *sporo-genes* spore-producing).

Cells are rod-shaped (3–10 µm long × 0.5–0.7 µm wide), motile by means of peritrichous flagella, and exhibit a Gram-negative cell wall ultrastructure. Sporulation is observed in the late stationary phase of growth. Growth occurs at 45–65 °C (optimum, 55–60 °C), at pH 4.5–8.0 (optimum, pH 7.5–8.0), and at sea salt concentrations of 20–60 g l<sup>-1</sup> (optimum, 25–30 g sea salt l<sup>-1</sup>). The optimal doubling time is around 45 min; the maximum cell yield is 8 × 10<sup>8</sup> cells ml<sup>-1</sup> in vials. Anaerobic. Able to ferment yeast extract, brain-heart infusion, D(+)–glucose, maltose, and, to a much lesser extent, peptone, galactose and a mixture of 20 amino acids. The main fermentation products on GYPS medium are H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, butyrate, ethanol, acetate, formate and L-alanine. The G+C content of the genomic DNA is 24.2 ± 1 mol%. The 16S rDNA similarity to *Clostridium halophilum* is 91%. The GenBank/EMBL accession number for the 16S rDNA sequence is AJ320233. The type strain, AM1114<sup>T</sup> (= CIP 107141<sup>T</sup> = DSM 14501<sup>T</sup>), was isolated from young entire *Alvinella pompejana* tubes attached to small fragments of chimney rocks that were collected from the hydrothermal site Elsa (HOT3) in the East-Pacific Rise (103° 56' 326 W, 12° 48' 200 N).

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the chief scientists of the French oceanographical cruise AMISTAD ('Advanced Microbiological Studies of Thermophiles: Adaptations and Diversity', 1999), C. Jeanthon, the Captain and the crew of *NO Atalante*, and the *DSV Nautille* pilots and support crew. This work was supported by the Région Bretagne and the French Dorsales Programme. Electron microscopy was performed at the 'service de Microscopie Electronique', IFR de biologie integrative, CNRS/Paris VI.

#### REFERENCES

- Adamse, A. D. (1980). New isolation of *Clostridium acetatum* (Wieringa). *Antonie Leeuwenhoek* **46**, 523–531.
- Andreesen, J. R., Gottschalk, G. & Schlegel, H. G. (1970). *Clostridium formicoaceticum* nov. spec. isolation, description and distinction from *C. acetatum* and *C. thermoaceticum*. *Arch Microbiol* **72**, 154–174.
- Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R. & Wolfe, R. S. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol Rev* **43**, 260–296.
- Baross, J. A. (1995). Isolation, growth and maintenance of hyperthermophiles. In *Archaea: a Laboratory Manual. Thermophiles*, pp. 15–23. Edited by F. T. Robb, A. R. Place, K. R. Sowers, H. J. Schreier, S. DasSarma & E. M. Fleischmann. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Blumentals, I. I., Itoh, M., Olson, G. J. & Kelly, R. M. (1990). Role of polysulfides in reduction of elemental sulfur by the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *Appl Environ Microbiol* **56**, 1255–1262.
- Braun, M., Mayer, F. & Gottschalk, G. (1981). *Clostridium acetatum* (Wieringa), a microorganism producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Arch Microbiol* **128**, 288–293.
- Broda, D. M., Saul, D. J., Bell, R. G. & Musgrave, D. R. (2000). *Clostridium algidixylanolyticum* sp. nov., a psychrotolerant, xylan-degrading, spore-forming bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 623–631.
- Buck, J. D. (1982). Nonstaining (KOH) method for determination of Gram reactions of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* **44**, 992–993.
- Cato, E. P., George, W. L. & Finegold, S. M. (1986). Genus *Clostridium* Prazmowski 1880, 23<sup>AL</sup>. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 1141–1200. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H. & Farrow, J. A. E. (1994). The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 812–826.
- Fardeau, M. L., Ollivier, B., Garcia, J. L. & Patel, B. K. C. (2001). Transfer of *Thermobacteroides leptospartum* and *Clostridium thermolacticum* as *Clostridium stercorarium* subsp. *leptospartum* subsp. nov., comb. nov. and *C. stercorarium* subsp. *thermolacticum* subsp. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1127–1131.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* **17**, 368–376.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **30**, 783–791.
- Fendrich, C., Hippe, H. & Gottschalk, G. (1990). *Clostridium halophilum* sp. nov. and *C. litorale* sp. nov., an obligate halophilic and a marine species degrading betaine in the Stickland reaction. *Arch Microbiol* **154**, 127–132.
- Galtier, N., Gouy, M. & Gautier, C. (1996). SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *CABIOS* **12**, 543–548.

## K. Alain and others

- Hippe, H., Andreesen, J. R. & Gottschalk, G. (1992). The genus *Clostridium* – nonmedical. In *The Prokaryotes*, vol. 2, pp. 1800–1866. Edited by A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer. New York: Springer.
- Jalava, J. & Eerola, E. (1999). Phylogenetic analysis of *Fusobacterium alocis* and *Fusobacterium sulci* based on 16S rRNA gene sequences: proposal of *Filifactor alocis* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. and *Eubacterium sulci* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 1375–1379.
- Jeanthon, C. (2000). Molecular ecology of hydrothermal vent microbial communities. *Antonie Leeuwenhoek* **77**, 117–133.
- Kengen, S. W. M. & Stams, A. J. M. (1994). Formation of L-alanine as a reduced end product in carbohydrate fermentation by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Arch Microbiol* **161**, 168–175.
- Kevbrin, V. V., Zhilina, T. N., Rainey, F. A. & Zavarzin, G. A. (1998). *Tindallia magadii* gen. nov., sp. nov.: an alkaliphilic anaerobic ammonifier from soda lake deposits. *Curr Microbiol* **37**, 94–100.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *J Mol Evol* **16**, 111–120.
- Kobayashi, T., Higuchi, S., Kimura, K., Kudo, T. & Horikoshi, K. (1995). Properties of glutamate dehydrogenase and its involvement in alanine production in a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus profundus*. *J Biochem* **118**, 587–592.
- Lake, J. A. (1987). A rate-independent technique for analysis of nucleic acid sequences: evolutionary parsimony. *Mol Biol Evol* **4**, 167–191.
- Li, Y., Mandelco, L. & Wiegel, J. (1993). Isolation and characterization of a moderately thermophilic anaerobic alkaliphile, *Clostridium paradoxum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **43**, 450–460.
- Li, Y., Engle, M., Weiss, N., Mandelco, L. & Wiegel, J. (1994). *Clostridium thermoalkaliphilum* sp. nov., an anaerobic and thermo-tolerant facultative alkaliphile. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 111–118.
- Longnecker, K. & Reysenbach, A. L. (2001). Expansion of the geographic distribution of a novel lineage of  $\epsilon$ -Proteobacteria to a hydrothermal vent site on the Southern East Pacific Rise. *FEMS Microbiol Ecol* **35**, 287–293.
- Lux, M. F. & Drake, H. L. (1992). Re-examination of the metabolic potentials of the acetogens *Clostridium aceticum* and *Clostridium formicoaceticum*: chemolithoautotrophic and aromatic-dependent growth. *FEMS Microbiol Lett* **74**, 49–56.
- Marmur, J. & Doty, P. (1962). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol* **5**, 109–118.
- Moyer, C. L., Dobbs, F. C. & Karl, D. M. (1995). Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl Environ Microbiol* **61**, 1555–1562.
- Moyer, C. L., Tiedje, J. M., Dobbs, F. C. & Karl, D. M. (1998). Diversity of deep-sea hydrothermal vent *Archaea* from Loihi Seamount, Hawaii. *Deep-Sea Res Part II* **45**, 303–317.
- Polz, M. F. & Cavanaugh, C. M. (1995). Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7232–7236.
- Pottu-Boumendil, J. (1989). Principes et méthodes de préparation. In *Techniques en Microscopie Électronique*, pp. 51–57. Paris: INSERM Editions.
- Powers, E. M. (1995). Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining Gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3756–3758.
- Raguénès, G., Pignet, P., Gauthier, G., Peres, A., Christen, R., Rougeaux, H., Barbier, G. & Guezennec, J. (1996). Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. *Appl Environ Microbiol* **62**, 67–73.
- Raguénès, G., Christen, R., Guézennec, J., Pignet, P. & Barbier, G. (1997). *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 989–995.
- Rainey, F. A. & Stackebrandt, E. (1993). 16S rDNA analysis reveals the phylogenetic diversity among the polysaccharolytic clostridia. *FEMS Microbiol Lett* **113**, 125–128.
- Rainey, F. A., Ward, N. L., Morgan, H. W., Toalster, R. & Stackebrandt, E. (1993). Phylogenetic analysis of anaerobic thermophilic bacteria: aid for their reclassification. *J Bacteriol* **175**, 4772–4779.
- Ravot, G., Ollivier, B., Fardeau, M.-L., Patel, B. K. C., Andrews, K. T., Magot, M. & Garcia, J.-L. (1996). L-alanine production from glucose fermentation by hyperthermophilic members of the domains *Bacteria* and *Archaea*: a remnant of an ancestral metabolism? *Appl Environ Microbiol* **62**, 2657–2659.
- Ravot, G., Magot, M., Fardeau, M. L., Patel, B. K. C., Thomas, P., Garcia, J. L. & Ollivier, B. (1999). *Fusibacter paucivorans* gen. nov., an anaerobic, thiosulfate-reducing bacterium from an oil-producing well. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 1141–1147.
- Reysenbach, A. L., Longnecker, K. & Kirshtein, J. (2000). Novel bacterial and archaeal lineages from an *in situ* growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3798–3806.
- Ryu, E. (1940). A simple method of differentiation between Gram-positive and Gram-negative organisms without staining. *Kiutsato Arch Exp Med* **17**, 58–63.
- Saitou, M. & Nei, M. (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406–425.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Stackebrandt, E., Kramer, I., Swiderski, J. & Hippe, H. (1999). Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **24**, 253–258.
- Takai, K. & Horikoshi, K. (1999). Genetic diversity of *Archaea* in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics* **152**, 1285–1297.
- Takai, K., Moser, D. P., Onstott, T. C., Spoelstra, N., Pfiffner, S. M., Dohnalkova, A. & Fredrickson, J. K. (2001). *Alkaliphilus transvaalensis* gen. nov., sp. nov., an extremely alkaliphilic bacterium isolated from a deep South African gold mine. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1245–1256.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–4680.
- Wery, N., Lesongeur, F., Pignet, P., Derennes, V., Cambon-Bonavita, M. A., Godfroy, A. & Barbier, G. (2001a). *Marinitoga camini* gen. nov., sp. nov., a rod-shaped bacterium belonging to the order *Thermotogales*, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol* **51**, 495–504.
- Wery, N., Moricet, J. M., Cuffe, V., Jean, J., Pignet, P., Lesongeur, F., Cambon-Bonavita, M. A. & Barbier, G. (2001b). *Caloranaerobacter azorensis* gen. nov., sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1789–1796.

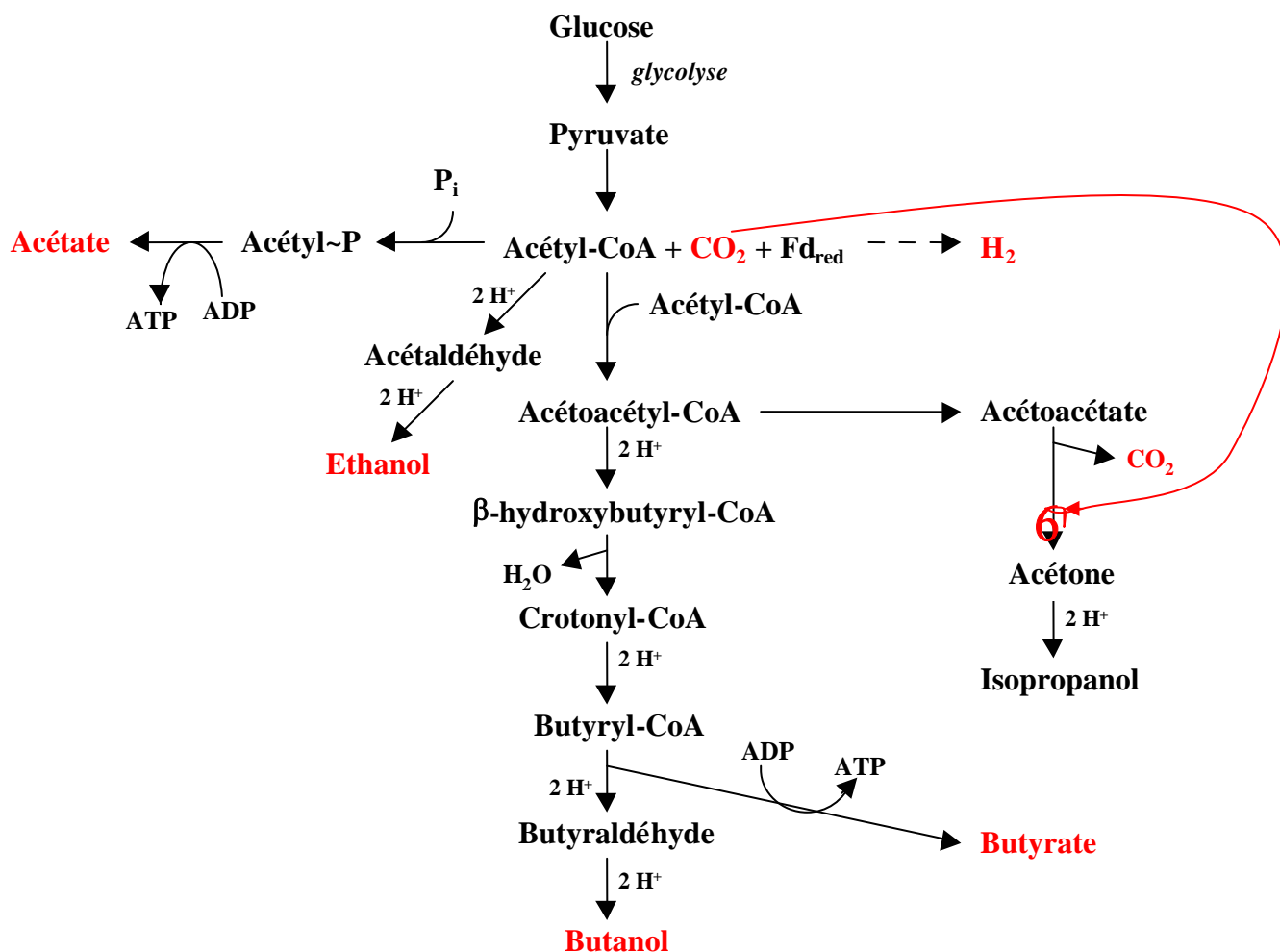


Fig. II.2. : Voie fermentaire du butyrate chez des bactéries du genre *Clostridium*.

Les produits issus de la fermentation du glucose par *Caminicella sporogenes* (souche AM1114<sup>T</sup>) sont indiqués en rouge sur la figure.

*Caminicella sporogenes* (souche AM1114<sup>T</sup>) est une bactérie hétérofermentaire qui semble utiliser la voie fermentaire du butyrate. En effet, lorsqu'elle consomme le glucose, cette souche produit du dihydrogène, du dioxyde de carbone, de l'acétate, du butanol, de l'éthanol et du butyrate (Fig. II.2.). Par contre, aucune production d'acétone ou d'isopropanol n'a été mesurée. La voie menant à ces produits pourrait être inhibée par le dioxyde carbone produit, un phénomène bien connu chez les clostridies.

**II.2. *Caminibacter hydrogeniphilus*, nouvelle espèce d'un nouveau genre de la sous-classe  $\epsilon$  des *Proteobacteria* (description de l'isolat AM1116<sup>T</sup>).**

Une seconde souche taxinomiquement intéressante a été isolée à partir d'un échantillon de tube d'*Alvinella pompejana*. Cette souche est la première  $\epsilon$ -*Proteobacteria* qui ait été isolée d'une source hydrothermale océanique profonde. Sa caractérisation a fait l'objet d'une publication.

Article 4 : **Karine Alain**, Joël Quérellou, Françoise Lesongeur, Patricia Pignet, Philippe Crassous, Gérard Raguénès, Valérie Cueff et Marie-Anne Cambon-Bonavita. *Caminibacter hydrogeniphilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an East-Pacific Rise hydrothermal vent (2002). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52 : 1317-1323.

---

## Article 4

### ***Caminibacter hydrogeniphilus* gen. nov., sp. nov., une nouvelle bactérie thermophile oxydant l'hydrogène isolée d'une source hydrothermale océanique profonde de la dorsale du Pacifique oriental**

Karine Alain, Joël Quérellou, Françoise Lesongeur, Patricia Pignet, Philippe Crassous, Gérard Raguénès, Valérie Cueff et Marie-Anne Cambon-Bonavita.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2002), 52 : 1317-1323.

---

## ***Caminibacter hydrogeniphilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an East Pacific Rise hydrothermal vent**

<sup>1,2,3</sup> Laboratoire de Microbiologie et de Biotechnologie des Extrémophiles, Département de Valorisation des Produits<sup>1</sup>, Laboratoire Environnement Profond, Direction des Ressources Océaniques<sup>2</sup> and Laboratoire "Biotechnologie et Molécules Marines", Département de Valorisation des Produits<sup>3</sup>, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France

Karine Alain,<sup>1</sup> Joël Querellou,<sup>1</sup> Françoise Lesongeur,<sup>1</sup> Patricia Pignet,<sup>1</sup> Philippe Crassous,<sup>2</sup> Gérard Raguénès,<sup>3</sup> Valérie Cuffe<sup>1</sup> and Marie-Anne Cambon-Bonavita<sup>1</sup>

Author for correspondence: Karine Alain. Tel: +33 2 98 22 45 53. Fax: +33 2 98 22 47 57.  
e-mail: Karine.Alain@ifremer.fr

**A novel thermophilic, anaerobic, hydrogen-oxidizing bacterium, designated strain AM1116<sup>T</sup>, was isolated from an East Pacific Rise hydrothermal vent sample. The cells were rod-shaped (1.0–1.5 × 0.5 µm), motile with polar flagella. They grew at temperatures between 50 and 70 °C (optimum 60 °C; doubling time approximately 1.5 h), at between pH 5.0 and 7.5 (optimum around pH 5.5–6.0) and in between 10 and 40 g NaCl l<sup>-1</sup> (optimum 20–25 g l<sup>-1</sup>). Cells grew chemolithoautotrophically in a H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> atmosphere (80:20; 200 kPa). Poor heterotrophic growth was observed on complex organic substrates. Elemental sulphur and nitrate served as electron acceptors, respectively yielding hydrogen sulphide and ammonia (doubling times were equal with the two electron acceptors). In contrast, when cystine was used as electron acceptor, growth was poor. The G+C content of the genomic DNA was 29 ± 1 mol%. Phylogenetic analyses of the 16S rRNA gene located the strain within the *ε-Proteobacteria*, in the bacterial domain. On the basis of 16S rDNA sequence comparisons, physiological and biochemical characteristics, it is proposed that the isolate should be described as the type species of a new genus, *Caminibacter* gen. nov., as *Caminibacter hydrogeniphilus* sp. nov. The type strain is strain AM1116<sup>T</sup> (= DSM 14510<sup>T</sup> = CIP 107140<sup>T</sup>).**

**Keywords:** deep-sea hydrothermal vent, thermophile, lithotroph, *ε-Proteobacteria*, *Caminibacter hydrogeniphilus*

### INTRODUCTION

The subclass *ε-Proteobacteria* comprises a complex group of Gram-negative, microaerophilic and/or anaerobic, chemoorganoheterotrophic or chemolithotrophic bacteria that are found in a variety of habitats. Many members of this group are eukaryotic pathogens. It currently contains two major lineages. The first lineage encompasses the genera *Arcobacter*, *Sulfurospirillum*, *Campylobacter*, *Thiovulum*, *Helicobacter* and *Wolinella*. In addition, some members of this lineage

are found to be the dominant ectosymbionts of some hydrothermal vent metazoans. The single phylotype recovered from nucleic acids extracted from epibionts of the Atlantic hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* was found to belong to the *ε-Proteobacteria* and also to be the major component of the free-living substrate community at this site (Polz & Cavanaugh, 1995). The filamentous ectosymbionts of the annelid polychaete *Alvinella pompejana* (Haddad *et al.*, 1995; Cary *et al.*, 1997), thriving at East Pacific Rise hydrothermal vents, were also found to belong to this lineage. These ectosymbionts were thought to contribute to protection against sulphide toxicity and/or to the nutrition of their host (Alayse-Danet *et al.*, 1987; Desbruyères *et al.*, 1998). Many attempts to culture them have been made in our laboratory (unpublished results) and in other laboratories (Priour

Published online ahead of print on 14 December 2001 as DOI 10.1099/ijs.0.02195-0.

The GenBank/EMBL accession number for the 16S rDNA sequence of strain AM1116<sup>T</sup> is AJ309655.



## K. Alain and others

& Jeanthon, 1987; Prieur *et al.*, 1990; Jeanthon & Prieur, 1990; Campbell *et al.*, 2001), under a wide range of temperatures in combination with different electron donors, electron acceptors and carbon sources, but, to date, none of them has been successful.

The second lineage contains environmental clone sequences from different hydrothermal communities that have been investigated by molecular phylogenetic approaches. Members of the  $\epsilon$ -*Proteobacteria* have been identified from both deep-sea Atlantic and Pacific vents (Polz & Cavanaugh, 1995; Moyer *et al.*, 1995; Reysenbach *et al.*, 2000; Longnecker & Reysenbach, 2001; Campbell *et al.*, 2001). In all the deep-sea hydrothermal vent microbial communities studied,  $\epsilon$ -*Proteobacteria* phylotypes were found to be dominant, accounting for 40–98% of the bacterial clone sequences (Moyer *et al.*, 1995; Reysenbach *et al.*, 2000; Longnecker & Reysenbach, 2001). Analyses of their numerical importance, using fluorescent *in situ* hybridization or 16S rRNA-based quantitative oligonucleotide hybridization techniques, have demonstrated that these  $\epsilon$ -proteobacteria were abundant, and even dominant, in the communities studied (Polz & Cavanaugh, 1995; Longnecker & Reysenbach, 2001). Their metabolism, their potential impact on the biogeochemistry and their place in the food chain of this ecosystem have remained undefined because, until recently (Campbell *et al.*, 2001), all attempts to culture them have failed.

In 1999, hydrothermal samples were collected from a deep-sea vent field located on the East Pacific Rise (13° N). In this paper, we describe the isolation and the characterization of a thermophilic member of the  $\epsilon$ -*Proteobacteria* belonging to the second lineage.

## METHODS

**Collection of samples.** In 1999, a deep-sea vent field located on the East Pacific Rise [Elsa (HOT3), 103° 56' W, 12° 48' N] was explored during the *AMISTAD* (*Advanced Microbiological Studies of Thermophiles: Adaptations and Diversity*) oceanographic cruise. Entire young tube samples of the hydrothermal vent polychaete *Alvinella pompejana*, which inhabits the surface of active sulphide structures ('chimneys', 'smokers'), attached to small fragments of chimney rock, were collected by the man-operated *Nautilie* submersible. The temperature ranged from 10 to 100 °C and the pressure was 26 MPa at the hydrothermal sampling site and the temperature recorded in the *Alvinella pompejana* colony was approximately 45–49 °C with a pH of 5.8. After collection, the samples were transferred immediately into an anaerobic chamber and then, after removal of the tube's inner contents, into 50 ml serum vials filled with a sterile solution of 3% (v/v) sea salts (Sigma). They were stored at 4 °C until enrichment in the laboratory.

**Culture medium and conditions.** The isolate was enriched and grown on KA22 medium containing (l<sup>-1</sup>): 30 g sea salts (Sigma), 2.54 g Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Merck), 1.95 g MES buffer (Sigma), 12 g elemental sulphur (Prolabo), 0.3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma), 0.5 ml vitamin mixture (Balch *et al.*, 1979), 10 ml trace element solution (Balch *et al.*, 1979) and

1 mg resazurin (Sigma). The pH of the medium was adjusted to 6.0 at room temperature before autoclaving and the medium was reduced with 0.5 g sodium sulphide l<sup>-1</sup> before inoculation. A mixture of H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20; 200 kPa) was used as the gas phase. Unless indicate otherwise, cultures were incubated at 60 °C.

**Enrichment and purification procedures.** Cultures were enriched anaerobically in KA22 medium inoculated with solid fragments of young *Alvinella pompejana* tubes, in 50 ml serum vials (Balch & Wolfe, 1976). They were incubated at 60 °C for 20 h under an atmosphere of H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20; 200 kPa). Cells were visualized by microscope observation. After enrichment, positive cultures were subcultured and then purified by use of the dilution-to-extinction technique (Baross, 1995). Purity of the isolate was confirmed by microscope observations and by cloning and sequencing of ten independent 16S rDNA clones.

**Observation of the culture and quantification.** Cells were observed under a light microscope (model BH2; Olympus) equipped with a phase-contrast oil immersion objective ( $\times 100$  magnification). Cells were quantified by direct cell counting using a Thoma chamber (depth 0.02 mm). Alternatively, cells were fixed with 1% (v/v) glutaraldehyde for 45 min at room temperature and stored at -20 °C before being counted in a Thoma chamber.

**Morphology.** The cells were Gram stained by use of the Bacto 3-step Gram stain Set-S (Difco). SpotTest flagella stain (Difco) was used for flagella detection. For scanning electron microscopy, cells were fixed with 10% formaldehyde (v/v) for 1 h and then harvested by centrifugation for 20 min at 1000 g. The pellets were resuspended in 23 g NaCl l<sup>-1</sup>, displayed on filters (0.22  $\mu$ m pore size, Nucleopore) and dried overnight at room temperature. Samples were then coated with gold (SCD040; Balzers) and examined with a scanning electron microscope (XL 30 LaB6; Philips).

**Determination of growth parameters.** To determine the optimum temperature, pH and NaCl for growth, cells were grown in Hungate tubes (27 ml; Belco) containing 5 ml KA22 medium and H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> at a pressure of 200 kPa in the headspace. Experiments were performed in thermostatic aluminium heating blocks (Bioblock) monitored with temperature probes placed in control tubes. To determine the effect of pH on growth, KA22 medium was modified with the following buffers (each at 10 mM; Sigma): for pH 3 and 4, no buffer; for pH 5, 5.5 and 6, MES; for pH 6.5 and 7, PIPES; for pH 7.5 and 8, HEPES; for pH 8.5 and 9, AMPSO. Sodium sulphide was added in the anaerobic chamber and, if necessary, the pH was adjusted with 0.1 M HCl or 0.1 M NaOH. To determine the effect of salinity on growth, KA22 medium was prepared without sea salts and with different concentrations of NaCl. For this experiment, the following salts were added to the medium (l<sup>-1</sup>): 1.0 g NH<sub>4</sub>Cl, 0.2 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.1 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.1 g KCl and 0.3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Cells were then incubated at the optimum temperature and pH for growth. The effects of temperature, pH and salinity were determined by measuring growth rates calculated by use of linear regression analyses from four to seven points along the logarithmic portions of the growth curves. All growth experiments were carried out in triplicate.

**Determination of growth requirements.** The ability of isolate AM1116<sup>T</sup> to use various electron donors was investigated. Formate (20 mM), acetate (20 mM), 0.5% methanol (v/v) or 2 g yeast extract l<sup>-1</sup> were added to the KA22 medium with a N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gas phase (80:20, 200 kPa).

The ability of the novel isolate to grow in the presence of different electron acceptors was tested on KA22 medium prepared without sulphur in which  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  was replaced with  $1 \text{ g NH}_4\text{Cl l}^{-1}$ . Elemental sulphur and L-cystine were tested at  $12 \text{ g l}^{-1}$ , polysulphides at  $10 \text{ mM}$  (Blumentals *et al.*, 1990) and thiosulphate, sulphate, nitrate and nitrite at  $20 \text{ mM}$ . The headspace gas was  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (80:20; 200 kPa). Microaerobic media, containing a gas phase of  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (200 kPa) and low concentrations of oxygen [from approximately 0.05 to 0.5% (v/v)  $\text{O}_2$ ], were prepared without resazurin and sodium sulphide.

The ability of strain AM1116<sup>T</sup> to utilize different carbon sources was investigated by adding the following compounds to the KA22 medium: formate (20 mM), acetate (20 mM), lactate (0.5% v/v), methanol (0.5% v/v), yeast extract (2 g l<sup>-1</sup>), tryptone (2 g l<sup>-1</sup>), brain/heart infusion (2 g l<sup>-1</sup>), peptone (2 g l<sup>-1</sup>), gelatin (2 g l<sup>-1</sup>), glycogen (2 g l<sup>-1</sup>), D-(+)-glucose (2 g l<sup>-1</sup>), D-(−)-fructose (2 g l<sup>-1</sup>), D-(+)-galactose (2 g l<sup>-1</sup>), maltose (2 g l<sup>-1</sup>), starch (2 g l<sup>-1</sup>), chitin (2 g l<sup>-1</sup>), dextran (2 g l<sup>-1</sup>), xylan (2 g l<sup>-1</sup>), cellulose (2 g l<sup>-1</sup>), D-(+)-cellulose (2 g l<sup>-1</sup>) and a mixture of 20 amino acids (each at 0.1 g l<sup>-1</sup>). This experiment was performed under a  $\text{H}_2$  (100%, 200 kPa) gas phase. All these tests were performed in serum vials and positive cultures were transferred to confirm growth. Growth was determined by direct cell counts in a Thoma chamber (depth 0.02 mm) with a phase-contrast microscope.

**Determination of  $\text{H}_2\text{S}$ .**  $\text{H}_2\text{S}$  formation was detected by the addition of  $500 \mu\text{l } 5 \text{ mM CuSO}_4/50 \text{ mM HCl}$  to 0.2 ml of the culture. A brown precipitate demonstrated the presence of  $\text{H}_2\text{S}$ .

**Determination of ammonia.**  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  formation was analysed as described by Koroleff (1969), with the modifications reported by Aminot & Chaussepied (1983). This method is based on the formation of indophenol blue, which absorbs at 630 nm in the presence of  $\text{NH}_3$  or  $\text{NH}_4^+$ . For this experiment, cells were grown on KA22 medium prepared without sulphur and  $\text{NO}_3^-$  was therefore the sole electron acceptor. This test was carried out in duplicate and repeated twice.

**Susceptibility to antibiotics.** Sensitivity to antibiotics was estimated by using 25, 50, 75 and  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  solutions of the following antibiotics: chloramphenicol, kanamycin, penicillin G, rifampicin, streptomycin and vancomycin. Antibiotic solutions were added to KA22 medium just before inoculation. When the antibiotic was diluted in ethanol (chloramphenicol) or DMSO (rifampicin), the same volume of solvent was added to control cultures.

**DNA extraction and purification.** Genomic DNA was extracted as described by Wery *et al.* (2001). The concentration and purity of the genomic DNA obtained were estimated by use of a GenQuant II spectrophotometer (Pharmacia) at 260, 280 and 320 nm. The quality of the extraction was checked on a 0.8% (w/v) agarose gel containing  $0.5 \mu\text{g}$  ethidium bromide  $\text{ml}^{-1}$ .

**DNA base composition.** The DNA was purified by caesium chloride gradient centrifugation (Sambrook *et al.*, 1989) and its purity was checked spectrophotometrically. The G+C content of the genomic DNA was determined from the melting point according to Marmur & Doty (1962), under the conditions reported by Raguénès *et al.* (1997). A calibration curve was constructed by use of ultrapure DNA from *Escherichia coli* strain B (50 mol% G+C), *Clostridium perfringens* (26.5 mol% G+C) and *Micrococcus luteus* (72 mol% G+C) as standards (Sigma).

**Amplification of the 16S rDNA.** The 16S rDNA was selectively amplified from purified genomic DNA by PCR with oligonucleotide primers designed to anneal to conserved positions in the 3' and 5' regions of the 16S rRNA genes. The forward primer was SAdir (5'-AGAGTTTGATCATGGC-TCAGA-3'), corresponding to positions 8–28 in the *E. coli* 16S rRNA, and the reverse primer was S17rev (5'-GTTAC-CTTGTTACGACTT-3'), corresponding to positions 1493–1509. The initial denaturation step consisted of heating the reaction mixture to  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  for 3 min. This was followed by 30 cycles of denaturation at  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  for 1 min, annealing at  $49 \text{ }^\circ\text{C}$  for 90 s and extension at  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  for 2 min. A final extension step was carried out at  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  for 6 min. The PCR products were analysed on 0.8% (w/v) agarose TAE gels (0.04 M Tris/acetate, 0.001 M EDTA) containing  $0.8 \mu\text{g}$  ethidium bromide  $\text{ml}^{-1}$  and recorded with a Fluor-S multiImager (Bio-Rad).

**16S rDNA sequence analysis.** The PCR product was sequenced bidirectionally with the primers described by Raguénès *et al.* (1996) by Genome Express SA (Grenoble, France) with an automatic DNA analysis system (Applied Biosystems). Some 1414 positions of the 16S rDNA were determined. The 16S rDNA sequence of strain AM1116<sup>T</sup> was compared to the sequences of representative proteobacteria and clones from hydrothermal vents. The CLUSTAL W method with weighted residues was used to align the sequences and to calculate similarity levels (Thompson *et al.*, 1994). Alignment was refined manually by use of the multiple sequence alignment editor SEAVIEW and phylogenetic reconstruction was achieved by use of PHYLO\_WIN (Galtier *et al.*, 1996) with the following settings: Jukes–Cantor distance matrix and successively the neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987), maximum-parsimony (Lake, 1987) and maximum-likelihood (Felsenstein, 1981) methods. Some 1104 nucleotides were included in the phylogenetic analysis. Bootstrap values were determined according to Felsenstein (1985). *E. coli* K-12 (J01695), *Vibrio diabolus* CNCM I-1629<sup>T</sup> (X99762) and the sequence of the uncultured symbiont of *Riftia pachyptila* (M99451) were used as outgroups.

## RESULTS AND DISCUSSION

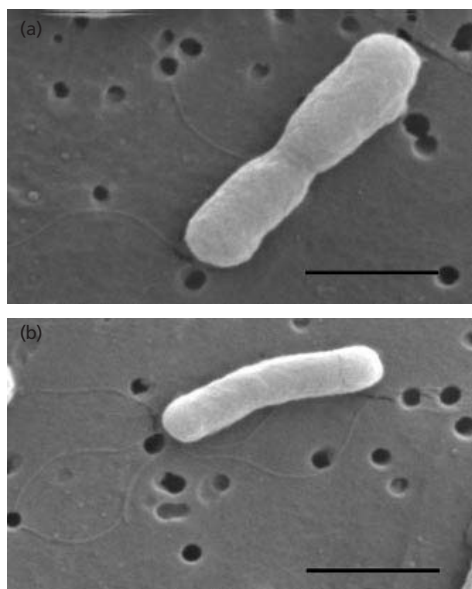
### Enrichment and isolation

Enrichment cultures were performed on KA22 medium with entire young *Alvinella pompejana* tubes (cleaned of their inner contents) attached to small fragments of chimney rock. After 20 h incubation, growth was observed at  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  under a  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (80:20; 200 kPa) gas phase. The enriched culture consisted of dense populations of short, rod-shaped, motile cells. It was subcultured successfully. One isolate was purified with five serial dilutions to extinction and is referred to as strain AM1116<sup>T</sup> (= DSM 14510<sup>T</sup> = CIP 107140<sup>T</sup>). The purity of the isolate was confirmed by microscope observations and by cloning and sequencing of ten independent 16S rDNA clones.

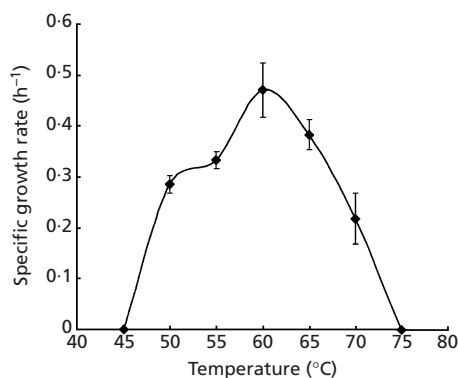
### Morphological and physiological characteristics

Scanning electron microscopy and phase-contrast microscopy indicated that cells of isolate AM1116<sup>T</sup> were motile rods, about 1.0–1.5  $\mu\text{m}$  long and 0.5  $\mu\text{m}$  wide. The cells were Gram-negative and appeared to divide

K. Alain and others

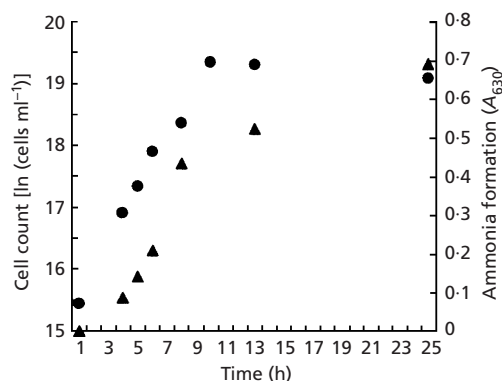


**Fig. 1.** Scanning electron micrographs of strain AM1116<sup>T</sup> in the mid-exponential phase of growth, showing division by constriction (a) and polar flagella (b). Bars, 1 µm.



**Fig. 2.** Effect of temperature on the specific growth rate of strain AM1116<sup>T</sup>. The cells were grown in KA22 medium (pH 6.0, 25 g NaCl l<sup>-1</sup>). Growth rates were calculated by performing linear regression analysis along the logarithmic part of the growth curves.

by constriction (Fig. 1a). As observed during scanning electron microscope analyses (Fig. 1b) and confirmed by the SpotTest flagella stain kit (Difco) used for flagella detection, the flagella were polar. Strain AM1116<sup>T</sup> grew at temperatures between 50 and 70 °C with optimum growth at around 60 °C; no growth was observed at 45 or 75 °C (Fig. 2). Strain AM1116<sup>T</sup> required NaCl for growth; growth was observed at NaCl concentrations of between 10 and 40 g l<sup>-1</sup>. The optimum NaCl concentration was between 20 and

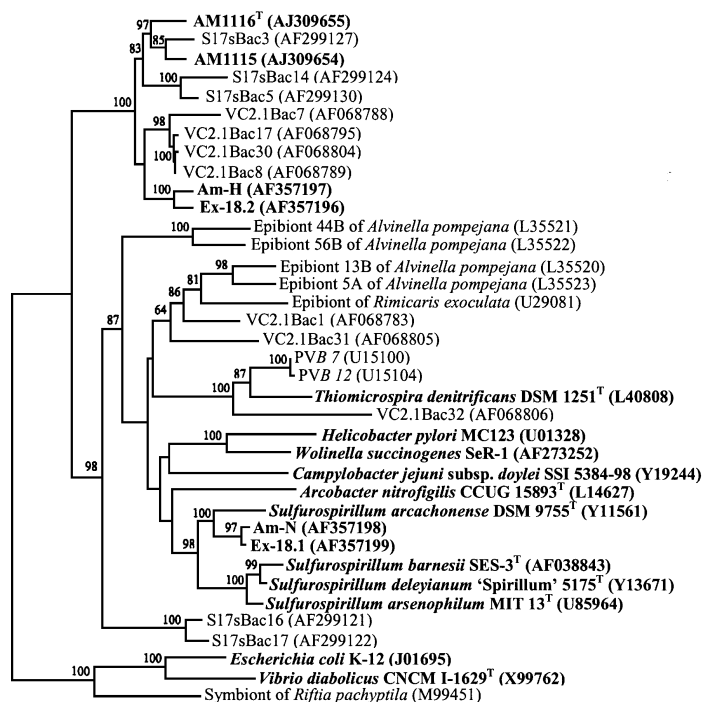


**Fig. 3.** Ammonia formation during the growth of isolate AM1116<sup>T</sup>. The growth curve (●) and ammonia formation (▲) (determined by absorbance at 630 nm of indophenol blue, demonstrating the formation of NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) are shown.

25 g l<sup>-1</sup>. Growth did not occur at 5 or 45 g NaCl l<sup>-1</sup>. Growth occurred at between pH 5.0 and 7.5 and the optimum pH was around 5.5–6.0, which corresponded with the pH recorded in the *Alvinella pompejana* colony during sampling.

#### Metabolic properties

Strain AM1116<sup>T</sup> was an anaerobic, obligately hydrogen-oxidizing bacterium, unable to grow under microaerophilic conditions. It was unable to grow organotrophically on the complex substrates or small organic molecules tested. Growth of the novel isolate was optimal in the presence of elemental sulphur or nitrate as the terminal electron acceptor (doubling times were equal). H<sub>2</sub>S was produced as a result of sulphur reduction. When nitrate was the terminal electron acceptor, isolate AM1116<sup>T</sup> produced high levels of ammonia or ammonium, which accumulated in the culture medium (Fig. 3). These data suggest that the newly isolated strain is an obligately chemolithotrophic bacterium that produces energy by reducing elemental sulphur or nitrate and by using molecular hydrogen as an electron donor. Of the other electron acceptors tested with H<sub>2</sub> as an electron donor and CO<sub>2</sub> as a carbon source, strain AM1116<sup>T</sup> was found to reduce cystine slightly (production of H<sub>2</sub>S), but not sulphate, thiosulphate or polysulphides. Very strong autotrophic growth occurred with CO<sub>2</sub> and weak heterotrophic growth occurred on yeast extract, tryptone, brain/heart infusion, peptone and gelatin. Limited growth observed on complex proteinaceous substrates probably resulted from decarboxylation of amino acids. The other carbon sources tested did not support growth. In optimum growth conditions (with CO<sub>2</sub> as a carbon source, H<sub>2</sub> as an electron donor, sulphur or nitrate as a terminal electron acceptor and at optimum temperature, pH and salinity), the final concentration was approximately 2.5 × 10<sup>8</sup> cells ml<sup>-1</sup> in vials.



**Fig. 4.** Phylogenetic position of strain AM1116<sup>T</sup> within the  $\epsilon$ -Proteobacteria. The alignment was performed with 16S rDNA sequences of representative species of the  $\epsilon$ -Proteobacteria (in bold) and uncultured  $\epsilon$ -proteobacteria from Atlantic and Pacific hydrothermal vents. Three species from the  $\gamma$ -Proteobacteria were chosen as outgroups. Accession numbers and strains are noted in parentheses. The topology shown corresponds to an unrooted tree obtained by a neighbour-joining algorithm (Jukes & Cantor corrections) established using PHYLONWIN. A total of 1104 nucleotides were included in the phylogenetic analysis. Bootstrap values are displayed on the branches. Bar, 7.2 nt substitutions per 100 nt. The positioning of the novel isolate was confirmed by maximum-parsimony and maximum-likelihood methods.

0-072

### Susceptibility to antibiotics

Growth of isolate AM1116<sup>T</sup> was inhibited by 25  $\mu$ g streptomycin, vancomycin, chloramphenicol, rifampicin and penicillin G ml<sup>-1</sup>. The strain was resistant to 100  $\mu$ g kanamycin ml<sup>-1</sup>.

### DNA base composition

The G+C content of the genomic DNA of strain AM1116<sup>T</sup> was 29  $\pm$  1 mol%.

### Phylogenetic analysis and taxonomic position of the novel isolate

The almost-complete sequence (1414 bp) of the 16S rDNA of strain AM1116<sup>T</sup> was determined. Phylogenetic analyses of the 16S rRNA gene located the strain within the  $\epsilon$ -Proteobacteria, in the bacterial domain. The phylogenetic position of the organism was determined by comparing the 16S rDNA sequence of strain AM1116<sup>T</sup> to those of 14 representative species of the  $\epsilon$ -Proteobacteria and 19 16S rDNA sequences of uncultured members of the  $\epsilon$ -Proteobacteria from Atlantic and Pacific hydrothermal vents. The three algorithms used (neighbour-joining, maximum-parsimony and maximum-likelihood) showed that the sequence of AM1116<sup>T</sup> belonged to a lineage clearly separated from the lineage including the majority of the  $\epsilon$ -Proteobacteria described (Fig. 4). This novel

lineage has been discovered recently by molecular methods (Polz & Cavanaugh, 1995; Moyer *et al.*, 1995; Reysenbach *et al.*, 2000; Longnecker & Reysenbach, 2001). It encompasses only bacteria from deep-sea Atlantic and Pacific vents.

The novel isolate was very closely related to several 16S rDNA sequences from deep-sea Atlantic vents (VC2.1Bac7, VC2.1Bac17, VC2.1Bac30, VC2.1Bac8 and several other sequences not marked on the phylogenetic tree; Reysenbach *et al.*, 2000) and south-eastern Pacific vents (S17sBac3, S17sBac14, S17sBac5 and several other sequences not marked on the phylogenetic tree; Longnecker & Reysenbach, 2001). They shared 92–95% 16S rDNA sequence similarity. Moreover, the strain was phylogenetically affiliated to two members of the  $\epsilon$ -Proteobacteria found recently in enrichment cultures from the hydrothermal vent polychaete *Alvinella pompejana* from the East Pacific Rise 13° N (strain Am-H) and from chimney samples from the Guaymas basin (strain Ex-18.2) (Campbell *et al.*, 2001). The level of 16S rDNA sequence similarity between strain AM1116<sup>T</sup> and these strains was 92–93%. Some of the metabolic properties of the novel isolate were similar to those of strains Am-H and Ex-18.2, which have been partially characterized and which are sulphur-reducing bacteria. Strain Am-H has been found to grow chemolithoautotrophically with H<sub>2</sub> as the electron donor and CO<sub>2</sub> as the carbon source, as is the case for strain AM1116<sup>T</sup>. However, although

## K. Alain and others

strain AM1116<sup>T</sup> shared some characteristics with these two cultivable phylogenetic relatives, it also exhibited significant metabolic and physiological differences, notably its temperature range for growth. Strains Am-H and Ex-18.2 are moderate thermophiles (the optimum growth temperature of strain Am-H was 45 °C and the optimum growth temperature of strain Ex-18.2 has not been determined, but the strain was isolated at 45 °C). Moreover, these two isolates differed from strain AM1116<sup>T</sup> in their ability to grow on formate as the energy and carbon source. In addition, strain Am-H has been found to grow chemoorganoheterotrophically on pyruvate as the electron donor and carbon source. If they belong to the same family as AM1116<sup>T</sup>, strains Am-H and Ex-18.2 probably correspond to another genus.

Strain AM1116<sup>T</sup> was closely related to strain AM1115 (95% 16S rDNA similarity), which was isolated in our laboratory (unpublished data) from the same sample as AM1116<sup>T</sup> and under the same conditions except that the enrichment temperature was 45 °C. Similar to strain AM1116<sup>T</sup>, this strain is a chemolithoautotrophic bacterium from the microenvironment of *Alvinella pompejana* that produces energy by using molecular hydrogen as an electron donor and by reducing elemental sulphur (unpublished data).

Although strain AM1116<sup>T</sup> was isolated from a sample taken from the environment of *Alvinella pompejana*, it belongs to a phylotype that is very distantly related to the filamentous epibiotic  $\epsilon$ -proteobacteria of this meta-zoan (Cary *et al.*, 1997) (mean similarity of 85–86%). Despite the fact that our isolate was found to be associated with the tubes of *Alvinella pompejana*, we hypothesize that it is not dependent on them.

On the basis of the overall 16S rRNA dissimilarity value of 17% between strain AM1116<sup>T</sup> and the closest fully described relatives (members of the genus *Sulfurospirillum*) and the fact that strain AM1116<sup>T</sup> and its relatives are distributed widely at deep-sea hydrothermal vents, we propose that strain AM1116<sup>T</sup> should be assigned as the type strain of the type species of a novel genus within the  $\epsilon$ -Proteobacteria. Because of its hydrothermal vent origin and its ability to grow lithotrophically on H<sub>2</sub>, we have named the novel species *Caminibacter hydrogeniphilus* gen. nov., sp. nov. A novel family will have to be established in the future to encompass this genus and related genera yet to be described.

#### Ecological significance

As indicated by their dominance in the molecular surveys that have studied hydrothermal vent communities (Polz & Cavanaugh, 1995; Moyer *et al.*, 1995; Reysenbach *et al.*, 2000; Longnecker & Reysenbach, 2001), members of the  $\epsilon$ -Proteobacteria certainly have a significant role in the ecology of hydrothermal vents. Their widespread distribution and autotrophic abilities suggest that strain AM1116<sup>T</sup> and its relatives are probably a major source of primary productivity in

hydrothermal vents. Their ability to use H<sub>2</sub> as an electron donor and S<sup>0</sup> as an electron acceptor may reflect the physiological remains of ancient metabolic pathways that first evolved in primitive organisms because of the ready availability of these inorganic compounds on the primitive Earth. Their ability to reduce elemental sulphur and nitrates in some cases enables them to contribute specifically to the sulphur and nitrogen cycles and more generally to biogeochemical cycling in deep-sea hydrothermal vents. Considering the wide geochemical gradients (nutrients, temperatures, oxygen etc.) present at deep-sea hydrothermal vents, the metabolic and physiological abilities of the  $\epsilon$ -proteobacteria from these extreme environments are probably more diverse than has so far been described. Fully appreciating the diversity among the members of the  $\epsilon$ -Proteobacteria and more widely among the entire microbial population in deep-sea environments is still a substantial challenge.

#### Description of *Caminibacter* gen. nov.

*Caminibacter* (Ca'mi.ni.bac.ter. L. gen. n. *camini* of a chimney; N.L. n. *bacter* masc. equivalent of Gr. neut. n. *bakterion* rod, staff; N.L. n. *Caminibacter* rod from a hydrothermal chimney, relating to the origin of the type species).

Cells are rod-shaped, motile and stain Gram-negative. They are thermophiles, adapted to the salinity of the ocean. Anaerobic, hydrogen-oxidizing, sulphur-reducing and denitrifying. Chemolithoautotrophic to mixotrophic. 16S rDNA sequence comparisons locate the genus within the  $\epsilon$ -Proteobacteria in the bacterial domain. This genus is not closely related to any described genera. The type and only species is *Caminibacter hydrogeniphilus*.

#### Description of *Caminibacter hydrogeniphilus* sp. nov.

*Caminibacter hydrogeniphilus* (hy.dro.ge.ni.phil'us. N.L. *hydrogenium* hydrogen; Gr. n. *philos* friend; N.L. adj. *hydrogeniphilus* hydrogen-liking, referring to its ability to grow lithotrophically on H<sub>2</sub>).

Cells are rod-shaped (1.0–1.5 × 0.5 µm), motile by polar flagella and stain Gram-negative. Cells divide by constriction. Growth occurs at between 50 and 70 °C (optimum 60 °C), pH 5.0 and 7.5 (optimum 5.5–6.0) and 10 and 40 g NaCl l<sup>-1</sup> (optimum 20–25 g NaCl l<sup>-1</sup>). Doubling time under optimum growth conditions is around 1.5 h; maximum cell yield is 2.5 × 10<sup>8</sup> cells ml<sup>-1</sup> in vials. Anaerobic. Obligately hydrogen-oxidizing. Chemolithoautotrophic to mixotrophic (heterotrophic growth on yeast extract, tryptone, peptone, brain/heart infusion and gelatin). Reduces S<sup>0</sup> and nitrate and, to a lesser extent, cystine. The DNA G+C content of the type strain is 29 ± 1 mol%. The GenBank/EMBL accession number for the 16S rDNA sequence of the type strain is AJ309655.

The type strain, strain AM1116<sup>T</sup> (= DSM 14510<sup>T</sup> = CIP 107140<sup>T</sup>), was isolated from young *Alvinella*

*pompejana* tubes attached to fragments of chimney rock that were collected from the hydrothermal site Elsa (HOT3) in the East Pacific Rise (103° 56' W, 12° 48' N).

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the chief scientists of the French oceanographical cruise *AMISTAD* (1999), C. Jeanthon, the captain and crew of the NO *L'Atalante* and the pilots and support crew of the DSV *Nautile*. This work was supported by Région Bretagne.

## REFERENCES

- Alayse-Danet, A.-M., Desbruyères, D. & Gaill, F. (1987). The possible nutritional or detoxification role of the epibiotic bacteria of alvinellid polychaetes: review of current data. *Symbiosis* **4**, 51–62.
- Aminot, A. & Chaussepied, M. (1983). Dosage de l'azote ammoniacal. In *Manuel des Analyses Chimiques en Milieu Marin*, pp. 107–118. BND/Documentation, CNEXO, France.
- Balch, W. E. & Wolfe, R. S. (1976). New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminantium* in a pressurized atmosphere. *Appl Environ Microbiol* **32**, 781–791.
- Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R. & Wolfe, R. S. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol Rev* **43**, 260–296.
- Baross, J. A. (1995). Isolation, growth and maintenance of hyperthermophiles. In *Archaea: a Laboratory Manual. Thermophiles*, pp. 15–23. Edited by F. T. Robb & A. R. Place. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Blumentals, I. I., Itoh, M., Olson, G. J. & Kelly, R. M. (1990). Role of polysulfides in reduction of elemental sulfur by the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *Appl Environ Microbiol* **56**, 1255–1262.
- Campbell, B. J., Jeanthon, C., Kostka, J. E., Luther, G. W., III & Cary, S. C. (2001). Growth and phylogenetic properties of novel bacteria belonging to the epsilon subdivision of the *Proteobacteria* enriched from *Alvinella pompejana* and deep-sea hydrothermal vents. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4566–4572.
- Cary, S. C., Cottrell, M. T., Stein, J. L., Camacho, F. & Desbruyères, D. (1997). Molecular identification and localization of filamentous symbiotic bacteria associated with the hydrothermal vent annelid *Alvinella pompejana*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 1124–1130.
- Desbruyères, D., Chevaldonné, P., Alayse, A.-M. & 15 other authors (1998). Biology and ecology of the "Pompeii worm" (*Alvinella pompejana* Desbruyères and Laubier), a normal dweller of an extreme deep-sea environment: a synthesis of current knowledge and recent developments. *Deep-sea Res Part II* **45**, 383–422.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* **17**, 368–376.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **30**, 783–791.
- Galtier, N., Gouy, M. & Gautier, C. (1996). SEAVIEW and PHYLO-WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* **12**, 543–548.
- Haddad, A., Camacho, F., Durand, P. & Cary, S. C. (1995). Phylogenetic characterization of the epibiotic bacteria associated with the hydrothermal vent polychaete *Alvinella pompejana*. *Appl Environ Microbiol* **61**, 1679–1687.
- Jeanthon, C. & Prieur, D. (1990). Susceptibility to heavy metals and characterization of heterotrophic bacteria isolated from two hydrothermal vent polychaetes, *Alvinella pompejana* and *Alvinella caudata*. *Appl Environ Microbiol* **56**, 3308–3314.
- Koroleff, F. (1969). Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. In *ICES, C. M. 1969/C: 9 Hydr. Comm.* Copenhagen: International Council for the Exploration of the Sea.
- Lake, J. A. (1987). A rate-independent technique for analysis of nucleic acid sequences: evolutionary parsimony. *Mol Biol Evol* **4**, 167–191.
- Longnecker, K. & Reysenbach, A. L. (2001). Expansion of the geographic distribution of a novel lineage of *e-Proteobacteria* to a hydrothermal vent site on the southern East Pacific Rise. *FEMS Microbiol Ecol* **35**, 287–293.
- Marmur, J. & Doty, P. (1962). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol* **5**, 109–118.
- Moyer, C. L., Dobbs, F. C. & Karl, D. M. (1995). Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl Environ Microbiol* **61**, 1555–1562.
- Polz, M. F. & Cavanaugh, C. M. (1995). Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7232–7236.
- Prieur, D. & Jeanthon, C. (1987). Preliminary study of heterotrophic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal vent invertebrates: *Alvinella pompejana* (polychaete) and *Bathymodiolus thermophilus* (bivalve). *Symbiosis* **4**, 87–98.
- Prieur, D., Chamroux, S., Durand, P., Erauso, G., Fera, P., Jeanthon, C., Le Borgne, L., Mével, G. & Vincent, P. (1990). Metabolic diversity in epibiotic flora associated with the pompeii worms, *Alvinella pompejana* and *Alvinella caudata* (Polychaeta: Annelida) from deep-sea hydrothermal vents. *Mar Biol* **106**, 361–367.
- Raguénès, G., Pignet, P., Gauthier, G., Peres, A., Christen, R., Rougeaux, H., Barbier, G. & Guezennec, J. (1996). Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. *Appl Environ Microbiol* **62**, 67–73.
- Raguénès, G., Christen, R., Guézennec, J., Pignet, P. & Barbier, G. (1997). *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 989–995.
- Reysenbach, A. L., Longnecker, K. & Kirshtein, J. (2000). Novel bacterial and archaeal lineages from an *in situ* growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3798–3806.
- Saitou, M. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406–425.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–4680.
- Wery, N., Lesongeur, F., Pignet, P., Derennes, V., Cambon-Bonavita, M.-A., Godfroy, A. & Barbier, G. (2001). *Marinitoga camini* gen. nov., sp. nov., a rod-shaped bacterium belonging to the order *Thermotogales*, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 495–504.

**II.3. *Desulfurobacterium crinifex*, une nouvelle espèce productrice de polymère formant des macrostructures atypiques *in vitro* (description de l'isolat NE1206<sup>T</sup>).**

Le troisième isolat ayant fait l'objet d'une caractérisation appartient au genre *Desulfurobacterium*. Il présente la particularité de former *in vitro* des structures macroscopiques filamenteuses dans lesquelles les cellules sont groupées en agrégats sphériques. Cet isolat a fait l'objet d'une étude descriptive décrite dans l'article 5.

Article 5 : **Karine Alain**, Sophie Rolland, Philippe Crassous, Françoise Lesongeur, Magali Zbinden, Christian Le Gall, Anne Godfroy, Antoine Pagé, S. Kim Juniper, Marie-Anne Cambon-Bonavita, Francis Duchiron et Joël Quérellou (2003). *Desulfurobacterium crinifex* sp. nov., a novel thermophilic, pinkish-streamer forming, chemolithoautotrophic bacterium isolated from a Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent and amendment of the genus *Desulfurobacterium*. *Extremophiles*, 7 :361-370.

---

## Article 5

***Desulfurobacterium crinifex* sp. nov., une nouvelle bactérie thermophile  
chimolithoautotrophe, formant des macrostructures, isolée d'une source hydrothermale  
océanique profonde de la dorsale Juan de Fuca.  
Amendement du genre *Desulfurobacterium*.**

**Karine Alain**, Sophie Rolland, Philippe Crassous, Françoise Lesongeur, Magali Zbinden, Christian Le Gall,  
Anne Godfroy, Antoine Pagé, S. Kim Juniper, Marie-Anne Cambon-Bonavita,  
Francis Duchiron et Joël Quérellou.

Extremophiles (2003), 7: 361-370.

---



## Extremophiles

October 2003; 7(5) : 361 - 370

<http://dx.doi.org/10.1007/s00792-003-0329-4>

© Springer-Verlag Tokyo Inc.

Archimer <http://www.ifremer.fr/docelec/>

Archive Institutionnelle de l'Ifremer

The original publication is available at <http://www.springerlink.com>

---

### ***Desulfurobacterium crinifex* sp. nov., a novel thermophilic, pinkish-streamer forming, chemolithoautotrophic bacterium isolated from a Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent and amendment of the genus *Desulfurobacterium***

Karine Alain<sup>A1</sup>, Sophie Rolland<sup>A1</sup>, Philippe Crassous<sup>A2</sup>, Françoise Lesongeur<sup>A1</sup>, Magali Zbinden<sup>A3</sup>, Christian le Gall<sup>A2</sup>, Anne Godfroy<sup>A1</sup>, Antoine Page<sup>A1 A4</sup>, S.Kim Juniper<sup>A4</sup>, Marie-Anne Cambon-Bonavita<sup>A1\*</sup>, Francis Duchiron<sup>A5</sup>, Joël Querellou<sup>A1</sup>

<sup>A1</sup> Laboratoire de Microbiologie et de Biotechnologie des Extrêmophiles, Département de Valorisation des Produits IFREMER, Centre de Brest BP 70 29280 Plouzané France

<sup>A2</sup> Département Environnement Profond Plouzané France

<sup>A3</sup> Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Développement Paris France

<sup>A4</sup> Geotop and Département des Sciences Biologiques Montréal Canada

<sup>A5</sup> Laboratoire de Microbiologie Industrielle Reims France

\* Marie.Anne.Cambon@ifremer.fr

---

**Abstract:** A novel thermophilic, chemolithoautotrophic bacterium, designated as NE1206 T, was isolated from a Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent sample (tubes of the annelid polychaete *Paralvinella sulfincola* attached to small pieces of hydrothermal chimney). The cells were rod-shaped (1.2–3.5×0.4–0.7 μm), occurring as single motile rods or forming macroscopic aggregates visible as pinkish to brownish streamers. The new isolate was anaerobic. It grew between 50 and 70 °C (optimum 60–65 °C; doubling time approximately 1 h 15 min at 60 °C), between pH 5.0 and 7.5 (optimum pH around 6.0–6.5) and at sea salts concentrations between 20 and 40 g l<sup>-1</sup> (optimum 30 g l<sup>-1</sup>). Cells grew chemolithoautotrophically in an H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> atmosphere (80/20, v/v; 200 kPa). Molecular hydrogen was the sole electron donor used by the strain. Nitrate and elemental sulfur served as electron acceptors, yielding ammonia and hydrogen sulfide, respectively (nitrate reduction supported higher growth rates than sulfur reduction). The G+C content of the genomic DNA was 36.7±0.8 mol%. Phylogenetic analyses of the 16S rRNA gene located the strain within the genus *Desulfurobacterium*. However, the novel isolate possesses physiological and biochemical characteristics that differ from the previously described species of this genus. We propose that the isolate represents a novel species, *Desulfurobacterium crinifex* sp. nov. The type strain is NE1206 T (DSM 15218 T, CIP 107649 T). An amendment of the genus *Desulfurobacterium* description is proposed, based on the phenotypic characteristics of the novel

**Keywords:** Cell networks, Deep-sea hydrothermal vent, *Desulfurobacterium crinifex*, Lithotroph, Nitrate-reducing, Thermophile

## INTRODUCTION

The deepest phylogenetically-branching bacterial phyla are, according to 16S rDNA phylogenetic analyses, the *Aquificae* and the *Thermotogae*. The phylum *Aquificae* includes the genera *Aquifex* (Huber *et al.*, 1992), *Thermocrinis* (Huber *et al.*, 1998), *Hydrogenobacter* (Kawasumi *et al.*, 1984), *Hydrogenobaculum* (Stöhr *et al.*, 2001), *Hydrogenothermus* (Stöhr *et al.*, 2001) and the very recently described genus *Persephonella* (Götz *et al.*, 2002). Cultivated representatives of this phylum have been isolated from marine and continental volcanic and geothermal heated springs (Reysenbach, 2001). Members of the *Aquificae* are thermophilic or hyperthermophilic rod-shaped microorganisms. Under some growth conditions and notably under a continuous water flow, many of them form long macroscopic filaments or aggregates forming coloured networks of cells (Eder *et al.*, 2002). With the exception of the strict aerobic heterotroph *Hydrogenobacter subterraneus* (Takai *et al.*, 2001), almost all *Aquificae* are strict chemolithoautotrophs able to grow by O<sub>2</sub> (under microaerobic conditions) or NO<sub>3</sub><sup>-</sup> reduction, using CO<sub>2</sub> as a carbon source and H<sub>2</sub>, S<sup>2-</sup>, S<sup>0</sup> or S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> as an electron donor. Chemoorganoheterotrophic growth on simple organic molecules also occurs within the genus *Thermocrinis* (Huber *et al.*, 1998). The phylum *Thermotogae* encompasses the genera *Thermotoga* (Huber *et al.*, 1986), *Petrotoga* (Davey *et al.*, 1993), *Geotoga* (Davey *et al.*, 1993), *Fervidobacterium* (Patel *et al.*, 1985), *Thermosipho* (Huber *et al.*, 1989) and *Marinitoga* (Wery *et al.*, 2001). Almost all cultivated members of this phylum have been isolated from extreme environments such as oil field brines or oil reservoirs, and from terrestrial or submarine volcanic areas (Alain *et al.*, 2002a). *Thermotogae* are rod-shaped moderate thermophilic or hyperthermophilic bacteria surrounded by a characteristic sheath-like outer structure devoid of cytoplasm called the “toga”. To date, all members are obligate anaerobes that derive energy from the fermentation of a broad range of organic compounds (carbohydrates, proteinaceous substrates or alcohols). In most cases, growth of these micro-organisms is enhanced by the addition of thiosulphate or other sulphur compounds (Ravot *et al.*, 1995). In addition, the recently described methanol-fermenting *Thermotoga lettingae* is able to use ferric iron and anthraquinone-2,6-disulfonate as electron acceptors (Balk *et al.*, 2002). Recently, two new species have been described belonging to two new genera that form a distinct 16S rRNA lineage between the order *Aquificales* and the order *Thermotogales* (L’Haridon *et al.*, 1998; Huber *et al.*, 2002). In the latest edition of ‘Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology’, the first species, *Desulfurobacterium thermolithotrophum* (L’Haridon *et al.*, 1998) was placed in the phylum *Aquificae* but with the designation “genus *incertae sedis*”

(L'Haridon & Jeanthon, 2001). *D. thermolithotrophum* strain BSA<sup>T</sup>, isolated from a Mid-Atlantic hydrothermal vent chimney, is a thermophilic strictly anaerobic chemolithoautotrophic bacterium growing by sulphur, thiosulphate or sulphite reduction with H<sub>2</sub> as an electron donor. The second novel isolate, *Thermovibrio ruber* (Huber *et al.*, 2002), isolated from sandy sediments of a hydrothermal vent off near Papua New Guinea, is a thermophilic, obligate anaerobic chemolithoautotrophic microorganism that reduces nitrate or sulphur in the presence of H<sub>2</sub> as an electron donor and CO<sub>2</sub> as a carbon source. The authors of both publications underline the fact that *D. thermolithotrophum* and *T. ruber* belong to the phylum *Aquificae* but may, presumably, represent a novel order when further isolates are described (L'Haridon *et al.*, 1998; Huber *et al.*, 2002).

In 2001, samples were collected from a deep-sea hydrothermal vent field on the Juan de Fuca Ridge, in the northeast Pacific ocean. In this paper, we report the isolation and describe the unique physiological and metabolic features of a novel isolate belonging to the genus *Desulfurobacterium*. In light of the phenotypic properties of this isolate, we describe it as the type strain of a new species and propose an amendment of the genus *Desulfurobacterium*.

## **MATERIALS AND METHODS**

### Collection of samples

Samples were collected at a depth of 1581 m from a sulphide edifice (T&S edifice) in the CASM vent field (130°01'W, 45°59'N) at Axial Volcano, on the Juan de Fuca Ridge, during the NeMO (New Millennium Observatory) 2001 expedition. Material collected by the remotely-operated vehicle (ROV) ROPOS consisted of small fragments of sulphide chimney and adhering tubes of the polychaete worm *Paralvinella sulfincola*, which colonizes the surface of actively venting sulphide edifices or chimneys. Once aboard ship, mucous tubes still attached to individual *P. sulfincola* were aseptically placed into sterile tubes containing sterile seawater (3% [v/v] sea salts solution), 20% (v/v) glycerol and frozen at -20 °C. Samples were transported frozen to the laboratory and thawed just before enrichment cultures.

## Culture medium and conditions

Isolate NE1206<sup>T</sup> was enriched and grown with KA22 medium (Alain *et al.*, 2002b), containing per litre: 30 g sea salts (Sigma), 2.54 g Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Merck), 1 g NaHCO<sub>3</sub>, 1.95 g MES buffer (Sigma), 12 g elemental sulphur (Prolabo), 0.3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma), 0.5 ml vitamin mixture (Balch *et al.*, 1979), 10 ml trace element solution (Balch *et al.*, 1979) and 1 mg resazurin (Sigma). The pH was adjusted to 6.5 at room temperature, before autoclaving, and the medium was reduced by 0.5 g l<sup>-1</sup> sodium sulphide before inoculation. A mixture of H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20, vol./vol.; 200 kPa) was used as the gas phase. Unless indicated otherwise, cultures were incubated at 60 °C with shaking (100 rpm).

## Enrichment and purification procedures

Enrichment cultures were carried out anaerobically in liquid KA22 medium inoculated with solid fragments of *Paralvinella sulfincola* tubes, under an atmosphere of H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20, vol./vol.; 200 kPa). After 36 h incubation at 60 °C, growth was observed by phase contrast microscopy. Positive cultures were subcultured and then purified using a dilution-to-extinction technique (Baross, 1995). Six serial dilutions to extinction were performed. A supplementary purification step was performed by streaking onto KA22 medium solidified with 0.8% (w/v) Phytigel (Sigma) gelling agent. Plates were incubated in anaerobic jars at 60 °C for 10 days under a H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20, vol./vol.; 200 kPa) atmosphere.

## Observation of the culture and quantification

Cells were observed under a light microscope equipped with a phase-contrast oil immersion objective (×100 magnification). Cells were counted by direct cell counting using a Thoma chamber (depth, 0.02 mm).

## Morphology

The Gram type was determined by use of the Ryu nonstaining KOH test (Ryu, 1940; Buck, 1982; Powers, 1995). The SpotTest™ flagella stain (Difco) was used for flagella detection.

For scanning electron microscopy, cells were fixed with 10% formaldehyde (v/v) for one hour, placed on filters (0.22  $\mu\text{m}$  pore size, Nucleopore) and dried over-night at room temperature. Macroscopic streamers were deposited directly onto filters and fixed over-night in a box under an atmosphere of formaldehyde. Samples were then coated with gold (SCD040, Balzers) and examined using a Philips XL 30-LaB6 scanning electron microscope.

Preparation of cells for ultrathin sectioning and transmission electron microscopy was as described elsewhere (Alain *et al.*, 2002c). Ultra-thin sections (50 nm) were prepared on a Reichert-Jung Ultramicrotome. TEM observations were performed on a LEO 912 electron microscope.

#### Determination of growth parameters

To determine the optimum temperature, pH and sea salts concentration for growth, cells were grown in Hungate tubes (27 ml; Bellco) containing 5 ml KA22 medium and  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  at a pressure of 200 kPa in the headspace. All growth parameters were tested with  $\text{H}_2$  as the electron donor and  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{S}^\circ$  was also present in the medium) as the electron acceptor. Experiments were performed in thermostatic aluminium heating blocks (Bioblock) monitored with temperature probes placed in control tubes. Parallel experiments were also performed in a thermostatic oven with shaking. To determine the effect of pH on the growth, KA22 medium was modified with the following 10 mM buffers (Sigma): for pH 3 and 4, no buffer; for pH 5, 5.5 and 6, MES (2-(N-morpholino)-ethane sulfonic acid) buffer; for pH 6.5 and 7, PIPES (piperazine-N,N'-bis-(2-ethane sulfonic acid)) buffer; for pH 7.5 and 8, HEPES (N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2-ethane sulfonic acid)) buffer; for pH 8.5, AMPSO (3-(1,1-dimethyl-2-hydroxyethyl)-amino-2-hydroxypropane sulfonic acid) buffer. Sodium sulphide was added in the anaerobic chamber and, if necessary, the pH was adjusted with 0.1 M HCl or 0.1 M NaOH. To determine the effect of sea salts concentration on the growth, KA22 medium was prepared with sea salts concentrations ranging from 0 to 70  $\text{g l}^{-1}$ . For all salts concentrations, cells were incubated at the optimal temperature and pH for growth. The effects of temperature, pH and salinity were determined by measuring maximum growth rates calculated by use of linear regression analyses from six to seven points along the logarithmic growth curves in the portion of the curve where the slope was maximal. All growth experiments were carried out in triplicate.

## Physiological and biochemical characteristics

The ability of isolate NE1206<sup>T</sup> to use various electron donors was investigated. For this experiment, the following electron donors were added to a minimal medium (modified KA22 medium without S<sup>o</sup> but with 4 g l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O to ensure an adequate sulphur source): formate (10 mM), acetate (10 mM), propionate (10 mM), methanol (0.5% v/v), yeast extract (2 g l<sup>-1</sup>), S<sup>o</sup> (12 g l<sup>-1</sup>), S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> (10 mM) and H<sub>2</sub>S (10 mM). These compounds were tested under anaerobic conditions with a N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gas phase (80/20, vol./vol.; 200 kPa) with NO<sub>3</sub><sup>-</sup> as the electron acceptor. H<sub>2</sub> was also tested under anaerobic conditions as the sole electron donor (H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, 80/20 vol./vol., 200 kPa). The following electron donors were also tested under microaerophilic conditions under an atmosphere of N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> (80/17/3, vol./vol.; 200 kPa) (O<sub>2</sub> percentages were measured by gas chromatography before inoculation): Fe<sup>2+</sup> (10 mM), S<sup>o</sup> (12 g l<sup>-1</sup>), S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> (10 mM), H<sub>2</sub>S (10 mM) and H<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>, 80/17/3 vol./vol.; 200 kPa).

The ability of the new isolate to grow in the presence of different electron acceptors was tested on a modified KA22 medium (prepared without Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> or sulphur but supplemented with 1 g l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl to ensure an adequate nitrogen source): Sulphate was tested at 20 mM on this modified sulphate-free medium. After the demonstration that the strain does not use sulphate as a terminal electron acceptor, the other electron acceptors were tested in the same modified KA22 medium supplemented by 4 g l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O to ensure a supplemental sulphur source. Elemental sulphur and L-cystine were tested at 12 g l<sup>-1</sup>, polysulphides at 10 mM (Blumentals *et al.*, 1990), nitrite at 1 mM, O<sub>2</sub> at concentrations ranging from 1 to 20%, and thiosulphate, ferric iron and nitrate were tested at 20 mM. The headspace gas was H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20, vol./vol.; 200 kPa). O<sub>2</sub> was also tested as a terminal electron acceptor (at concentrations ranging from 1 to 20%) with S<sup>o</sup> (12 g l<sup>-1</sup>) or S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> (10 mM) as the electron donor; in experiments where the headspace gas was N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20, vol./vol.; 200 kPa).

The ability of strain NE1206<sup>T</sup> to utilise different carbon sources was investigated by adding the following compounds to the KA22 medium prepared without NaHCO<sub>3</sub>: formate (10 mM), acetate (10 mM), propionate (10 mM), lactate (0.5% v/v), methanol (0.5% v/v), yeast extract (2 g l<sup>-1</sup>), tryptone (2 g l<sup>-1</sup>), peptone (2 g l<sup>-1</sup>), D(+)-glucose (2 g l<sup>-1</sup>), maltose (2 g l<sup>-1</sup>), starch (2 g l<sup>-1</sup>) and CO<sub>2</sub> (20%). These experiments were performed under a H<sub>2</sub> (100%, 200 kPa) gas phase.

The effect of different growth factors was also tested. In separate experiments the KA22 medium was amended with complex organic substrates (yeast extract, peptone and tryptone added at 0.1% v/v), organic acids (formate added at 0.5% v/v, and acetate and propionate added at 0.1% v/v), carbohydrates (D(+)-glucose, D(+)-galactose

and maltose tested at 0.1% v/v) and selenite-tungstate solution (1 ml l<sup>-1</sup> of a stock solution: 6 mg l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O; 0.8 mg l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0.4 g l<sup>-1</sup> NaOH).

All these tests were performed in triplicate in serum vials. Positive cultures were transferred at least twice on the same substrate combination to confirm growth. Growth was determined by direct cell counts in a Thoma chamber (depth 0.02 mm) with a phase-contrast microscope.

Cytochrome oxidase activity was tested using the “oxidase “ kit (Remel), based on the reaction of N, N-dimethyl-1,4-phenylene diamine and alpha-naphtol, where the presence of oxidase activity is confirmed by a dark blue coloration.

#### Analyses of metabolic products and analytical techniques

H<sub>2</sub>S formation was detected by the addition of 500 µl of 50 mM HCl - 5 mM CuSO<sub>4</sub> to 0.2 ml of the culture. A brown precipitate demonstrated the presence of H<sub>2</sub>S. H<sub>2</sub>S concentrations were measured spectrometrically at 670 nm 1 h after addition of 0.1 ml of a 100 mM FeCl<sub>3</sub> solution and 0.1 ml of a 19 mM N, N-dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride to 10 ml of culture, by comparison to an H<sub>2</sub>S calibration curve.

Ammonium / ammonia concentrations were determined by use of an ammonia detection kit (Fa. Boehringer Mannheim/R-biopharm, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's instructions. This test was carried out spectrometrically after addition of NADH, 2-oxoglutarate, and glutamate-dehydrogenase to the samples yielding glutamate and NAD. Quantitative nitrate determination was performed by use of a nitrate detection kit (Fa. Boehringer Mannheim/R-biopharm, Darmstadt, Germany) following the manufacturer's recommendations. This was carried out spectrometrically after addition of NADPH and nitrate reductase to the sample leading to nitrate reduction. The amount of NADPH oxidised during the reaction is stoichiometric to the amount of nitrate. For nitrate and ammonia determinations, cells were grown at 60°C on KA22 medium prepared without sulphur and resazurin (pH 6.0, 30 g l<sup>-1</sup> sea salts, atmosphere of H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>). For these experiments, samples were deproteinized with 5-sulfosalicylic acid, then degassed to eliminate carbon dioxide before determinations were performed. Nitrite was determined quantitatively using a colorimetric nitrite test kit (chemical method: sulfanilamide) (HI 3873; Hanna Instruments, France).

Gas percentages within gas atmosphere of vials were determined using an MTI micro-gas chromatograph equipped with a thermal conductivity detector. A molecular sieve with argon as the carrier gas and a temperature

of 30 °C were used to detect O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>. CO<sub>2</sub> was determined using a Poraplot U column, at 100 °C, with helium as the carrier gas. The analysed gas phases were pumped from the culture vials directly and without gas contamination, by the suction pump of the MTI system.

#### DNA extraction and purification

Genomic DNA was extracted as described by Wery *et al.* (2001). The concentration and purity of the genomic DNA obtained were estimated by use of a GenQuant II spectrophotometer (Pharmacia) at 260, 280 and 320 nm. The quality of the extraction was checked on a 0.8% (w/v) agarose gel containing 0.5 µg ethidium bromide ml<sup>-1</sup>.

#### DNA base composition and phylogenetic analysis

The G+C content of the genomic DNA was determined from the melting point according to Marmur & Doty (1962), as described elsewhere (Alain *et al.*, 2002b). A calibration curve was constructed by use of ultrapure DNA from *Escherichia coli* Strain B (50% G+C), *Clostridium perfringens* (26.5% G+C) and calf thymus (42% G+C) as standards (Sigma).

The 16S rDNA was selectively amplified from purified genomic DNA by PCR with oligonucleotide primers designed to anneal to conserved positions in the 3' and 5' regions of the 16S rRNA genes. The forward primer was SAdir (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAGA-3') corresponding to positions 8-28 in the *Escherichia coli* 16S rRNA and the reverse primer was S17rev (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3'), corresponding, 1493-1509. The initial denaturation step consisted of heating the reaction mixture to 94 °C for 3 min. This was followed by 30 cycles as follows: denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 49 °C for 1 min 30 s and extension at 72 °C for 2 min. A final extension step was carried out at 72 °C for 6 min. The PCR products were analysed on 0.8% (w/v) agarose TAE-gels (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA), containing 0.8 µg ethidium bromide ml<sup>-1</sup> and recorded with a Fluor-S multiImager (Bio-Rad).

The 16S rDNA gene PCR product was bidirectionally sequenced by Genome Express S.A. (Grenoble, France) with an automatic DNA analysis system (Applied Biosystems). The following primers, chosen to generate an overlapping set of sequences, were used for sequencing: SAdir, S17rev, 533F (5'-TGBCAGCMGCCGCGGTAA-3'), 517R (5'-ACCGCGGCKGCTGGC-3'), 690R (5'-TCTACGCATTTACC-



3') and 1100R (5'-AGGGTTGCGCTCGTTG-3'). One thousand five hundred and twenty one positions of the 16S rDNA were determined. To check for potential polymorphisms in the 16S rDNA genes and to confirm the direct sequencing results, PCR products were cloned into the PCR2.1 vector of the TOPO-TA cloning kit (Invitrogen). Ten independent 16S rDNA clone genes were sequenced.

The 16S rDNA sequence of the strain NE1206<sup>T</sup> was compared to the sequences of representative members of the phylum *Aquificae* and clones from hydrothermal vents or hot springs. The CLUSTALW method with weighted residues was used to align the sequences and to calculate similarity levels (Thompson *et al.*, 1994). Alignment was manually refined by use of the multiple sequence alignment editor SEAVIEW and phylogenetic reconstruction was produced by use of PHYLO\_WIN (Galtier *et al.*, 1996) with the settings: Jukes-Cantor distance matrix, and successively the neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) and maximum likelihood (Felsenstein, 1981) methods. 1243 nucleotides were included in the phylogenetic analysis. Bootstrap values were determined according to Felsenstein (1985). *Marinitoga piezophila* KA3<sup>T</sup> (AF326121) was used as outgroup. Using the CLUSTALW method with weighted residues, similarity matrices were constructed on 1399 nucleotides of a subset of *Aquificales* sequences unequivocally aligned.

The 16S rDNA gene sequence of strain NE1206<sup>T</sup> has been deposited in the EMBL database under the accession number AJ507320.

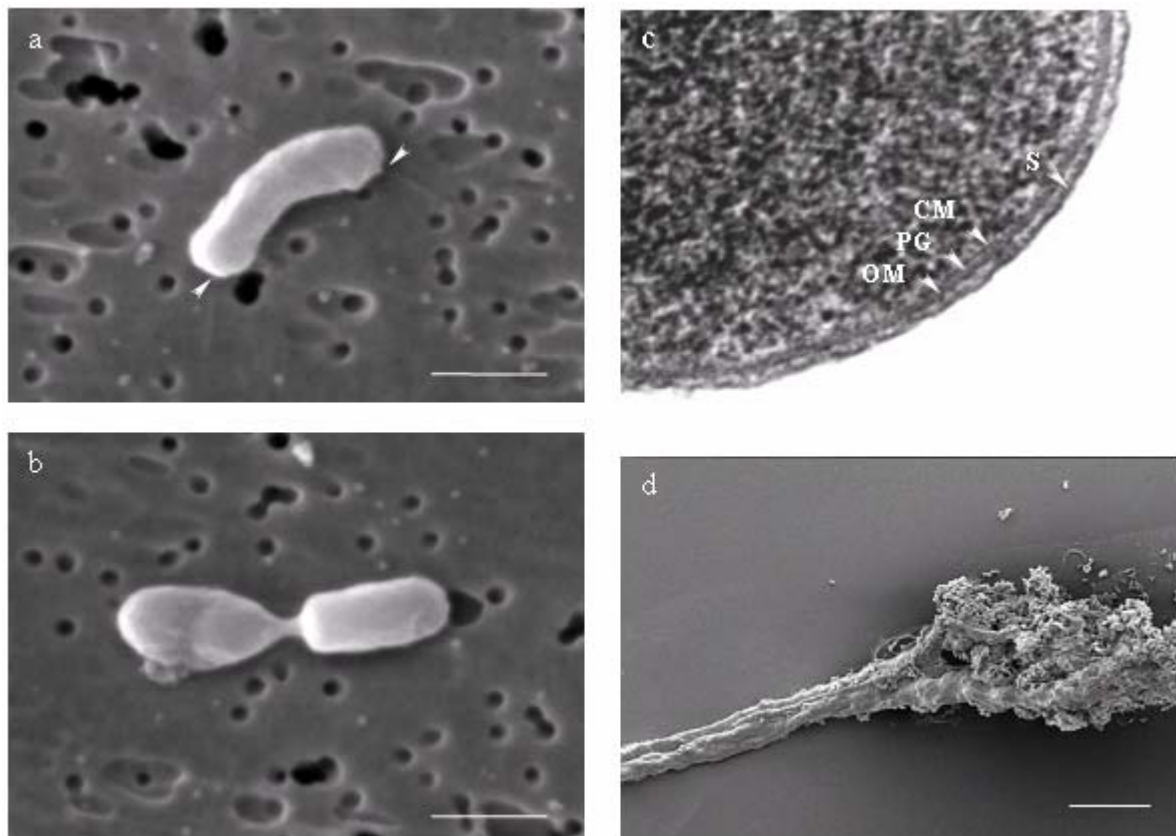
## RESULTS

### Enrichment, isolation and morphology

In order to enrich for thermophilic chemolithoautotrophic microorganisms, KA22 medium was inoculated with intact, small *Paralvinella sulfincola* tubes (cleaned of their inner content) attached to small fragments of hydrothermal chimney rocks. After 36 hours incubation, growth was observed at 60 °C, under an H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gas phase. The enriched culture consisted of dense populations of rod-shaped, motile cells. After 10 days incubation of plates under an H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> atmosphere at 60 °C, pinkish colonies 1-2 mm in diameter were observed. One isolate, referenced as strain NE1206<sup>T</sup> (DSM 15218<sup>T</sup>, CIP 107649<sup>T</sup>) was completely characterised.

Phase-contrast microscopy indicated that cells of isolate NE1206<sup>T</sup> were motile, straight to slightly curved rods of 0.9-3.5  $\mu\text{m}$  long and 0.4-0.7  $\mu\text{m}$  wide. When cultivated with shaking under anaerobic conditions, cells were slightly longer. Polar flagella were observed (Fig. 1a). As observed during scanning electron microscopy analyses (Fig. 1b), cells divided by constriction. They were Gram-negative (Fig. 1c) and formed balloons during the late stationary phase of growth. Very frequently and systematically when growth occurred into nonreduced media, cells formed aggregates that arranged in macroscopic pinkish to brownish branched streamers. The total length of these pinkish cell networks, in vials, was sometimes up to 8 cm for a diameter that varied from the diameter of a hair to 2 mm diameter in vials. The microbial architecture of these unusual macroscopic structures was highly conserved from one streamer formed *in vitro* to another (Fig. 1d). This architecture was maintained by a polymeric matrix whose chemical composition and function are under characterisation.

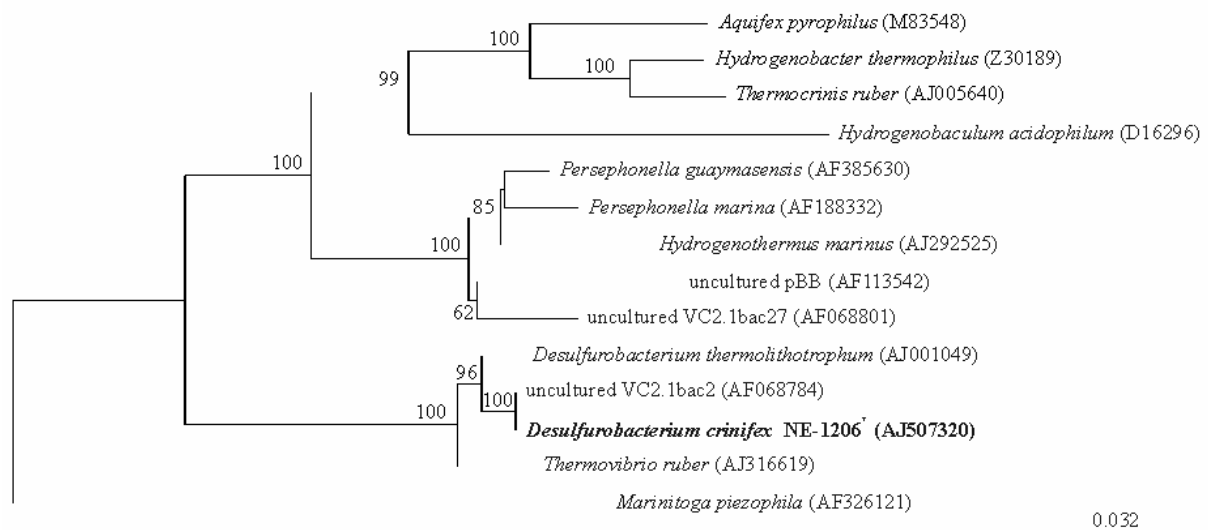
Fig. 1. (a, b) Scanning electron micrographs of strain NE1206<sup>T</sup> in the mid-exponential phase of growth, showing (a) polar flagella (b) division by constriction. Bar = 1  $\mu\text{m}$ . (c) Transmission electron micrograph of ultrathin section of strain NE1206<sup>T</sup> showing a Gram-negative cell envelope, with from inside to outside a cytoplasmic membrane (CM), a thin peptidoglycan layer (PG), an outer membrane (OM) and an S-layer (S). (d) Scanning electron micrograph of a macroscopic visible filament produced by cells of strain NE1206<sup>T</sup> in culture vials (KA22 medium, H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> atmosphere, 60°C), Bar = 500  $\mu\text{m}$ .



## Growth parameters

The novel isolate NE1206<sup>T</sup> grew between 50 and 70 °C with an optimum around 60-65 °C. Growth did not occur at 45 or 75 °C (Fig. 2). The strain grew at sea salts concentrations between 20 and 40 g l<sup>-1</sup>. The optimum sea salts concentration for growth was 30 g l<sup>-1</sup>. Growth of the isolate was optimal around pH 6.0-6.5, although growth was observed at pH 5.0 and 7.5. Under optimal growth conditions (at 60 °C with shaking, pH 6.5, 30 g l<sup>-1</sup> sea salts, with H<sub>2</sub> as electron donor, CO<sub>2</sub> as carbon source and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> as terminal electron acceptor) the doubling time was around 1 h 15 minutes.

Fig. 2. Effect of temperature on the maximum growth rate ( $\mu_{max}$ ) of strain NE1206<sup>T</sup>. The cells were grown under agitation with H<sub>2</sub> as electron donor, CO<sub>2</sub> as carbon source and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> as terminal electron acceptor (at pH 6.5 and with 30 g sea salts l<sup>-1</sup>). The experiment was performed in triplicate. Maximum growth rates were calculated by performing linear regression analysis of the part of the logarithmic growth curves where the slope was maximal.



## Growth characteristics

Strain NE1206<sup>T</sup> was an anaerobic, cytochrome oxidase negative, hydrogen-oxidising, thermophilic bacterium. Tests for growth requirements highlighted the obligate chemolithoautotrophic character of the novel isolate. Growth was possible by reduction of nitrates or elemental sulphur, using molecular hydrogen as electron donor

and carbon dioxide as carbon source (Table 1). The shortest generation times were obtained by nitrate-reduction. Ammonia was produced from nitrate reduction (Fig. 3). Nitrite could not be detected in the culture medium after growth by nitrate reduction. When nitrate was not present in the culture medium, H<sub>2</sub>S was produced as a result of sulphur reduction. Final H<sub>2</sub>S concentrations of 4.0 to 14.6 mmol l<sup>-1</sup> were measured. The novel isolate was unable to grow organotrophically on the complex substrates or small organic molecules tested. On the other hand, the strain was found to tolerate low oxygen concentrations but was demonstrated to not reduce it. It could be grown on nonreduced KA22 medium (up to oxygen concentrations of 3%) but exclusively without shaking or under a relatively gentle one (100-120 rpm). Under these conditions, a pinkish polymer was regularly produced. Moreover, final end products of anaerobic respiration (H<sub>2</sub>S if S<sup>0</sup> was the electron acceptor or ammonia if that was nitrate) were detected in these nonreduced media. When shaken at high velocity (250 rpm), nonreduced media did not allow growth of the novel isolate (while reduced ones allowed it). Under this micro-oxygenation of the medium homogenised by a strong shaking, cellular lysis was observed only after 2 days incubation at 60 °C. Furthermore, the novel isolate was unable to grow with oxygen (microaerophilic conditions with 1 to 20% O<sub>2</sub> were tested) as the sole terminal electron acceptor when cultivated at 60 °C and at 250 rpm. All these results together demonstrate that the strain is able to tolerate oxygen but does not reduce it.

Fig. 3. Nitrate consumption (●) and ammonium / ammonia formation (■) during growth (▲) of strain NE 1206<sup>T</sup>. This experiment was performed on a modified KA22 medium prepared without S<sup>0</sup> and resazurin. Cultures were grown at 60 °C, pH 6.0, with 30 g l<sup>-1</sup> sea salts under an H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> atmosphere (80/20, vol./vol.; 200 kPa).

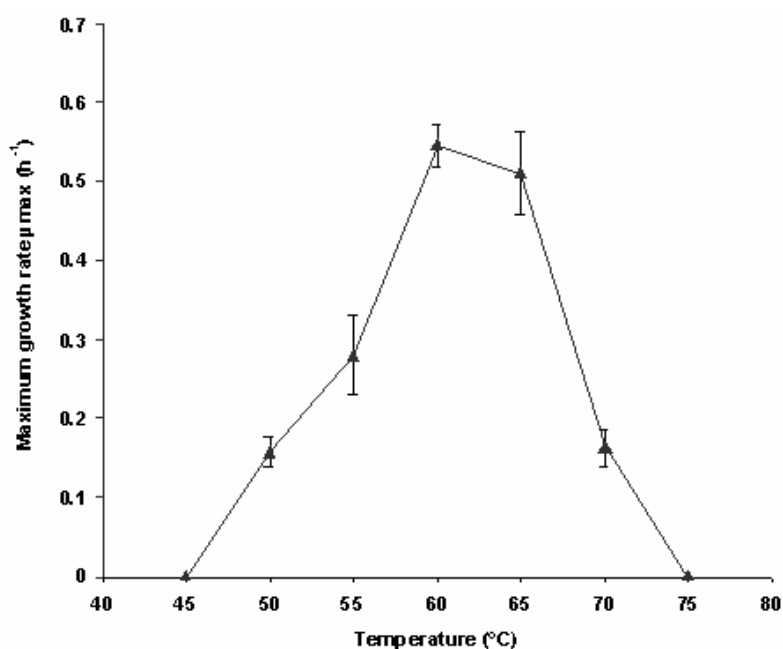


Table 1. Comparison of metabolic characteristics of *Desulfurobacterium crinifex* and *Desulfurobacterium thermolithotrophum*.

Electron donor	Electron acceptor	Carbon source	<i>D. thermolithotrophum</i> *	<i>D. crinifex</i>
H <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CO <sub>2</sub>	-	+ §
H <sub>2</sub>	S <sup>0</sup>	CO <sub>2</sub>	+ §	+
H <sub>2</sub> S	O <sub>2</sub> (3%)	CO <sub>2</sub>	ND	-
H <sub>2</sub> S	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CO <sub>2</sub>	ND	-
Fe <sup>2+</sup>	O <sub>2</sub> (3%)	CO <sub>2</sub>	ND	-
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CO <sub>2</sub>	ND	-
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	O <sub>2</sub> (1 to 20 %)	CO <sub>2</sub>	ND	-
S <sup>0</sup>	O <sub>2</sub> (1 to 20 %)	CO <sub>2</sub>	ND	-
S <sup>0</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CO <sub>2</sub>	ND	-
Formate	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / S <sup>0</sup>	CO <sub>2</sub>	-	-
methanol	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / S <sup>0</sup>	CO <sub>2</sub>	-	-
acetate	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / S <sup>0</sup>	CO <sub>2</sub>	-	-
propionate	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / S <sup>0</sup>	CO <sub>2</sub>	ND	-
yeast extract	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / S <sup>0</sup>	CO <sub>2</sub>	-	-
H <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / S <sup>0</sup>	glucose	ND	-
H <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / S <sup>0</sup>	starch	ND	-
H <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / S <sup>0</sup>	maltose	ND	-
H <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / S <sup>0</sup>	methanol	ND	-
H <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / S <sup>0</sup>	peptone	ND	-
H <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / S <sup>0</sup>	tryptone	ND	-
H <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / S <sup>0</sup>	yeast extract	ND	-
H <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / S <sup>0</sup>	NaHCO <sub>3</sub>	ND	-
H <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / S <sup>0</sup>	lactate	ND	-
H <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / S <sup>0</sup>	formate	ND	-
H <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / S <sup>0</sup>	acetate	ND	-
H <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / S <sup>0</sup>	propionate	ND	-
H <sub>2</sub>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>	-	-
H <sub>2</sub>	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>	+	-
H <sub>2</sub>	L-cystine	CO <sub>2</sub>	-	-
H <sub>2</sub>	polysulphides	CO <sub>2</sub>	+	-
H <sub>2</sub>	SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>	+	-
H <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	CO <sub>2</sub>	-	-
H <sub>2</sub>	Fe <sup>3+</sup>	CO <sub>2</sub>	ND	-
H <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> (1 to 20 %)	CO <sub>2</sub>	ND	-

\* data from L'Haridon *et al.*, 1998

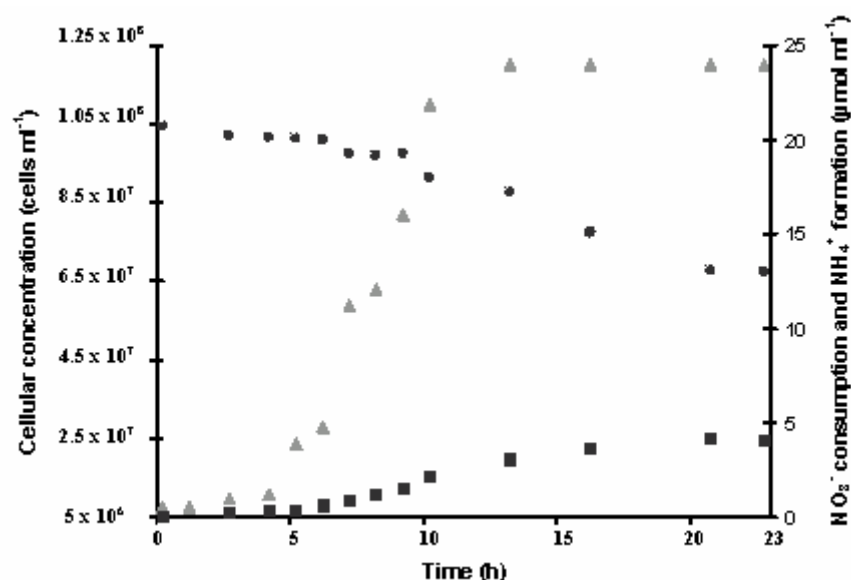
ND, not determined ; -, no growth ; +, growth ; § conditions for which higher growth rates were measured.

These data suggest that the new isolate is an obligate chemolithoautotrophic bacterium that produces energy by reducing elemental sulphur or nitrate using molecular hydrogen as an electron donor. Routinely, when cultivated under agitation with H<sub>2</sub> as an electron donor, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> as an electron acceptor, CO<sub>2</sub> as a carbon source (and under optimal temperature, pH and salinity), cell densities obtained were 5 x 10<sup>7</sup> – 1 x 10<sup>8</sup> cells per ml in vials. Occasionally, final cell concentrations of 3 x 10<sup>8</sup> cells per ml were obtained. Under our experimental conditions, none of the electron acceptor/donor and carbon source combinations supported growth of strain NE1206<sup>T</sup> (Table 1). When added individually to the KA22 medium and at the concentrations tested, selenite-tungstate solution, formate, galactose, maltose and tryptone had no effect on growth (Table 1). On the other hand, the addition of yeast extract, brain-heart infusion, peptone, acetate and propionate slightly lengthened the generation time of the strain. At the concentration tested, lactate had a complete inhibitory effect on growth.

## DNA base composition and phylogenetic position of the novel isolate

As determined by melting point analysis, the G+C content of the genomic DNA of strain NE1206<sup>T</sup> was 36.7 ± 0.8 mol%. Phylogenetic analyses of the almost complete sequence (1521 bp) of the 16S rDNA gene of strain NE1206<sup>T</sup>, using the neighbor-joining and maximum likelihood algorithms for tree reconstruction, located the strain in the deeply branching phylum *Aquificae*, within the genus *Desulfurobacterium*, in the domain Bacteria (Fig. 4). The phylogenetic position of the organism was determined by comparing the 16S rDNA sequence of strain NE1206<sup>T</sup> to those of nine representative *Aquificae* species and to three 16S rDNA sequences of uncultured *Aquificae*. In all calculations, its closest cultivated relative was *Desulfurobacterium thermolithotrophum* (L'Haridon *et al.*, 1998), sharing 96% 16S rDNA sequence similarity (value obtained by the CLUSTALW method on 1399 nucleotides of a subset of sequences of unequivocal alignment). It was followed by the recently described genus *Thermovibrio ruber* (95%). The novel isolate was very closely related to the 16S rDNA sequence of the uncultured clone VC2.1bac2 (and to other sequences unmarked on the phylogenetic tree) from an Atlantic hydrothermal vent (Reysenbach *et al.*, 2000). They shared 99% 16S rDNA gene sequence similarity. The secondary structural feature of the 16S rRNA sequence, characterised by a CUC bulge and a single nucleotide bulge in the helix found at positions 198-219 (*E. coli* numbering), retrieved in the 16S rRNA sequence of *Desulfurobacterium thermolithotrophum* (L'Haridon *et al.*, 1998) and proposed to be a signature of the *Aquificales* lineage (Reysenbach *et al.*, 1994), was also shared by the novel isolate.

Fig. 4. Phylogenetic position of strain NE1206<sup>T</sup> within the phylum *Aquificae*. The alignment was performed with 16S rDNA sequences of representative *Aquificae* species and uncultured *Aquificae* from Atlantic hydrothermal vents and terrestrial hot springs. The *Thermotogale Marinitoga piezophila* was chosen as outgroup. Accession numbers are noted in brackets. The topology shown corresponds to an unrooted tree obtained by a neighbor-joining algorithm (Jukes and Cantor corrections) established using PHYLO\_WIN. 1243 nucleotides were included in the phylogenetic analysis. Bootstrap values are displayed on their relative branches. Scale bar indicates 6.7 nt substitutions per 100 nt. The positioning of the new isolate was confirmed by the maximum likelihood method.



## DISCUSSION

Phylogenetic analyses of the 16S rRNA sequence clearly indicated that the novel isolate belonged to a deep-branching lineage of Bacteria. This strain is an anaerobic, thermophilic bacterium growing autotrophically on CO<sub>2</sub> by nitrate or sulphur reduction using hydrogen as an electron donor. On the basis of these characteristics, it resembles the recently described deeply-branching genus *Thermovibrio* (Huber, Diller et al. 2002). However, strain NE 1206<sup>T</sup> differs from *Thermovibrio ruber* (Huber, Diller et al. 2002) by its genotypic characteristics. The G+C contents of the genomic DNA of both strains are almost 10% different (46 mol% for *Thermovibrio ruber* strain ED11/3LLK<sup>T</sup> against 36.7 mol% for strain NE 1206<sup>T</sup>). Moreover, based on the analysis of their 16S rRNA sequences, they are phylogenetically distinct. The novel isolate is phylogenetically more closely related to the genus *Desulfurobacterium*. Strain NE 1206<sup>T</sup> shares some characteristics with the only described species, *Desulfurobacterium thermolithotrophum* (L'Haridon et al., 1998). Indeed, both strains grow

chemolithoautotrophically using CO<sub>2</sub> as a carbon source, H<sub>2</sub> as an electron donor and S<sup>o</sup> as an electron acceptor; their temperature, salinity and pH ranges for growth are relatively comparable; both strains are anaerobic; the G+C content of the genomic DNA of *D. thermolithotrophum* and of the novel isolate are 35 mol% and 36.7 ± 0.8 mol%, respectively ; cells stain Gram negative.

However, some characteristics distinguish both species; *D. thermolithotrophum* strain BSA<sup>T</sup> is capable of reducing thiosulphate and sulphite, whereas under our experimental conditions the new strain is not. The novel isolate shows a major metabolic difference from *D. thermolithotrophum* as a result of its ability to grow by nitrate reduction. The best growth rates of the strain were obtained chemolithoautotrophically, by anaerobic nitrate respiration, using H<sub>2</sub> as an electron donor and CO<sub>2</sub> as a carbon source.

Hydrothermal vent chimney structures result from the mixing of the hot hydrothermal fluid, rich in reduced chemical compounds, with the surrounding cold and oxygenated deep-sea water. Steep thermal and chemical gradients are established in the vicinity of the smokers. Both CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>, the exclusive carbon source and electron donor used by the strain in our experimental conditions, are abundant in hydrothermal fluids. Elemental sulphur are produced at vents as a result of chemical or biological oxidation of hydrogen sulphide, which is present in high concentration in the hydrothermal fluid. Finally, nitrates used by the strain as preferential electron acceptor are also available in the seawater into which the hydrothermal fluids are discharged. Unlike oxygen which is rapidly reduced by sulphide from the hydrothermal fluid, nitrate is a more stable electron acceptor that can persist in microniches in this ecosystem. Strain NE 1206<sup>T</sup>, capable of growing chemolithoautotrophically either by sulphur reduction or by anaerobic nitrate reduction shows a metabolic plasticity by using several chemical species and gases available in its environment. Consequently, it has the potential to be an important primary producer within its ecological niche.

In addition to the metabolic characteristics that distinguish both strains, the ability of *D. thermolithotrophum* strain BSA<sup>T</sup> to form macroscopic coloured streamers in liquid culture has not been reported previously, to our knowledge. Polymer production was very frequently observed in cultures of the novel isolate, and occurred systematically when cells were submitted to low oxygen concentrations. Based on the principle that bacterial polymers are generally produced as direct and functional responses to selective pressures in the environment (Whitfield, 1988), this observation could suggest that oxygen would be an important environmental constraint for polymer secretion. This hypothesis has still to be corroborated, especially since polymer production was also often observed under anaerobic conditions. A thorough investigation of the architecture of the unusual cellular network built by the novel isolate and an analysis of the chemical composition of the polymer matrix embedding



its cells is in progress. This may lead to physiological and ecological insights and to a better understanding of the population dynamic of the strain *in vitro* and *in situ* (Alain *et al.*, in preparation).

Furthermore, the novel isolate tolerated oxygen but was unable to use it as a terminal electron acceptor. Growth under non-reductive conditions occurred only under relatively gentle shaking (100 – 120 rpm) but never at high velocity (250 rpm). As stated in the Results section, products of anaerobic respiration (ammonia or H<sub>2</sub>S according to the electron acceptor provided in the medium) were detected in the culture media, suggesting the probable occurrence of local anaerobic microniches within the culture media. It is possible that the polymeric matrix, once produced by the cells in an anaerobic microniche, could protect them from oxygen while concurrently the H<sub>2</sub>S they produced would contribute to reducing the culture medium.

Although *Desulfurobacterium thermolithotrophum* and the novel isolate were both isolated from hydrothermal samples (sulphide chimney sample for *D. thermolithotrophum* and a tube of the polychaete *Paralvinella sulfincola* mixed with sulphide chimney fragment for the novel isolate), they exhibit major phenotypic differences. They were isolated from geographically well-separated hydrothermal environments. The first strain was isolated from a Mid-Atlantic Ridge sample (L'Haridon *et al.*, 1998) and the novel isolate from Juan de Fuca Pacific Ridge in the Pacific. Up to now, the occurrence of members of the genus *Desulfurobacterium*, detected either by culture or by molecular method, was restricted to hydrothermal chimneys of the Mid-Atlantic Ridge (Reysenbach *et al.*, 2000). This study expands their geographical localisation to deep-sea hydrothermal vents of the northeast Pacific. Considerable further work would be required to determine whether the observed differences between *D. thermolithotrophum* and the novel isolate are just a biogeographical consequence or are a result of a microflora selection by the different chemical and mineralogical differences between the two environments. Replicate sampling under similar habitat conditions will be required before any biogeographical influences can be considered. Additionally, a thorough examination of the architecture and polymeric composition of the unusual macroscopic network built by cells of the novel isolate (and perhaps by other members of this genus) might give us clues to understand their physiological and ecological behaviour in their biotope.

On the basis of the 16S rRNA sequence distance, the morphologic and major metabolic differences between the novel isolate and *Desulfurobacterium thermolithotrophum*, we propose to assign strain NE 1206<sup>T</sup> as the type strain of a novel species for which we propose the name *Desulfurobacterium crinifex* (= which makes hair).

### Amendment of the genus *Desulfurobacterium*

The description of *Desulfurobacterium* is based on L'Haridon *et al.* (1998), plus the following characteristics: Anaerobic. Sulphur, thiosulphate, sulphite and nitrate can be reduced. Cells, in liquid culture may form macroscopic coloured cell masses encased in a polymeric matrix.

### Description of *Desulfurobacterium crinifex*, sp. nov.

*Desulfurobacterium crinifex* sp. nov. (cri'ni.fex; L. masc. n. *crinis*, hair; L. suffix n. -fex, maker; N. L. nom n. *crinifex*, hair maker, to indicate the production of streamers by the organism). Cells are rod-shaped (0.9-3.5 length  $\times$  0.4-0.7  $\mu\text{m}$  wide), motile with polar flagella and stain Gram-negative. Cells divide by constriction. Growth occurs between 50 °C and 70 °C (optimum: 60-65 °C), pH 5.0 and 7.5 (optimum: 6.0-6.5), 20 and 40 g sea salts  $\text{l}^{-1}$  (optimum: 30 g sea salts  $\text{l}^{-1}$ ). Optimal doubling time around 1 h 15 min.; mean cell yield comprised between  $5 \times 10^7$  and  $1 \times 10^8$  cells  $\text{ml}^{-1}$ ; maximum cell yield:  $3 \times 10^8$  cells  $\text{ml}^{-1}$  in vials (with shaking). Anaerobic. Obligate chemolithoautotrophic. Hydrogen-oxidising. Reduces  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{S}^\circ$ .  $\text{H}_2\text{S}$  is formed from  $\text{S}^\circ$  and ammonia is formed from  $\text{NO}_3^-$ . G+C content is  $36.7 \pm 0.8$  mol%. Isolated from a tube of the hydrothermal annelid polychaete *Paralvinella sulfincola* from the Juan de Fuca Ridge (T&S edifice, 130°01'W, 45°59'N, 1581 m depth, CASM vent field). The type strain is *Desulfurobacterium crinifex* NE 1206<sup>T</sup> (DSM 15218<sup>T</sup>, CIP 107649<sup>T</sup>). The EMBL accession number for the 16S rDNA sequence for NE 1206<sup>T</sup> is AJ507320.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Professor H. Trüper (University of Bonn, Germany) for correction of the etymology of the new species. We are grateful to Christian Jeanthon and Stéphane L'Haridon for stimulating and critical discussions. We acknowledge the officers and crew of the R/V *Brown* and the ROV *Ropos* operations team. We thank the 'Service de microscopie électronique', IFR de biologie intégrative, CNRS/Paris VI, for transmission electron microscopy.

This work was financially supported by Ifremer, Programme Dorsales, Région Bretagne and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

## REFERENCES

Alain, K., Marteinsson, V.T., Miroshnichenko, M.L., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Prieur, D. & Birrien, J.-L. (2002a) *Marinitoga piezophila* sp. nov., a rod-shaped, thermo-piezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 1331-1339.

Alain, K., Quérellou, J., Lesongeur, F., Pignet, P., Crassous, P., Raguénès, G., Cuff, V. and Cambon-Bonavita, M.A. (2002b) *Caminibacter hydrogeniphilus*, gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic hydrogen-oxidising bacterium isolated from an East-Pacific rise hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 1317-1323.

Alain, K., Pignet, P., Zbinden, M., Quillevere, M., Duchiron, F., Donval, J.-P., Lesongeur, F., Raguènes, G., Crassous, P., Querellou, J., Cambon-Bonavita, M.-A. (2002c) *Caminicella sporogenes* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic spore-forming bacterium isolated from an East-Pacific Rise hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 1621-1628.

Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R. & Wolfe, R. S. (1979) Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol Rev* 43: 260-296.

Balk, M., Weijma, J. & Stams, A.J.M. (2002) *Thermotoga lettingae* sp. nov., a novel thermophilic, methanol-degrading bacterium isolated from a thermophilic anaerobic reactor. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 1361-1368.

Baross, J. A. (1995) Isolation, growth and maintenance of hyperthermophiles. In *Archaea: a Laboratory Manual. Thermophiles* (ed. F. T. Robb & A.R. Place. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory) 15-23.

Blumentals, I. I., Itoh, M., Olson, G. J. & Kelly, R. M. (1990) Role of polysulfides in reduction of elemental sulfur by the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *Appl Environ Microbiol* 56: 1255-1262.

Buck, J. D. (1982) Nonstaining (KOH) method for determination of Gram reactions of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* 44: 992-993.

Davey, M. E., Wood, W. A., Key, R., Nakamura, K. & Stahl, D. A. (1993) Isolation of three species of *Geotoga* and *Petrotoga*: two new genera, representing a new lineage in the bacterial line of descent distantly related to the “*Thermotogales*”. *System Appl Microbiol* 16: 191-200.

Eder, W. & Huber, R. (2002) New isolates and physiological properties of the *Aquificales* and description of *Thermocrinis albus* sp. nov.. *Extremophiles* 6: 309-318.

Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17: 368-376.

Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 30: 783-791.

Galtier, N., Gouy, M. & Gautier, C. (1996) SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 12: 543-548.

Götz, D., Banta, A., Beveridge, T.J., Rushdi, A.I., Simoneit, B.R.T. & Reysenbach, A.-L. (2002) *Persephonella marina* gen. nov., sp. nov. and *Persephonella guaymasensis* sp. nov., two novel, thermophilic, hydrogen-oxidizing microaerophiles from deep-sea hydrothermal vents. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 1349-1359.

Huber, R., Langworthy, T. A., König, H., Thomm, M., Woese, C. R., Sleytr, U. B. & Stetter, K. O. (1986) *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90 °C. *Arch Microbiol* 144: 324-333.

Huber, R., Woese, C. R., Langworthy, T. A., Fricke, H. & Stetter, K. O. (1989) *Thermosiphon africanus* gen. nov., represents a new genus of thermophilic eubacteria within the “*Thermotogales*”. *System Appl Microbiol* 12: 32-37.

Huber, R., Wilharm, T., Huber, D., Trincone, A., Burggraf, S., König, H., Rachel, R., Rockinger, I., Fricke, H. & Stetter, K.O. (1992) *Aquifex pyrophilus* gen. nov. sp. nov., represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. *System Appl Microbiol* 15: 340-351.

Huber, R., Eder, W., Heldwein, S., Wanner, G., Huber, H., Rachel, R., & Stetter, K.O. (1998) *Thermocrinis ruber* gen. nov. sp. nov., a pink-filament-forming hyperthermophilic bacterium isolated from Yellowstone National park. *Appl Environ Microbiol* 64: 3576-3583.

Huber H., Diller, S., Horn, C. & Rachel, R. (2002) *Thermovibrio ruber* gen. nov., sp. nov., a novel extremely thermophilic, chemolithoautotrophic deeply branching bacterial nitrate-reducer. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 1859-1865.

Kawasumi, T., Igarashi, Y., Kodama, T. & Minoda, Y. (1984) *Hydrogenobacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., an extremely thermophilic, aerobic, hydrogen-oxidizing bacterium. *Int J Syst Bact* 34: 5-10.

L'Haridon, S., Cilia, V., Messner, P., Raguénès, G., Gambacorta, A., Sleytr, U.B., Prieur, D. & Jeanthon, C. (1998) *Desulfurobacterium thermolithotrophum* gen. nov., sp. nov., a novel autotrophic, sulphur-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Bact* 48: 701-711.

L'Haridon, S. & Jeanthon, C. (2001) *Genus incertae sedis* I. *Desulfurobacterium*. In *Bergey's manual of Systematic bacteriology*. 2<sup>nd</sup> edn. Vol. one, pp 359-367. Edited by G. m. Garrity. New York, Berlin, Heidelberg: Springer.

Marmur, J. & Doty, P. (1962) Determination of the base composition of desoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol* 5: 109-118.

Patel, B. K. C., Morgan, H. W. & Daniel, R. M. (1985) *Fervidobacterium nodosum* gen. nov. and spec. nov., a new chemoorganotrophic, caldoactive, anaerobic bacterium. *Arch Microbiol* 141: 63-69.

Powers, E. M. (1995) Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining Gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. *Appl Environ Microbiol* 61: 3756-3758.

Ravot, G., Ollivier, B., Magot, M., Patel, B. K. C., Crolet, J.-L., Fardeau, M.-L. & Garcia, J.-L. (1995) Thiosulfate reduction, an important physiological feature shared by members of the order *Thermotogales*. *Appl Environ Microbiol* 61: 2053-2055.

Reysenbach, A. L., Longnecker, K. & Kirshtein, J. (2000) Novel bacterial and archaeal lineages from an *in situ* growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Appl Environ Microbiol* 66: 3798-3806.

Reysenbach, A.-L. (2001) Phylum BI. *Aquificae* phy. nov. *In* Bergey's manual of Systematic bacteriology. 2<sup>nd</sup> edn. Vol. one, pp 359-367. Edited by G. m. Garrity. New York, Berlin, Heidelberg: Springer.

Ryu, E (1940) A simple method of differentiation between Gram-positive and Gram-negative organisms without staining. *Kitasato Arch Exp Med* 17: 58-63.

Saitou, M. & Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.

Stöhr, R., Waberski, A., Völker, H., Tindall, B.J. & Thomm, M. (2001) *Hydrogenothermus marinus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, recognition of *Calderobacterium hydrogenophilum* as a member of the genus *Hydrogenobacter* and proposal of the reclassification of *Hydrogenobacter acidophilus* as *Hydrogenobaculum acidophilum* gen. nov., comb. nov., in the phylum '*Hydrogenobacter/aquifex*'. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 1853-1862.

Takai, K., Komatsu, T. & Horikoshi, K. (2001) *Hydrogenobacter subterraneus* sp. nov., an extremely thermophilic, heterotrophic bacterium unable to grow on hydrogen gas, from deep subsurface geothermal water. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 1425-1435.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.

Wery, N., Lesongeur, F., Pignet, P., Derennes, V., Cambon-Bonavita, M.A., Godfroy, A. & Barbier, G. (2001) *Marinitoga camini* gen. nov., sp. nov., a rod-shaped bacterium belonging to the order *Thermotogales*, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 495-504.

Whitfield, C. (1988) Bacterial extracellular polysaccharides. *Can J Microbiol* 34: 415-420.

## II.4. Conclusion des études taxinomiques

Les études microbiologiques réalisées à partir d'échantillons de tubes de différentes espèces de polychètes Alvinellidae provenant des dorsales actives du Nord Est Pacifique ou des cheminées hydrothermales du Pacifique oriental, nous ont permis d'isoler des micro-organismes, mésophiles ou thermophiles, utilisant des voies métaboliques variées. De nombreux micro-organismes fermentaires appartenant à l'ordre archéen des *Thermococcales* et à l'ordre bactérien des *Thermotogales* ont notamment été isolés. Une bactérie chimioorganohétérotrophe appartenant, elle, au phylum des Firmicutes et appelée *Caminicella sporogenes* (gen. nov., sp. nov.), a ainsi fait l'objet d'une caractérisation (Alain *et al.*, 2002). Les micro-organismes hétérotrophes isolés pourraient être impliqués dans la dégradation des sécrétions de mucus et des tubes produits par les alvinelles, ainsi que dans le recyclage des débris organiques présents dans le micro-environnement de ces polychètes. Plusieurs souches chimiolithoautotrophes ont également été isolées durant ce travail. Deux d'entre elles, appelées, respectivement, *Caminiobacter hydrogeniphilus* (gen. nov., sp. nov.) et *Desulfurobacterium crinifex* (gen. nov., sp. nov.), et appartenant aux  $\epsilon$ -*Proteobacteria* et à une lignée bactérienne profonde (située entre l'ordre des *Thermotogales* et l'ordre des *Aquificales*), ont été décrites (Alain *et al.*, 2002d; Alain *et al.*, 2003). Ces 2 souches sont des bactéries autotrophes thermophiles oxydant l'hydrogène et réduisant le soufre et les nitrates. Outre l'intérêt lié à leur position taxinomique nouvelle, ces micro-organismes sont intéressants à divers titres. Ainsi, *Caminiobacter hydrogeniphilus* est la première souche appartenant aux  $\epsilon$ -*Proteobacteria* qui ait été isolée d'une source hydrothermale océanique profonde. Avant son isolement, les  $\epsilon$ -*Proteobacteria* d'origine hydrothermale étaient connues uniquement par leurs séquences d'ADNr 16S (Polz et Cavanaugh, 1995; Reysenbach *et al.*, 2000; Corre *et al.*, 2001; Longnecker et Reysenbach, 2001; Alain *et al.*, 2002b). Les études moléculaires les ayant mises en évidence avaient démontré qu'il existait une diversité génétique extrêmement importante au sein de ce groupe. Ceci ajouté au fait que leur présence était systématique sur les édifices hydrothermaux étudiés et qu'ils étaient numériquement importants, avait conduit à l'hypothèse que ces micro-organismes affiliés aux  $\epsilon$ -*Proteobacteria* pourraient constituer des maillons importants du compartiment microbien de l'écosystème hydrothermal (Longnecker et Reysenbach, 2001; Alain *et al.*, 2002b). L'isolement de *Caminiobacter hydrogeniphilus* a permis de démontrer que certaines  $\epsilon$ -*Proteobacteria* d'origine hydrothermale sont thermophiles et susceptibles d'intervenir dans les cycles géochimiques hydrothermaux du soufre et de l'azote. En outre, des travaux ultérieurs ont rapporté l'isolement d'autres  $\epsilon$ -*Proteobacteria* hydrothermales, susceptibles également d'intervenir dans ces cycles (Miroshnichenko *et al.*, 2002; Takai *et al.*, 2003a). *Desulfurobacterium crinifex*, le second isolat autotrophe ayant fait l'objet d'une caractérisation, présente la caractéristique originale de sécréter de grandes quantités de polymère, et, de former, *in vitro*, des macrostructures atypiques dans lesquelles ses cellules sont



engluées. Cette propriété sécrétrice est également partagée par une bactérie du même genre isolée de fluides hydrothermaux prélevés sur la dorsale Juan de Fuca (Huber *et al.*, 2003). Au sein leur environnement naturel, les micro-organismes autotrophes *Caminibacter hydrogeniphilus* et *Desulfurobacterium crinifex* sont probablement des producteurs primaires.

### Chapitre III. De la description d'un environnement à des hypothèses sur son écologie.

L'évolution de nos travaux et les résultats obtenus au cours des différentes étapes du travail nous ont amenés à nous poser des questions sur l'écologie et le fonctionnement de l'écosystème hydrothermal. Ainsi, les derniers travaux effectués témoignent de l'évolution du sujet vers des questions d'écologie microbienne et d'écologie fonctionnelle qui intègrent des approches pluridisciplinaires.

#### III.1. Description des macrostructures formées par *Desulfurobacterium crinifex* et de leurs propriétés : implications écologiques.

L'observation des macrostructures filamenteuses originales formées en culture par *Desulfurobacterium crinifex* nous a amenée à nous poser des questions sur leur fonction. Une observation approfondie de ces structures, ainsi qu'une caractérisation préliminaire du polymère et de ses propriétés ont donc été réalisées afin de tenter d'élucider ce rôle. Ces travaux sont décrits dans l'article n°6.

Article 6 : **Karine Alain**, Philippe Crassous, Jean Guézennec, Yves Fouquet, Magali Zbinden, Marie-Anne Cambon-Bonavita et Joël Quérellou. Conspicuous filamentous networks of the thermophilic hydrothermal vent species *Desulfurobacterium crinifex* : spatial arrangement of cells *in vitro*, polymer production and mineral precipitation capabilities. *Extremophiles*, en préparation.

---

## Article 6

### **Réseaux filamenteux macroscopiques formés par l'espèce thermophile hydrothermale *Desulfurobacterium crinifex* : arrangement spatial des cellules *in vitro*, production de polymère et propriétés de précipitations minérales.**

Karine Alain, Philippe Crassous, Jean Guézennec, Yves Fouquet, Magali Zbinden,  
Marie-Anne Cambon-Bonavita et Joël Quéréllou.

Extremophiles, soumis.

---

**To submission in the journal *Extremophiles***

**Conspicuous filamentous networks of the thermophilic hydrothermal vent species  
*Desulfurobacterium crinifex* : spatial arrangement of cells *in vitro*, polymer production  
and mineral precipitation capabilities.**

Karine ALAIN<sup>1</sup>, Philippe CRASSOUS<sup>2</sup>, Jean GUEZENNEC<sup>3</sup>, Yves FOUQUET<sup>4</sup>, Magali  
ZBINDEN<sup>5</sup>, Marie-Anne CAMBON-BONAVITA<sup>1</sup> & Joël QUERELLOU<sup>1\*</sup>.

Running title : Macroscopic networks built by *Desulfurobacterium crinifex*

<sup>1</sup> Laboratoire de Microbiologie et de Biotechnologie des Extrêmophiles, Département de Valorisation des Produits, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France.

<sup>2</sup> Département Environnement Profond, Direction des Ressources Océaniques, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France.

<sup>3</sup> Laboratoire Biotechnologie et Molécules Marines, Département de Valorisation des Produits, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France.

<sup>4</sup> Laboratoire Géochimie-Métallogénie, Département Géosciences marines, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France.

<sup>5</sup> UMR SAE, Adaptations aux milieux extrêmes, Université Pierre et Marie Curie, 7, quai Saint Bernard, 75252 Paris Cédex 05, France.

\* corresponding author: Mailing address: Laboratoire de Microbiologie et de Biotechnologie des Extrêmophiles, Département de Valorisation des Produits, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France  
Tel:+33-2-98-22-46-86. Fax: +33-2-98-22-47-57. e-mail: jquerell@ifremer.fr

Keywords: deep-sea hydrothermal vent, polymer, crystals, cells network, thermophile, *Desulfurobacterium crinifex*.

## **Abstract**

The recently described chemolithoautotrophic bacterium *Desulfurobacterium crinifex*, isolated from a deep-sea hydrothermal vent, is able to form *in vitro*, characteristic, atypical streamer-like macroscopic networks. By the combined use of scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) analysis, we determined the spatial arrangements of cells during the formation of these networks. Within these macrostructures, the dividing-bacterial cells forming micro-colonies secrete a polymeric matrix mainly composed of carbohydrates in which they are embedded, and form uni- or multi-lobed globules which are themselves covered of a polymeric sheath extending to the whole surface of the streamer. Analyses by induced coupled plasma (ICP) spectroscopy demonstrated a very strong metal biosorption capacity of the biomass (bacterial cells + polymer) and, on an other scale, a trapping capacity for other chemical species. Furthermore, mineral crystallization processes, systematically induced in polymer-secreting cultures, were put to the fore by extensive SEM analyses. Crystals of calcium carbonate, calcium sulfate and magnesium sulfate were identified by the combination of EDX-spectroscopy and X-ray diffraction. Because biofilms and microbial mats are common features around deep-sea hydrothermal vent fluid emissions, these results raise the question of their ecological significance at deep-sea hydrothermal vents. Their contribution to mineral deposition is also discussed.

## Introduction

Over the past twenty-five years, deep-sea hydrothermal vents from Pacific and Atlantic oceans and the more recently discovered ones from Indian ocean have been the target of extensive research at biological, ecological, geological, geochemical and microbiological levels. These tectonically and volcanically-active environments are considered as extreme from an anthropocentric point of view. They are inhabited by a luxuriant and unusual micro- and macro-fauna. Around the emissions of the heated and reduced fluid, a rich microbial diversity has been described. These areas, limited both in time and in space and characterized by a high hydrostatic pressure and by steep chemical and thermal gradients, are of keen interest to microbiologists. Consequently, they are among the most studied extreme environments. In addition, unusual micro-organisms thriving in these environments are of considerable biotechnological interest as potential sources of thermostable enzymes, biologically active molecules or metabolites, and biopolymers such as exopolysaccharides and poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates. Within the past decade, results obtained by cultivation-independent molecular 16S rDNA-based methods, have highlighted the fact that an overwhelming proportion of the hydrothermal microbial species, genera and even orders were still uncultivated and that culturing efforts should continue (Jeanthon, 2000; Quérellou *et al.* 2001). To date, several chemolithoautotroph, chemoorganoheterotroph and mixotroph archaeal and bacterial species have been isolated from deep-sea vents (Godfroy *et al.* 1997; Jeanthon *et al.* 1998; L'Haridon *et al.* 1998; Barbier *et al.* 1999; Takai *et al.* 2000; Wery *et al.* 2001; Alain *et al.* 2002a, 2002b, 2002c; Gotz *et al.* 2002; Jeanthon *et al.* 2002; Miroschnichenko *et al.* 2002, 2003; Cambon-Bonavita *et al.*, 2003).

Marine prokaryotic biopolymers represent a category of products of growing interest for many industrial sectors. Due to their interesting rheological characteristics, metal binding properties, biological activities and original chemical composition, they are expected to find biotechnological applications in the near future, in many industrial sectors such as food industry, pharmacy, medicine or bioremediation domain (Guézennec 2002). Up to now, only few polymer-excreting micro-organisms have been isolated from deep-sea hydrothermal vents. The majority of them belongs to aerobic mesophilic strains of the bacterial subclass  $\gamma$  of *Proteobacteria* (Vincent *et al.* 1994; Raguénès *et al.* 1996, 1997a, 1997b, 2003). A few species belong to fermentative thermophilic or hyperthermophilic micro-organisms of the bacterial genus *Thermotoga* (Rinker and Kelly 2000) or the archaeal genus *Thermococcus* (Rinker and Kelly 1996). Excreted polymers can display a wide range of properties, depending on the strain and on the physico-chemical characteristics of the natural habitat in which the micro-organism thrives. The main functions assigned to exopolymeric-exopolysaccharidic sheaths (capsules or slimes) in natural environments are : (i) to intervene in the adhesion of cells to surfaces of their immediate environment, providing micro-organisms the capability to form biofilms in some cases; (ii) to protect cells from harmful conditions, antibacterial agents or predation by protozoans; (iii) to release carbon excesses in response to an energy source limitation, (iv) to transport reducing equivalents out of the cell, and (v) to chelate or to trap metal ions which can be required or toxic for

bacterial life (Whitfield 1988; Weiner *et al.* 1995; De Philippis and Vincenzini 1998; Rinker and Kelly 2000).

The ecology of micro-organisms from deep-sea vents is still understudied, and the precise function of polymers excreted by some of them, like the role of mats formed by microbial communities, has not yet been addressed. These questions may find a beginning of answer thanks to the organization of cells observed *in vitro* with the novel species *Desulfurobacterium crinifex* (Alain *et al.* 2003). This novel thermophilic polymer-secreting strain was isolated from a Juan de Fuca ridge hydrothermal vent (Axial Volcano, CASM vent field). It grows chemolithoautotrophically by nitrate or sulfur reduction and has the ability to build up conspicuous streamers composed of a polymeric matrix within which microbial cells are embedded. The subject of the present work was to describe these unusual cellular networks by microscopic and analytical techniques. The architecture and formation of these macroscopically visible streamers built up *in vitro*, the chemical composition of the polymeric matrix embedding the *D. crinifex* community and some properties of this microbial colony wrapped up in its secreted sheath are hereafter described. These observations raise the question of the physiology of this strain *in situ* and of its ecological significance.

## Materials & Methods

### *Strain source*

*Desulfurobacterium crinifex* NE1206<sup>T</sup> was isolated from a deep-sea hydrothermal vent sample collected on the Juan de Fuca ridge (T&S edifice, 130°01'W, 45°59'N, 1581 m depth, CASM vent field) as described elsewhere (Alain *et al.* 2003). The type strain NE1206<sup>T</sup> was deposited in the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) and the Collection de l'Institut Pasteur (CIP) public collections. Its references in these collections are, respectively, DSM 15218<sup>T</sup> and CIP 107649<sup>T</sup>.

### *Media and culture conditions*

The strain was routinely cultivated with H<sub>2</sub> as electron donor, CO<sub>2</sub> as a carbon source and nitrate as terminal electron acceptor, on KA22 medium (Alain *et al.* 2002b) containing l<sup>-1</sup>: 30 g sea salts (Sigma), 2.54 g Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (Merck), 1 g NaHCO<sub>3</sub>, 1.95 g MES buffer (Sigma), 12 g elemental sulfur (Prolabo), 0.3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma), 0.5 ml vitamin mixture (Balch *et al.* 1979), 10 ml trace element solution (= 1X) (Balch *et al.* 1979) and 1 mg resazurin (Sigma). Its pH was adjusted to 6.5 at room temperature, before autoclaving, and the medium was reduced by 0.5 g l<sup>-1</sup> sodium sulfide before inoculation. A mixture of H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20 by vol.; 200 kPa) was used as the gas phase. Unless indicated otherwise, cultures were incubated at 60°C at 100 rpm.

In order to determine approximately the quantity of polymer produced per cell, cells of concentrated cultures were counted onto a Thoma chamber and the exopolymer-producing culture was lyophilized

then weighted (because of the architecture of the macrostructures within which cells were encased, cells could not be eliminated before lyophilization).

To investigate how different physiological and chemical conditions influence polymer and polyhydroxyalkanoate production, the strain was cultivated on the usual medium and conditions modified as follow:

- to test the ability of the strain to grow with its exopolymer as a carbon source, the KA22 medium was prepared without NaHCO<sub>3</sub> and supplemented with 2 g l<sup>-1</sup> lyophilized exopolymer. In this experiment, the gas phase was replaced by H<sub>2</sub> (100%; 200 kPa).
- to test the influence of pH, salinity and temperature on the construction of polymeric macrofilaments, strain NE1206<sup>T</sup> was cultivated in the conditions described elsewhere, conditions tested during the characterization of the strain (Alain *et al.* 2003).
- to investigate the influence of trace element concentration on the production of extracellular polymeric material, the isolate was cultivated without trace element and with trace element concentrations ranging from 1X to 40X.
- to investigate the influence of oxygen micro-concentrations on the polymer production, the strain was cultivated in KA22 medium under a gas phase containing 0.1 to 3% oxygen.

All these experiments were carried out at least in duplicate.

### ***Scanning electron microscopy***

Macroscopic streamers were deposited directly onto filters and fixed over-night in a box under an atmosphere of formaldehyde. Samples were then coated with gold (SCD040, Balzers) and examined with a scanning electron microscope XL 30-LaB6 (Philips). Alternatively, samples were dehydrated through a series of vials of increasing concentrations of ethyl alcohol then dried using the carbon dioxide critical point procedure described elsewhere (Alain *et al.* 2002a), before being observed by scanning electron microscopy (SEM).

The elemental composition of the particles accumulated during bacterial growth was analyzed by energy-dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX) (Philips XL 30-LaB6 EDX 4i).

### ***Transmission electron microscopy***

Macroscopic filamentous streamers, of different thickness, built by the cells, were fixed at room temperature in a fixative solution containing 3 % glutaraldehyde (v/v), 0.2 M cacodylate buffer, pH = 7.4, and 0.35 M sucrose. After 1 h 30 min. fixation, the fixative solution was carefully removed and replaced by the washing solution (0.2 M cacodylate – 0.5 M saccharose; pH 7.4). A post-fixation in osmium tetroxyde (0.2 M cacodylate buffer) was then performed. Samples were then dehydrated in ethanol and propylene oxide series. Ultra-thin sections (50 nm) were obtained on a Reichert-Jung Ultramicrotome. TEM observations were performed on a LEO 912 electron microscope with a LaB6 source.



### **Whole-cell hybridization**

In order to visualize the arrangement of cells within the macroscopically visible network, whole-cell hybridization experiments were performed. Macroscopic streamers from mid-exponential and stationary phases of growth cultures were picked up with a sterile inoculating loop then transferred in a fixation solution of NaCl 23 g l<sup>-1</sup> / formaldehyde 3% (v/v). After 2 h incubation at room temperature, the preparation was washed in phosphate-buffered saline (PBS). Fixed aggregates were spotted onto an hydrophobic super-Teflon® treated microscopic slide (Polylabo), then dried at 45°C during 30 min. Afterwards, they were dried up by successive transfers in ethanol solutions of increasing concentrations. After drying at room temperature, cells were hybridized with the universal bacterial probe EUB338 (5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3') (Amann *et al.* 1990) labeled with Fluorescein-isothiocyanate (FITC) (Eurogentec) or with the universal *Aquificales-Desulfurobacterium* probe HYDR540 (5'-TCG-CGC-AAC-GCT-CGG-GAC-C-3') (Harmsen *et al.* 1997) labeled with Indocarbocyanin (Cy3) (Eurogentec). Fluorescent *In situ* hybridizations (FISH) were carried out at 46°C after addition of 1.5 µl probe and 13.5 µl hybridization solution (NaCl 5M: 360 µl, Tris-HCl 1M: 40 µl, formamide: 200 µl for Eub338 and 1200 µl for Hydr540, sodium dodecyl sulfate (SDS) 10%: 2 µl, deionized water: 1398 µl for Eub338 and 398 µl for hydr540) onto each well of the slide. After 2 h hybridization, the slide was washed up 20 min. at 48°C in a wash solution (NaCl 5M: 4.5 ml, Tris-HCl 1M: 1 ml, SDS 10%: 50 µl, deionized water: 44.45 ml). After the FISH procedure, each sample was stained with 10 µl of 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI 2 mg l<sup>-1</sup>). After addition of Citifluor (Citifluor Ltd; U.K.) on the slide, the hybridized cells were viewed with an Olympus microscope (BH-2) equipped with a UV lamp and filters for FITC or Cy3.

### **Isolation and purification of bacterial polymer**

Bacterial biomass was made soluble in a 0.1 M NaCl solution at 50°C for 2 hours. The cells were removed by high speed centrifugation and the resulting supernatant purified by dialysis (cut-off 30 000 daltons) under running milli-Q water for 48 hours. The polysaccharide was then lyophilized prior to chemical analysis.

### **Chemical analyses**

The molar ratio of monosaccharides was determined according to Kamerling *et al.* (1975) and Montreuil *et al.* (1986). Briefly the monosaccharide residues were analysed after either aqueous acidic hydrolysis or acidic methanolysis of the polymer and subsequent GC and GC/MS analyses as peracetylated derivatives or trimethylsilyl derivatives, respectively. Protein content was determined by the method of Lowry *et al.* (1953), with bovine serum albumin as standards.

### **Fourier transform-infrared spectroscopy (FTIR)**

Pellets for Fourier transform-infrared analysis were obtained by carefully grinding a mixture of 2 mg of polymer with 200 mg of dry KBr and then pressing in a 16 mm diameter mold. FTIR spectra were

recorded on a Bruker vector 22 instrument with a resolution of  $4\text{ cm}^{-1}$ . Spectra were run in the  $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$  region.

#### ***Induced Coupled Plasma spectroscopy (ICP)***

Biosorption properties of the biomass (bacterial cells + polymeric substance) were investigated by comparing the concentrations of different ions present in the culture medium before inoculation and at the end of the experiment. The biomass was then separated from the medium by high speed centrifugation and the supernatant analyzed by induced couple plasma (ICP) for ion contents. Induced Coupled Plasma spectroscopy analyses were performed on a Vista Pro Varian ICP-AES after dissolving the biomass in concentrated nitric acid.

#### ***X-ray diffraction (XRD)***

Bulk mineral composition was obtained using powder X-ray diffraction technique. The equipment used was a Bruker D-500 goniometer coupled to a Cu X-ray tube, with the automated DAC0-MP system for data acquisition. Mineral phases were identified on the diffraction spectra using the EVA program. The samples were dried at ambient temperature and then prepared under the binocular on double sided sticky paper in order to concentrate all available material on a surface close to the size of the X-ray window. Analytical conditions routinely used were: 25 ma, 35 Kv.; Start :  $5^\circ$ , End :  $70^\circ$ , Step :  $0.02^\circ$ , Step Time : 5,0 s. Background and  $\text{CuK}\alpha_2$  lines were removed from the diagram.

## **Results**

The strain *Desulfurobacterium crinifex* is frequently observed to grow in an extensive polymer matrix as massif and compact accumulation of cells in a nodular manner (Alain *et al.* 2003). These atypical macroscopic structures, morphologically comparable to pinkish streamers, and some of their properties are described herein.

#### ***Spatial arrangement of cells within the in vitro-built conspicuous filamentous cellular networks***

These structures, attached by a root to the bottom of the vial or to any solid material inserted in the medium, floated in the culture media and spread out by thin ramifications at the medium culture surface. They exhibited a pinkish-brownish color resulting from the trapping of the colored compounds of the medium (trace elements and resazurin). Their diameter was variable among different cultures, with a maximum diameter of 2 mm for a length of approximately 3 cm observed for a 30 ml culture. The totality of the macrofilament was covered by a polymeric sheath. The ultrastructure of these streamers was examined by scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and fluorescent *in situ* hybridization (FISH). It was found to be highly conserved from one streamer to another. The outside sheath of the macrofilament covered a large

assemblage of small uni- or multi-lobed corpuscles, with a homogeneous polymeric appearance and a conserved spherical lobe diameter of 12-15  $\mu\text{m}$  (Fig. 1a, 1b). Furthermore, the polymeric sheath embedding the macrofilament was through and through deformed by typical spherical extents pierced of small holes (Fig. 1c). The spherical corpuscles contained a very dense network of very small rods (Fig. 1d). SEM observations of macrofilaments under construction and FISH analyses - performed with domain- and phylum-specific bacterial and *Aquificales-Desulfurobacterium* hybridization probes - demonstrated that these rods were bacterial cells (Fig. 1e, 1f, 1g). TEM of thin sections of the macrofilaments revealed that cells were dividing inside these macroscopic streamers (Fig. 1h). In other respects, it was observed that the length of the bacterial cells inside the macrofilaments ( $0.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ) was inferior to that measured on free living cells of *D. crinifex* (Alain *et al.* 2003). Cells were orientated longitudinally or horizontally depending on the level in which they were, and distances between cells were relatively conserved ( $0.05 \pm 0.03 \mu\text{m}$ ) (Fig. 1h).

#### ***Exopolymer production, chemical composition and properties***

The macrofilament structure was cemented by a polymeric matrix. A mean production of  $12 \pm 5 \text{ pg}$  of polymer per cell was measured. In addition to the observations obtained during the characterization of the strain, experiments were carried out to determine the conditions inducing polymer production. Mucous streamers were observed only, but not systematically, around the optimal temperature (60-65°C), pH (5.5-6.5) and salinity (25-35  $\text{g l}^{-1}$  sea salts) for growth, but never at the limits of these factors. Macrofilaments were built with  $\text{H}_2$  as electron donor,  $\text{CO}_2$  as carbon source and either with nitrate or sulfur as sole terminal electron acceptor. The production of exopolymeric material was found to be independent of the presence of trace elements ( $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{CoSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  (Balch *et al.* 1979)) but was demonstrated to be favored by the presence of these minerals in the culture medium (production of polymer was observed with mineral concentrations two to thirty times (2X to 30X) superior to the trace element concentrations (1X) routinely used). Finally, growth of *D. crinifex*, described as an anaerobe (Alain *et al.* 2003), was often observed in media containing traces of oxygen (in the range 0.1-3%  $\text{O}_2$ ) and was systematically accompanied by macrofilament formation.

Chemical analyses of the polymer indicated the presence of both proteins and carbohydrates as main components of the extracellular substance. Proteins accounted for up to 15 % of the total polymeric substance. Neutral sugars were mostly present in the carbohydrate moiety, with galactose, glucose, arabinose and ribose predominating. Uronic acid and galacturonic acid were present at very low concentrations. FTIR analyses revealed a slight absorption band at  $1720 \text{ cm}^{-1}$ , indicating the presence of acyl groups while no doublets at  $1250 \text{ cm}^{-1}$ – $1230 \text{ cm}^{-1}$ , characteristic of the presence of ester sulfate groups, were observed on the spectrum.

The binding capacity of the total biomass, as measured by ICP, ranged from 86% to 99% for trace elements such as iron, manganese, molybdenum, cobalt, zinc and copper and was low for aluminium, with percentages ranging from 10% to 25% of the initial concentration. It was considerably lower (from 9 to 25%) for elements like sodium, magnesium, potassium and calcium, for which the initial concentration was more important in the culture medium.

### ***Mineral precipitation capabilities***

Scanning electron microscopy observations revealed the systematic presence of numerous mineral crystals within macrofilament-containing cultures (Fig. 2a-2d), while mineralizations were absent from non-inoculated media incubated under exactly the same conditions.

Crystals were completely embedded in the polymeric matrix or free in the culture medium. They included cubes, prisms, cauliflower-like forms and bladed parallelepipeds with either cubic, orthorhombic or monoclinic appearances. A maximum size of 52  $\mu\text{m}$  was measured for one of these crystals within a 30 ml culture of *Desulfurobacterium crinifex*. Combination of SEM imaging and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) provided their chemical composition. X-ray diffraction analysis (XRD) was performed in order to identify the minerals (data not shown). However, XRD results were not always interpretable because of numerous interferences with the elemental sulfur pattern and/or the relatively low concentration of the crystals in comparison to that of the biomass. Tabular bladed crystals with a slanted parallelogram outline and bladed blocky crystals were analyzed by EDX spectroscopy and identified as calcium sulfate (Fig. 2a, 2b). They could correspond to anhydrite ( $\text{CaSO}_4$ ) or gypsum (hydrated calcium sulfate  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) minerals. Due to interferences with the elemental sulfur pattern, XRD analysis did not allow to discriminate between these two forms. However, the major diffraction line characteristic of anhydrite was retrieved by XRD and the qualitative analysis performed by EDX-spectroscopy allowed to calculate an atomic percentage of the different elements close to that of anhydrite but very different from that of gypsum. Calcium sulfate crystals were often highly represented in polymer-producing cultures. Few crystalline solids identified by EDX spectroscopy as magnesium sulfates were also detected in some cultures. Crystals with radial fibrous showing a cauliflower-like form were found to be composed of calcium carbonate (Fig. 2c). They could correspond to calcite ( $\text{CaCO}_3$ ) or aragonite ( $\text{CaCO}_3$ ). Furthermore, in few cases, complex assemblages of metals and salts were also observed by SEM-EDX (Fig. 2d). The relative proportion of each crystal category was very different from one culture to another.

## **Discussion**

To our knowledge, this is the first observation of a such conserved and organized macrostructure formed *in vitro* by a pure culture of a deep-sea vent bacterial strain. *Desulfurobacterium crinifex* strain

NE1206<sup>T</sup>, which is a strict chemoautotrophic bacterium using CO<sub>2</sub> as sole carbon source, possesses obviously a very efficient carbon fixation pathway.

### ***Exopolymer***

The production of exocellular investments of a polymeric nature, and notably of a polysaccharidic nature, is generally considered to be directly related to environmental constraints on the producing micro-organism (Dudman 1977; Whitfield 1988; De Philippis and Vincenzini 1998). In the case of *D. crinifex*, this polymer production occurred under optimal *in vitro* growth conditions. Furthermore, micro-oxic conditions and high mineral concentrations would seem to be selective pressures favoring the production of polymer by the strain. Interestingly, this polymer was found to contain high amounts of C<sub>5</sub> carbohydrates - arabinose and ribose -, compounds rarely present in microbial exopolysaccharides.

ICP analyses demonstrated a strong binding capacity of the biomass for many metals and chemical elements. The presence of acyl groups rather than neutral sugars in the bacterial polymer could be responsible for part of the binding capacity of the extracellular substance. But on the other hand, living or even dead cells could also participate in the binding of such elements through their own metabolism, membranes and cell wall components as well.

### ***Mineral precipitations***

Our results showed that mineralizations are mediated or consecutive to polymeric secretions and occur randomly.

Precipitation reactions usually occur when solutes encounter a change of pH, temperature or when their concentrations increase locally, leading to the formation of a new solid from soluble ionic species. In our case, the binding properties of the biomass for metals and ions could be at the origin of the observed mineralizations. These adsorption properties led to an increase in metal and ion concentrations near the polymeric matrix and this local accumulation of elements would be one of the event leading to a shift of the equilibrium towards crystal formation.

There is an increasing evidence that micro-organisms play a role in mineral deposition at deep-sea hydrothermal vent chimneys. Since more than a decade, studies have led to the hypothesis that filamentous structures observed at many deep-sea hydrothermal vent sites and thought to be microbial cells (demonstrated to be of a biologic nature by an acridine-orange staining) were obviously involved in silica and iron deposition at these sites (Juniper and Fouquet 1988). Recent studies have demonstrated the presence of iron-oxidizing bacteria in hydrothermal gelatinous microbial mats rich in iron-oxides (Emerson and Moyer 2002), and other studies have examined the ultrastructure of bacteriogenic iron oxides from hydrothermal vents (Kennedy *et al.* 2003). The microbiologically-mediated crystallization observed with our polymer-producing isolate raises, one more time, the

question of the implication of bacteria in mineralisation processes. For example, in the case of calcium sulfate minerals, which have been detected in several culture of *D. crinifex*, geochemical evidence indicates that anhydrite ( $\text{CaSO}_4$ ) found at deep-sea hydrothermal vents is formed abiotically by heating seawater at temperatures exceeding  $160^\circ\text{C}$ , and that gypsum ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) results of anhydrite hydration. In our cultures, the direct biogenic production of calcium sulfate crystals at  $60^\circ\text{C}$ , probably results from a local supersaturation of the elements. Even if the mechanism seems to be random in our case, such mineralisation processes induced by microbial mats or microbial biofilms, may, under certain conditions, play a major role in the mineral deposition. Besides, it is also conceivable that part of the hydrothermal minerals formed at temperature lower than  $121^\circ\text{C}$  (the maximum temperature for growth known actually for a micro-organism (Kashefi and Lovley 2003)), whose formation can be totally explained geochemically, could be of a biogenic origin.

### ***Macrostructure construction as an ecological strategy ?***

The role of these atypical macrostructures built by *D. crinifex* has not been investigated in this study. However, in the light of our observations of the streamers and their properties, some hypotheses may be proposed. Our experiments demonstrated that *D. crinifex* was unable to grow with the polymer as sole carbon source. These macrofilaments may be, thus, a life mode adopted by the strain to adapt to its natural environment.

*D. crinifex* was isolated from a material consisting of small fragments of sulphide chimney (essentially composed of sphalerite  $\text{ZnS}$ , marcassite  $\text{FeS}_2$ , pyrite  $\text{FeS}_2$  and barite  $\text{BaSO}_4$ ) from actively venting edifices of the Juan de Fuca Ridge, mixed with adhering tubes of the polychaete worm *Paralvinella sulfincola*. The deep-sea hydrothermal vent environment is among the most extreme environments on Earth since its inhabitants are constantly submitted to high hydrostatic pressures, high temperatures variations at the centimetre scale level, and strong gradients of sulphide and metal concentrations. The ecological niches are there numerous and, even within a restricted area, the environmental variations can be important. The macrostructures could serve to moderate environmental physico-chemical shifts and to create a stable microhabitat.

The polymeric streamers may also serve as a protection in such an unstable environment. Some experimental results argue for this protective role. The polymer was demonstrated to have a strong binding power for metals which are generally toxic to life. Moreover, the growth of the strain, when producing an exopolymer sheath, was possible in the presence of very high mineral concentrations or under micro-oxic conditions, suggesting strongly, in those cases, a role in protecting cells against these toxic compounds.

In addition to the protective function of these macrostructures, the streamers embedding the bacteria could play a role in the adhesion. In their natural environment, it is conceivable that cells would adopt the strategy to form macrostructures, to hold their own in a rapidly-flowing area where physico-chemical conditions would be favorable to their nutrition and to their growth.

None of these hypotheses about the function of these macrofilaments has been demonstrated and *in situ* experiments are needed to set between them.

This study was a preliminary analysis of the complex and atypical macrostructures built by *Desulfurobacterium crinifex*. All the results presented herein have allowed the description and the demonstration of some properties of the polymer under known and controlled conditions, without being confronted to technical problems generally encountered with *in situ* experiments at the complex deep-sea hydrothermal vent environment. However, further thorough investigations and *in situ* experiments will be necessary to understand the biology and ecology of *D. crinifex* and to confirm or not our hypotheses concerning the functions of these macrostructures in their natural environment and in interaction with microbial and animal populations, to study their abundance and to estimate their importance within the deep-sea hydrothermal vent ecosystem.

Biofilms are a very common feature at deep-sea hydrothermal vents, but, to date, little attention has been paid to their role in microbial ecology in these environments. Their ecological importance within the abyssal vent ecosystem is probably considerable. Fully appreciating the ecological functions of the biofilms in the extreme and changing deep-sea hydrothermal vent natural environment will be a substantial challenge.

### **Acknowledgements**

We are grateful to Kim Juniper and Antoine Pagé for providing the hydrothermal bulk sample from which *D. crinifex* was isolated. We thank Jacqueline Ratiskol for sugars analysis. We thank Laurent Urios for stimulating and helpful discussions. We acknowledge Xavier Moppert for FTIR analysis. This work was financially supported by Ifremer and Région Bretagne.

## Figures

Fig. 1. (a-f) Scanning electron micrographs of polymeric streamer-like macrostructure formed by *Desulfurobacterium crinifex* strain NE1206<sup>T</sup>, in KA22 liquid medium, at 60°C, under a gas phase of H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20, vol./vol.; 200 kPa). (a-d) A streamer whose extremity was crushed; (a) General view of the streamer, showing a ramification, and on the right, the area that was crushed, bar: 200 µm; (b) Microphotograph of the crushed part of the streamer showing the uni- and multi-lobed corpuscles included in the sheath of the streamer, bar: 100 µm; (c) A spherical extent of the streamer polymeric sheath pierced of small holes, bar: 5 µm; (d) A spherical corpuscle whose sheath was torn, showing the dense internal network of bacterial rods, bar: 5 µm. (e, f) Streamers under construction, showing the bacterial cells embedded in their polymer secretions, bar: 20 µm. (g) FISH micrograph of a streamer of *D. crinifex* with the universal bacterial probe EUB338 labeled with FITC, bar: 10 µm. (h) Transmission electron micrograph of a thin section of a streamer showing the relatively regular arrangement of cells, some of them being in division, bar: 0.5 µm.

Fig. 2. Scanning electron micrographs of crystals observed in polymer-producing cultures of *D. crinifex* whose chemical compositions were determined by EDX spectroscopy. (a, b) Calcium sulfate crystals, bar: 20 µm; (c) Cauliflower-form crystal of calcium carbonate, bar: 10 µm; (d) Unidentified crystal containing C, Fe, Cu, P, Na, Cl elements, bar: 10 µm.

## References

- Alain, K, Marteinsson, VT, Miroshnichenko, ML, Bonch-Osmolovskaya, EA, Prieur, D, Birrien, JL (2002a) *Marinitoga piezophila* sp. nov., a rod-shaped, thermo-piezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1331-1339.
- Alain, K, Quérellou, J, Lesongeur, F, Pignet, P, Crassous, P, Raguénès, G, Cueff, V, Cambon-Bonavita, MA (2002b) *Caminibacter hydrogeniphilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an East Pacific Rise hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1317-1323.
- Alain, K, Pignet, P, Zbinden, M, Quillévéré, M, Duchiron, F, Donval, JP, Lesongeur, F, Raguénès, G, Crassous, P, Quérellou, J, Cambon-Bonavita, MA (2002c) *Caminicella sporogenes* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic spore-forming bacterium isolated from an East-Pacific Rise hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1621-1628.
- Alain, K, Rolland, S, Crassous, P, Lesongeur, F, Zbinden, M, Le Gall, C, Godfroy, A, Pagé, A, Juniper, SK, Cambon-Bonavita, MA, Duchiron, F, Quérellou, J (2003) *Desulfurobacterium crinifex* sp. nov., a novel



thermophilic, pinkish-streamers forming, chemolithoautotrophic bacterium isolated from a Juan de Fuca ridge hydrothermal vent and amendment of the genus *Desulfurobacterium*. *Extremophiles* 7:361-370.

Amann, R, Binder, B, Olson, R, Chisholm, S, Devereux, R, Stahl, D (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 56:1919-1925.

Balch, WE, Fox, GE, Magrum, LJ, Woese, CR, Wolfe, RS (1979) Methanogens: Reevaluation of a unique biological group. *Microbiol Rev* 43:260-296.

Barbier, G, Godfroy, A, Meunier, J-R, Quérellou, J, Cambon, M-A, Lesongeur, F, Grimont, PAD, Raguénès, G (1999) *Pyrococcus glycovorans*, sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from the East Pacific Rise. *Int J Syst Bacteriol* 49:1829-1837.

Cambon-Bonavita, M-A, Lesongeur, F, Pignet, P, Wery, N, Lambert, C, Godfroy, A, Quérellou, J, Barbier, G (2003) *Thermococcus atlanticus* sp. nov., a hyperthermophilic Archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent in the Mid-Atlantic Ridge. *Extremophiles* 7: 101-109.

De Philippis, R, Vincenzini, M (1998) Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiol Rev* 22:151-175.

Dudman, W (1977) The role of surface polysaccharides in natural environments. In I.W. Sutherland (eds.) *Surface carbohydrates of the prokaryotic cell*. Academic Press, New York, pp. 357-414.

Emerson, D, Moyer, CL (2002) Neutrophilic Fe-Oxidizing Bacteria Are Abundant at the Loihi Seamount Hydrothermal Vents and Play a Major Role in Fe Oxide Deposition. *Appl Environ Microbiol* 68:3085-3093.

Godfroy, A, Lesongeur, F, Raguénès, G, Quérellou, J, Antoine, E, Meunier, J-R, Guézennec, J, Barbier, G. (1997) *Thermococcus hydrothermalis* sp. nov., a new hyperthermophilic Archaeon isolated from deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Bacteriol* 47: 622-626.

Gotz, D, Banta, A, Beveridge, TJ, Rushdi, AI, Simoneit, B, Reysenbach, AL (2002) *Persephonella marina* gen. nov., sp. nov. and *Persephonella guaymasensis* sp. nov., two novel, thermophilic, hydrogen-oxidizing microaerophiles from deep-sea hydrothermal vents. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1349-1359.

Guézennec, J (2002) Deep-sea hydrothermal vents: A new source of innovative bacterial exopolysaccharides of biotechnological interest? *J Industr Microbiol Biotechnol* 29:204-208.

Harmsen, H, Prieur, D, Jeanthon, C (1997) Group-Specific 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes To Identify Thermophilic Bacteria in Marine Hydrothermal Vents. *Appl Environ Microbiol* 63:4061-4068.

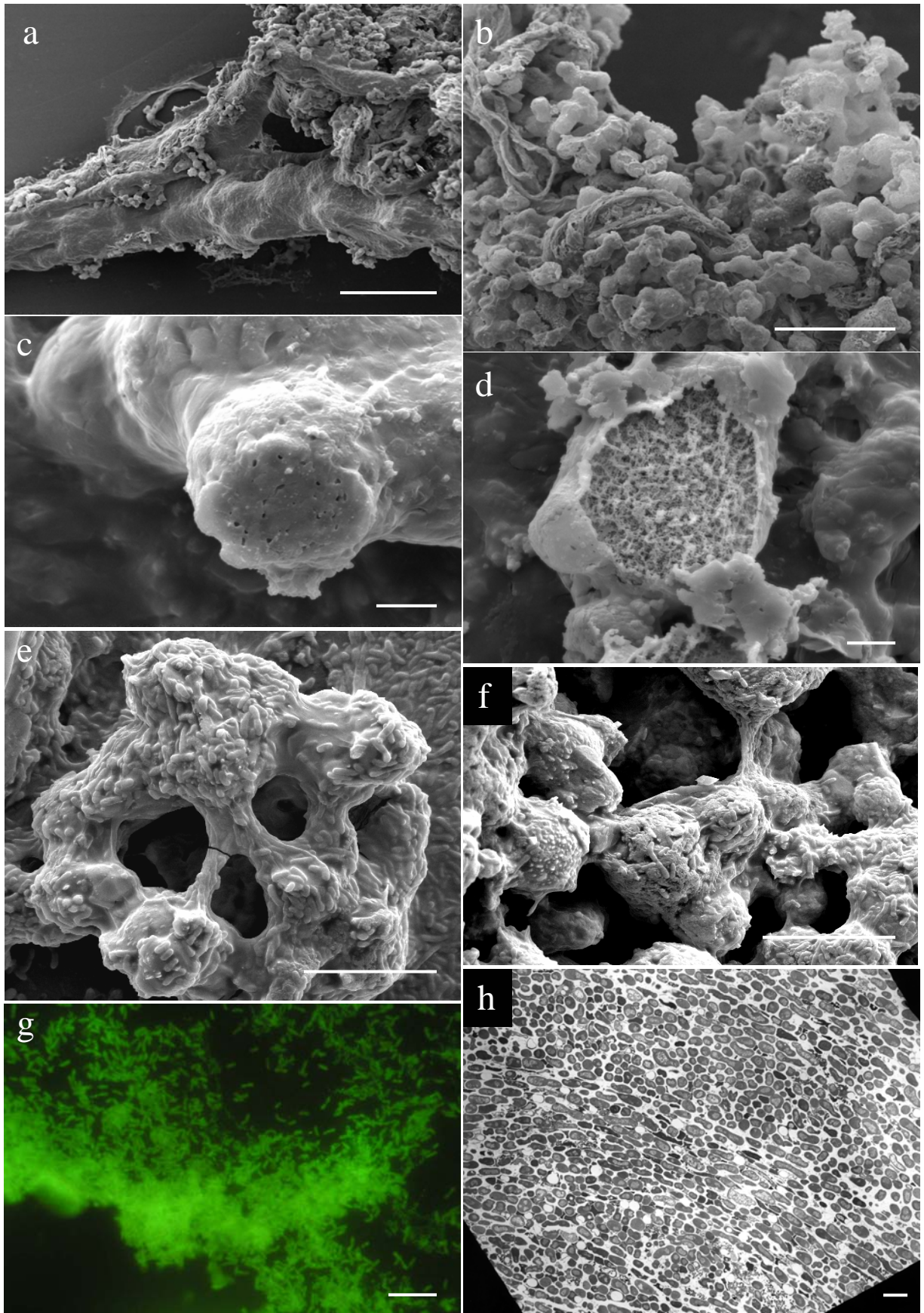
- Jeanthon, C (2000) Molecular ecology of hydrothermal vent microbial communities. *Antonie van Leeuwenhoek* 77:117-133.
- Jeanthon, C, L'Haridon, S, Cueff, V, Banta, A, Reysenbach, AL, Prieur, D (2002) *Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus *Thermodesulfobacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:765-772.
- Jeanthon, C, L'Haridon, S, Reysenbach, AL, Vernet, M, Messner, P, Sleytr, UB, Prieur, D (1998) *Methanococcus infernus* sp. nov., a novel hyperthermophilic lithotrophic methanogen isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Bacteriol* 48:913-919.
- Juniper, K, Fouquet, Y (1988) Filamentous iron-silica deposits from modern and ancient hydrothermal sites. *Canadian Mineralogist* 26:859-869.
- Kamerling, J, Gerwig, G, Vliegenhart, J, Clamp, J (1975) Characterization by gas chromatography-mass spectrometry of pertrimethylsilyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycolipids. *Biochem J* 151:491-495.
- Kashefi, K, Lovley, DR (2003) Extending the upper temperature limit for life. *Science*:934.
- Kennedy, CB, Scott, SD, Ferris, FG (2003) Ultrastructure and potential sub-seafloor evidence of bacteriogenic iron oxides from Axial Volcano, Juan de Fuca Ridge, north-east Pacific ocean. *FEMS Microbiol Ecol* 43:247-254.
- L'Haridon, S, Cilia, V, Messner, P, Raguénès, G, Gambacorta, A, Sleytr, UB, Prieur, D, Jeanthon, C (1998) *Desulfurobacterium thermolithotrophum* gen. nov., sp. nov., a novel autotrophic, sulphur-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Bacteriol* 48:701-711.
- Lowry, O, Rosenbrough, N, Farr, A, Randall, R (1953) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Miroshnichenko, ML, Kostrikina, NA, L'Haridon, S, Jeanthon, C, Hippe, H, Stackebrandt, E, Bonch-Osmolovskaya, EA (2002) *Nautilia lithotrophica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfur-reducing epsilon-proteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1299-1304.
- Miroshnichenko, ML, Kostrikina, NA, Chernyh, NA, Pimenov, NV, Tourova, TP, Antipov, AN, Spring, S, Stackebrandt, E, Bonch-Osmolovskaya, EA (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. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:323-329.

- Montreuil, J, Bouquelet, S, Debray, H, Fournet, B, Spik, G, Stecker, G (1986) Carbohydrate analysis: a practical approach. In Chaplin, M.F., Kennedy, J.K. (eds) Glycoproteins. Washington DC: IRL press, pp. 143-204.
- Quérellou, J, Alain, K, Cambon-Bonavita, MA (2001) Thermophiles from deep-sea hydrothermal vents. *Vie Milieu* 51:161-172.
- Raguénès, G, Pignet, P, Gauthier, G, Peres, A, Christen, R, Rougeaux, H, Barbier, G, Guézennec, J (1996) Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. *Appl Environ Microbiol* 62:67-73.
- Raguénès, G, Christen, R, Guézennec, J, Pignet, P, Barbier, G (1997a) *Vibrio diabolicus*, sp. nov. a new polysaccharide-secreting organisms isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychate annelid, *Alvinella pompejana*. *Int J Syst Bacteriol* 47:989-995.
- Raguénès, G, Peres, A, Ruimy, R, Pignet, P, Christen, R, Loaec, M, Rougeaux, H, Barbier, G, Guézennec, J (1997b) *Alteromonas infernus* sp nov, a new polysaccharide-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *J Appl Microbiol* 82:422-430.
- Raguénès, G, Cambon-Bonavita, MA, Lohier, J-F, Boisset, C, Guézennec, J (2003) A novel, highly viscous polysaccharide excreted by an *Alteromonas* isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *Curr Microbiol* 46:448-452.
- Rinker, K, Kelly, R (1996) Growth Physiology of the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis*: Development of a Sulfur-Free Defined Medium, Characterization of an Exopolysaccharide, and Evidence of Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol* 62:4478-4485.
- Rinker, KD, Kelly, RM (2000) Effect of carbon and nitrogen sources on growth dynamics and exopolysaccharides production for the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis* and bacterium *Thermotoga maritima*. *Biotechnol Bioeng* 5:537-547.
- Takai, K, Sugai, A, Itoh, T, Horikoshi, K (2000) *Palaeococcus ferrophilus* gen. nov., sp nov., a barophilic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:489-500.
- Vincent, P, Pignet, P, Talmont, F, Bozzi, L, Fournet, B, Guézennec, 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*. *Appl Environ Microbiol* 60:4134-4141.
- Weiner, R, Langille, S, Quintero, E (1995) Structure, function, and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides. *J Industr Microbiol* 15:339-346.

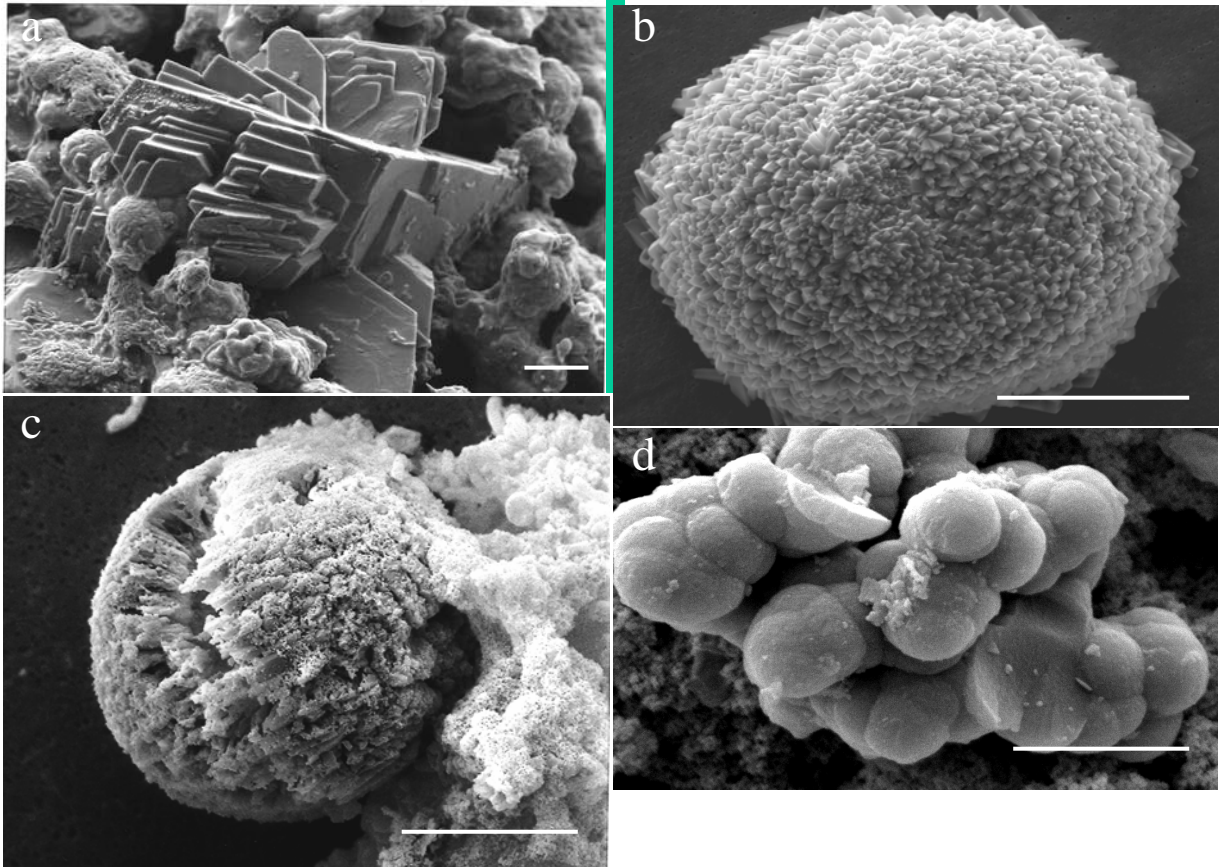
Wery, N, Moricet, JM, Cueff, V, Jean, J, Pignet, P, Lesongeur, F, Cambon-Bonavita, M-A, Barbier, G (2001) *Caloranaerobacter azorensis* gen. nov., sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1789-1796.

Whitfield, C (1988) Bacterial extracellular polysaccharides. *Can J Microbiol* 34:415-420.

Zobell, C (1943) The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J Bacteriol* 46:39-56.







### III.2. Expériences de colonisation *in situ* : caractérisation de la microflore précédant l'installation des Alvinellidae.

Durant ma thèse, j'ai eu l'opportunité de participer à la campagne océanographique PHARE sur le site atelier EPR 13°N. L'objectif de cette campagne était de réaliser une étude interdisciplinaire des communautés d'organismes et de micro-organismes du pôle chaud des cheminées hydrothermales. La thématique dans laquelle s'est inscrit mon travail s'intitulait 'Dynamique de la colonisation par les Alvinellidae'. Fondée sur une approche intégrant à la fois les disciplines de la biologie, la microbiologie, l'écologie et la chimie, elle visait à étudier l'évolution temporelle de la microflore associée aux Alvinellidae.

Lors de cette campagne, des modules de colonisation en titane, appelés TRACs (Titanium Ring for Alvinellid Colonisation), ont été déployés sur des bouquets d'Alvinellidae présents sur différentes cheminées hydrothermales. Notre but était d'identifier les premiers colonisateurs de nouveaux supports, sur différentes échelles de temps (de quelques jours à plusieurs semaines). Tout au long de la colonisation, un suivi vidéographique de l'évolution de la colonisation a pu être réalisé grâce aux caméras du ROV (Remotely Operated Vehicle) VICTOR 6000. Parallèlement, une caractérisation chimique (sulfures, fer II dissous, pH) et thermique du biotope a été réalisée grâce au dispositif d'analyses chimique *in situ* appelé ALCHIMIST (Le Bris *et al.*, 2000). Mon travail a consisté à identifier les populations microbiennes présentes sur les différents modules de colonisation déployés sur des périodes moyennes (20 jours), au moyen d'analyses moléculaires de la diversité et d'approches culturelles. Parallèlement, Françoise Lesongeur a effectué le même type de travail sur les tapis microbiens des modules déployés sur de courtes périodes (5-7 jours). Les résultats obtenus ont été confrontés aux données physico-chimiques *in situ* et discutés en fonction du stade de colonisation par les populations d'Alvinellidae. Ils sont présentés dans l'article n°7.

Article 7 : **Karine Alain**, Magali Zbinden, Nadine Le Bris, Françoise Lesongeur, Françoise Gaill et Marie-Anne Cambon-Bonavita. Early steps of microbial colonisation processes at deep-sea hydrothermal vents. *Environmental Microbiology*, sous presse.

---

## **Article 7**

### **Premiers stades de colonisation microbienne au niveau des sources hydrothermales profondes**

Karine Alain, Magali Zbinden, Françoise Lesongeur, Nadine Le Bris,  
Françoise Gaill et Marie-Anne Cambon-Bonavita.

Environmental Microbiology, sous presse.

---



**Manuscript EM2003K-173 / sous presse**

**Early steps in microbial colonisation processes at deep-sea hydrothermal vents**

Karine ALAIN<sup>1\*</sup>, Magali ZBINDEN<sup>2</sup>, Nadine LE BRIS<sup>3</sup>, Françoise LESONGEUR<sup>1</sup>,  
Joël QUERELLOU<sup>1</sup>, Françoise GAILL<sup>2</sup> & Marie-Anne CAMBON-BONAVITA<sup>1</sup>.

Running title : early steps in microbial colonisation of alvinellid habitats

<sup>1</sup> Laboratoire de Microbiologie et de Biotechnologie des Extrêmophiles, Département de Valorisation des Produits, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France.

<sup>2</sup> UMR SAE, Adaptations aux milieux extrêmes, Université Pierre et Marie Curie, 7, quai Saint Bernard, 75252 Paris Cédex 05, France.

<sup>3</sup> Département Environnement Profond, Direction des Ressources Océaniques, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France.

\* corresponding author: Mailing address: Laboratoire de Microbiologie et de Biotechnologie des Extrêmophiles, Département de Valorisation des Produits, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France  
Tel:+33-2-98-22-45-53. Fax: +33-2-98-22-47-57. e-mail: Karine.Alain@ifremer.fr

Keywords: EPR 13°N, colonisation, *ε-Proteobacteria*, 16S rRNA, phylogeny, *Alvinella*

## Summary

A pluri-disciplinary *in situ* colonisation experiment was performed to study early stages of colonisation in deep-sea vent *Alvinella* spp. worm habitats. Four colonisation devices were deployed onto *Alvinella* spp. colonies of different chimneys of the East-Pacific Rise (EPR 13°N), for two different periods: a short (less than a week) and a longer one (3 weeks). Video imagery and monitoring of the thermal and physico-chemical conditions were performed during the colonisation experiments. Numerous micro-organisms bearing specialised adhesion-appendages and/or high amounts of polymeric extracellular matrix were observed on devices, which may efficiently contribute to the colonisation of new surfaces. The microbial cohorts preceding and accompanying *Alvinella* spp. settlement were identified. In all cases, *Archaea* could not be detected and the microbial mats were essentially composed of  $\epsilon$ -*Proteobacteria*. Within this group, one phylotype (*AlviH2*) was found to dominate the libraries of three colonisation devices. Dominance of  $\epsilon$ -*Proteobacteria* in the libraries may reflect the wide physiological variety encountered within this group or an adaptability of these micro-organisms towards their changing environment. Bacteria affiliated to the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group or to the  $\epsilon$ -*Proteobacteria*, that grow either chemoorganoheterotrophically by fermentation or chemolithoautotrophically with H<sub>2</sub> as an electron donor and S<sup>0</sup>/S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> or NO<sub>3</sub><sup>-</sup> as a terminal electron acceptor, were isolated from one of the microbial mat formed in 20 days.

## Introduction

Deep-sea hydrothermal vents are among the most productive ecosystems on Earth (Tunnicliffe, 1991; Shillito *et al.*, 1999). At the base of the deep-sea vent food chain are chemosynthetic micro-organisms fixing carbon dioxide into organic carbon using the energy of the reduced chemical species from the hydrothermal fluid (Jannasch and Wirsén, 1979). These microbial primary producers allow the development of diverse secondary microbial populations and the settlement of a rich fauna, either through the direct consumption of these micro-organisms (grazing, deposit-feeding or filter-feeding animals), or the establishment of complex symbiotic associations. In an environment characterised by steep physical and chemical gradients, and by great temporal instabilities, microbial populations have to adapt rapidly and must be able to colonise newly-formed surfaces. The initial microbial colonisers of such surfaces have not yet been identified.

This issue was part of the objectives of the PHARE oceanographic cruise, carried out on the EPR 13°N (Le Bris *et al.*, 2002). Our work focused on the alvinellid tube assemblages formed on vent chimney walls, which are presumed to represent the “hottest” metazoan-colonised biotopes (Desbruyères *et al.*, 1985; Chevalloné *et al.*, 1992). Previous results obtained from similar habitats (EPR 9°N) have shown a rapid colonisation of titanium devices (TRACs) (Gaill *et al.*, 1996; Zbinden *et al.*, 2001, 2003) by chemoautotrophic prokaryotes, followed by the arrival of alvinellid worms after 11 days (Taylor *et al.*, 1999). Taking into account these results, four experiments were performed over two different time periods: two on a short-term period (less than a week) and two on a longer one (3 weeks).

We used molecular 16S rDNA sequence analysis and fluorescent *in situ* hybridisation methods, in combination with cultural approaches and videoscopic and microscopic observations, to study the settlement of microbial communities on TRACs. Additionally, temperature was monitored on the devices during the colonisation process and the chemical conditions were characterised using *in situ* techniques. The insights of this integrated multi-disciplinary approach are discussed in terms of vent biotope colonisation.

## Results

### *Description of the chemical and thermal conditions at the study sites*

Large variations of thermal and chemical conditions were recorded in the immediate vicinity of the experiments (Table 1), within a few decimetres from colonisation devices in and just above the *Alvinella* spp. colony. As previously underlined, such steep environmental gradients, from hot to cold, alkaline to acidic, sulphidic to oxygenated conditions constitute the main environmental characteristics of these particular biotopes (Gaill and Hunt, 1991; Chevaldonné *et al.*, 1991, 1992; Childress and Fischer, 1992; Sarradin *et al.*, 1998; Luther *et al.*, 2001; Le Bris *et al.*, 2003). Temperatures recorded by autonomous probes on the TRACs themselves however suggest that conditions closer to the ambient seawater than to the most acidic and hot hydrothermal fluid counterpart should be expected on the TRAC itself (Table 2). The only marked difference between experiments lies in the ferrous iron concentration. Iron was notably negligible at the TRAC T2 and TRAC T6 sites, while it was present at concentrations similar to sulphide for the TRACs T3 and T4 (Table 1) (hereafter the TRACs will be named according to their number, i.e. T2, T3, T4, T6).

### *Macroscopic observations, FISH analysis and electron microscopy*

At the Genesis vent field, the microbial colonisation of T2 was visible after a 2-day deployment, as evidenced by rare 'filamentous mat' on video imagery (data not shown). A few amphipods and limpets were also observed moving on the TRAC wall. After 5 days, T2 was covered by a very thin microbial veil and was colonised by many limpets. FISH analysis demonstrated that this sample was dominated by micro-organisms of the bacterial domain, with a rod or a coccus morphology (data not shown). Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) confirmed the dominance of cocci and rods of different sizes (1-5  $\mu\text{m}$  long) embedded in a polymeric matrix (Fig. 1c). Several micro-organisms with a prosthecate morphology and a few filamentous microbes were also observed (Fig. 1a, 1b). Individual representatives of pico-eukaryotes could be present (data not shown).

Video imagery revealed that the T3, T4 and T6 colonisation modules were covered with a thin whitish microbial mat after 3 days incubation (data not shown). T3 and T4 (Fig. 1d) were covered with a filamentous mat and also hosted *Alvinella* individuals at recovery, after long term deployment. FISH experiments indicated that all the observed morphologies were affiliated to the bacterial domain. In all microscopic observations, T3, T4 and T6 samples were found to be dominated by microbes with a filamentous morphology mixed with many rods, rectangular cells and few cocci and spirilla (Fig. 1e, 1f, 1g). Many sheathed chains of large rectangular cells (15 x 5  $\mu\text{m}$ ), resembling polycysts, were frequently observed (Fig. 1g). Furthermore, different types of small and long rods (from 0.5 to 25  $\mu\text{m}$  long) were observed, occurring individually or in chains. Some of these rods were slightly curved. A background of extracellular polymer was observed (Fig. 1f).

Under our experimental conditions, mat samples from the four TRACs used for FISH analysis with the universal archaeal probe produced negative results.

### ***Microbial 16S rDNA libraries from the colonisation modules***

Amplifications of DNAs extracted from the superior spokes of the TRACs (Fig. 1d), and subjected to PCR with universal archaeal 16S rDNA primers remained unsuccessful whatever the PCR condition used. 16S rDNA amplification products were obtained only with universal bacterial primers. The clone library for each TRAC was generated from the compilation of two independent bacterial clone libraries, based on two different amplification products and cloning experiments, in order to better represent bacterial diversity. A total of 118 expected-size amplicons (~1500 bp with universal primers used) from T2, of 106 for T3, 126 for T4 and 120 for T6 were obtained and partially sequenced. A phylogenetic analysis was performed to group these sequences into phylotypes. Sequences differing less than 3% were considered as a single relatedness group based on the species definition (Rossello Mora and Amann, 2000). Four chimerical sequences produced from phylogenetically distant parent molecules and with recombination sites in highly conserved regions were detected. These chimerical sequences were excluded from phylogenetic analyses. Only 16, 9, 10 and 23 phylotypes were detected in the T2, T3, T4 and T6 libraries respectively.

### ***Phylogenetic analyses***

Sequences from T3 and T4 were all related to the  $\epsilon$ -subclass of *Proteobacteria*, as well as most of the sequences from T2 and T6 (Fig. 2, Tables 3 and 4). 87.3% of the T2 clone sequences were related to the  $\epsilon$ -*Proteobacteria* and 79.6% of them were grouped in one phylotype (*AlviH1*: *Alvinella* spp. Habitat 1, Fig. 2) with a similarity level above 97% between them. *AlviH1* was closely related to microbial sequences associated to the *Riftia pachyptila* tubes (Lopez-Garcia *et al.*, 2002). 94.2% of T6 sequences were related to the  $\epsilon$ -*Proteobacteria*. Most of the T3, T4 and T6 clone sequences were grouped in one phylotype (*AlviH2*, Fig. 2). *AlviH2* was closely related to the Vent 12 clone sequence, detected from a deep-sea hydrothermal mat sample from EPR 9°N (Podar *et al.*, 2002) and to a clone of *Paralvinella palmiformis* cocoon from the Juan de Fuca Ridge, referenced as *P. palm* C/A13 (Alain *et al.*, 2002b). These sequences belonged to the phylogenetic cluster of *Rimicaris exoculata* epibiont (Polz and Cavanaugh, 1995) and *Alvinella pompejana* epibiont APG 13b (Haddad *et al.*, 1995). Four sequences from T4 and 27 sequences from T6 grouped in a third phylotype (*AlviH3*, Fig. 2). Sequences from this phylotype were related to the a1b024 clone sequence from hydrothermally active sediments of the Guaymas basin (Teske *et al.*, 2002). Sequences from the T4 and T6 libraries, and many sequences from the T3 library were closely related to the deep-sea Pacific vent sequence Vent 23 (Podar *et al.*, 2002).

The remaining sequences from the four TRACs were scattered within the  $\epsilon$ -*Proteobacteria* subdivision. Most of them were related to (i) deep-sea hydrothermal vent sequences from an *in situ* growth chamber deployed on a Mid-Atlantic Ridge vent (Reysenbach *et al.*, 2000; Corre *et al.*, 2001), (ii) from the *Riftia pachyptila* tubes (Lopez-Garcia *et al.*, 2002), (iii) from a diffuse flow hydrothermal vent habitat at the Juan de Fuca Ridge (Huber *et al.*, 2003), (iv) from a microbial mat collected on the East-Pacific Rise 9°N (Podar *et al.*, 2002) or, (v) from deep-sea cold seep sediment clone sequences (Inagaki *et al.*, 2002). The sequence referenced as T6-Ph07-916 was closely related to a deep-sea vent chemolithoautotrophic strain (referenced as OTIN DHVE str. G025-1) that was recently isolated at 25°C and that used nitrate as terminal electron acceptor (Takai *et al.*, 2003).

11% of the sequences from T2 and 5% of the sequences from T6 were interspersed within the *Fusobacteria*, the Firmicutes, the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group (CFB), and within the  $\delta$ - and  $\gamma$ -*Proteobacteria* (Fig. 3, Tables 3 and 4). Ten sequences from the TRAC T2 clone library belonged to the  $\gamma$ -*Proteobacteria* (Fig. 3). Most of them were closely related to a deep-sea cold seep sediment clone referenced as CS5.30 (Inagaki *et al.*, 2002). T2-PP12-481 sequence was closely related to a sequence detected from *Paralvinella palmiformis* cocoon (Alain *et al.*, 2002b). The other sequences from the T2 library were very distantly related to the CFB group (Fig. 3). In the T6 library, two sequences were related to the CFB group and closely related to sequences detected from Juan de Fuca and Indian oceanic Ridges (Table 4). Other clones from the TRAC T6 were most closely related to uncultivated deep-sea marine  $\delta$ -*Proteobacteria* (Bidle *et al.*, 1999), uncultivated deep-sea Pacific hydrothermal vent Firmicutes or *Fusobacteria* (Alain *et al.*, 2002b; Huber *et al.*, 2003) (Fig. 3).

### **Enrichment and isolation**

In an attempt to cultivate bacterial strains belonging to the dominant  $\epsilon$ -*Proteobacteria* AlviH2 cluster found on T3, T4 and T6 and considering that the clone library from T4 was dominated (75.4%) by sequences from one dominant phylotype and comprised only 11 phylotypes, we used a sample from T4 to perform enrichment cultures. Cultures were performed at temperatures and pH measured near the TRAC T4 (15°C and 30°C and pH 5 to 6).

Under our experimental conditions and at the concentrations tested, no positive enrichment cultures were obtained after three weeks incubation on the KAA medium, with ferrous iron as electron donor, oxygen as electron acceptor and CO<sub>2</sub> as carbon source. On the other hand, positive enrichment cultures were obtained both at 15 and 30°C, on the KAB, KAC and KAD media.

The micro-organisms enriched, anaerobically, at 15°C, with H<sub>2</sub> as electron donor, S<sup>0</sup>/S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> as electron acceptors, and CO<sub>2</sub> as carbon source (KAB medium) included small rods and cocci. This enrichment culture was successfully subcultured once but could not be subcultured further. Microbial populations were also enriched at 30°C on the same KAB medium. They were mainly composed of motile and non-motile small rods (1-2  $\mu$ m) mixed with few cocci. This enrichment culture was successfully

subcultured and one strain, referenced as T4-KAB-str.1, was isolated using repeated dilutions-to-extinction cultures. This chemoautotrophic, hydrogen-oxidising, sulphur or thiosulphate-reducing strain was found to belong to the genus *Nautilia* of  $\epsilon$ -*Proteobacteria*, of which the type species has been isolated from *A. pompejana* tubes (Miroshnichenko *et al.*, 2002) (Fig. 2).

Positive enrichment cultures were also obtained anaerobically with H<sub>2</sub> as electron donor, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> as terminal electron acceptor and CO<sub>2</sub> as carbon source (KAC medium). At 15°C, the enriched populations were composed of motile and non-motile small rods (1-2 µm) and of non-motile long rods (5-10 µm), that could not be subcultured. At 30°C, the morphological diversity included cocci, motile and non-motile short (0.5-1 µm) and middle-sized (2-4 µm) rods. They were successfully subcultured. One strain of motile small rods was isolated from this enrichment culture and referenced as T4-KAC-str.1. Interestingly, this strain, able to grow chemolithoautotrophically by denitrification with hydrogen as electron donor, was not detected by molecular method. It was assigned to the  $\epsilon$ -*Proteobacteria* (Fig. 2).

Finally, positive enrichment cultures were obtained in a semi-solid sulphide/oxygen gradient incubated under a CO<sub>2</sub> atmosphere (KAD medium). At 15°C, chains of rectangular cells with a polycystous-like morphology, mixed with motile and non-motile rods, were enriched. This enrichment culture was subcultured twice but could not be subcultured a third time. At 30°C, the enriched populations were morphologically-diverse. They included large rectangular cell morphotypes (15 x 5 µm), rods, cocci and long thin rods (20-25 µm). One non-motile rod-shaped bacteria was isolated under these conditions and referenced as T4-KAD-str.1. Because of the poor growth, other conditions were assessed. It appeared that the strain grew by fermentation in media containing proteinaceous and glucidic substrates. Growth of the strain T4-KAD-str.1 observed in semi-solid sulphide/oxygen gradient was not obtained by chemolithoautotrophy using hydrogen sulphide as electron donor and oxygen as terminal electron acceptor, but was obtained by agarose fermentation. This strain was found to represent a new family of the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group (Fig. 3).

## Discussion

Our main objective here was to study the early steps of the colonisation process by the microbial cohort preceding alvinellid settlement. Although limitations inherent to *in situ* experimentation at deep-sea vents were encountered, we were able to reproduce 4 experimental conditions, on two different periods, in areas that could be considered on a biological basis as “similar vent habitats”.

### *Absence of archaeal related sequences*

As stated in the Results section, hybridisation with the universal archaeal probe was not observed. Additionally, most of the cells labelled with DAPI exhibited a strong fluorescence with the universal bacterial probe and, finally, PCR amplifications performed with archaeal primers produced negative

results. As a whole, these results suggest that *Archaea* were absent on the superior spokes of the TRACs. Several hypotheses might explain their absence or their very low representation. (i) Physico-chemical conditions occurring in the immediate vicinity of the TRACs, and notably the relatively low temperature, could explain this result. Indeed, the vast majority of the archaeal sequences detected by molecular methods at vent environments derived from the hottest areas of the chimneys (Schrenk *et al.*, 2003). Moreover, despite numerous mesophilic *Archaea* have been isolated from many environments, the archaeal strains isolated, to date, from deep-sea vents were all thermophiles or hyperthermophiles (Jeanton, 2000; Quérellou *et al.*, 2001). (ii) A second point is that, at low temperature, oxygen is expected to be present in the mixing zone, at least periodically, and up to now, known hydrothermal *Archaea* were mostly anaerobic or microaerophilic. (iii) Another explanation that might be advanced to explain the absence of *Archaea* on the TRACs is the lack of time for *Archaea* settlement (our longest deployment time was 20 days). *Archaea* might not belong to the earliest microbial cohorts in these conditions.

### ***Bacterial diversity***

The microbial diversity within clone libraries corresponding to short-term experiments appeared at first sight to be more important than the diversity from longer deployments. Indeed, the number of detected phylotypes was higher in the short-term experiments. These results have to be tempered and interpreted taking into account inherent biases introduced by the method. The possible limitations of molecular phylogenetic approaches, such as nucleic acid extraction, primers selectivity and cloning biases (Theron and Cloete, 2000) or PCR biases (Suzuki and Giovannoni, 1996) are well established. Moreover, part of these different sequences could belong to slightly-different multi-copies of 16S rDNA genes (Farrelly *et al.*, 1995). Considering that a unique procedure was followed, these limitations, in our case, can be assumed to be comparable for the different samples. Moreover, it is likely that the bacterial diversity of the TRACs was not fully covered. This can be even demonstrated in the case of T4. Indeed, we isolated three bacteria that have not been detected by molecular methods. However, accumulation curves of the phylotypes from the TRACs (data not shown) reached a saturation plateau suggesting that the major part of the phylotypes were detected. Taking all these biases into account, we can propose that the phylotypes represented by a large number of sequences (more than 10) within the clone libraries were phylotypes of micro-organisms actually installed on the TRACs. In that respect, the TRAC T3 appeared to be the one with the highest number of phylotypes (5 phylotypes settled on TRACs) represented by numerous sequences. Taking all that into account, molecular inventories of the microbial populations colonising the TRACs highlighted the predominance of micro-organisms of the  $\epsilon$ -subclass of *Proteobacteria* in the libraries. For more than a decade, many surveys have reported the prevalence of  $\epsilon$ -*Proteobacteria* at deep-sea hydrothermal vents, occurring among the free-living bacteria, within the mats covering the chimneys edifices, within the sediments, associated with animals or acting as epibionts of animals (Moyer *et al.*, 1995; Polz



and Cavanaugh, 1995; Cary *et al.*, 1997; Reysenbach *et al.*, 2000; Corre *et al.*, 2001; Longnecker and Reysenbach, 2001; Alain *et al.*, 2002b; Lopez-Garcia *et al.*, 2002). Our physico-chemical measurements indicated a high instability of environmental conditions associated to the colonisation devices, typical of mixing interfaces at hydrothermal vents. According to this, it can be hypothesised that *ε-Proteobacteria* display the largest ability to deal with a wide range of physico-chemical conditions allowing them to colonise new surfaces in such areas. The wide variety of metabolisms encountered among this taxonomic group is probably helpful for rapid colonisation.

### ***Early steps of colonisation processes***

This study not only expands our knowledge of the large diversity among the *ε-Proteobacteria*, but also demonstrates that they may play a key role in early steps of colonisation processes. One major result of these *in situ* colonisation experiments was that the same group of *ε-Proteobacteria* dominated the libraries from the three TRACs deposited at Elsa and Actinoir vent fields (T3, T4, T6), and that another phylotype of *ε-Proteobacteria* dominated the library from T2 deposited at the Genesis vent field (Fig. 2). Sequences from these phylotypes were not closely related to those of any cultivated strain. In a heterogeneous and vast subclass, such as *ε-Proteobacteria*, it is difficult to formulate hypotheses regarding their physiology. So, enrichment cultures were performed and three bacterial strains were isolated from the microbial mat covering T4. The metabolic properties of these strains, growing either chemolithoautotrophically, by nitrate-reduction using H<sub>2</sub> as an electron donor, by sulphur or thiosulphate-reduction coupled to hydrogen-oxidation, or by chemoorganoheterotrophy, demonstrated that different metabolic pathways were likely to be involved within the microbial mat colonised by alvinellid worms. The microbial colonisation time sequence described in other terrestrial or aquatic environments (Marshall *et al.*, 1971; Marshall, 1992) starts by the fixation of a “conditioning biofilm”, then of pioneer micro-organisms and goes ahead by an increase of their phylogenetic and metabolic diversity, further followed by the establishment of eukaryotic organisms. If this model of a sequential establishment of a mat applies also in our case, the microbial groups detected in the short-term experiments could be considered as the pioneer micro-organisms. No major differences were observed in the microbial phylogenetic diversity between the short-term and longer experiments. We can thus assume that these two experiments correspond to different evolution stages in the colonisation process of a new surface with alvinellids settlement in the long experiment. Regarding our main target, we identified the microbial cohorts preceding the alvinellid settlement, and the microbial suite accompanying *Alvinella* spp. Besides, other motile animals such as limpets and amphipods appeared to be sometimes associated to the mat in a very early step.

In a previous experiment, TRACs moored on a similar structure were rapidly colonised by bacteria (3 days) and by *Alvinellidae* (11 days) (Taylor *et al.*, 1999). In these experiments, a very rapid colonisation of the TRAC by a chemoautotrophic H<sub>2</sub>S-oxidising bacterium, identified as a new species

of *Arcobacter* excreting rigid filaments of elemental sulphur, had allowed the settlement of alvinellids after only 11 days (Taylor *et al.*, 1999; Wirsen *et al.*, 2002). In our experiments, no *Arcobacter* species were retrieved in the clone libraries. Put together, these results demonstrated that the first microbial colonisers were not always the same microbial species. However, even if they correspond to different species, they could play the same roles in the colonisation process. In our study, scanning electron microscopy revealed a wide range of morphologies and, notably, morphological appendages specialised in the adhesion to surfaces. The T2 mat included many prosthecate bacteria with numerous cytoplasmic extrusions which were likely to be involved in fixation (Fig. 1b). Besides, the wall surface of this colonisation module was covered by a polymeric matrix (Fig. 1a, 1b). This viscous polymer was probably secreted by bacterial cells and could play a role in the adhesion process. T3, T4 and T6 were largely dominated by entangled filamentous morphotypes forming a mesh-net-like network (Fig. 1f). Filamentous bacteria possess a high surface/volume ratio. Such a morphology could favour the adhesion to solid substrates in natural environment by increasing the cell surface. The complex network formed by the tangle of filamentous bacteria and polymer secretions could benefit to the adhesion of both the free bacteria and alvinellids tubes. Moreover, this mat is probably useful for metazoan and larvae nutrition. T4-KAB-str.1 and T4-KAC-str.1 are both autotrophic micro-organisms fixing carbon dioxide into organic carbon (and therefore contribute to fix carbon for other micro-organisms and eukaryotes), by using chemical compounds usually found in the hydrothermal environment and the surrounding seawater ( $H_2$ ,  $CO_2$ ,  $S^0/S_2O_3^{2-}$  and  $NO_3^-$ ). Strain T4-KAD-str.1 may use polymer secretion from other bacteria to grow.

#### ***Possible abiotic and biotic controls on diversity of TRAC biofilms***

Video, FISH analysis, electron microscopy and sequences analyses depict two groups in our set of TRACs : T3, T4, and T6 on one hand and T2 on the other. Temperature, pH, sulphide and iron contents constitute determinant biogeochemical factors of the hydrothermal environment (Luther *et al.*, 2001; Le Bris *et al.*, 2003). The data presented here consistently reflect the variability of chemical conditions described previously in the vicinity of the alvinellid communities. Remarkably high temperature, high sulphide and low pH levels can be reached in this habitat. However, temperatures monitored on the TRACs were low, suggesting that the micro-organisms were exposed to the cooler part of the environmental range (Tables 1, 2). With respect to the chemical and temperature ranges displayed here, the four sites are not very different, except for iron. Our data enabled us to discriminate two iron-depleted sites (T2 and T6) from the two others where iron levels were quite high (T3 and T4). However, this chemical anomaly cannot explain the bacterial diversity of T2, since T6 does not display the same pattern. This is also consistent with the fact that no positive enrichment culture was obtained with ferrous iron as the electron donor, suggesting that this metabolism, if present, is not dominant in our experiments even in a quite highly iron concentrated site (T4). Hence,

even though the possibility of chemical influence on microbial diversity cannot be discarded, a more complex combination of abiotic and biological factors may have to be considered.

The differences between the microbial populations from T2 and those from T3, T4 and T6 can also be considered with respect to the biological environment. Actually, after a 5-day deployment, T2 was colonised by very numerous limpets, while these animals were less represented on the other TRACs. Limpets being motile animals, they might have transported micro-organisms (zoochory). More likely, colonisation by these grazing animals could have influenced the microbial assemblages detected after a 5-day deployment by predation, explaining why very numerous sequences were under-represented in the bacterial clone sequence library of T2.

### ***Conclusion***

Our results highlighted that the microbial cohort preceding the *Alvinella* spp. settlement was mainly composed of  $\epsilon$ -*Proteobacteria*, the majority of the clone sequences clustering, in three of four experiments, in one phylotype. As indicated by their large dominance in the microbial libraries of the colonisation devices,  $\epsilon$ -*Proteobacteria* obviously possess an ability to colonise new surfaces exposed to highly variable physico-chemical conditions and might be major actors in colonisation processes occurring in deep-sea hydrothermal vent environments. Scanning electron microscopic observations, additionally, led to the conclusion that the microbial colonisers, which precede the settlement of alvinellid worms and which are not obligatorily always the same species, develop diverse strategies to colonise novel surfaces: they produce adhesive matrix, which in turn might be easily colonised by other species, or form a microbial veil attached to the surface thanks to morphological differentiation of the cells. The formation of a primary microbial mat has always been observed to precede the animals recruitment and could then be a prerequisite necessary to the worms settlement. Further experiments will be necessary to fully understand the microbial colonisation strategies at deep-sea hydrothermal vents and to study the sequential establishment of the animal populations on newly-formed surfaces.

### **Experimental procedures**

#### ***In situ colonisation experiments and sampling***

In April-May 2002, *in situ* colonisation experiments were carried out at 2620 m depth at deep-sea hydrothermal vents of the East Pacific Rise 13°N (12°48'N, 103°56'W) during the PHARE oceanographic cruise. Four colonisation modules were deposited by the remotely-operated vehicle (ROV) VICTOR 6000 within the mixing zone surrounding chimneys at the top of *Alvinellidae* colonies. As described elsewhere (Taylor et al., 1999), the *in situ* colonisation modules were titanium

rings pierced of numerous apertures, equipped with two MICREL™ temperatures probes and called TRAC (Titanium Ring for Alvinellid Colonisation). T2 was placed 5 days at the Genesis vent site on the PP12 chimney, T6 7 days at Actinoir vent site on the Ph07 chimney, T3 20 days at Elsa vent site on the Hot3 chimney and T4 20 days at Elsa vent site on the Ph01 chimney. Two other TRACs referenced as T1 and T5 were not considered for this study because they could not be adequately recovered. Video imagery of the four TRACs was acquired during dives of the ROV VICTOR (Bowtech and Betacam cameras). Furthermore, temperatures time series were recorded continuously during all the duration of the deployment, with autonomous probes, which were positioned in the central part of the TRACs, at 1 cm under the top and 1 cm above the base (for T3, the sensor at the top of the TRAC rapidly stopped after the deployment, so only values for the bottom are available). The temperature probes are commercial deep-sea sensors T6000 (MICREL, France), with temperature range from 0 to 200°C (precision 0.4°C). Frequency was of 1 measurement per minute for short term experiments (5 and 7 days) and 1 per 10 minutes for the long ones (20 days).

After the colonisation period, the TRAC was recovered by the teleoperated-arm of the VICTOR and placed in a sterile box, as close as possible to the chimney.

Once on shipboard, the microbial mats covering the TRACs were aseptically collected (taking care to identify each fraction depending on its location on the TRAC) and each sample was subsampled in five fractions. Samples for molecular analysis were stored in sterile artificial seawater at -80°C; Samples for FISH (Fluorescent *In situ* Hybridisation) analysis were fixed for 2 hours in a 3% (v/v) formaldehyde solution then stored at -20°C in a solution of PBS (Phosphate Buffered Saline) buffer / ethanol (50/50 %); Samples for TEM (Transmission Electron Microscopy) and SEM (Scanning Electron Microscopy) were fixed at 4°C for 10 hours in a fixative solution containing 2.5% glutaraldehyde (v/v), 0.2M cacodylate buffer and 0.2M NaCl, at pH 7.4; Samples for cultures were stored in a sterile solution of 3% (v/v) sea salts - 20% (v/v) glycerol in the absence and in the presence of 0.05% (v/v) Na<sub>2</sub>S reducing agent. Samples for molecular, cultural and FISH analyses were transported frozen to the laboratory and thawed just before processing.

### **Chemical analysis**

pH, total sulphide and ferrous iron were determined *in situ* using the submersible flow analyser Alchemist (Le Bris *et al.*, 2000) and a combined pH probe (Le Bris *et al.*, 2001). A FIA-colorimetric method adapted from Coale *et al.* (1991) was used to determine iron II in the 0-1000 µM range. The sample inlet of the analyser and the pH sensor were combined with the temperature probe of the VICTOR and could be positioned precisely with the submersible manipulator. The pH and temperature measurement rate was set to 1 meas./5s. The chemical analyser only enables 1 meas./ 1 min. 30 s. Measurements were performed in the surrounding (< 30 cm) of each TRAC, by positioning the sensors and inlet with the manipulator arm close to *Alvinella* tubes or a few centimetres above.

One to two hours long measurement series were duplicated or triplicated for each experiment at different times of the deployment.

### ***Electron microscopy***

Bacteria were aseptically scraped from the TRAC walls (at the same location, on the TRAC, than samples collected for the other analyses). Samples were fixed as described above. After a 2000 g centrifugation for 15 minutes, the fixative was carefully removed and replaced by the washing solution until further work in the laboratory.

For transmission electron microscopy, a post-fixation step in osmium tetroxide (1 V in 1 V of 0.2M cacodylate buffer) was performed. After post-fixation and washing, the pellet were embedded in agar (2 % w/v solution), according to Pottu-Boumendil (Pottu-Boumendil, 1989). Agar blocks containing the cells were cut in small cubes of 1 mm<sup>3</sup>. These cubes were then dehydrated in ethanol and propylene oxide series and further embedded in epon (Epon 812, Agar) according to a routine procedure. Ultra-thin sections (50 nm) were obtained on a Reichert-Jung Ultramicrotome. TEM observations were performed on a Philips 201 electron microscope, operated at 80 kV.

For scanning electron microscopy, samples were rinsed and a drop of the sample was laid down on a 13 mm diameter coverglass, first coated with poly-L-lysine. Samples were then dehydrated in ethanol and critical point dried with liquid CO<sub>2</sub> (Balzers CPD 020) prior to coating with gold-palladium (Edwards evaporator) and examined with a scanning electron microscope JEOL JSM-840A, operating at 17 kV.

### ***Enrichment and isolation***

The media employed for the enrichment cultures were designed to enrich chemolithoautotrophic micro-organisms that might be expected to grow with potential electron donors and electron acceptors which had been *in situ* (iron, nitrate, sulfate). Enrichment cultures were performed using samples from T4 in an attempt to isolate the bacteria whose phylotype dominated the libraries from three TRACs and more specifically the library of T4. Four culture media were used for the enrichment cultures:

- Enrichments cultures were performed in a medium designed to enrich chemolithoautotrophic iron-oxidising bacteria. For this experiment, a liquid enrichment technique for iron-oxidising bacteria was used, developed by Emerson and Moyer (2002) and based on the maintenance of low Fe(II) and O<sub>2</sub> concentrations by the regular addition of small amounts of air and FeCl<sub>2</sub> to a liquid medium in a closed vessel. These enrichment cultures were performed with the KAA medium containing (per litre): 30 g sea salts (Sigma), 2.54 g Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Merck), 1 g NH<sub>4</sub>Cl (Sigma), 1.95 g MES buffer (Sigma), 0.3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma), 0.5 ml vitamin mixture (Balch *et al.*, 1979), 10 ml trace element solution (Balch *et al.*, 1979), 1 ml selenite-tungstate solution (6 mg l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O; 0.8 mg l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0.4 g l<sup>-1</sup> NaOH) and 1 mg resazurin (Sigma). The pH was adjusted to 5.0 before autoclaving. In the anaerobic chamber, the medium was aliquoted into

Hungate tubes or penicillin vials, then the media were gassed with N<sub>2</sub>. A sterile FeCl<sub>2</sub> stock solution was prepared as described elsewhere (Emerson and Moyer, 2002). Just prior to inoculation, a sterile syringe was used to deliver 200 μM FeCl<sub>2</sub>, a mean concentration encountered in this type of environment, from the stock solution into the culture medium. A mixture of H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> (80/19/1, vol./vol.; 200 kPa) was used as the gas phase.

- The KAB medium was used to enrich sulphur-/thiosulphate-reducing hydrogen-oxidising micro-organisms and contained (per litre): 30 g sea salts (Sigma), 1 g NH<sub>4</sub>Cl (Sigma), 1.95 g MES buffer (Sigma), 12 g elemental sulphur (Prolabo), 2.48 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O (Merck), 0.3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma), 0.5 ml vitamin mixture (Balch *et al.*, 1979), 10 ml trace element solution (Balch *et al.*, 1979), 1 ml selenite-tungstate solution and 1 mg resazurin (Sigma). The pH was adjusted to 6.0 at room temperature, before autoclaving (2 times 30 min. at 100°C), and the medium was reduced by 0.5 g l<sup>-1</sup> sodium sulphide before inoculation. A mixture of H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20, vol./vol.; 200 kPa) was used as the gas phase.
- The KAC medium was designed to enrich chemolithoautotrophic nitrate-reducing microbes able to use H<sub>2</sub> as an electron donor. It contained (per litre): 30 g sea salts (Sigma), 1 g NH<sub>4</sub>Cl (Sigma), 1.95 g MES buffer (Sigma), 2.54 g Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Merck), 0.3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma), 0.5 ml vitamin mixture (Balch *et al.*, 1979), 10 ml trace element solution (Balch *et al.*, 1979), 1 ml selenite-tungstate solution and 1 mg resazurin (Sigma). The pH was adjusted to 6.0 and the medium was reduced by 0.5 g l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>S before inoculation. A mixture of H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20, vol./vol.; 200 kPa) was used for this experiment.
- Enrichment cultures in semi-solid sulphide/oxygen gradient were performed to enrich chemolithoautotrophic sulphide-oxidising micro-organisms. All these experiments were carried out by use of the technique described by Nelson & Jannasch (Nelson and Jannasch, 1983), on the KAD medium. These cultures were performed in Hungate screw-capped tubes (150 x 16 mm), and contained three phases: a 4 ml sulphide-agar “plug”, a 8 ml “overlayer” phase of slush agar KAD medium and a 11 ml gas phase of CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> (97/3, vol./vol., 200 kPa) above the agar layers. The “plug” phase contained (per litre): 30 g sea salts (Sigma), 15 g agar (Sigma) and 1 mM H<sub>2</sub>S. The “overlayer” phase contained (per litre): 30 g sea salts (Sigma), 0.2 g agar (Sigma), 1 g NH<sub>4</sub>Cl (Sigma), 1.95 g MES buffer (Sigma) (pH adjusted to 6.0), 0.3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma), 0.5 ml vitamin mixture (Balch *et al.*, 1979), 10 ml trace element solution (Balch *et al.*, 1979), 1 ml selenite-tungstate solution and 1 mg resazurin (Sigma). A delay of 24 h was observed before inoculating the media to allow sulphide (0–1 mM) and oxygen gradients (3–0%) to stabilise.

These enrichments cultures were performed at the approximate mean temperature measured by the MICREL™ temperature probes of the TRAC T4 (15°C), but also at a slightly higher temperature (30°C) in order to allow the enrichment of other micro-organisms groups. Cultures were performed at pH values consistent with those measured at the opening of *A. pompejana* tubes (Desbruyères *et al.*, 1998).

After enrichment, positive cultures were subcultured, then purified using the dilution-to-extinction technique under the same conditions than enrichment (Baross, 1995). Isolates were checked for purity by microscopic observations and identified by 16S rDNA analysis as described elsewhere (Alain *et al.*, 2002a).

#### ***Nucleic acid extraction and purification***

DNA was extracted from approximately 0.5 g (wet weight) of thawed sample following the protocol described by Alain *et al.* (2002b) with the following minor modifications. This DNA extraction protocol combined chemical and enzymatic lysis extraction procedures. For these TRAC samples, the applied lysis treatments were 1 h and 1.5 h. After 1.5 h lysis, intact cells could not be observed by microscopy. As described previously (Alain *et al.*, 2002b), eukaryotic DNA was used to favour precipitation of the low prokaryotic DNA quantities and to allow a better visualisation of DNA during the purification step (caesium chloride density gradient centrifugation).

#### ***Amplification and cloning of 16S rDNA genes***

16S rDNA were amplified by PCR, under the conditions previously described (Alain *et al.*, 2002b). The bacterial forward primer was SAdir (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTCA GA-3') corresponding to positions 8-28 in the *Escherichia coli* 16S rRNA and the bacterial reverse primer was S17rev (5'-GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3'), corresponding to positions 1493-1509. 16S rDNAs, intergenic sequences and part of the 23S rDNA of the *Archaea* were amplified with the specific forward primer 21Fa (5'-TTC CGG TTG ATC CTG CCG GA-3') and a specific reverse primer 23SA-REV (5'-CTT TCG GTC GCC CCT ACT-3') (position 257-234 on *Thermococcus celer* 23S rDNA sequence). Expected amplification product sizes are 1500 bp for bacterial gene and 1900 bp for archaeal gene. The PCR products were cloned directly to separate them from each other, by the TA cloning method, using a TOPO TA Cloning<sup>®</sup> kit (pCR2.1 vector), according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Clone libraries were constructed by transforming *E. coli* TOP10F' cells. For each TRAC sample, two bacterial clones libraries were constructed from two independent PCR amplifications and cloning experiments, in order to represent the prokaryotic community.

#### ***16S rDNA sequencing and phylogenetic analysis***

Sequencing procedures were as described previously (Alain *et al.*, 2002b). These sequences were checked for the presence of chimeras using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) program (Altschul *et al.*, 1990) to compare 16S rDNA partial sequences.

To determine approximate phylogenetic affiliations, sequences were compared to those in available databases by use of the BLAST network service (Altschul *et al.*, 1990). Alignments of 16S rDNA sequences were performed using the CLUSTALW program (Thompson *et al.*, 1994), then refined manually using the SEAVIEW program (Galtier *et al.*, 1996). All the trees were constructed by the

PHYLO-WIN program (Galtier *et al.*, 1996), on the basis of evolutionary distance (Saitou and Nei, 1987) and maximum likelihood (Felsenstein, 1981). Only homologous positions were included in the phylogenetic comparisons. The robustness of inferred topologies was tested by the bootstrap resampling (Felsenstein, 1985) of trees calculated on the basis of evolutionary distance (neighbor-joining algorithm with Jukes & Cantor corrections) and maximum likelihood. Sequences displaying more than 97% similarity were considered to be related, and grouped in the same phylotype. The presented phylogenetic tree topologies correspond to unrooted trees obtained using the neighbor-joining algorithm. These topologies were confirmed by using the maximum likelihood algorithm. Bootstrap values presented here are the lowest obtained between the two phylogenetic methods.

#### ***Nucleotide sequence accession numbers***

The EMBL accession numbers of the 66 sequences used in this study are AJ575940 to AJ576005. The EMBL accession numbers of the isolates T4-KAD-str.1, T4-KAB-str.1 and T4-KAC-str.1 are AJ575808 to AJ575810 respectively.

#### ***Fluorescent in situ hybridisation (FISH)***

On board, samples from the four TRACs were fixed for two hours with 3% (v/v) formaldehyde in an artificial seawater solution, then rinsed in PBS buffer (Phosphate Buffered Saline buffer: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 800 ml distilled water, pH 7.4), before storage in 50% ethanol in PBS at -20°C. In the laboratory, fixed crude samples from the TRACs were spotted onto hydrophobic super-Teflon® treated microscopic slide (Polylabo), then dried at 45°C during 30 min. Afterwards, they were dried up by successive transfers in ethanol solutions of increasing concentrations. After drying at room temperature, cells were hybridised with the universal bacterial probe EUB338 (5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3') (Amann *et al.*, 1990) labelled with Fluorescein-isothiocyanate (FITC) (Eurogentec) or with the universal archaeal probe ARCH915 (5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3') (Stahl and Amann, 1991) labelled with Indocarbocyanin (Cy3) (Eurogentec). Fluorescent *In situ* hybridizations (FISH) were carried out at 46°C after addition of 1.5 µl probe and 13.5 µl hybridisation solution (NaCl 5M: 360 µl, Tris-HCl 1M: 40 µl, formamide: 200 µl for EUB338 and 700 µl for ARCH915, sodium dodecyl sulphate (SDS) 10%: 2 µl, deionized water: 1398 µl for EUB338 and 898 µl for ARCH915) onto each well of the slide. After 2 h hybridisation, the slide was rinsed up 20 min. at 48°C in a wash solution (NaCl 5M: 4.5 ml, Tris-HCl 1M: 1 ml, EDTA 0.5M: 0 for EUB338 and 500 µl for ARCH915, SDS 10%: 50 µl, deionized water: 44.45 ml for EUB338 and 43.95 ml for ARCH915). After the FISH procedure, each sample was stained with 10 µl of 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI 2 mg l<sup>-1</sup>). After addition of Citifluor (Citifluor Ltd; U.K.) on the slide, the hybridised cells were viewed with an Olympus microscope (BH-2) equipped with a UV lamp and filters for FITC or Cy3.



## Acknowledgements

We thank Philippe Rodier, Philippe Crassous and Philippe Noël for technical assistance and Marie-Claire Fabri for map construction. We are grateful to Pierre-Marie Sarradin, Gilles Roy and Claudie Le Divenah for implementing the *in situ* probes and analyser. We thank the captain and crew of the NO *L'Atalante* and the pilots and support crew of the ROV *Victor*. Electron microscopy was performed at the 'service de Microscopie Electronique', IFR de biologie intégrative, CNRS, Paris VI. This work was financially supported by Région Bretagne and programs Dorsales (INSU, Ifremer, CNRS-SDV), GEOMEX (CNRS), Ventox (contract EVK3-1999-00056P) (Ifremer, CNRS, INSUE).

## Figures and Tables

Fig. 1. Microphotographs of the colonisers of the TRAC T2 (a-c) and T4 (d-g). (a, b) Scanning electron microphotographs of the colonisers; (a) micrograph representative of limited areas of the TRAC surfaces, showing filamentous micro-organisms mixed with cocci and rods, bar: 3  $\mu\text{m}$ ; (b) many prosthecate bacteria with numerous cytoplasmic extrusions were observed, bar: 1  $\mu\text{m}$ ; (c) Transmission electron micrograph of a Gram-negative cell in division, bar: 0.5  $\mu\text{m}$ ; (d) Photograph of the TRAC T4 deposited for 20 days at Elsa vent field, scaling: diameter of the central ring is 4 cm (copyright Ifremer/PHARE 2002); (e) Scanning electron micrographs of the T4 coloniser, showing entangled filamentous micro-organisms and some cocci, bar: 1  $\mu\text{m}$ ; (f) Scanning electron micrograph representative of the aspect of the majority of the T4 TRAC surfaces, showing numerous filaments and many long rods mixed with some cocci and small rods, bar: 10  $\mu\text{m}$ ; (g) Transmission electron micrograph of a micro-organism resembling to a polycyst and its rectangular cells, bar: 1  $\mu\text{m}$ .

Fig. 2. Phylogenetic position of the  $\varepsilon$ -*Proteobacteria* sequences and isolates from the TRACs. The tree topology shown was developed by the neighbor-joining method, using two  $\gamma$ -*Proteobacteria* as outgroup. 16S rDNA reference sequences were obtained from GenBank (accession numbers are indicated in the figure). The letter T followed by a number refers to the number of the TRAC from which the sequence was detected. Scale bar indicates the expected number of changes per sequence position. The percentage noted after each sequence represented by at least ten clones, indicates the percentage of sequences belonging to this phylotype (= sequences sharing more than 97% identity). The abbreviation *AlviH* means '*Alvinella* spp. Habitat'.

Fig. 3. Phylogenetic position of the 16S rDNA sequences from the TRACs and of the isolate T4-KAD-str.1. The tree topology shown was obtained by the neighbor-joining method, using *Thermotoga maritima* and *Marinitoga piezophila* as outgroup. 16S rDNA reference sequences were obtained from GenBank (accession numbers are indicated in the figure). The letter T followed by a number refers to the number of the TRAC from which the sequence was detected. Scale bar indicates the expected number of changes per sequence position.

Table 1. Chemical and thermal ranges determined *in situ* over the alvinellid colony in the immediate vicinity of TRACs (S -II: total dissolved sulphide; Fe II: total dissolved iron II). Numbers under brackets indicate the number of measures performed.

Table 2. Maximal, minimal and mean temperatures measured by the MICREL probes placed on the TRACs.

Table 3. Distribution and phylogenetic affiliations of bacterial 16S rDNA sequences from the TRACs T2, T3 and T4.

Table 4. Distribution and phylogenetic affiliations of bacterial 16S rDNA sequences from the TRACs T6.

## References

- Alain, K., Quérellou, J., Lesongeur, F., Pignet, P., Crassous, P., Raguénès, G. *et al.* (2002a) *Caminiibacter hydrogeniphilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an East Pacific Rise hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1317-1323.
- Alain, K., Olagnon, M., Desbruyeres, D., Page, A., Barbier, G., Juniper, S.K. *et al.* (2002b) Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with mucous secretions of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis*. *FEMS Microbiol Ecol* **42**: 463-476.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., and Lipman, D. (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Amann, R., Binder, B., Olson, R., Chisholm, S., Devereux, R., and Stahl, D. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* **56**: 1919-1925.

- Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R., and Wolfe, R.S. (1979) Methanogens : Reevaluation of a unique biological group. *Microbiol Rev* **43**: 260-296.
- Baross, J. (1995) Isolation, growth and maintenance of hyperthermophiles. In *Archaea: a Laboratory Manual. Thermophiles*. F.T. Robb and A.R. Place (eds). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory. pp. 15-23.
- Bidle, K.A., Kastner, M., and Bartlett, D.H. (1999) A phylogenetic analysis of microbial communities associated with methane hydrate containing marine fluids and sediments in the Cascadia margin (ODP site 892B). *FEMS Microbiol Lett* **177**: 101-108.
- Cary, S., Cottrell, M., Stein, J., Camacho, F., and Desbruyères, D. (1997) Molecular Identification and Localization of Filamentous Symbiotic Bacteria Associated with the Hydrothermal Vent Annelid *Alvinella pompejana*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1124-1130.
- Chevaldonné, P., Desbruyères, D., and Le Haître, M. (1991) Time-series of temperature from three deep-sea hydrothermal vent sites. *Deep-Sea Res* **38**: 1417-1430.
- Chevaldonné, P., Desbruyères, D., and Childress, J. (1992) Some like it hot....and some even hotter. *Nature* **359**: 593-594.
- Childress J. and Fischer C. (1992). The biology of hydrothermal vent animals: physiology, biochemistry and autotrophic symbioses. *Oceanogr Mar Biol Ann Rev* **30**: 337-441.
- Coale, K.H., Chin, C.S., Massoth, G.J., Johnson, K.S., and Baker, E.T. (1991) *In situ* chemical mapping of dissolved iron and manganese in hydrothermal plumes. *Nature* **352**: 325-328.
- Corre, E., Reysenbach, A.-L., and Prieur, D. (2001) Epsilon-Proteobacterial diversity from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. *FEMS Microbiol Lett* **205**: 329-335.
- Desbruyères D., Gaill F., Laubier L. and Fouquet Y. (1985) Polychaetous annelids from hydrothermal vent ecosystems: an ecological overview. *Biol Soc Wash Bull* **6**: 103-116.
- Desbruyères, D., Chevaldonné, P., Alayse, A. -M., Jollivet, D., Lallier, F. H., Jouin-Toulmond, C., Zal, F., Sarradin, P. -M., Cosson, R., Caprais, J. -C., Arndt, C., O'Brien, J., Guézennec, J., Hourdez, S., Riso, R., Gaill, F., Laubier, L., Toulmond, A. (1998) Biology and ecology of the "Pompeii worm" (*Alvinella pompejana* Desbruyères and Laubier), a normal dweller of an extreme deep-sea environment: a synthesis of current knowledge and recent developments. *Deep-sea Res Part II* **45**: 383-422.
- Emerson, D., and Moyer, C.L. (2002) Neutrophilic Fe-Oxidizing Bacteria Are Abundant at the Loihi Seamount Hydrothermal Vents and Play a Major Role in Fe Oxide Deposition. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3085-3093.

- Farrelly, V., Rainey, F., and Stackebrandt, E. (1995) Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl Environ Microbiol* **61**: 2798-2801.
- Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* **17**: 368-376.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evol* **30**: 783-791.
- Gaill, F. and Hunt, S. (1991) The biology of Annelid worms from high temperature hydrothermal vent regions. *Rev Aqua Sci* **4**: 107-137.
- Gaill, F., Felbeck, H., Desbruyères, D., Lallier, F., Toulmond, A., Alayse, A.-M. *et al.* (1996) Hot 96. *InterRidge News* **5**: 22-24.
- Galtier, N., Gouy, M., and Gautier, C. (1996) SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *CABIOS* **12**: 543-548.
- Haddad, A., Camacho, F., Durand, P., and Cary, S. (1995) Phylogenetic characterization of the epibiotic bacteria associated with the hydrothermal vent polychaete *Alvinella pompejana*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1679-1687.
- Huber, J.A., Butterfield, D.A., and Baross, J.A. (2003) Bacterial diversity in a subseafloor habitat following a deep-sea volcanic eruption. *FEMS Microbiol Ecol* **43**: 393-409.
- Inagaki, F., Sakihama, Y., Inoue, A., Kato, C., and Horikoshi, K. (2002) Molecular phylogenetic analyses of reverse-transcribed bacterial rRNA obtained from deep-sea cold seep sediments. *Environ Microbiol* **4**: 277-286.
- Jannasch, H., and Wirsén, C. (1979) Chemosynthetic primary production at East Pacific sea floor spreading centers. *Bioscience* **29**: 592-598.
- Jeanthon, C. (2000) Molecular ecology of hydrothermal vent microbial communities. *Antonie van Leeuwenhoek* **77**: 117-133.
- Le Bris, N., Sarradin, P., Birot, D., and Alayse-Danet, A. (2000) A new chemical analyzer for *in situ* measurement of nitrate and total sulfide over hydrothermal vent biological communities. *Mar Chem* **72**: 1-15.
- Le Bris, N., Sarradin, P.M., and Pennec, S. (2001) A new deep-sea probe for *in situ* pH measurement in the environment of hydrothermal vent biological communities. *Deep Sea Res I* **48**: 1941-1951.
- Le Bris, N., Gaill, F., Alain, K., Cambon-Bonavita, M.-A., Desbruyères, D., Fabri, M.-C. *et al.* (2002) Biogeochemical interactions in extreme environmental conditions: an integrated study (PHARE 2002/EPR 13°N). *Inter Ridge News* **11**: 20-23.
- Le Bris, N., Sarradin, P.M., and Caprais, J.C. (2003) Contrasted sulphide chemistries in the environment of 13°N EPR vent fauna. *Deep Sea Res I* **50**: 737-747.

- Longnecker, K., and Reysenbach, A.-L. (2001) Expansion of the geographic distribution of a novel lineage of epsilon-*Proteobacteria* to a hydrothermal vent site on the Southern East Pacific Rise. *FEMS Microbiol Ecol* **35**: 287-293.
- Lopez-Garcia, P., Gaill, F., and Moreira, D. (2002) Wide bacterial diversity associated with tubes of the vent worm *Riftia pachyptila*. *Environ Microbiol* **4**: 204-215.
- Luther, G.W., Rozan, T.F., Tallefert, M., Nuzzio, D.B., Meo, C.D., Shank, T.M. *et al.* (2001) Chemical speciation drives hydrothermal vent ecology. *Nature* **410**: 813-816.
- Marshall, K., Stout, R., and Mitchell, R. (1971) Selective sorption of bacteria from seawater. *Can J Microbiol* **17**: 1413-1416.
- Marshall, K. (1992) Planktonic versus sessile life of prokaryotes. *In: The prokaryotes*. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer K.H. Springer-Verlag, New-York. **2**: 262-275.
- Miroshnichenko, M.L., Kostrikina, N.A, L'Haridon, S., Jeanthon, C., Hippe, H., Stackebrandt, E., Bonch-Osmolovskaya, E.A. (2002) *Nautilia lithotrophica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfur-reducing  $\epsilon$ -proteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1299-1304.
- Moyer, C., Dobbs, F., and Karl, D. (1995) Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1555-1562.
- Nelson, D.C., and Jannasch, H.W. (1983) Chemoautotrophic growth of a marine *Beggiatoa* in sulfide-gradient cultures. *Arch Microbiol* **136**: 262-269.
- Podar, M., Mullineaux, L., Huang, H.-R., Perlman, P.S., and Sogin, M.L. (2002) Bacterial Group II Introns in a Deep-Sea Hydrothermal Vent Environment. *Appl Environ Microbiol* **68**: 6392-6398.
- Polz, M.F., and Cavanaugh, C.M. (1995) Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Proceed Natl Acad Sci USA* **92**: 7232-7236.
- Pottu-Boumendil, J. (1989) Principes et méthodes de préparation. *In Techniques en microscopie électronique*. Paris: INSERM editions: 51-57.
- Quérellou, J., Alain, K., and Cambon Bonavita, M.A. (2001) Thermophiles from deep-sea hydrothermal vents. *Vie Milieu* **51**: 161-172.
- Reysenbach, A.L., Longnecker, K., and Kirshtein, J. (2000) Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3798-3806.
- Rossello Mora, R., and Amann, R. (2000) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 39-67.

- Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.
- Sarradin, P.M., Caprais, J.C., Briand, P., Gaill, F., Shillito, B., and Desbruyères, D. (1998) Chemical and thermal description of the Genesis hydrothermal vent community environment (13°N, EPR). *Cah Biol Mar* **39**: 159-167.
- Schrenk, M.O., Kelley, D.S., Delaney, J.R., and Baross, J.A. (2003) Incidence and Diversity of Microorganisms within the Walls of an Active Deep-Sea Sulfide Chimney. *Appl Environ Microbiol* **69**: 3580-3592.
- Stahl, D., and Amann, R. (1991) Development and application of nucleic acid probes. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (eds.), John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England: 205-248.
- Shillito, B., Ravaux, J., Gaill, F., Delachambre, J., Thiébaud, E., Childress, J. (1999) Preliminary data on carbon production of deep-sea vent tubeworms. *Mar Ecol Prog Ser* **183**: 275-279.
- Suzuki, M., and Giovannoni, S. (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* **62**: 625-630.
- Takai, K., Inagaki, F., Nakagawa, S., Hirayama, H., Nunoura, T., Sako, Y. *et al.* (2003) Isolation and phylogenetic diversity of members of previously uncultivated epsilon-*Proteobacteria* in deep-sea hydrothermal fields. *FEMS Microbiol Lett* **218**: 167-174.
- Taylor, C.D., Wirsén, C.O., and Gaill, F. (1999) Rapid Microbial Production of Filamentous Sulfur Mats at Hydrothermal Vents. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2253-2255.
- Teske, A., Hinrichs, K.-U., Edgcomb, V., de Vera Gomez, A., Kysela, D., Sylva, S.P. *et al.* (2002) Microbial Diversity of Hydrothermal Sediments in the Guaymas Basin: Evidence for Anaerobic Methanotrophic Communities. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1994-2007.
- Theron, J., and Cloete, T.E. (2000) Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Critical Rev Microbiol* **26**: 37-57.
- Thompson, J., Higgins, D., and Gibson, T. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- Tunnicliffe, V. (1991) The biology of hydrothermal vents: Ecology and evolution. *Oceanog Mar Biol Ann Rev*, **29**: 319-407.

Wirsen, C.O., Sievert, S.M., Cavanaugh, C.M., Molyneux, S.J., Ahmad, A., Taylor, L.T. et al. (2002) Characterization of an Autotrophic Sulfide-Oxidizing Marine *Arcobacter* sp. That Produces Filamentous Sulfur. *Appl Environ Microbiol* **68**: 316-325.

Zbinden, M., Martinez, I., Guyot, F., Cambon-Bonavita, M.-A., and Gaill, F. (2001) Zinc-iron sulphide mineralization in tubes of hydrothermal vent worms. *Eur J Mineral* **13**: 653-658.

Zbinden, M., Le Bris, N., Compere, P., Martinez, I., Guyot, F., and Gaill, F. (2003) Mineralogical gradients associated with alvinellids at deep-sea hydrothermal vents. *Deep Sea Res I* **50**: 269-280.

Table 1

Site	T (°C)	pH	S -II (µM)	Fe II (µM)
PP12	4-77 (n=1109)	4.5-7.5 (n=1109)	14-860 (n=24)	< dl
HOT3	2-70 (n=485)	4.7-8.0 (n=485)	199-775 (n=10)	289-839 (n=10)
Ph01	3-124 (n=1313)	3.8-8.0 (n=1313)	5-142 (n=27)	29-77 (n=27)
Ph07	3-94 (n=416)	5.7-7.8 (n=416)	141-985 (n=20)	< dl

Table 2

TRAC	Maximal temperature	Minimal temperature	Mean temperature
T2 lower part	19.7	1.5	5.2
T2 upper part	11.8	1.9	5.7
T3 lower part	65.8	18.2	33.6
T3 upper part	-	-	-
T4 lower part	43.1	2.3	13.1
T4 upper part	22.8	2.2	12.4
T6 lower part	17.7	4.5	10.2
T6 upper part	15.6	4.4	9.7



Table 3

Sequence type	No. of similar sequences <sup>a</sup>	Closest match organism or clone name <sup>b</sup>	% identity <sup>c</sup>	Phylogenetic affiliation
T2-PP12-404	94	Uncultured deep-sea vent clone R76-B76 (AF449250)	97	<i>ε-Proteobacteria</i>
T2-PP12-547		Uncultured deep-sea vent clone R76-B76 (AF449250)	97	<i>ε-Proteobacteria</i>
T2-PP12-500		Uncultured deep-sea vent clone R103-B19 (AF449233)	97	<i>ε-Proteobacteria</i>
T2-PP12-465		1	Uncultured deep-sea vent clone <i>P. palm</i> C/A 18 (AJ441207)	93
T2-PP12-593	1	Uncultured deep-sea vent clone Vent 18 (AY075125)	99	<i>ε-Proteobacteria</i>
T2-PP12-440	1	Uncultured deep-sea sediment clone BD2-5 (AB015535)	87	<i>ε-Proteobacteria</i>
T2-PP12-431	2	Uncultured deep-sea vent clone Vent 19 (AY075123)	97	<i>ε-Proteobacteria</i>
T2-PP12-455	1	Uncultured deep-sea cold seep sediment CS5.17 (AB069796)	97	<i>ε-Proteobacteria</i>
T2-PP12-495	2	Uncultured deep-sea vent clone Vent 10 (AY075121)	98	<i>ε-Proteobacteria</i>
T2-PP12-578	1	Uncultured deep-sea vent clone VC2.1-Bac32 (AF068806)	97	<i>ε-Proteobacteria</i>
T2-PP12-403	4	Uncultured deep-sea cold seep sediment clone CS5.30 (AB069800)	91	<i>γ-Proteobacteria</i>
T2-PP12-454	1	Uncultured deep-sea cold seep sediment clone CS5.30 (AB069800)	95	<i>γ-Proteobacteria</i>
T2-PP12-560	1	<i>Thiothrix</i> sp. (AF148516)	91	<i>γ-Proteobacteria</i>
T2-PP12-452	1	Uncultured vent <i>Riftia pachyptila</i> endosymbiont (U77478)	89	<i>γ-Proteobacteria</i>
T2-PP12-590	1	<i>Thiomicrospira crunogena</i> (AF064545)	94	<i>γ-Proteobacteria</i>
T2-PP12-481	2	Uncultured deep-sea vent clone <i>P. palm</i> A 79 (AJ441234)	98	<i>γ-Proteobacteria</i>
T2-PP12-425	2	Uncultured aquifer clone BVA77 (AY013608)	87	CFB group ?
T2-PP12-516	1	Uncultured coastal marine sediment clone LCP-26 (AF286031)	85	CFB group ?
T2-PP12-489	1			chimera
T2-PP12-522	1			chimera
T3-Hot3-737	1	Uncultured deep-sea vent clone R76-B61 (AF449248)	98	<i>ε-Proteobacteria</i>
T3-Hot3-601	26	Uncultured deep-sea vent clone Vent 23 (AY075126)	96	<i>ε-Proteobacteria</i>
T3-Hot3-706	36	Uncultured deep-sea vent clone <i>P. palm</i> C/A 13 (AJ441203)	96	<i>ε-Proteobacteria</i>
T3-Hot3-637		Uncultured deep-sea vent clone <i>P. palm</i> C/A 13 (AJ441203)	95	<i>ε-Proteobacteria</i>
T3-Hot3-648	14	Uncultured deep-sea vent clone Vent 23 (AY075126)	95	<i>ε-Proteobacteria</i>
T3-Hot3-602	17	Uncultured deep-sea vent clone Vent 23 (AY075126)	95	<i>ε-Proteobacteria</i>
T3-Hot3-748	10	Uncultured deep-sea vent clone Vent 18 (AY075125)	96	<i>ε-Proteobacteria</i>
T3-Hot3-751	1	Uncultured deep-sea vent clone Vent 18 (AY075125)	94	<i>ε-Proteobacteria</i>
T3-Hot3-727	4	Uncultured deep-sea vent clone VC1.2-C1 51 (AF367496)	94	<i>ε-Proteobacteria</i>
T3-Hot3-659	1	Uncultured deep-sea vent clone VC1.2-C1 02 (AF367482)	92	<i>ε-Proteobacteria</i>
T4-Ph01-311	5	Uncultured deep-sea vent clone Vent 12 (AY075127)	97	<i>ε-Proteobacteria</i>
T4-Ph01-41	4	Uncultured hydrothermal sediment clone a1b024 (AF420343)	98	<i>ε-Proteobacteria</i>
T4-Ph01-42	95	Uncultured deep-sea vent clone Vent 12 (AY075127)	97	<i>ε-Proteobacteria</i>
T4-Ph01-65		Uncultured deep-sea vent clone Vent 12 (AY075127)	97	<i>ε-Proteobacteria</i>
T4-Ph01-5		Uncultured deep-sea vent clone Vent 12 (AY075127)	97	<i>ε-Proteobacteria</i>
T4-Ph01-40		2	Uncultured deep-sea vent clone 33-PA72B98 (AF468700)	96
T4-Ph01-240	6	Uncultured deep-sea vent clone Vent 18 (AY075125)	94	<i>ε-Proteobacteria</i>
T4-Ph01-13	1	Uncultured deep-sea vent clone Vent 23 (AY075126)	95	<i>ε-Proteobacteria</i>
T4-Ph01-11	3	Uncultured hydrothermal sediment clone a2b004 (AF420345)	98	<i>ε-Proteobacteria</i>
T4-Ph01-321	2	Uncultured deep-sea vent clone R76-B129 (AF449252)	98	<i>ε-Proteobacteria</i>
T4-Ph01-307	1	Uncultured deep-sea vent clone <i>P. palm</i> C/A 55 (AJ441208)	98	<i>ε-Proteobacteria</i>
T4-Ph01-44	6	Uncultured deep-sea vent clone R103-B43 (AF449237)	96	<i>ε-Proteobacteria</i>
T4-Ph01-108	1			chimera

<sup>a</sup>Sequences sharing more than 97% 16S rDNA identity by the CLUSTALW program of GCG

<sup>b</sup>Based on BLAST search. EMBL/GenBank accession numbers are in brackets.

<sup>c</sup>Based on alignable base pairs

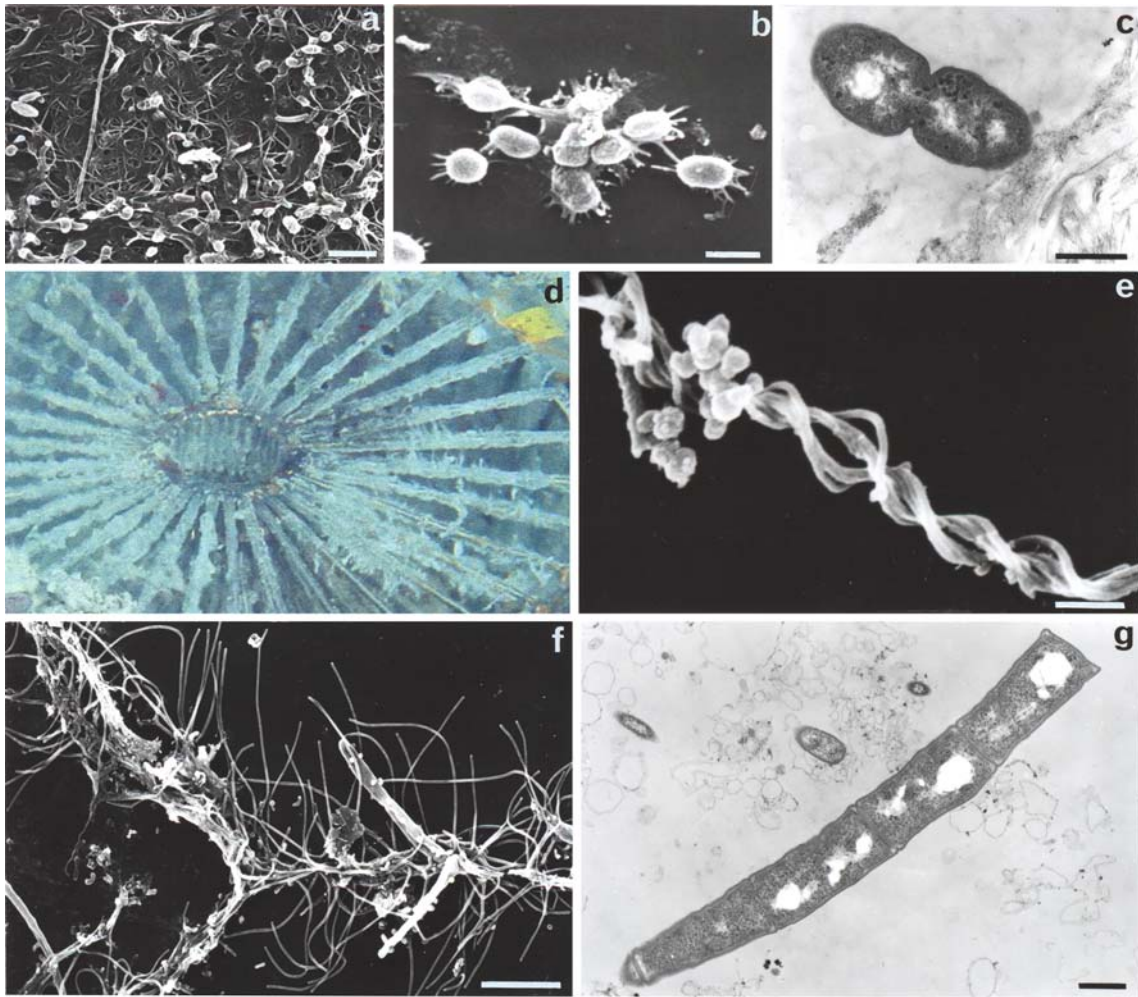
Table 4

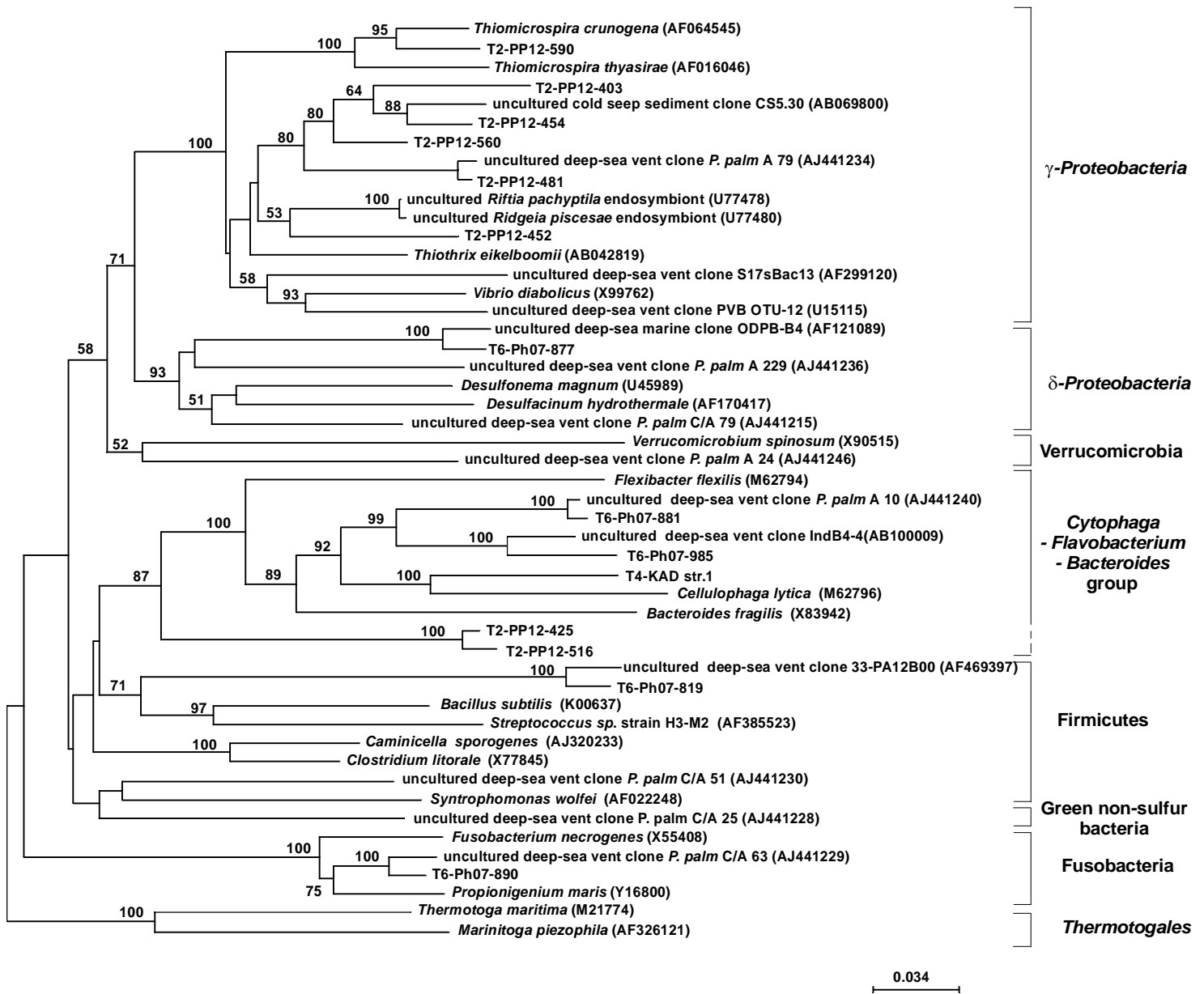
Sequence type	No. of similar sequences <sup>a</sup>	Closest match organism or clone name <sup>b</sup>	% identity <sup>c</sup>	Phylogenetic affiliation
T6-Ph07-974	1	Uncultured deep-sea vent clone Vent 18 (AY075125)	94	<i>ε-Proteobacteria</i>
T6-Ph07-945	5	Uncultured deep-sea vent clone 33-PA72B98 (AF468700)	94	<i>ε-Proteobacteria</i>
T6-Ph07-837	3	Uncultured deep-sea vent clone 33-PA72B98 (AF468700)	96	<i>ε-Proteobacteria</i>
T6-Ph07-973	1	Benzene mineralizing consortium clone SB-17 (AF029044)	96	<i>ε-Proteobacteria</i>
T6-Ph07-811	27	Uncultured hydrothermal sediment clone a1b024 (AF420343)	98	<i>ε-Proteobacteria</i>
T6-Ph07-847		Uncultured hydrothermal sediment clone a1b024 (AF420343)	97	<i>ε-Proteobacteria</i>
T6-Ph07-805	13	Uncultured deep-sea vent clone R76-B61 (AF449248)	98	<i>ε-Proteobacteria</i>
T6-Ph07-957	1	Uncultured deep-sea vent clone R76-B61 (AF449248)	95	<i>ε-Proteobacteria</i>
T6-Ph07-983	1	Uncultured deep-sea vent clone <i>P. palm</i> C/A 89 (AJ441211)	97	<i>ε-Proteobacteria</i>
T6-Ph07-924	51	Uncultured deep-sea vent clone Vent 12 (AY075127)	96	<i>ε-Proteobacteria</i>
T6-Ph07-856		Uncultured deep-sea vent clone Vent 12 (AY075127)	97	<i>ε-Proteobacteria</i>
T6-Ph07-927		Uncultured deep-sea vent clone Vent 12 (AY075127)	97	<i>ε-Proteobacteria</i>
T6-Ph07-889	1	Uncultured <i>Rimicaris exoculata</i> ectosymbiont (U29081)	94	<i>ε-Proteobacteria</i>
T6-Ph07-904	2	Uncultured deep-sea vent clone R76-B129 (AF449252)	98	<i>ε-Proteobacteria</i>
T6-Ph07-972	1	Uncultured deep-sea vent clone 33-PA72B98 (AF468700)	92	<i>ε-Proteobacteria</i>
T6-Ph07-987	1	Uncultured crude oil storage cavity clone 1014 (AB030587)	92	<i>ε-Proteobacteria</i>
T6-Ph07-914	1	<i>Sulfurospirillum deleyianum</i> (Y13671)	90	<i>ε-Proteobacteria</i>
T6-Ph07-984	1	Uncultured deep-sea vent clone VC1.2-C1 31 (AF367491)	96	<i>ε-Proteobacteria</i>
T6-Ph07-962	1	Uncultured hydrothermal sediment clone a1b024 (AF420343)	93	<i>ε-Proteobacteria</i>
T6-Ph07-916	1	Uncultured deep-sea vent clone VC1.2-C1 51 (AF367496)	96	<i>ε-Proteobacteria</i>
T6-Ph07-850	1	Uncultured deep-sea vent clone 33-FL74B00 (AF468778)	95	<i>ε-Proteobacteria</i>
T6-Ph07-877	1	Uncultured deep-sea marine clone ODPB-B4 (AF121089)	98	<i>δ-Proteobacteria</i>
T6-Ph07-881	1	Uncultured deep-sea vent clone <i>P. palm</i> A 10 (AJ441240)	97	CFB group
T6-Ph07-985	1	Uncultured deep-sea vent clone IndB4-4 (AB100009)	93	CFB group
T6-Ph07-819	2	Uncultured deep-sea vent clone 33-PA12B00 (AF469397)	95	Firmicutes
T6-Ph07-890	1	Uncultured deep-sea vent clone <i>P. palm</i> C/A 63 (AJ441229)	95	<i>Fusobacteria</i>
T6-Ph07-989	1			chimera

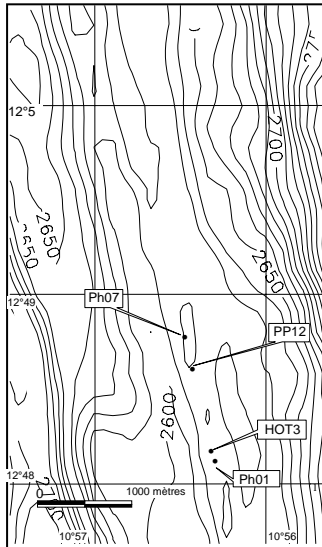
<sup>a</sup>Sequences sharing more than 97% 16S rDNA identity by the CLUSTALW program of GCG

<sup>b</sup>Based on BLAST search. EMBL/GenBank accession numbers are in brackets.

<sup>c</sup>Based on alignable base pairs







	Cheminée hydrothermale (champ hydr.)	Durée du déploiement	Nombre de clones analysés	Nombre de phylotypes
TRAC T2	PP12 (Genesis)	5 jours	118	16
TRAC T3	Hot 3 (Elsa)	20 jours	106	9
TRAC T4	Ph01 (Elsa)	20 jours	126	10
TRAC T6	Ph07 (Actinoir)	7 jours	120	23

Carte bathymétrique de la dorsale du Pacifique Oriental (EPR 13°N), indiquant la localisation des sites hydrothermaux où des modules de colonisation ont été déposés. Tableau résumant les durées de déploiement des modules de colonisation et le nombre de séquences de clones analysées.

### II.3. Conclusion du chapitre III

Les derniers travaux réalisés ont été menés avec une optique de compréhension des influences réciproques et des interactions entre les micro-organismes et leur environnement. L'analyse de l'ultrastructure des macrofilaments formés *in vitro* par *Desulfurobacterium crinifex* et l'étude de la composition du polymère sécrété ont soulevé de nombreuses questions quant au rôle de ces macrostructures. Ces structures macroscopiques présentent une ultrastructure complexe et très conservée, laissant supposer une communication intercellulaire et un fonctionnement coordonné au sein du macrofilament. Par ailleurs, il a été démontré que la biomasse (cellules + polymère) possédait un très fort pouvoir de rétention pour les métaux et une capacité de fixation, non négligeable, pour les autres éléments. En outre, il a été observé que la présence du polymère induisait systématiquement la formation de cristaux à partir des éléments présents dans le milieu de culture. Compte-tenu de cette propriété, il se pourrait que cette souche intervienne, au moins en partie, dans certains processus de minéralisation ayant lieu au niveau des sources hydrothermales océaniques profondes. Cependant, des expérimentations *in situ* ultérieures devront être envisagées afin de vérifier si cette souche forme des macrostructures comparables dans son environnement naturel et, le cas échéant, afin de déterminer leur fonction.

Les expériences de colonisation *in situ* réalisées ont mis en évidence la présence d'une grande diversité phylogénétique au sein de la sous-classe  $\epsilon$  des *Proteobacteria*. Les séquences d'ADNr 16S de ce groupe dominaient les banques de séquences réalisées à partir des tapis microbiens formés sur les modules déployés. Cette microflore correspondait à la cohorte précédant et/ou accompagnant l'établissement des Alvinellidae. Des analyses microscopiques des populations microbiennes installées sur les modules de colonisation ont révélé la présence d'une matrice de polymère dans laquelle les cellules étaient engluées, et/ou de micro-organismes possédant des extensions cytoplasmiques. Il semblerait donc que les premiers colonisateurs microbiens aient développé des stratégies pour s'accrocher aux modules et qu'une fois un premier tapis microbien formé, les alvinelles s'y soient installées. Le tapis microbien, qui constitue vraisemblablement une source nutritionnelle pour ces animaux mangeurs de dépôt, pourrait être, en plus, nécessaire à la fixation des premières larves ou des premiers juvéniles d'Alvinellidae, avant que ceux-ci n'aient sécrété leur tube.

Cette étude des assemblages microbiens associés aux polychètes hydrothermaux Alvinellidae a été menée sur une période de 3 années.

Une première étape du travail, basée sur des techniques de phylogénie moléculaire, a permis d'identifier les populations microbiennes associées, à un instant donné, à différents individus appartenant à quelques espèces d'alvinelles. Une diversité microbienne très importante a été détectée, ainsi qu'un très grand nombre de séquences d'ADNr 16S nouvelles ou appartenant à des groupes taxinomiques jamais mis en évidence dans les écosystèmes hydrothermaux profonds. L'un des résultats principaux de cette étude est que toutes les banques de clones constituées étaient largement dominées par des séquences affiliées aux  $\epsilon$ -*Proteobacteria*. Les différentes études réalisées améliorent significativement notre connaissance de la composition des populations microbiennes présentes sur les édifices hydrothermaux actifs. Cependant, les caractérisations phylogénétiques qui ont été réalisées ne permettent pas pour autant d'avoir accès aux propriétés physiologiques des micro-organismes détectés par leur séquence d'ADNr 16S. De plus, elles n'apportent aucun renseignement sur leur niveau d'activité dans le micro-environnement au moment du prélèvement. Tout au plus, dans les cas où les séquences détectées sont affiliées de manière robuste à un groupe monophylétique dans lequel les micro-organismes présentent une physiologie homogène, des hypothèses peuvent être formulées et discutées. Ainsi, bien que certaines des études n'aient pas pu être réalisées en réplicats faute d'échantillons, quelques hypothèses ont été émises concernant la fonction de certains des micro-organismes présents dans le micro-environnement des alvinelles. Parmi les micro-organismes identifiés par leur séquence d'ADNr 16S, certains pourraient contribuer à la détoxification de l'environnement, à la production primaire ou participer à la dégradation de la matière organique.

Les techniques culturales d'enrichissement-isolément ont également permis d'améliorer nos connaissances de la microflore du micro-environnement de ces polychètes, et d'une manière plus générale des sources hydrothermales océaniques profondes. Des micro-organismes fermentaires appartenant aux *Thermococcales*, aux *Thermotogales*, aux CFB et aux Firmicutes, ont ainsi été isolés. Des bactéries autotrophes réduisant le soufre et/ou les nitrates et appartenant aux  $\epsilon$ -*Proteobacteria* ou au genre *Desulfurobacterium* ont également été isolées. Trois micro-organismes phylogénétiquement intéressants ont fait l'objet d'une caractérisation.

- Le premier d'entre eux, *Caminiella sporogenes* est une bactérie thermophile fermentant des protéines et des glucides et représentant un nouveau genre du phylum des Firmicutes (Alain *et al.*, 2002).
- Un second isolat, *Desulfurobacterium crinifex*, est une bactérie thermophile chimiolithoautotrophe productrice de polymère respirant le soufre ou les nitrates et oxydant l'hydrogène (Alain *et al.*, sous presse).

- Enfin, *Caminibacter hydrogeniphilus*, la troisième souche, est une bactérie thermophile chimiolithoautotrophe utilisant le dioxyde de carbone comme source de carbone, l'hydrogène comme donneur d'électrons et les nitrates ou le soufre élémentaire comme accepteurs terminaux d'électrons (Alain *et al.*, 2002). Cette souche est, en outre, la première  $\epsilon$ -*Proteobacteria* isolée des sources hydrothermales océaniques profondes. Elle ouvre des perspectives nouvelles sur l'étude de la contribution des  $\epsilon$ -*Proteobacteria*, majoritaires dans ce type d'habitat, au fonctionnement des écosystèmes hydrothermaux.

L'étude des interactions entre le compartiment microbien et les Alvinellidae, ainsi que leur turn-over, ne faisaient pas partie des objectifs indiqués de cette étude. Les travaux menés nous ont donné des images instantanées des populations microbiennes associées aux Alvinellidae qui ne sont pas forcément représentatives d'un environnement dynamique. Les études culturelles nous ont, en outre, renseigné sur le métabolisme de certaines souches, permettant d'inférer de leur rôle au sein de l'écosystème. Ne disposant d'aucune information sur l'activité et la représentativité *in situ* de ces micro-organismes, ce rôle demeure cependant hypothétique. L'étude des interactions entre le compartiment microbien, les Alvinellidae, les édifices hydrothermaux et les facteurs physico-chimiques pourrait faire l'objet de travaux futurs. En effet, dans un système dynamique tel que celui des sources hydrothermales, les aspects spatio-temporels et environnementaux sont certainement importants et seront à prendre en considération pour la compréhension du fonctionnement de l'écosystème.

Les derniers travaux effectués témoignent de l'évolution du sujet vers une approche d'écologie microbienne. Ils ont tenté de considérer la microbiologie dans un contexte complexe influencé par des phénomènes biologiques, géochimiques et minéralogiques. Les études ultrastructurales et chimiques des macrofilaments extrêmement atypiques formés en culture par *Desulfurobacterium crinifex* ont soulevé de nombreuses questions quant à leur fonction. Ceux-ci pourraient être le reflet d'une stratégie développée par la souche au cours de son évolution pour s'adapter à l'environnement hydrothermal changeant. Cette question concernant la fonction de ces macrostructures ne pourra être élucidée que grâce à des expérimentations et des observations sur de longues périodes de leur évolution *in situ*. De plus, en raison de leurs propriétés de rétention et de cristallisation, ces macrostructures pourraient intervenir dans certains processus de précipitations minérales au niveau de l'écosystème hydrothermal.

Par ailleurs, les expérimentations *in situ* de colonisation de supports vierges ont été menées de manière intégrée. Les cortèges microbiens précédant l'installation des alvinelles et ceux associés à ces polychètes ont été analysés par des méthodes moléculaires et culturelles. Les conditions thermiques et chimiques ont été enregistrées tout au long de la colonisation par les micro-organismes et les animaux.



Au vu des résultats, il semblerait que la formation d'un tapis microbien soit un préalable nécessaire à la colonisation par les alvinelles.

Suite à ces diverses études, il apparaît clairement que les méthodes moléculaires et culturales, en permettant de répondre à des interrogations différentes, s'avèrent parfaitement complémentaires. Des questions relevant de l'écologie fonctionnelle des sources hydrothermales profondes ont été soulevées au cours des derniers travaux effectués. De nombreuses investigations devront être effectuées avant de pouvoir comprendre parfaitement les relations entre les micro-organismes et leur écosystème, ainsi que les régulations qui les régissent. Les expériences de colonisation *in situ* réalisées ont, notamment, démontré l'intérêt et l'importance des études pluridisciplinaires. A l'avenir, ce type d'approches intégrées pourrait être réalisé de manière plus systématique. Par ailleurs, les contraintes techniques et financières inhérentes aux études des écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds font que la plupart des études phylogénétiques effectuées à partir d'échantillons hydrothermaux ont été réalisées à partir d'un seul échantillon. Celles-ci ne donnent qu'une image figée des populations microbiennes présentes à un instant donné dans une microniche d'un écosystème extrêmement variable et instable. Dans le futur, il faudra envisager de considérer de manière plus approfondie la composante temporelle des processus afin d'appréhender la dynamique de la biocénose et les successions de populations. Les observatoires benthiques devraient apporter des réponses concernant la dynamique de l'écosystème. Il faudra, d'autre part, identifier les acteurs des activités bactériennes majeures des écosystèmes hydrothermaux afin de déterminer leur fonction au sein de l'écosystème et leur contribution aux différents cycles biogéochimiques.

Les difficultés et les contraintes techniques pesant sur les expérimentations *in situ* réalisées à plus de 2000 mètres de profondeur, sont extrêmement importantes et compliquent considérablement la tâche des scientifiques. La compréhension totale des processus spatio-temporels et fonctionnels sera probablement longue et difficile. Elle nécessitera, de toute évidence, le développement de nouveaux outils d'analyses et de prélèvement.

## *Conclusion générale*

Cette étude des assemblages microbiens associés aux polychètes hydrothermaux Alvinellidae a été menée sur une période de 3 années.

Une première étape du travail, basée sur des techniques de phylogénie moléculaire, a permis d'identifier les populations microbiennes associées, à un instant donné, à différents individus appartenant à quelques espèces d'alvinelles. Une diversité microbienne très importante a été détectée, ainsi qu'un très grand nombre de séquences d'ADNr 16S nouvelles ou appartenant à des groupes taxinomiques jamais mis en évidence dans les écosystèmes hydrothermaux profonds. L'un des résultats principaux de cette étude est que toutes les banques de clones constituées étaient largement dominées par des séquences affiliées aux  $\epsilon$ -*Proteobacteria*. Les différentes études réalisées améliorent significativement notre connaissance de la composition des populations microbiennes présentes sur les édifices hydrothermaux actifs. Cependant, les caractérisations phylogénétiques qui ont été réalisées ne permettent pas pour autant d'avoir accès aux propriétés physiologiques des micro-organismes détectés par leur séquence d'ADNr 16S. De plus, elles n'apportent aucun renseignement sur leur niveau d'activité dans le micro-environnement au moment du prélèvement. Tout au plus, dans les cas où les séquences détectées sont affiliées de manière robuste à un groupe monophylétique dans lequel les micro-organismes présentent une physiologie homogène, des hypothèses peuvent être formulées et discutées. Ainsi, bien que certaines des études n'aient pas pu être réalisées en réplicats faute d'échantillons, quelques hypothèses ont été émises concernant la fonction de certains des micro-organismes présents dans le micro-environnement des alvinelles. Parmi les micro-organismes identifiés par leur séquence d'ADNr 16S, certains pourraient contribuer à la détoxification de l'environnement, à la production primaire ou participer à la dégradation de la matière organique.

Les techniques culturales d'enrichissement-isolément ont également permis d'améliorer nos connaissances de la microflore du micro-environnement de ces polychètes, et d'une manière plus générale des sources hydrothermales océaniques profondes. Des micro-organismes fermentaires appartenant aux *Thermococcales*, aux *Thermotogales*, aux CFB et aux Firmicutes, ont ainsi été isolés. Des bactéries autotrophes réduisant le soufre et/ou les nitrates et appartenant aux  $\epsilon$ -*Proteobacteria* ou au genre *Desulfurobacterium* ont également été isolées. Trois micro-organismes phylogénétiquement intéressants ont fait l'objet d'une caractérisation.

- Le premier d'entre eux, *Caminiella sporogenes* est une bactérie thermophile fermentant des protéines et des glucides et représentant un nouveau genre du phylum des Firmicutes (Alain *et al.*, 2002).
- Un second isolat, *Desulfurobacterium crinifex*, est une bactérie thermophile chimiolithoautotrophe productrice de polymère respirant le soufre ou les nitrates et oxydant l'hydrogène (Alain *et al.*, sous presse).

- Enfin, *Caminibacter hydrogeniphilus*, la troisième souche, est une bactérie thermophile chimiolithoautotrophe utilisant le dioxyde de carbone comme source de carbone, l'hydrogène comme donneur d'électrons et les nitrates ou le soufre élémentaire comme accepteurs terminaux d'électrons (Alain *et al.*, 2002). Cette souche est, en outre, la première  $\epsilon$ -*Proteobacteria* isolée des sources hydrothermales océaniques profondes. Elle ouvre des perspectives nouvelles sur l'étude de la contribution des  $\epsilon$ -*Proteobacteria*, majoritaires dans ce type d'habitat, au fonctionnement des écosystèmes hydrothermaux.

L'étude des interactions entre le compartiment microbien et les Alvinellidae, ainsi que leur turn-over, ne faisaient pas partie des objectifs indiqués de cette étude. Les travaux menés nous ont donné des images instantanées des populations microbiennes associées aux Alvinellidae qui ne sont pas forcément représentatives d'un environnement dynamique. Les études culturelles nous ont, en outre, renseigné sur le métabolisme de certaines souches, permettant d'inférer de leur rôle au sein de l'écosystème. Ne disposant d'aucune information sur l'activité et la représentativité *in situ* de ces micro-organismes, ce rôle demeure cependant hypothétique. L'étude des interactions entre le compartiment microbien, les Alvinellidae, les édifices hydrothermaux et les facteurs physico-chimiques pourrait faire l'objet de travaux futurs. En effet, dans un système dynamique tel que celui des sources hydrothermales, les aspects spatio-temporels et environnementaux sont certainement importants et seront à prendre en considération pour la compréhension du fonctionnement de l'écosystème.

Les derniers travaux effectués témoignent de l'évolution du sujet vers une approche d'écologie microbienne. Ils ont tenté de considérer la microbiologie dans un contexte complexe influencé par des phénomènes biologiques, géochimiques et minéralogiques. Les études ultrastructurales et chimiques des macrofilaments extrêmement atypiques formés en culture par *Desulfurobacterium crinifex* ont soulevé de nombreuses questions quant à leur fonction. Ceux-ci pourraient être le reflet d'une stratégie développée par la souche au cours de son évolution pour s'adapter à l'environnement hydrothermal changeant. Cette question concernant la fonction de ces macrostructures ne pourra être élucidée que grâce à des expérimentations et des observations sur de longues périodes de leur évolution *in situ*. De plus, en raison de leurs propriétés de rétention et de cristallisation, ces macrostructures pourraient intervenir dans certains processus de précipitations minérales au niveau de l'écosystème hydrothermal.

Par ailleurs, les expérimentations *in situ* de colonisation de supports vierges ont été menées de manière intégrée. Les cortèges microbiens précédant l'installation des alvinelles et ceux associés à ces polychètes ont été analysés par des méthodes moléculaires et culturelles. Les conditions thermiques et chimiques ont été enregistrées tout au long de la colonisation par les micro-organismes et les animaux.

Au vu des résultats, il semblerait que la formation d'un tapis microbien soit un préalable nécessaire à la colonisation par les alvinelles.

Suite à ces diverses études, il apparaît clairement que les méthodes moléculaires et culturales, en permettant de répondre à des interrogations différentes, s'avèrent parfaitement complémentaires. Des questions relevant de l'écologie fonctionnelle des sources hydrothermales profondes ont été soulevées au cours des derniers travaux effectués. De nombreuses investigations devront être effectuées avant de pouvoir comprendre parfaitement les relations entre les micro-organismes et leur écosystème, ainsi que les régulations qui les régissent. Les expériences de colonisation *in situ* réalisées ont, notamment, démontré l'intérêt et l'importance des études pluridisciplinaires. A l'avenir, ce type d'approches intégrées pourrait être réalisé de manière plus systématique. Par ailleurs, les contraintes techniques et financières inhérentes aux études des écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds font que la plupart des études phylogénétiques effectuées à partir d'échantillons hydrothermaux ont été réalisées à partir d'un seul échantillon. Celles-ci ne donnent qu'une image figée des populations microbiennes présentes à un instant donné dans une microniche d'un écosystème extrêmement variable et instable. Dans le futur, il faudra envisager de considérer de manière plus approfondie la composante temporelle des processus afin d'appréhender la dynamique de la biocénose et les successions de populations. Les observatoires benthiques devraient apporter des réponses concernant la dynamique de l'écosystème. Il faudra, d'autre part, identifier les acteurs des activités bactériennes majeures des écosystèmes hydrothermaux afin de déterminer leur fonction au sein de l'écosystème et leur contribution aux différents cycles biogéochimiques.

Les difficultés et les contraintes techniques pesant sur les expérimentations *in situ* réalisées à plus de 2000 mètres de profondeur, sont extrêmement importantes et compliquent considérablement la tâche des scientifiques. La compréhension totale des processus spatio-temporels et fonctionnels sera probablement longue et difficile. Elle nécessitera, de toute évidence, le développement de nouveaux outils d'analyses et de prélèvement.

*Références bibliographiques*

## A

- Adams MWW, Holden JF, Menon AL, Schut GJ, Grunden AM, Hou C, Hutchins AM, Jenney FE, Kim C, Ma K, Pan G, Roy R, Sapra R, Story SV, Verhagen MF** (2001) Key role for sulfur in peptide metabolism and in regulation of three hydrogenases in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol* **183**: 716-724
- Alain K, Marteinsson VT, Miroshnichenko ML, Bonch-Osmolovskaya EA, Prieur D, Birrien JL** (2002a) *Marinitoga piezophila* sp. nov., a rod-shaped, thermo-piezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1331-1339
- Alain K, Olagnon M, Desbruyères D, Page A, Barbier G, Juniper SK, Quérellou J, Cambon-Bonavita M-A** (2002b) Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with mucous secretions of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis*. *FEMS Microbiol Ecol* **42**: 463-476
- Alain K, Pignet P, Zbinden M, Quillévéré M, Duchiron F, Donval JP, Lesongeur F, Raguénès G, Crassous P, Quérellou J, Cambon-Bonavita MA** (2002c) *Caminiocella sporogenes* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic spore-forming bacterium isolated from an East-Pacific Rise hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1621-1628
- Alain K, Quérellou J, Lesongeur F, Pignet P, Crassous P, Raguénès G, Cuff V, Cambon-Bonavita MA** (2002d) *Caminiobacter hydrogeniphilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an East Pacific Rise hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1317-1323
- Alain K, Rolland S, Crassous P, Lesongeur F, Zbinden M, Le Gall C, Godfroy A, Page A, Juniper SK, Cambon-Bonavita MA, Duchiron F, Quérellou J** (2003) *Desulfurobacterium crinifex* sp. nov., a novel thermophilic, pinkish-streamers forming, chemolithoautotrophic bacterium isolated from a Juan de Fuca ridge hydrothermal vent. Emendation of the genus *Desulfurobacterium*. *Extremophiles* **7**: 361-370.
- Alain K, Zbinden M, Le Bris N, Lesongeur F, Gaill F, Cambon-Bonavita MA** (sous presse) Early steps of microbial colonisation processes at deep-sea hydrothermal vents. *Environmental Microbiology*.
- Alain K, Crassous P, Guézennec J, Fouquet Y, Zbinden M, Cambon-Bonavita MA, Quérellou J** (soumis) Conspicuous filamentous networks of the thermophilic hydrothermal vent species *Desulfurobacterium crinifex*: spatial arrangement of cells *in vitro*, polymer production and mineral precipitation capabilities. *Extremophiles*.
- Alayse-Danet A, Desbruyères D, Gaill F** (1987) The possible nutritional or detoxification role of the epibiotic bacteria of alvinellid polychaetes: review of the current data. *Symbiosis* **4**: 51-62
- Alayse-Danet A, Gaill F, Desbruyères D** (1986) In situ bicarbonate uptake by bacteria-*Alvinella* associations. *Mar Ecol* **7**: 233-240
- Alazard D, Dukan S, Urios A, Verhe F, Bouabida N, Morel F, Thomas P, Garcia J-L, Ollivier B** (2003) *Desulfovibrio hydrothermalis* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from hydrothermal vents. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 173-178
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer K-H** (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**: 143-169
- Amann G, Stetter KO, Llobet-Brossa E, Amann R, Anton J** (2000) Direct proof for the presence and expression of two 5% different 16S rRNA genes in individual cells of *Haloarcula marismortui*. *Extremophiles* **4**: 373-376
- Amann R, Ludwig W** (2000) Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 555-565
- Antoine E, Cilia V, Meunier J-R, Guezennec J, Lesongeur F, Barbier G** (1997) *Thermosiphon melanesiensis* sp. nov., a new thermophilic anaerobic bacterium belonging to the *Thermotogales*, isolated from deep-sea hydrothermal vent in the southern Pacific ocean. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 1118-1123
- Aravind L, Tatusov R, Wolf Y, Walker D** (1998) Evidence for massive gene exchange between archaeal and bacterial hyperthermophiles. *Trends Genet* **14**: 442-444
- Arraiano C** (1993) Post-transcriptional control of gene expression: bacterial mRNA degradation. *World J Microbiol Biotech* **9**: 421-432
- Ashkin A, Dziedzic J, Yamane Y** (1987) Optical trapping and manipulation of single cells using infra-red beams. *Nature* **330**: 769-771
- Audiffren C, Cayol J-L, Joulain C, Casalat L, Thomas P, Garcia J-L, Ollivier B** (2003) *Desulfonauticus submarinus* gen. nov., sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1585-1590

## B

- Bachoon DS, Chen F, Hodson RE** (2001) RNA recovery and detection of mRNA by RT-PCR from preserved prokaryotic samples. *FEMS Microbiol Lett* **201**: 127-132
- Barbier G, Godfroy A, Meunier J-R, Quérellou J, Cambon M-A, Lesongeur F, Grimont PAD, Raguénès G** (1999) *Pyrococcus glycovorans*, sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from the East Pacific Rise. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 1829-1837
- Baross J, Deming J** (1985) The role of bacteria in the ecology of black smoker environments. *Bull Biol Soc Wash* **6**: 355-371
- Baross J, Deming JW** (1993) Growth at high temperatures: Isolation, taxonomy, physiology, ecology. In *The hydrothermal vents of the Eastern Pacific: an overview* (Jones, ed.) *M. Biol. Soc. Wash. Bull.*: 355-371

- Beja O, Aravind L, Koonin E, Suzuki M, Hadd A, Nguyen L, Jovanovich S, Gates C, Feldman R, Spudich J, Spudich E, DeLong E** (2000) Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science* **289**: 1902-1906
- Benbouzid-Rollet N, Lopez-Garcia P, Watrin L, Erauso G, Prieur D, Forterre P** (1997) Isolation of new plasmids from hyperthermophilic Archaea of the order Thermococcales. *Res Microbiol* **148**: 767-775
- Blöchl E, Rachel R, Burggraf S, Hafenbradl D, Jannasch HW, Stetter KO** (1997) *Pyrolobus fumarii*, gen. nov., sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C. *Extremophiles* **1**: 14-21
- Blumentals II, itoh M, Olson GJ, Kelly RM** (1990) role of polysulfides in reduction of elemental sulfur by the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *Appl Environ Microbiol* **56**: 1255-1262
- Boetius A, Ravensschlag K, Schubert C, Rickert D, Widdel F, Gieseke A, Amann R, Jorgensen B, Witte U, Pfannkuche O** (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**: 623-626
- Boschker HTS, Middelburg JJ** (2002) Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* **40**: 85-95
- Bouvier T, del Giorgio PA** (2003) Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): A quantitative review of published reports. *FEMS Microbiol Ecol* **44**: 3-15
- Brisbarre N, Fardeau M-L, Cuff V, Cayol J-L, Barbier G, Cilia V, Ravot G, Thomas P, Garcia J-L, Ollivier B** (2003) *Clostridium caminithermale* sp. nov., a slightly halophilic and moderately thermophilic bacterium isolated from an Atlantic deep-sea hydrothermal chimney. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1043-1049
- Burggraf S, Jannasch HW, Nicolaus B, Stetter KO** (1990) *Archaeoglobus profundus*, sp. nov., represents a new species within the sulfate-reducing archaeobacteria. *Syst Appl Microbiol* **13**: 24-28
- ## C
- 
- Cambon-Bonavita MA, Raguénès G, Jean J, Vincent P, Guézennec J** (2002) A novel polymer produced by a bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid. *J Appl Microbiol* **93**: 310-315
- Cambon-Bonavita MA, Lesongeur F, Pignet P, Wery N, Lambert C, Godfroy A, Quérellou J, Barbier G** (2003) *Thermococcus atlanticus* sp. nov., a hyperthermophilic Archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent in the Mid-Atlantic Ridge. *Extremophiles* **7**: 101-109
- Campbell BJ, Cary SC** (2001) Characterization of a novel spirochete associated with the hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 110-117
- Campbell BJ, Jeanthon C, Kostka JE, Luther GW, III, Cary SC** (2001) Growth and Phylogenetic Properties of Novel Bacteria Belonging to the Epsilon Subdivision of the *Proteobacteria* Enriched from *Alvinella pompejana* and Deep-Sea Hydrothermal Vents. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4566-4572
- Campbell BJ, Stein JL, Cary SC** (2003) Evidence of chemolithoautotrophy in the bacterial community associated with *Alvinella pompejana*, a hydrothermal vent polychaete. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5070-5078
- Canganella F, Jones WJ, Gambacorta A, Antranikian G** (1998) *Thermococcus guaymasensis* sp. nov. and *Thermococcus aggregans* sp. nov., two novel thermophilic archaea isolated from the Guaymas Basin hydrothermal vent site. *Int J Syst Bacteriol* **48**: 1181-1185
- Cary S, Cottrell M, Stein J, Camacho F, Desbruyeres D** (1997) Molecular Identification and Localization of Filamentous Symbiotic Bacteria Associated with the Hydrothermal Vent Annelid *Alvinella pompejana*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1124-1130
- Charlou JL, Donval JP, Fouquet Y, Jean-Baptiste P, Holm N** (2002) Geochemistry of high H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> vent fluids issuing from ultramafic rocks at the Rainbow hydrothermal field (36[deg]14'N, MAR). *Chem Geol* **191**: 345-359
- Chevaldonné P** (1996) Ecologie des cheminées hydrothermales actives. Thèse de doctorat de l'Université de la Méditerranée (Aix-marseille II): 19-25
- Chevaldonné P, Godfroy A** (1997) Enumeration of microorganisms from deep-sea hydrothermal chimney samples. *FEMS Microbiol Lett* **146**: 211-216
- Cohen G, Barbe V, Flament D, Galperin M, Heilig R, Lecompte O, Poch O, Prieur D, Quérellou J, Ripp R, Thierry J-C, Van der Oost J, Weissenbach J, Zivanovic Y, Forterre P** (2003) An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Mol Microbiol* **47**: 1495-1512
- Connon SA, Giovannoni SJ** (2002) High-Throughput Methods for Culturing Microorganisms in Very-Low-Nutrient Media Yield Diverse New Marine Isolates. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3878-3885
- Corliss JB, Ballard RD** (1977) Oases of life in the cold abyss. *National Geographic* **152**: 440-453
- Corre E** (2000) Approches moléculaires de la diversité microbienne de deux environnements extrêmes: les sources hydrothermales profondes et les réservoirs pétroliers. In Thèse en microbiologie de l'Université de Bretagne Occidentale: 80
- Corre E, Reysenbach A-L, Prieur D** (2001) Epsilon-Proteobacterial diversity from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. *FEMS Microbiol Lett* **205**: 329-335
- Cottrell MT, Cary SC** (1999) Diversity of dissimilatory bisulfite reductase genes of bacteria associated with the deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid *Alvinella pompejana*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1127-1132
- Cowen JP, Giovannoni SJ, Kenig F, Johnson HP, Butterfield D, Rappé MS, Hutnak M, Lam P** (2003) Fluids from aging ocean crust that support microbial life. *Science* **299**: 120-123



**Crosby LD, Criddle CS** (2003) Understanding bias in microbial community analysis techniques due to *rrn* operon copy number heterogeneity **34**: 790-802

## D

**Degens E** (1974) Synthesis of organic matter in the presence of silicate and lime. *Chem. Geol.* **13**: 1-10

**Deming JW, Baross JA** (1993) Deep-sea smokers : Windows to a subsurface biosphere. *Geochim Cosmochim Acta* **57**: 3219-3230

**Desbruyères D, Laubier L** (1980) *Alvinella pompejana* gen. nov. sp. nov., Ampharetidae aberrant des sources hydrothermales de la ride est-Pacifique. *Oceanol Acta* **3**: 267-274

**Desbruyères D, Laubier L** (1982) *Paralvinella grasslei*, new genus, new species of Alvinellinae (Polychaeta: Ampharetidae) from the Galapagos Rift geothermal vents. *Proc Biol Soc Wash* **95**: 484-494

**Desbruyères D, Gaill F, Laubier L, Fouquet Y** (1985) Polychaetous annelids from hydrothermal vent ecosystems: an ecological overview. *Biol Soc Wash Bull* **6**: 103-116

**Desbruyères D, Laubier L** (1986) Les Alvinellidae, une famille nouvelle d'annélides polychètes inféodées aux sources hydrothermales sous-marines: systématique, biologie et écologie. *Can J Zool* **64**: 2227-2245

**Desbruyères D, Laubier L** (1991) Systematics, phylogeny, ecology and distribution of the Alvinellidae (Polychaeta) from deep-sea hydrothermal vents. *Ophelia Suppl* **5**: 31-45

**Desbruyères D, Laubier L** (1993) New species of Alvinellidae (polychaeta) from the North Fiji back-arc basin hydrothermal vents (southwestern Pacific). *Proc Biol Soc Wash* **106**: 225-236

**Desbruyères D, Chevaldonné P, Alayse A-M, Jollivet D, Lallier FH, Jouin-Toulmond C, Zal F, Sarradin P-M, Cosson RP, Caprais J-C, Arndt C, O'Brien J, Guézennec J, Hourdez S, Riso R, Gaill F, Laubier L, Toulmond A** (1998) Biology and ecology of the "pompeii worm" (*Alvinella pompejana* Desbruyères and Laubier), a normal dweller of an extreme deep-sea environment: a synthesis of current knowledge and recent developments. *Deep-Sea Res Part II* **45**: 383-422

**Duffaud GD, dHennezel OB, Peek AS, Reysenbach AL, Kelly RM** (1998) Isolation and characterization of *Thermococcus barossii*, sp. nov., a hyperthermophilic Archaeon isolated from a hydrothermal vent flange formation. *Syst Appl Microbiol* **21**: 40-49

**Durand P, Prieur D, Jeanthon C, Jacq E** (1990) Présence et activité de bactéries hétérotrophes manganoxydantes associées aux Alvinellidés (Annelides polychètes) dans un site d'hydrothermalisme profond de la dorsale du Pacifique oriental. *CR Acad Sci Paris* **310**: 273-278

**Durand P, Reysenbach A-L, Prieur D, Pace N** (1993) Isolation and characterization of *Thiobacillus hydrothermalis* sp. nov., a mesophilic obligately chemolithotrophic bacterium isolated from a deep-sea

hydrothermal vent in Fiji Basin. *Arch Microbiol* **159**: 1502-150639-150644

## E

**Edmond J, Van Damm K, MacDuff R, Measures C** (1982) Chemistry of hot springs on the East Pacific Rise and their effluent dispersal. *Nature* **297**: 187-191

**Edmond J, Von Damm K** (1983) Hot springs on the ocean floor. *Sci Am* **248**: 78-93

**Edwards KJ, Rogers DR, Wirsén CO, McCollom TM** (2003) Isolation and Characterization of Novel Psychrophilic, Neutrophilic, Fe-Oxidizing, Chemolithoautotrophic {alpha}- and {gamma}-Proteobacteria from the Deep Sea. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2906-2913

**Emerson D, Moyer CL** (2002) Neutrophilic Fe-Oxidizing Bacteria Are Abundant at the Loihi Seamount Hydrothermal Vents and Play a Major Role in Fe Oxide Deposition. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3085-3093

**Erauso G, Reysenbach AL, Godfroy A, Meunier JR, Crump B, Partensky F, Baross JA, Marteinson V, Barbier G, Pace NR, Prieur D** (1993) *Pyrococcus abyssi* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Arch Microbiol* **160**: 338-349

**Erauso G** (1994) Les *Thermococcales* du bassin Nord-Fidjien, description d'une nouvelle espèce: *Pyrococcus abyssi* et caractérisation de son plasmide. Thèse de doctorat en océanographie biologique (Université de Bretagne Occidentale)

## F

**Farnleitner A, Kreuzinger N, Kavka G, Grillenberger S, Rath J, Mach R** (2000) Comparative analysis of denaturing gradient gel electrophoresis and temporal temperature gradient gel electrophoresis in separating *Escherichia Coli uidA* amplicons differing in single base substitutions. *Lett Appl Microbiol* **30**: 427-431

**Farrelly V, Rainey F, Stackebrandt E** (1995) Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl Environ Microbiol* **61**: 2798-2801

**Felsenstein J** (1973) Maximum-likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Syst Zool* **22**: 240-249

**Felsenstein J** (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* **17**: 368-376

**Felsenstein J** (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evol* **30**: 783-791

**Fiala G, Stetter KO, Jannasch HW, Langworthy TA, Madon J** (1986) *Staphylothermus marinus* sp. nov. represents a novel genus of extremely thermophilic submarine heterotrophic archaeobacteria growing up to 98°C. *Syst Appl Microbiol* **8**: 106-113

**Fitch W** (1971) Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst Zool* **20**: 406-416

**Fouquet Y, Auclair G, Cambon P, Etoubleau J** (1988) Geological setting and mineralogical and geochemical investigations on sulfide deposits near 13°N on the East-Pacific Rise. *Mar Geol* **84**: 145-178

**Fox GE, Pechman K, Woese CR** (1977) Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid : molecular approach to prokaryotic systematics. *Int J Syst Bacteriol* **27**: 44-57

**Frohlich J, König H** (2000) New techniques for isolation of single prokaryotic cells. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 567-572

**Fuchs BM, Glockner FO, Wulf J, Amann R** (2000) Unlabeled Helper Oligonucleotides Increase the In Situ Accessibility to 16S rRNA of Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3603-3607

**Fuhrman J, Azam F** (1980) Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica, and California. *Appl Environ Microbiol* **39**: 1085-1095

**Fuhrman J, Azam F** (1982) Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar Biol* **66**: 109-120

## G

**Gaill F, Bouligand Y** (1987) Alternating positive and negative twist of polymers in an invertebrate integument. *Mol Crystallogr Liquid Crystallogr*

**Geslin C, Le Romancer M, Gaillard M, Erauso G, Prieur D** (2003a) Observation of virus-like particles in high temperature enrichment cultures from deepsea hydrothermal vents. *Res Microbiol* **154**: 303-307

**Geslin C, Le Romancer M, Erauso G, Gaillard M, Perrot G, Prieur D** (2003b) PAV1, the first virus-like particle isolated from a hyperthermophilic euryarchaeote, 'Pyrococcus abyssi'. *J Bacteriol* **185**: 3888-3894

**Ghiorse W** (1984) Biology of iron- and manganese-depositing bacteria. *Annu Rev Microbiol* **38**: 515-550

**Giovannoni S, Britschgi T, Moyer C, Field K** (1990) Genetic diversity in Sargasso sea bacterioplankton. *Nature* **345**: 60-62

**Godfroy A, Meunier J-R, Guezennec J, Lesongeur F, Raguénès G, Rimbault A, Barbier G** (1996) *Thermococcus fumicolans* sp. nov. a new hyperthermophilic archaeum isolated from deep-sea hydrothermal vent in North Fiji bassin. *Int J Syst Bacteriol* **46**: 1113-1119

**Godfroy A, Lesongeur F, Raguénès G, Quérellou J, Antoine E, Meunier J-R, Guezennec J, Barbier G** (1997) *Thermococcus hydrothermalis* sp. nov., a new hyperthermophilic Archaeon isolated from deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 622-626

**Godfroy A, Raven NDH, Sharp RJ** (2000) Physiology and continuous culture of the hyperthermophilic deep-sea vent archaeon *Pyrococcus abyssi* ST549. *FEMS Microbiol Lett* **186**: 127-132

**Godon J-J, Duthoit F, Delbès C, Millet L, Montel M-C** (2001) Utilisation d'une technique d'empreinte moléculaire dans l'étude d'écosystèmes microbiens complexes. Application à la fabrication d'un fromage au lait cru "l'AOC Salers". *Lait* **81**: 257-262

**Gold T** (1992) The Deep, Hot Biosphere. *Proc Natl Acad Sci* **89**: 6045-6049

**Gonzalez JM, Kato C, Horikoshi K** (1995) *Thermococcus peptonophilus* sp. nov., a fast-growing, extremely thermophilic archaeobacterium isolated from deep-sea hydrothermal vents. *Arch Microbiol* **164**: 159-164

**Gonzalez JM, Masuchi Y, Robb FT, Ammeramn JW, Maeder DL, Yanagibayashi M, Tamaoka J, Kato C** (1998) *Pyrococcus horikoshii* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from hydrothermal vent at the Okinawa Trough. *Extremophiles* **2**: 123-130

**Gotz D, Banta A, Beveridge TJ, Rushdi AI, Simoneit B, Reysenbach AL** (2002) *Persephonella marina* gen. nov., sp. nov. and *Persephonella guaymasensis* sp. nov., two novel, thermophilic, hydrogen-oxidizing microaerophiles from deep-sea hydrothermal vents. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1349-1359

**Grassle J** (1986) The ecology of deepsea hydrothermal vent communities. *Adv Mar Biol* **23**: 301-362

**Graves PR, Haystead TAJ** (2002) Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol. Rev* **66**: 39-63

**Grote R, Li LN, Tamaoka J, Kato C, Horikoshi K, Antranikian G** (1999) *Thermococcus siculi* sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent at the Mid-Okinawa Trough. *Extremophiles* **3**: 55-62

## H

**Haddad A, Camacho F, Durand P, Cary S** (1995) Phylogenetic characterization of the epibiotic bacteria associated with the hydrothermal vent polychaete *Alvinella pompejana*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1679-1687

**Harmsen H, Prieur D, Jeanthon C** (1997) Group-Specific 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes To Identify Thermophilic Bacteria in Marine Hydrothermal Vents. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4061-4068

**Harmsen HJM, Prieur D, Jeanthon C** (1997) Distribution of microorganisms in deep-sea hydrothermal vent chimneys investigated by whole-cell hybridization and enrichment culture of thermophilic subpopulations. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2876-2883

**Hayashi K** (1991) PCR-SSCP: a simple and sensitive method for the detection of mutations in genomic DNA. *PCR Methods Applic* **1**: 34-38

**Haymon R** (1983) Growth history of hydrothermal black smoker chimneys. *Nature* **301**: 695-698

- Hedlund BP, Gosink JJ, Staley JT** (1997) Verrucomicrobia div. nov., a new division of the Bacteria containing three new species of *Prostheco bacter*. *Antonie van Leeuwenhoek* **72**: 29-38
- Hedrick D, Pledger R, White D, Baross J** (1992) In situ microbial ecology of hydrothermal vent sediments. *FEMS Microbiol Ecol* **101**: 1-10
- Holm NG, Charlou JL** (2001) Initial indications of abiotic formation of hydrocarbons in the Rainbow ultramafic hydrothermal system, Mid-Atlantic Ridge. *Earth Planetary Sci Lett* **191**: 1-8
- House CH, Schopf JW, Stetter KO** (2003) Carbon isotopic fractionation by Archaeans and other thermophilic prokaryotes. *Organic Geochem* **34**: 345-356
- Huber R, Stöhr J, Honenhaus S, Rachel R, Burggraf S, Jannasch HW, Stetter KO** (1995) *Thermococcus chitonophagus* sp. nov., a novel, chitin-degrading, hyperthermophilic archaeum from a deep-sea hydrothermal environment. *Arch Microbiol* **164**: 255-264
- Huber H, Jannasch H, Reinhard R, Fuchs T, Stetter KO** (1997) *Archaeoglobus veneficus*, sp. nov., a novel facultative chemolithoautotrophic hyperthermophilic sulfite reducer, isolated from abyssal black smokers. *Syst Appl Microbiol* **20**: 374-380
- Huber R, Huber H, Stetter KO** (2000a) Towards the ecology of hyperthermophiles: biotopes, new isolation strategies and novel metabolic properties. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 615-623
- Huber H, Burggraf S, Mayer T, Wyschkony I, Rachel R, Stetter KO** (2000b) *Ignicoccus* gen. nov., a novel genus of hyperthermophilic, chemolithoautotrophic Archaea, represented by two new species, *Ignicoccus islandicus* sp nov and *Ignicoccus pacificus* sp nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 2093-2100
- Huber H, Hohn MJ, Rachel R, Fuchs T, Wimmer VC, Stetter KO** (2002a) A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**: 63-67
- Huber JA, Butterfield DA, Baross JA** (2002b) Temporal Changes in Archaeal Diversity and Chemistry in a Mid-Ocean Ridge Subseafloor Habitat. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1585-1594
- Huber JA, Butterfield DA, Baross JA** (2003) Bacterial diversity in a subseafloor habitat following a deep-sea volcanic eruption. *FEMS Microbiol Ecol* **43**: 393-409
- Huelsenbeck J, Hillis D** (1993) Success of phylogenetic methods in the four-taxon case. *Syst Biol* **42**: 247-264
- Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR** (1998) Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *J Bacteriol* **180**: 6793-
- Hugenholtz P** (2002) Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biol* **3**: 1-8
- J**
- 
- Jannasch H, Wirsén C** (1979) Chemosynthetic primary production at East Pacific sea floor spreading centers. *Bioscience* **29**: 592-598
- Jannasch H, Mottl M** (1985) Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents. *Science* **229**: 717-725
- Jannasch H, Wirsén C, Nelson D, Robertson L** (1985) *Thiomicrospira crunogena* sp. nov., a colorless sulfur-oxidising bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Bacteriol* **35**: 422-424
- 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*. *Appl Environ Microbiol* **56**: 3308-3314
- Jeanthon C, L'Haridon S, Reysenbach AL, Vernet M, Messner P, Sleytr UB, Prieur D** (1998) *Methanococcus infernus* sp. nov., a novel hyperthermophilic lithotrophic methanogen isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Bacteriol* **48**: 913-919
- Jeanthon C, L'Haridon S, Reysenbach AL, Corre E, Vernet M, Messner P, Sleytr UB, Prieur D** (1999) *Methanococcus vulcanius* sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen isolated from East Pacific Rise, and identification of *Methanococcus* sp. DSM 4213(T) as *Methanococcus fervens* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 583-589
- Jeanthon C, L'Haridon S, Cuffé V, Banta A, Reysenbach AL, Prieur D** (2002) *Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus *Thermodesulfobacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 765-772
- Jolivet E, L'Haridon S, Corre E, Forterre P, Prieur D** (2003) *Thermococcus gammatolerans* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 847-851
- Jones WJ, Leigh JA, Mayer F, Woese CR, Wolfe RS** (1983) *Methanococcus jannaschii* sp. nov. an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Arch Microbiol* **136**: 254-261
- Jouin C, Gaill F** (1990) Gills of the hydrothermal vent annelids: structure, ultrastructure and functional implications in two alvinellid species. *Prog Oceanogr* **24**: 59-69
- Jukes T, Cantor C** (1969) Evolution of protein molecules. In H.N. Munro (ed.), *Mammalian protein metabolism*. Academic press, New York, NY: 21-31
- Juniper K, Fouquet Y** (1988) Filamentous iron-silica deposits from modern and ancient hydrothermal sites. *Canadian Mineralogist* **26**: 859-869
- K**
- 
- Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS** (2002) Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* **296**: 1127-1129
- Karl D** (1980) Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microb Rev* **44**: 739-796

**Karl DM** (1995) Ecology of free-living, hydrothermal vent microbial communities. In DM Karl, ed, The microbiology of deep-sea hydrothermal vents. CRC Press, pp 35-124

**Kashefi K, Tor JM, Holmes DE, Gaw Van Praagh CV, Reysenbach AL, Lovley DR** (2002) *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon capable of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe(III) serving as the sole electron acceptor. Int J Syst Evol Microbiol **52**: 719-728

**Kashefi K, Holmes DE, Baross JA, Lovley DR** (2003) Thermophily in the *Geobacteraceae*: *Geothermobacter ehrlichii* gen. nov., sp. nov., a Novel Thermophilic Member of the *Geobacteraceae* from the "Bag City" Hydrothermal Vent. Appl Environ Microbiol **69**: 2985-2993

**Kashefi K, Lovley DR** (2003) Extending the upper temperature limit for life. Science **301**: 934

**Kelley DS, Karson JA, Blackman DK, Fruh-Green GL, Butterfield DA, Lilley MD, Olson EJ, Schrenk MO, Roe KK, Lebon GT, Rivizzigno P, the AT3-60 shipboard party** (2001) An off-axis hydrothermal vent field near the Mid-Atlantic Ridge at 30°N. Nature **412**: 145-149

**Kengen SWM, Stams AJM** (1994) Formation of L-alanine as a reduced end product in carbohydrate fermentation by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Arch Microbiol **161**: 168-175

**Kimura M** (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol **16**: 111-120

**Kogura K, Simidu U** (1979) A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. Can J Microbiol **25**: 415-420

**Kopczynski E, Bateson M, Ward D** (1994) Recognition of chimeric small-subunit ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms. Appl Environ Microbiol **60**: 746-748

**Kurr M, Huber R, König H, Jannasch HW, Fricke H, Trincone A, Kristjansson JK, Stetter KO** (1991) *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C. Arch Microbiol **156**: 239-247

**Kyrpides N, Olsen G** (1999) Archaeal and bacterial hyperthermophiles: horizontal gene exchange or common ancestry? Trends Genet **15**: 298-299

## L

**Lane D, Stahl D, Olsen G, Pace N** (1985) Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences. Proc Biol Soc Wash **6**: 389-400

**Laue BE, Nelson DC** (1997) Sulfur-oxidizing symbionts have not co-evolved with their hydrothermal vent tube worm hosts: an RFLP analysis. Mol Mar Biol Biotechnol **6**: 180-188

**Lawrence J** (1999) Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. Curr Opin Microbiol **2**: 519-523

**Le Guyader H** (2002) Doit-on abandonner le concept d'espèce? Courrier de l'environnement de l'INRA **46**: 51-64

**L'Haridon S, Cilia V, Messner P, Raguenes G, Gambacorta A, Sleytr UB, Prieur D, Jeanthon C** (1998) *Desulfurobacterium thermolithotrophum* gen. nov., sp. nov., a novel autotrophic, sulphur-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. Int J Syst Bacteriol **48**: 701-711

**Lee N, Nielsen PH, Andreassen KH, Juretschko S, Nielsen JL, Schleifer K-H, Wagner M** (1999) Combination of Fluorescent In Situ Hybridization and Microautoradiography---a New Tool for Structure-Function Analyses in Microbial Ecology. Appl Environ Microbiol **65**: 1289-1297

**Liu W, Marsh T, Cheng H, Forney L** (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Appl Environ Microbiol **63**: 4516-4522

**Longnecker K, Reysenbach A-L** (2001) Expansion of the geographic distribution of a novel lineage of epsilon-*Proteobacteria* to a hydrothermal vent site on the Southern East Pacific Rise. FEMS Microbiol Ecol **35**: 287-293

**Lonsdale P** (1977) Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading centers. Deep Sea Res **24**: 857-863

**Lopez-Garcia P, Gaill F, Moreira D** (2002) Wide bacterial diversity associated with tubes of the vent worm *Riftia pachyptila*. Environ Microbiol **4**: 204-215

**Loy A, Lehner A, Lee N, Adamczyk J, Meier H, Ernst J, Schleifer K-H, Wagner M** (2002) Oligonucleotide Microarray for 16S rRNA Gene-Based Detection of All Recognized Lineages of Sulfate-Reducing Prokaryotes in the Environment. Appl Environ Microbiol **68**: 5064-5081

**Lueders T, Friedrich MW** (2003) Evaluation of PCR Amplification Bias by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Small-Subunit rRNA and mcrA Genes by Using Defined Template Mixtures of Methanogenic Pure Cultures and Soil DNA Extracts. Appl Environ Microbiol **69**: 320-326

## M

**Manefield M, Whiteley AS, Griffiths RI, Bailey MJ** (2002) RNA Stable Isotope Probing, a Novel Means of Linking Microbial Community Function to Phylogeny. Appl Environ Microbiol **68**: 5367-5373

**Marteinsson VT, Birrien J-L, Kristjansson JK, Prieur D** (1995) First isolation of thermophilic aerobic non-sporulating heterotrophic bacteria from deep-sea hydrothermal vents. FEMS Microbiol Ecol **18**: 163-174

**Marteinsson VT, Birrien J-L, Jeanthon C, Prieur D** (1996) Numerical taxonomic study of thermophilic *Bacillus* isolated from three geographical separated deep-

sea hydrothermal vents. *FEMS Microbiol Ecol* **21**: 255-266

**Marteinsson VT, Moulin P, Birrien JL, Gambacorta A, Vernet M, Prieur D** (1997a) Physiological responses to stress conditions and barophilic behavior of the hyperthermophilic vent archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1230-1236

**Marteinsson VT, Birrien JL, Prieur D** (1997b) In situ enrichment and isolation of thermophilic microorganisms from deep-sea vent environments. *Can J Microbiol* **43**: 694-697

**Marteinsson VT, Birrien JL, Raguene G, da Costa MS, Prieur D** (1999a) Isolation and characterization of *Thermus thermophilus* Gy1211 from a deep-sea hydrothermal vent. *Extremophiles* **3**: 247-251

**Marteinsson VT, Birrien JL, Reysenbach AL, Vernet M, Marie D, Gambacorta A, Messner P, Sleytr UB, Prieur D** (1999b) *Thermococcus barophilus* sp. nov., a new barophilic and hyperthermophilic archaeon isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Bacteriol* **49 Part 2**: 351-359

**Marteinsson VT, Reysenbach AL, Birrien JL, Prieur D** (1999c) A stress protein is induced in the deep-sea barophilic hyperthermophile *Thermococcus barophilus* when grown under atmospheric pressure. *Extremophiles* **3**: 277-282

**Mayr E** (1942) Systematics and the origin of species. In Columbia University press, New York

**Miroshnichenko ML, Kostrikina NA, L'Haridon S, Jeanthon C, Hippe H, Stackebrandt E, Bonch-Osmolovskaya EA** (2002) *Nautilia lithotrophica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfur-reducing epsilon-proteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1299-1304

**Miroshnichenko ML, Kostrikina NA, Chernyh NA, Pimenov NV, Tourova TP, Antipov AN, Spring S, Stackebrandt E, Bonch-Osmolovskaya EA** (2003a) *Caldithrix abyssi* gen. nov., sp. nov., a nitrate-reducing, thermophilic, anaerobic bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent, represents a novel bacterial lineage. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 323-329

**Miroshnichenko ML, L'Haridon S, Jeanthon C, Antipov AN, Kostrikina NA, Tindall BJ, Schumann P, Spring S, Stackebrandt E, Bonch-Osmolovskaya EA** (2003b) *Oceanithermus profundus* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, microaerophilic, facultatively chemolithoheterotrophic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 747-752

**Miroshnichenko ML, L'Haridon S, Necessian O, Antipov AN, Kostrikina NA, Tindall BJ, Schumann P, Spring S, Stackebrandt E, Bonch-Osmolovskaya EA, Jeanthon C** (2003c) *Vulcanithermus mediatlanticus* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Thermaceae* from a deep-sea hot vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1143-1148

**Miroshnichenko ML, Slobodkin AI, Kostrikina NA, L'Haridon S, Necessian O, Spring S, Stackebrandt E, Bonch-Osmolovskaya EA, Jeanthon C** (2003d) *Deferribacter abyssi* sp. nov., an anaerobic thermophile from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1637-1641

**Moeseneder MM, Arrieta JM, Muyzer G, Winter C, Herndl GJ** (1999) Optimization of Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Complex Marine Bacterioplankton Communities and Comparison with Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3518-3525

**Morris SA, Radajewski S, Willison TW, Murrell JC** (2002) Identification of the Functionally Active Methanotroph Population in a Peat Soil Microcosm by Stable-Isotope Probing. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1446-1453

**Moyer C, Dobbs F, Karl D** (1994) Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl Environ Microbiol* **60**: 871-879

**Moyer C, Dobbs F, Karl D** (1995) Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1555-1562

**Moyer CL, Tiedje JM, Dobbs FC, Karl DM** (1998) Diversity of deep-sea hydrothermal vent Archaea from Loihi Seamount, Hawaii. *Deep Sea Res Part II: Topical Studies in Oceanography* **45**: 303-317

**Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG** (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**: 695-700

**Muyzer G, Teske A, Wirsén KO, Jannasch HW** (1995) Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vents samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch Microbiol* **164**: 165-172

**Muyzer G, Hottenträger S, Teske A, Wawer C** (1996) Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA- A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In *MME manual*, ed, Akkermans, A.D.I. Van Elsas, J.D. De Bruijn, F.J. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands

**Muyzer G** (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* **2**: 3217-3322

## N

**Nakagawa S, Takai K, Horikoshi K, Sako Y** (2003) *Persephonella hydrogeniphila* sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 863-869

**Nealson D, Fisher C** (1995) Chemoautotrophic and methanotrophic endosymbiotic bacteria at deep-sea vents and seeps. In Karl DM (ed.) *The microbiology of deep-sea hydrothermal vents*. CRC Press Inc, Boca Raton: 125-167

**Nelson DC, Jannasch HW** (1983) Chemoautotrophic growth of a marine *Beggiatoa* in sulfide-gradient cultures. *Arch Microbiol* **136**: 262-269

**Nelson KE, Clayton RA, Gill SR, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson LD, Nelson WC, Ketchum KA, McDonald L, Utterback TR, Malek JA, Linher KD, Garrett MM, Stewart AM, Cotton MD, Pratt MS, Phillips CA, Richardson D, Heidelberg J, Sutton GG, Fleischmann RD, Eisen JA, White O, Salzberg SL, Smith HO, Venter JC, Fraser CM** (1999) Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399**: 323-329

**Nercessian O, Reysenbach A-L, Prieur D, Jeanthon C** (2003) Archaeal diversity associated with *in situ* samplers deployed on hydrothermal vents on the East-Pacific Rise (13°N). *Environ Microbiol* **5**: 492-502

**Nielsen JL, Juretschko S, Wagner M, Nielsen PH** (2002) Abundance and Phylogenetic Affiliation of Iron Reducers in Activated Sludge as Assessed by Fluorescence In Situ Hybridization and Microautoradiography. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4629-4636

**Nogales B, Moore ERB, Abraham W-R, Timmis KN** (1999) Identification of the metabolically active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenyl-polluted moorland soil. *Environ Microbiol* **1**: 199-212

**Nogales B, Timmis KN, Nedwell DB, Osborn AM** (2002) Detection and Diversity of Expressed Denitrification Genes in Estuarine Sediments after Reverse Transcription-PCR Amplification from mRNA. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5017-5025

## O

**Ogier J-C, Son O, Gruss A, Tailliez P, Delacroix-Buchet A** (2002) Identification of the Bacterial Microflora in Dairy Products by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3691-3701

**Orphan VJ, Hinrichs K-U, Ussler W, III, Paull CK, Taylor LT, Sylva SP, Hayes JM, Delong EF** (2001) Comparative Analysis of Methane-Oxidizing Archaea and Sulfate-Reducing Bacteria in Anoxic Marine Sediments. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1922-1934

**Ouverney CC, Fuhrman JA** (1999) Combined Microautoradiography-16S rRNA Probe Technique for Determination of Radioisotope Uptake by Specific Microbial Cell Types In Situ. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1746-1752

## P

**Pagé A, Juniper SK, Olagnon M, Alain K, Desrosiers G, Quérellou J, Cambon-Bonavita MA** (soumis) Microbial diversity associated with mineral and biogenic samples from an active deep-sea hydrothermal vent chimney. *FEMS Microbiol Ecol*.

**Pelz O, Chatzinotas A, Andersen N, Bernasconi SM, Hesse C, Abraham W-R, Zeyer J** (2001) Use of isotopic and molecular techniques to link toluene degradation in denitrifying aquifer microcosms to specific microbial populations. *Arch Microbiol* **175**: 270-281

**Peplies J, Glockner FO, Amann R** (2003) Optimization Strategies for DNA Microarray-Based Detection of Bacteria with 16S rRNA-Targeting Oligonucleotide Probes. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1397-1407

**Pernthaler J, Glockner FO, Schonhuber W, Amann R** (2000) Fluorescence in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *FEMS Microbiol Ecol* **33**: 171-180

**Pernthaler A, Pernthaler J, Amann R** (2002) Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3094-3101

**Philippe H** (2000) Long branch attraction and protist phylogeny. *Protist* **51**: 307-316

**Pley U, Schipka J, Gambacorta A, H.W. J, Fricke H, Rachel R, Stetter KO** (1991) *Pyrodicticum abyssi* sp. nov. represents a novel heterotrophic marine archaeal hyperthermophile growing at 110°C. *Syst Appl Microbiol* **14**: 245-253

**Plugge CM, Stams AJM** (2002) Enrichment of thermophilic syntrophic anaerobic glutamate-degrading consortia using a dialysis membrane reactor. *Microbiol Ecol* **43**: 379-387

**Polz MF, Cavanaugh CM** (1995) Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7232-7236

**Prieur D, Jeanthon C** (1987) Preliminary study of heterotrophic bacteria isolated from two deep sea hydrothermal vent invertebrates: *Alvinella pompejana* (polychaete) and *Bathymodiolus thermophilus* (bivalve). *Symbiosis* **4**: 87-98

**Prieur D, Chamroux S, Durand P, Erauso G, Fera P, Jeanthon C, Le Borgne L, Mével G, Vincent P** (1990) Metabolic diversity in epibiotic microflora associated with the Pompeii worms *Alvinella pompejana* et *A. caudata* (Polychaeta: Annelida) from deep-sea hydrothermal vents. *Mar Biol* **106**: 361-367

**Prieur D, Marteinsson VT** (1998) Prokaryotes living under elevated hydrostatic pressure. *Adv Biochem Engineer Biotechnol* **61**: 23-35

**Prieur D** (1998) Un enfer très fécond. *Biofutur* **179**: 25-26

**Prieur D, Voytek M, Jeanthon C, Reysenbach A-L** (2001) Deep-sea thermophilic prokaryotes. *In Re al.*, ed, Thermophiles: biodiversity, ecology and evolution. Kluwer Academic/Plenum publishers, New York, pp 11-22

## R

**Radajewski S, Ineson P, Parekh NR, Murrell JC** (2000) Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* **403**: 646-649

- Raguénès G, Pignet P, Gauthier G, Pérès A, Christen R, Rougeaux H, Barbier G, Guézennec J** (1996) Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. *Appl Environ Microbiol* **62**: 67-73
- Raguénès G, Christen R, Guezennec J, Pignet P, Barbier G** (1997a) *Vibrio diabolicus*, sp. nov. a new polysaccharide-secreting organisms isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychate annelid, *Alvinella pompejana*. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 989-995
- Raguénès G, Peres A, Ruimy R, Pignet P, Christen R, Loaec M, Rougeaux H, Barbier G, Guézennec JG** (1997b) *Alteromonas infernus* sp nov, a new polysaccharide-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *J Appl Microbiol* **82**: 422-430
- Raguénès G, Cambon-Bonavita MA, Lohier J-F, Boisset C, Guézennec J** (2003) A novel, highly viscous polysaccharide excreted by an *Alteromonas* isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *Curr Microbiol* **46**: 448-452
- Raguénès G, Cambon-Bonavita MA, Lohier J-F, Boisset C, Guézennec J** A novel high viscous polysaccharide excreted by an *Alteromonas* isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *Curr Microbiol sous presse*
- Raven N, Ladwa N, Sharp R** (1992) Continuous culture of the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus furiosus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **38**: 263-267
- Reysenbach A-L, Giver L, Wickham G, Pace N** (1992) Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* **60**: 2113-2119
- Reysenbach AL, Longnecker K, Kirshtein J** (2000) Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3798-3806
- Rieley G, Van Dover CL, Hedrick DB, Eglinton G** (1999) Trophic ecology of *Rimicaris exoculata*: a combined lipid abundance/stable isotope approach. *Mar Biol* **133**: 495-499
- Rossello Mora R, Amann R** (2000) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 39-67
- Ruby E, Jannasch H** (1982) Physiological characteristics of *Thiomicrospira* sp. strain L-12 isolated from deep-sea hydrothermal vents. *J Bacteriol* **149**: 161-165
- S**
- 
- Saitou N, Nei M** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425
- Sako Y, Nakagawa S, Takai K, Horikoshi K** (2003) *Marinithermus hydrothermalis* gen. nov., sp. nov., a strictly aerobic, thermophilic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 59-65
- Sarrazin J, Robigou V, Juniper SK, Delaney JR** (1997) Biological and geological dynamics over four years on a high-temperature sulfide structure at the Juan de Fuca ridge hydrothermal observatory. *Mar Ecol Prog Ser* **153**: 5-24
- Sarrazin J, Juniper SK** (1999) Biological characteristics of a hydrothermal edifice mosaic community. *Mar Ecol Prog Ser* **185**: 1-19
- Schafer T, Schonheit P** (1991) Pyruvate metabolism of the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *Arch Microbiol* **155**: 366-377
- Schrenk MO, Kelley DS, Delaney JR, Baross JA** (2003) Incidence and Diversity of Microorganisms within the Walls of an Active Deep-Sea Sulfide Chimney. *Appl Environ Microbiol* **69**: 3580-3592
- Schwieger F, Tebbe CC** (1998) A New Approach To Utilize PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4870-4876
- Ségonzac M** (1992) Les peuplements associés à l'hydrothermalisme océanique du Snake Pit (dorsale médio-Atlantique; 23°N, 3840 m): composition et microdistribution de la mégafaune. *CR Acad Sci Paris* **314**: 593-600
- Ségonzac M, Saint Laurent M, Casanova B** (1993) l'énigme du comportement trophique des crevettes *Alvinocarididae* des sites hydrothermaux de la dorsale médio-Atlantique. *Cah Biol Mar* **34**: 535-571
- Sheridan GEC, Masters CI, Shallcross JA, Mackey BM** (1998) Detection of mRNA by Reverse Transcription-PCR as an Indicator of Viability in *Escherichia coli* Cells. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1313-1318
- Singleton DR, Furlong MA, Rathbun SL, Whitman WB** (2001) Quantitative Comparisons of 16S rRNA Gene Sequence Libraries from Environmental Samples. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4374-4376
- Slobodkin AI, Tourova TP, Kostrikina NA, Chernyh NA, Bonch-Osmolovskaya EA, Jeanthon C, Jones BE** (2003) *Tepidibacter thalassicus* gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic, anaerobic, fermentative bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1131-1134
- Sneath P** (1989) Numerical taxonomy. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Williams, ST, Sharpe, ME and Holt, JG, Eds). Williams and Wilkins, Baltimore, MD **4**: 2303-2305
- Sokolova TG, Gonzalez JM, Kostrikina NA, Chernyh NA, Tourova TP, Kato C, Bonch-Osmolovskaya EA, Robb FT** (2001) *Carboxydobrachium pacificum* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, CO-utilizing marine bacterium from Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 141-149
- Spieß F, MacDonald K, Atwater T, Ballard R, Carranza A, Cordoba D, Cox C, Diaz-Garcia V, Francheteau J, Guerrero J, Hawkins J, Haymon RM, Hessler R, Juteau T, Kastner M, Larson R, Luyendyk B, McDougall J, Miller S, Normark W, Orcutt J, Rangin C** (1980) East Pacific Rise: hot springs and geophysical experiments. *Science* **207**: 1421-1433

**Stackebrandt E, Goebel B** (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* **44**: 846-849

**Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont P, Kampfer P, Maiden M, Nesme X, Rossello-Mora R, Swings J, Truper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB** (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1043-1047

**Stackebrandt E** (2003) The richness of prokaryotic diversity: there must be a species somewhere. *Food Technol Biotechnol* **41**: 17-22

**Stahl D, Lane D, Olsen G, Pace N** (1984) Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts ribosomal RNA sequences. *Science* **224**: 409-411

**Stetter KO** (1999) Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Lett.* **452**: 22-25

**Suess E** (1980) Particulate organic carbon flux in the oceans - surface productivity and oxygen utilization. *Nature* **288**: 260-263

**Summit M, Baross J** (1998) Thermophilic subseafloor microorganism from the 1996 North Gorda Ridge eruption. *Deep-Sea Res Part II* **45**: 2751-2766

**Summit M, Baross JA** (2001) A novel microbial habitat in the mid-ocean ridge subseafloor. *PNAS* **98**: 2158-2163

**Suzuki M, Giovannoni S** (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol.* **62**: 625-630

## T

**Takai K, Horikoshi K** (1999) Genetic diversity of Archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics* **152**: 1285-1297

**Takai K, Sugai A, Itoh T, Horikoshi K** (2000) *Palaeococcus ferrophilus* gen. nov., sp nov., a barophilic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Part 2**: 489-500

**Takai K, Horikoshi K** (2000) *Thermosipho japonicus* sp nov., an extremely thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in Japan. *Extremophiles* **4**: 9-17

**Takai K, Komatsu T, Inagaki F, Horikoshi K** (2001) Distribution of *Archaea* in a Black Smoker Chimney Structure. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3618-3629

**Takai K, Inoue A, Horikoshi K** (2002) *Methanothermococcus okinawensis* sp. nov., a thermophilic, methane-producing archaeon isolated from a Western Pacific deep-sea hydrothermal vent system. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1089-1095

**Takai K, Inagaki F, Nakagawa S, Hirayama H, Nunoura T, Sako Y, Neelson KH, Horikoshi K** (2003a) Isolation and phylogenetic diversity of members of previously uncultivated epsilon-*Proteobacteria* in deep-

sea hydrothermal fields. *FEMS Microbiol Lett* **218**: 167-174

**Takai K, Kobayashi H, Neelson KH, Horikoshi K** (2003b) *Deferribacter desulfuricans* sp. nov., a novel sulfur-, nitrate- and arsenate-reducing thermophile isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 839-846

**Taroncher-Oldenburg G, Griner EM, Francis CA, Ward BB** (2003) Oligonucleotide Microarray for the Study of Functional Gene Diversity in the Nitrogen Cycle in the Environment. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1159-1171

**Teske A, Hinrichs K-U, Edgcomb V, de Vera Gomez A, Kysela D, Sylva SP, Sogin ML, Jannasch HW** (2002) Microbial Diversity of Hydrothermal Sediments in the Guaymas Basin: Evidence for Anaerobic Methanotrophic Communities. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1994-2007

**Theron J, Cloete TE** (2000) Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Critical Rev Microbiol* **26**: 37-57

**Tunnicliffe V, Desbruyères D, Jollivet D, Laubier L** (1993) Systematic and ecological characteristics of *Paralvinella sulfincola* Desbruyères and Laubier, a new polychaete (family Alvinellidae) from northeast Pacific hydrothermal vents. *Can J Zool* **71**: 286-297

**Tuttle J** (1985) The role of sulfur-oxidizing bacteria at deepsea hydrothermal vents. *Bull Biol Soc Wash* **6**: 335-343

## U

**Urbach E, Vergin KL, Giovannoni SJ** (1999) Immunochemical Detection and Isolation of DNA from Metabolically Active Bacteria. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1207-1213

## V

**Van Dover CL, Fry B, Grassle JF, Humphris S, Rona PA** (1988) Feeding biology of the shrimp *Rimicaris exoculata* at hydrothermal vents on the Mid-Atlantic Ridge. *Mar Biol* **98**: 209-216

**Van Dover CL, Humphris SE, Fornari D, Cavanaugh CM, Collier R, Goffredi SK, Hashimoto J, Lilley MD, Reysenbach A-L, Shank TM, Von Damm KL, Banta A, Gallant RM, Gotz D, Green D, Hall J, Harmer TL, Hurtado LA, Johnson P, McKiness ZP, Meredith C, Olson E, Pans IL, Turnipseed M, Won Y, Young III CR, Vrijenhoek RC** (2001) Biogeography and ecological setting of Indian ocean hydrothermal vents. *Science* **294**: 818-823

**Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K, Swings J** (1996) Polyphasic taxonomy: a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* **60**: 407-438



---

**W**


---

**Wayne L, Brenner D, Colwell R, Grimont P, Kandler O, Krichevsky K, Moore L, Moore W, Muray R, Stackebrandt E, Starr M, Truper HG** (1987) Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* **37**: 463-464

**Weisburg W, Barns S, Pelletier D, Lane D** (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* **173**: 697-703

**Wery N, Lesongeur F, Pignet P, Derennes V, Cambon-Bonavita M, Godfroy A, Barbier G** (2001a) *Marinitoga camini* gen. nov., sp. nov., a rod-shaped bacterium belonging to the order *Thermotogales*, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 495-504

**Wery N, Moricet J, Cueff V, Jean J, Pignet P, Lesongeur F, Cambon-Bonavita M, Barbier G** (2001b) *Caloranaerobacter azorensis* gen. nov., sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1789-1796

**Wilson MS, Bakermans C, Madsen EL** (1999) In Situ, Real-Time Catabolic Gene Expression: Extraction and Characterization of Naphthalene Dioxygenase mRNA Transcripts from Groundwater. *Appl Environ Microbiol* **65**: 80-87

**Wirsen CO, Brinkhoff T, Kuever J, Muyzer G, Molyneux S, Jannasch HW** (1998) Comparison of a New *Thiomicrospira* Strain from the Mid-Atlantic Ridge with Known Hydrothermal Vent Isolates. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4057-4059

**Woese CR, Fox GE** (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5088-5090

**Woese C** (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**: 221-271

**Wu L, Thompson DK, Li G, Hurt RA, Tiedje JM, Zhou J** (2001) Development and Evaluation of Functional Gene Arrays for Detection of Selected Genes in the Environment. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5780-5790

---

**Y**


---

**Yurkov V, Beatty JT** (1998) Isolation of Aerobic Anoxygenic Photosynthetic Bacteria from Black Smoker Plume Waters of the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean. *Appl Environ Microbiol* **64**: 337-341

---

**Z**


---

**Zal F** (1999) *Riftia pachyptila*, le ver géant des abysses. *La Recherche* **317**: 90-95

**Zierenberg RA, Adams MWW, Arp AJ** (2000) Life in extreme environments: Hydrothermal vents. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 12961-12962

**Zuckerland E, Pauling L** (1965) Molecules as documents of evolutionary history. *J Theoret Biol* **8**: 357-366

## *Annexes*

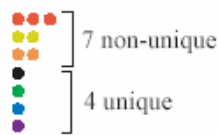
Le programme LIBSHUFF a été développé par David Singleton du département de microbiologie de l'université de Géorgie (Athens, Georgia, USA) (Singleton *et al.*, 2001).

## The theory behind LIBSHUFF

A library represents a sample of a larger population. For example, imagine a sample of colored marbles. In this example, each color represents a different 16S rRNA gene sequence. Closely related sequences are represented by similar colors.



To calculate the coverage of the population by the sample, determine the number of unique marbles in the sample.



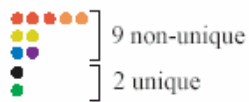
Thus, coverage of the population by your sample would be:

$$C = 1 - (\text{number unique}/\text{total number})$$

$$C = 1 - (4/11)$$

$$C = 63.6\%$$

If we broaden our definition of "unique" such that close colors are considered the same (e.g. red/orange; blue/violet), then our coverage changes.



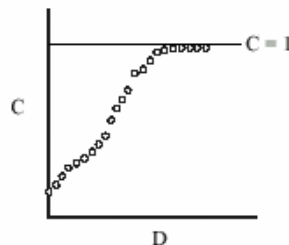
Thus, coverage of the population by your sample would now be:

$$C = 1 - (2/11)$$

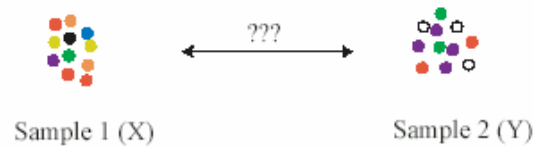
$$C = 81.8\%$$

The 16S rRNA gene equivalent of this is to increase the allowable evolutionary distance that determines whether two samples are the same. For example, where previously a distance of 0 might be required for two sequences to be the same (i.e. 100% sequence similarity), now a distance of only 0.01 is required (i.e. ~99% sequence similarity).

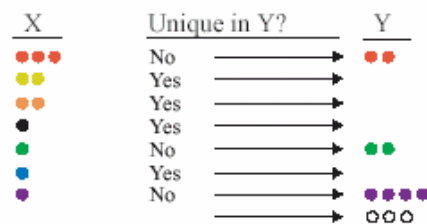
Plotting the coverage (C) vs. Distance (D), gives a coverage curve for the sample (called a "homologous" coverage curve, or Cx)



If we have two samples, from two populations, we can compare them and determine if they are significantly different.



To compare the samples, we first compare every marble in X individually to the entire sample Y to see if it would be unique if it was in library Y.

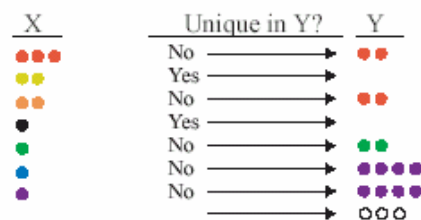


In this example, 6 out of 11 marbles from X (2 yellow, 2 orange, 1 black, and 1 blue) were not found in Y, thus these marbles would be unique. Then, our calculated "heterologous" coverage of X by Y would be:

$$C = 1 - (6/11)$$

$$C = 45.5\%$$

Once again, relaxing the criterion for uniqueness such that red/orange and blue/violet are considered the same, we get a different coverage.

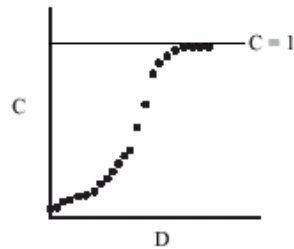


Now, only 3 of 11 marbles in X were not found in Y, and would be considered unique. Thus, our "heterologous" coverage of X by Y under this definition of "unique" would be:

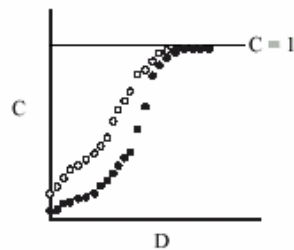
$$C = 1 - (3/11)$$

$$C = 72.7\%$$

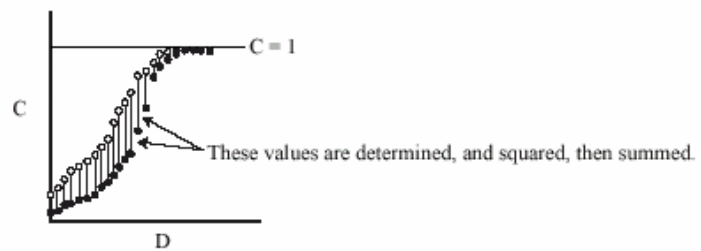
Similarly to the homologous coverage curve, a "heterologous" coverage curve, or  $C_{xy}$  can be created.



When the two curves ( $C_x$  and  $C_{xy}$ ) are plotted on the same graph, we begin to see how well sample Y represents sample X. When two samples are not significantly different, the curves are similar. However, in this example, the two curves do not appear similar. But are they different enough to consider the samples significantly different?



To determine this, we first determine the value  $\Delta C$  using the Cramér von-Mises type statistic. Simply, the difference between equivalent points in the two curves is determined, that value is squared, and these squares are summed to give a single number ( $\Delta C$ ).



Once a  $\Delta C$  has been determined for the original samples, the samples are shuffled together.

In order to illustrate the concept of the shuffling, consider this simple comparison:



Sample X



Sample Y

If we shuffle these two samples together . . .



. . . and then randomly separate them into NEW samples of the same size as the originals . . .



. . . then most of the time the NEW samples will look something like this, a mixture of the two original samples. In this example, it is obvious that the original samples (X and Y) are far more different to each other than the NEW samples are to each other. If  $\Delta C$  values were calculated for the original samples and the shuffled samples, the  $\Delta C$  value would be much greater for the original samples.

If we shuffle the originals a large number of times (say 999), it is likely that the original samples will be more different (higher  $\Delta C$ ) than the VAST MAJORITY of shuffled samples (lower  $\Delta C$ s). Thus the original samples would appear to be significantly different.

For the opposite extreme:



Sample X



Sample Y

If we shuffle these two samples together . . .



. . . and then randomly separate them into NEW samples of the same size as the originals...



. . . probability determines that the shuffled samples will look very similar to the original samples. If we shuffle these samples a large number of times (say 999), chances are that a fair number of shuffled sample will appear MORE different (higher  $\Delta C$ s) than the original samples. Thus, the original samples would NOT appear significantly different.

Obviously, complex samples will not be as obvious as these examples. To determine the significance of difference between original samples and shuffles of those samples, a p-value is determined by ranking  $\Delta C$  values.

For example, imagine that two samples have a  $\Delta C$  of 0.251, and we shuffle the sample 999 more times to obtain a total of 1000  $\Delta C$  values. After sorting the entire list of  $\Delta C$  values, we can determine where our actual  $\Delta C$  value ranks . . .

$\Delta C$	Rank
⋮	⋮
0.253	450th
0.251	451st
0.250	452nd
0.249	453rd
0.245	454th
⋮	⋮

← Thus, the p-value would be 0.451, the samples would not be significantly different.

However, if the libraries were not similar, the  $\Delta C$  value may rank differently...

$\Delta C$	Rank	
⋮	⋮	
0.253	4th	
0.251	5th	← In this example, the p-value would be 0.005, and the samples would be considered significantly different.
0.250	6th	
0.249	7th	
0.245	8th	
⋮	⋮	

Because 16S rDNA clone libraries may have hundreds of sequences (signified in these examples by marbles), with hundred of different sequences (different colors), the calculations are much more complex than these simple examples. However, these examples should illustrate some of the basic concepts underlying the LIBSHUFF analysis.

Thank you for your interest in our analysis.



*« Le commencement de toutes les Sciences,  
c'est l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont. »*

Aristote (384-322 av. J.-C.)