

Biodiversité d'Archaea hyperthermophiles de sites hydrothermaux du Pacifique oriental

Biodiversity of hyperthermophilic Archaea from hydrothermal vents of the East Pacific Rise

GÉRARD RAGUÉNÈS ⁽¹⁾, JEAN-ROCH MEUNIER ⁽²⁾, ÉLISABETH ANTOINE ⁽¹⁾, ANNE GODFROY ⁽¹⁾, JEAN-CLAUDE CAPRAIS ⁽¹⁾, FRANÇOISE LESONGEUR ⁽¹⁾, JEAN GUEZENNEC ⁽¹⁾, GEORGES BARBIER ⁽¹⁾

⁽¹⁾ IFREMER Centre de Brest, Environnement profond, BP 70, 29280 Plouzané, France.

⁽²⁾ The Weizman Institute of Science, Cell Biology, Rehovot 76100, Israel.

RÉSUMÉ

Lors de la campagne océanographique américaine MVT'90, des échantillons (fragments de cheminées hydrothermales et tubes de vers de Pompéi) ont été prélevés sur plusieurs sites hydrothermaux de la ride du Pacifique oriental. Ils ont permis l'isolement de 125 souches thermophiles, hétérotrophes, soufre-réductrices et anaérobies. Les résultats obtenus révèlent le caractère acidophile des souches isolées à la température la plus élevée (97°C). L'étude taxonomique des 38 isolats les plus thermophiles met en évidence l'existence de 2 sous-ensembles très différenciés en fonction des températures d'isolement et des G + C% du génome de ces souches. Les résultats d'hybridation ADN/ADN avec des Archaea des genres *Thermococcus*, *Pyrococcus* et *Staphylothermus* préalablement décrites indiquent une forte biodiversité. ▲

Mots clés : océan Pacifique, sources hydrothermales profondes, Archaea, thermophilie, taxonomie.

ABSTRACT

During the MVT'90 US oceanographic cruise, various samples (pieces of hydrothermal chimneys, Pompei worms tubes) were collected from deep-sea hydrothermal vents of the East Pacific Rise. They led to the isolation of 125 thermophilic, heterotrophic, sulfur-reducing and anaerobic strains. The results indicated an acidophilic behaviour of the most thermophilic strains (97°C). Taxonomic study of the 38 most thermophilic isolates revealed 2 sub-groups depending on isolation temperatures and G + C% contents of genomes. DNA/DNA hybridization data with previously described Archaea of the genera *Thermococcus*, *Pyrococcus* and *Staphylothermus* showed an important biodiversity. ▲

Key words: Pacific Ocean, deep-sea vents, Archaea, thermophily, taxonomy.

Abridged version (see p. 400-1)

Depuis la découverte en 1977 des premières sources hydrothermales profondes sur la ride des Galapagos [1], plusieurs sites hydrothermaux ont été

explorés sur la ride du Pacifique oriental, les bassins arrière-arc du Sud-Ouest Pacifique et sur la ride médio-Atlantique à des profondeurs comprises entre 700m et 3 700m [2]. A partir d'échantillons prélevés lors de campagnes océanographiques organisées sur ces sites hydrothermaux, les microbiologistes ont pu isoler depuis quelques années des micro-organismes hyperthermophiles (croissance \geq à 80°C) originaux [3-5] appartenant au domaine des Archaea [6]. En 1990, une campagne océanographique américaine MVT'90 a été organisée par Rutgers University (University

Note présentée par Lucien Laubier.

Note remise le 7 décembre 1994, acceptée après révision le 23 janvier 1995.

Correspondance : G. Raguénès.

of New Jersey, États-Unis) sur plusieurs sites hydrothermaux de la ride du Pacifique oriental aux latitudes de 11° N, 13° N et 21° N pour étudier la génétique des peuplements d'animaux. Suite à cette campagne, nous avons pu disposer d'échantillons d'animaux et de fragments de sulfures polymétalliques. Ils ont été utilisés pour isoler des micro-organismes hyperthermophiles hétérotrophes métabolisant le soufre, étudier leur diversité taxonomique intrasite et inter-site et rechercher des taxons nouveaux.

La méconnaissance des conditions optimales de croissance susceptibles de varier significativement d'une souche à l'autre et l'obligation de cultiver les isolats à haute température (problèmes de stabilité du matériel utilisé et des biomolécules) ont empêché l'emploi de méthodes classiques en microbiologie basées sur l'étude des phénotypes (auxanogrammes, recherche d'activités enzymatiques) et nous ont conduit à préférer les méthodes suivantes : (1) caractérisation des lipides membranaires; (2) détermination du contenu en bases guanine (G) et cytosine (C) du génome; (3) hybridations qualitatives ADN/ADN ou *Dot Blot*; (4) étude des profils de restriction des gènes codant pour les ARN ribosomiaux ou ribotypage.

Matériels et méthodes

Prélèvements

Les échantillons ont été collectés à une profondeur de 2 600 m par le submersible américain Alvin mis en œuvre par le N/O Atlantis II au cours des mois de mai et juin 1990 sur la dorsale du Pacifique oriental. Les prélèvements ont été remontés à la surface dans une enceinte isotherme, transférés dans des flacons contenant de l'eau de mer stérile et un réducteur (0,5 g/l de Na₂S), puis conservés ainsi jusqu'à leur étude au laboratoire. Sur les 3 sites, des fragments de sulfures polymétalliques provenant d'édifices actifs ont été récoltés par le submersible. Les cheminées hydrothermales des zones 13° N et 21° N étaient toutes recouvertes par d'abondantes populations d'Alvinellidés (principalement l'espèce *Alvinella pompejana* ou ver de Pompéi). Aucune des cheminées de 11° N ne supportait de tels peuplements. Les températures des fluides émis par ces cheminées mesurées au point d'émission variaient entre 270 °C et 350 °C.

Isolement des bactéries

Les cultures d'enrichissement ont été effectuées en anaérobiose en milieux liquides Zobell-Soufre [7] et BHI-Soufre (Brain Heart Infusion (Difco, Détroit, États-Unis) : 9 g/l, Sea Salts (Sigma Chimie, France) : 30 g/l, fleur de soufre : 10 g/l), à pH 5,5 et 7,5, à 60 °C, 80 °C et 95 °C. Les cultures positives ont été purifiées par repiquages successifs sur milieux solides contenant un agent gélifiant thermostable (Gelrite®, Scott Laboratories, Long Island, États-Unis) et incubées en jarre anaérobie dans des étuves ventilées. Toutes ces manipulations ont été effectuées à l'intérieur d'une enceinte anaérobie sous atmosphère contrôlée (N₂/H₂/CO₂ 90 : 5 : 5).

Caractérisation des souches

1. Caractérisation des lipides membranaires. La recherche de la présence d'éthers de glycérol dans les lipides membranaires a été effectuée afin de vérifier l'appartenance ou non des isolats au domaine des Archaea [8].

2. Le contenu en guanine et cytosine du génome des isolats a été déterminé par thermo-dénaturation [9]. Afin de minimiser la marge d'erreur, la technique a été étalonnée en dénaturant thermiquement les ADN de *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* (Sigma, France), de G+C% connus, et en établissant la droite de régression correspondante.

3. Hybridations qualitatives ADN/ADN [10]. Les hybridations ADN/ADN ou « Dot-Blot » ont été effectuées avec 6 souches de référence : *Pyrococcus furiosus* [11], *Pyrococcus woesei* [12], *Staphylothermus marinus* [13], *Thermococcus celer* [14], *Thermococcus litoralis* [15] et *Thermococcus stetteri* [16]. En effet, sur l'ensemble des Archaea hyperthermophiles anaérobies chimio-organotrophes de référence, seules ces 6 souches ont été capables de croître dans des conditions de culture identiques à celles de nos isolats.

4. Ribotypage. L'étude des profils de restriction des gènes codant pour les ARN ribosomiaux [17] a été effectuée en utilisant une sonde d'ARNr 16S et 23S d'une Archaea thermophile *Pyrococcus furiosus* marquée à la peroxydase (Kit ECL™ direct labelling system, Amersham, Amersham Place, Royaume-Uni) [18].

Résultats

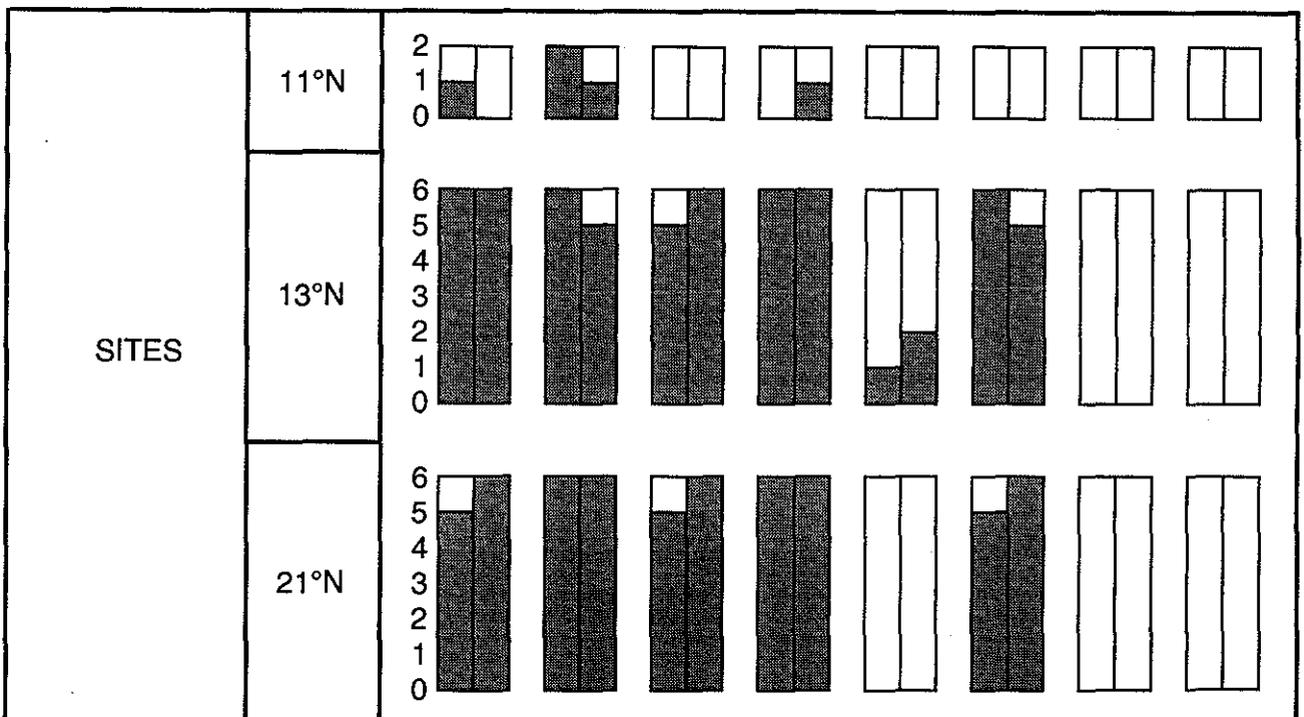
Cent vingt-cinq souches ont été isolées à partir des échantillons, 63 provenant de la zone 21° N, 57 de la zone 13° N et 5 de la zone 11° N. Il s'agit de souches croissant sur milieux organiques complexes salés en présence de soufre (S°) et produisant d'abondantes quantités d'hydrogène sulfuré. Repiquées à 10 % en milieu liquide, elles entrent en phase stationnaire à des densités de l'ordre de 10⁹ cellules/ml après 6 à 7 h de culture. Ces souches se caractérisent donc par une croissance rapide avec un temps de doublement d'environ 1 h. Les résultats obtenus (Fig. 1) indiquent :

- la rareté des cultures positives et la quasi-absence d'isolats hyperthermophiles pour les échantillons collectés sur la zone 11° N;
- une tendance acidophile des isolats les plus thermophiles.

L'étude taxonomique a été menée sur les 38 souches les plus thermophiles (isolées à 80 °C et 97 °C), 36 isolées sur milieu Zobell-Soufre (pH 5,5 et 7,5) et 2 souches sur milieu BHI-Soufre à 97 °C pH 7,5. Les analyses de lipides mettent en évidence la présence d'éthers de glycérol sous forme de di-éthers et tétra-éthers pour l'ensemble des souches étudiées. Ce résultat indique l'appartenance de ces souches au règne des Archaea. La distribution de fréquence des pourcentages de guanine et cytosine (G+C%) présentée par la Figure 2 montre que les 38 souches hyperthermophiles se répartissent en 2 groupes dissociés : le premier dont les G+C% varient de 54 à 59 regroupe les 23 souches isolées à 80 °C, le second dont les G+C% varient de 44 à 49 regroupe les 15 souches isolées à 97 °C. Les résultats d'hybridation (à l'exclusion de ceux obtenus avec *Staphylothermus marinus* qui n'a hybridé avec aucun

de nos isolats) ont été traités par analyse factorielle des correspondances multiples (Fig. 3) [19] en liaison avec les températures d'isolement et les teneurs en G+C%, compte tenu des bonnes corrélations observées entre ces 3 groupes de résultats. La projection du nuage de 38 points (isolats) dans le plan défini par les 2 premiers axes factoriels permet d'interpréter 69% de l'inertie totale. Le premier axe oppose les 2 groupes d'isolats révélés par l'examen des distributions de fréquence de G+C% présentées ci-dessus. L'analyse factorielle permet de constater que les isolats obtenus à 80°C montrent des hybridations nulles avec le genre *Pyrococcus* et, corrélativement, des hybridations très fortes avec l'espèce *Thermococcus celer* et très faibles avec l'espèce *Thermococcus stetteri*. Les résultats d'hybridation séparent selon le deuxième axe, en 2 sous-groupes, les isolats les plus thermophiles obtenus à 95°C qui se caractéri-

sent tous par des hybridations très faibles ou nulles avec l'espèce *Thermococcus celer*. Le premier sous-groupe rassemble les isolats à niveaux d'hybridation élevés avec le genre *Pyrococcus* et très faibles avec l'espèce *Thermococcus litoralis*. Le second sous-groupe rassemble les isolats à niveaux d'hybridation moyens à nuls avec les différentes espèces des genres *Pyrococcus* et *Thermococcus*. Ce dernier groupe rassemble donc les isolats les plus originaux au regard des souches de référence disponibles. Les possibles taxons nouveaux devront y être recherchés en priorité. Les résultats de ribotypage (Fig. 4) mettent en évidence une importante biodiversité génétique des isolats au sein des 3 groupes principaux établis par analyse factorielle des correspondances multiples. En effet, seuls quelques rares profils identiques peuvent être observés au sein de chaque groupe.



CONDITIONS DE CULTURE	Milieu	ZS BS							
	pH	7,5	5,5	7,5	5,5	7,5	5,5	3,5	3,5
	T°C	60°C		80°C		97°C		100°C	110°C

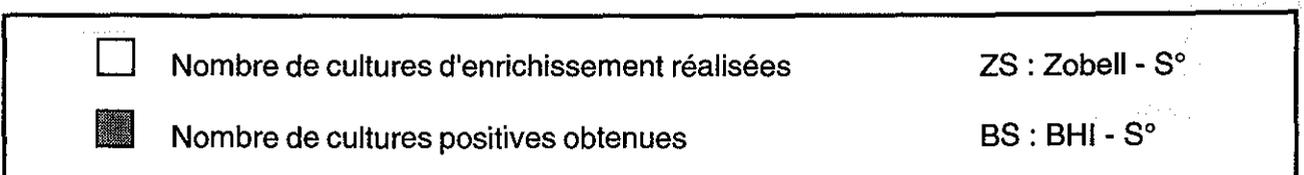


Figure 1. Bilan des cultures d'enrichissement réalisées à partir des échantillons collectés lors de la campagne MVT' 90.

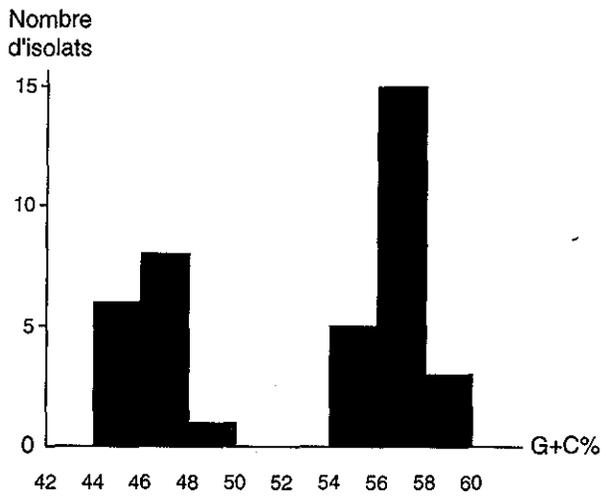
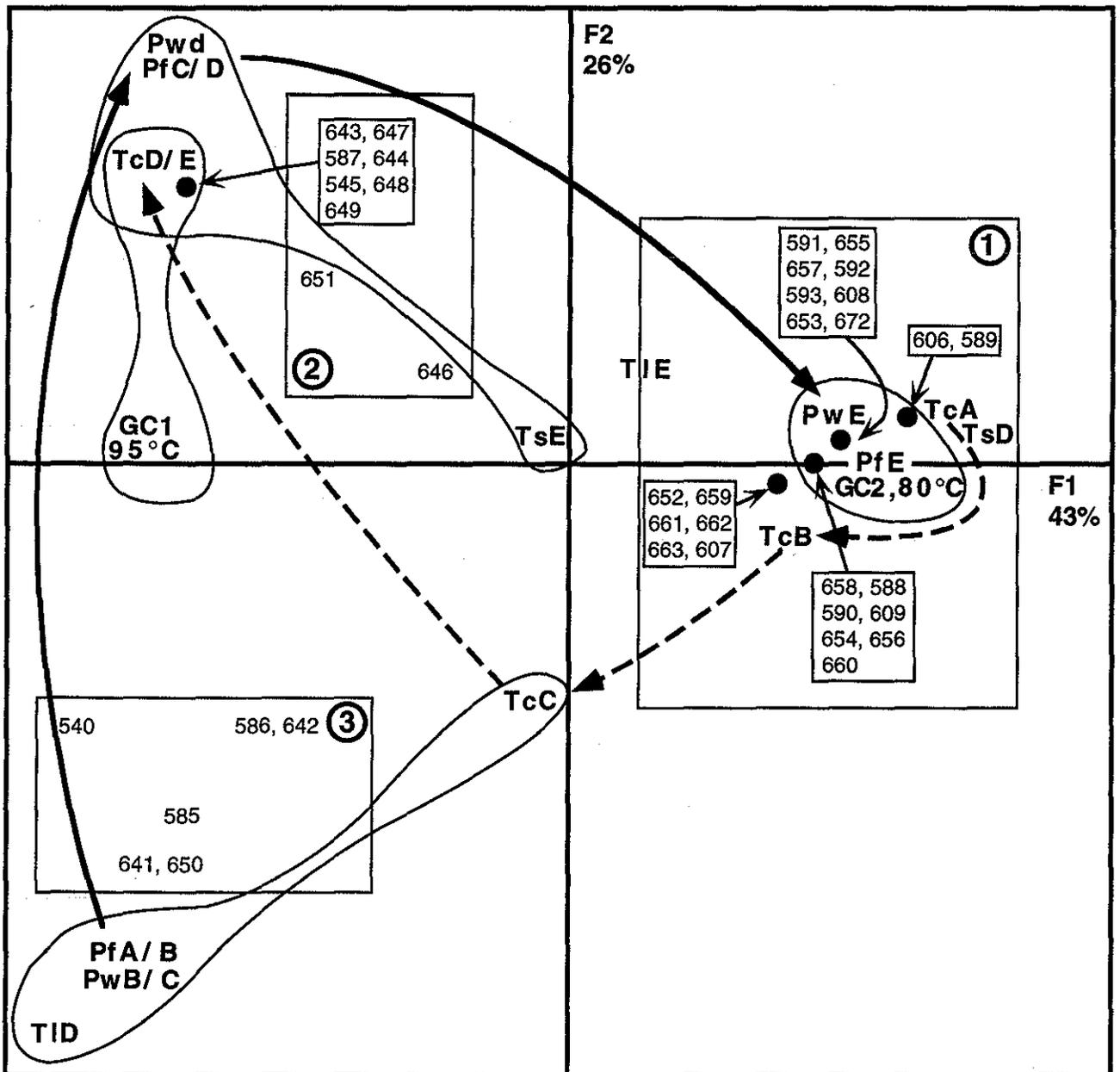


Figure 2. Distribution de fréquence des teneurs en G+C% mesurées.

Figure 3. Résultats de l'analyse factorielle des correspondances multiples. Légende: les variables actives pour cette analyse étaient les résultats d'hybridation ADN/ADN des isolats de la campagne MVT' 90 avec les souches de référence utilisées, les teneurs en G+C% et les températures d'isolement. Signification des modalités pour les différentes variables: classes de niveaux d'hybridation (de A \cong 100% à E=0%) avec *Pyrococcus furiosus*: Pf, avec *Pyrococcus woesei*: Pw, avec *Thermococcus celer*: Tc, avec *Thermococcus stetteri*: Ts. Pourcentages de G et C de l'ADN: GC1: 40% < G+C% < 50 et GC2: 50% < G+C% < 60. Températures d'isolement: 80°C et 95°C. Individus: les numéros à 3 chiffres correspondent à l'identité des isolats.



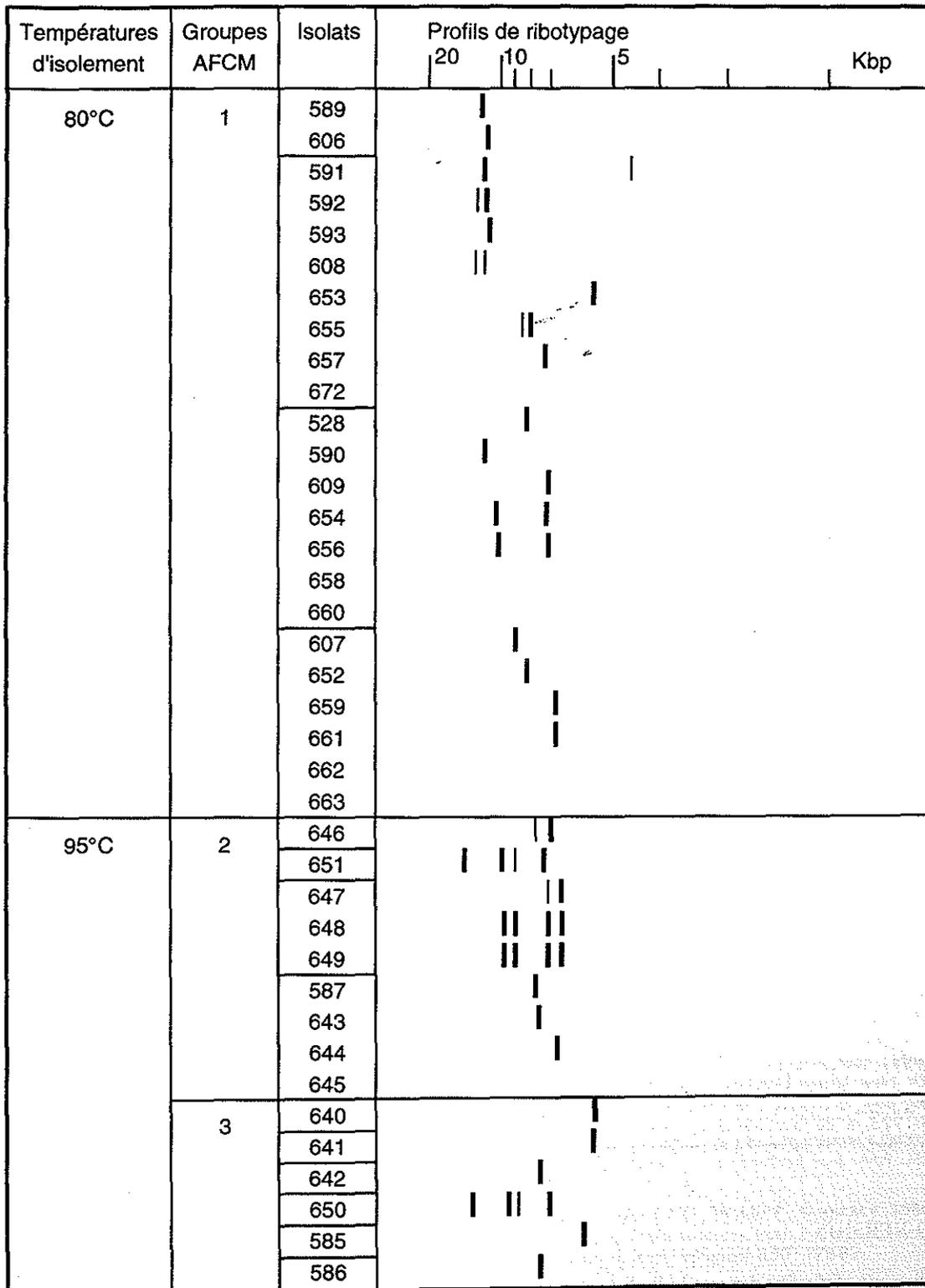


Figure 4. *Profils de ribotypage obtenus pour chaque isolat.* Légende: AFCM = analyse factorielle des correspondances multiples. Le ribotypage est représenté sous forme de profils normalisés (et non par des autoradiogrammes) afin d'en faciliter la lecture et l'interprétation. L'épaisseur des bandes traduit l'intensité de l'hybridation observée.

Discussion et conclusion

Les Archaea des écosystèmes hydrothermaux profonds actuellement décrites appartiennent à 3 groupes métaboliques : les méthanogènes (genres *Methanococcus* [20, 21] et *Methanopyrus* [22, 23]), les sulfato-réductrices (*Archaeoglobus profundus* [24]), et principalement les sulfo-thermophiles (*Staphylothermus marinus*, *Désulfurococcus* sp. [25], les isolats ES1 et ES4 [26, 27], *Pyrodictium abyssi* [28], *Pyrococcus* sp., souche GB-D [29], *Pyrococcus abyssi* [30], les souches TY et TYS [31] et *Thermococcus profundus* [32]).

Les souches isolées à partir d'échantillons hydrothermaux de la ride du Pacifique oriental sont donc toutes des Archaea sulfo-thermophiles à croissance rapide. Le bilan des cultures d'enrichissement nous permet de dégager 2 cas de figure : (1) la rareté des isolats hétérotrophes sulfo-thermophiles qui coïncide avec l'absence des peuplements d'alvinelles sur la paroi des édifices hydrothermaux à 11° N ; (2) l'abondance des isolats hétérotrophes sulfo-thermophiles et la présence d'alvinelles sur la paroi des cheminées hydrothermales à 13° N et 21° N.

Ce constat est à rapprocher des indications selon lesquelles les alvinelles se nourrissent de matériel particulaire : l'étude de leur contenu digestif révèle la présence de particules minérales et de micro-organismes [33-36].

L'examen des résultats obtenus en fonction du pH du milieu de culture d'isolement permet d'établir une tendance acidophile marquée des isolats qui croissent à 97°C. Ces résultats peuvent être rapprochés des données disponibles sur le pH des fluides hydrothermaux de la ride Est-Pacifique à 13 et 21° N [37, 38] qui, avant dilution dans l'eau de mer ambiante, se situent à des valeurs comprises entre 3 et 4.

Du fait de l'aptitude de certaines souches de référence (genres *Pyrococcus*, *Staphylothermus* et *Thermococcus*) à croître dans les conditions de culture retenues, nos isolats pouvaient *a priori* être considérés comme proches de ces genres. L'absence d'hybridations avec *Staphylothermus marinus* et les hybridations à des niveaux variables avec les Thermococcales nous conduisent à rapprocher nos isolats de cet ordre. Les résultats d'hybridation et de typage révèlent la forte biodiversité des 38 isolats archaebacté-

riens étudiés alors que seuls 2 milieux de culture différents ont été utilisés. Chez les bactéries, selon les espèces, la diversité révélée par le ribotypage se situe à un niveau spécifique ou infraspécifique [39].

A l'échelle de la zone étudiée, nos résultats ne permettent pas d'établir de différenciation géographique des populations de micro-organismes. Les 38 isolats peuvent être répartis en 2 groupes, l'un de plus faible G+C% (44-49) correspond aux souches isolées à 97°C, l'autre de plus fort G+C% (54-59) qui correspond aux souches isolées à 80°C. Ce résultat établit une fois de plus qu'il n'existe pas de corrélation positive entre la thermophilie des micro-organismes et la teneur en G+C% de leurs ADN respectifs. Selon les résultats d'hybridation, les souches isolées à 80°C semblent proches de *Thermococcus celer* et de ce fait appartiennent probablement au genre *Thermococcus*. Certaines souches isolées à 97°C hybrident très fortement avec le genre *Pyrococcus* et fortement avec *Thermococcus celer*; leur appartenance à l'ordre des Thermococcales est donc probable. En revanche, d'autres souches isolées à 97°C n'hybrident pas ou pratiquement pas avec les genres *Pyrococcus* et *Thermococcus*. L'hypothèse d'espèce(s) ou de genre(s) nouveau(x) devra donc être testée en priorité avec ces isolats.

Au-delà de ce premier travail de taxonomie moléculaire sur des souches hyperthermophiles isolées à partir d'échantillons de la ride du Pacifique oriental, la position taxonomique exacte de quelques isolats sélectionnés sur la base de leur G+C% et des résultats d'hybridation devra être établie par séquençage d'ARN 16S et hybridation quantitative ADN/ADN avec les souches de référence (seul critère utilisable pour la définition d'espèces nouvelles). Cela nous permettra de préciser la signification taxonomique des résultats de ribotypage chez les Archaea. S'il est impossible à ce stade d'affirmer l'existence d'espèces nouvelles, les résultats obtenus montrent clairement une nette diversité génotypique au sein d'un groupe d'isolats hyperthermophiles homogène au plan métabolique (thermophiles hétérotrophes anaérobies métabolisant le soufre) et proche de l'ordre des Thermococcales. Elle permet d'espérer une diversité phénotypique associée dont l'étude est engagée dans une perspective biotechnologique (criblage d'enzymes thermostables, recherche de spécificités fonctionnelles...). ▼

Remerciements : nous remercions Richard A. Lutz et Robert Vrijehoek (Institute of Marine and Coastal Sciences, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, États-Unis) chefs de mission de la campagne MVT' 90, Anne-Marie Alayse et Daniel Desbruyères (IFREMER Centre de Brest) pour la collecte d'échantillons. Ce travail a bénéficié du soutien financier de l'IFREMER, de la Région Bretagne (Contrat de plan 1989-1993) et du ministère chargé de la Recherche (Essor des biotechnologies). Il constitue une contribution de l'IFREMER aux activités du Groupement de recherche Bactocéan créé par le CNRS.

ABRIDGED VERSION

Since the discovery of the first deep-sea hydrothermal vents in 1977 on the Galapagos ridge, many sites were explored on the East Pacific Rise, the SW Pacific back-arc basins and the Mid-Atlantic Ridge. Owing to the extreme conditions of temperatures and hydrostatic pressure, those ecosystems quickly interested the microbiologists and led to the isolation of many original autotrophic and heterotrophic thermophilic strains. During the

MVT' 90 US oceanographic cruise, various samples of hydrothermal chimneys and annelids (Pompeii worms) were collected. A study was conducted with 3 main objectives: the isolation of thermophilic-heterotrophic-anaerobic strains, an estimation of the taxonomic biodiversity intra- and intersite and the research of new taxa. Enrichment cultures were performed on Zobell-S° and BHI-S° liquid media (pH 5,5 and 7,5 - 80° C and 97° C) and purification was done in same conditions on solid media using a thermostable gellan gum. Because of the impossibility of using

classic identification tests, the following techniques were utilized for taxonomic study: (1) membrane lipid analysis (presence of ether lipids); (2) determination of the G + C% content of DNA by thermodenaturation; (3) DNA/DNA hybridizations or "Dot-Blots" with 6 reference strains able to grow in same conditions: *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus woesei*, *Staphylothermus marinus*, *Thermococcus celer*, *Thermococcus litoralis* and *Thermococcus stetteri*; (4) rRNA-gene-restriction patterns or "ribotyping": the study was performed with a 16S - 23S rRNA probe of the thermophilic Archaea *Pyrococcus furiosus* labelled and detected with the kit ECL™ system, Amersham, UK.

125 thermophilic, sulfur-metabolizing, heterotrophic, anaerobic, fast-growing Archaea were isolated. Enrichment cultures showed that the existence of an early bacterial population on the East Pacific Rise hydrothermal chimneys could be required for annelids chimneys colonization. They also indicated an acidophilic behaviour of the most thermophilic strains. Both the Dot-Blots and ribotyping carried out on the 38 most thermophilic isolates

revealed an important biodiversity but didn't established a geographic differentiation between the microbial populations. According to their G + C%, the 38 strains could be classified in 2 groups: a first group with low G + C% (44-49) corresponding to the strains isolated at 97° C and a second one with higher G + C% (54-59) corresponding to the strains isolated at 80° C. This result confirms that no simple relation exists between the thermophily of microorganisms and the G + C% contents of their DNA. The strains isolated at 80° C probably belonged to the genus *Thermococcus*. If some strains isolated at 97° C would be related to the Thermococcales order, others did not hybridized with the genera *Pyrococcus*, *Thermococcus* or *Staphylothermus*. So, the hypothesis of new genera of Thermococcales will be tested. At this stage, it is impossible to establish occurrence of new species, but the results clearly showed a genotypic diversity inside an homogeneous taxonomic group of hyperthermophilic strains. An associated phenotypic diversity along with subsequent biotechnological perspectives should then be expected. ▲

RÉFÉRENCES

- Lonsdale P. 1977. Structural geomorphology of a fast-spreading rise crest: The East Pacific Rise near 3°25' S. *Mar. Geophys. Res.* 3: 251-93.
- Lutz R.A., Kennish M. 1993. Ecology of deep-sea hydrothermal vent communities: a review. *Reviews of Geophysics* 31: 211-42.
- Prieur D., Jeanthon C., Jacq E. 1987. Les communautés bactériennes des sources hydrothermales profondes du Pacifique oriental. *Vie Milieu* 37 (3/4): 149-64.
- Gottschal J.C., Prins R.A. 1991. Thermophiles: a life at elevated temperatures. *Tree* 6(5): 157-62.
- Segeer A.H., Burggraf S., Fiala G., Huber G., Huber R., Pley U., Stetter K.O. 1993. Life in hot springs and hydrothermal vents. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 23: 77-93.
- Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for a domain Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4576-9.
- Belkin S., Jannasch H.W. 1985. A new extremely thermophilic, sulfur reducing heterotrophic marine bacterium. *Arch. Microbiol.* 141: 181-6.
- Langworthy T.A., Pond J.L. 1986. Archaeobacterial ether lipids and chemotaxonomy. *System. Appl. Microbiol.* 7: 253-6.
- Mandel M., Marmur J. 1968. Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. *Meth. Enzym.* 12 (B): 195-206.
- Shambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. In: Nolan C. ed. *Molecular cloning, a laboratory manual*, vol.1. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Fiala G., Stetter K.O. 1986. *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100° C. *Arch. Microbiol.* 145: 56-61.
- Zillig W., Holz I., Klenk H.P., Trent J., Wunderl S., Janekovic D., Imsel E., Haas B. 1987. *Pyrococcus woesei*, sp. nov., an ultra-thermophilic marine archaeobacterium, representing a novel order, Thermococcales. *System. Appl. Microbiol.* 9: 62-70.
- Fiala G., Stetter K.O., Jannasch H.W., Langworthy T.A., Madon J. 1986. *Staphylothermus marinus* sp. nov. represents a novel genus of extremely thermophilic submarine heterotrophic archaeobacteria growing up to 98° C. *System. Appl. Microbiol.* 8: 106-13.
- Zillig W., Holz I., Janekovic D., Schäfer W., Reiter W.D. 1983. The archaeobacterium *Thermococcus celer* represents a novel genus within the thermophilic branch of the archaeobacteria. *System. Appl. Microbiol.* 4: 88-94.
- Belkin S., Jannasch H.W. 1985. A new extremely thermophilic, sulfur-reducing heterotrophic marine bacterium. *Arch. Microbiol.* 141: 181-6.
- Miroshnichenko M.L., Bonch-Osmolovskaya E.A., Neuner A., Kostrikina N.A., Chernych N.A., Alekseev V.A. 1989. *Thermococcus stetteri* sp. nov., a new extremely thermophilic marine sulfur-metabolizing archaeobacterium. *System. Appl. Microbiol.* 12: 257-62.
- Grimont F., Grimont P.A.D. 1986. Ribosomal, ribonucleic acid restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 173 (B): 165-75.
- Meunier J.R. 1994. Biodiversité et systématique des populations de micro-organismes thermophiles isolés d'écosystèmes hydrothermaux océaniques abyssaux. Thèse de doctorat de l'Institut national agronomique Paris-Grignon, 316 p.
- ITCF. 1991. Manuel d'utilisation du logiciel statistique STAT-ICTF, ed. ITCF - Céréalières de France, 75116 Paris.
- Jones W.J., Leigh J.A., Mayer F., Woese C.R., Wolfe R.S. 1983. *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.* 136: 254-61.
- Zhao H., Wood A.G., Widdel F., Bryant M.P. 1988. An extremely thermophilic *Methanococcus* from a deep-sea hydrothermal vent and its plasmid. *Arch. Microbiol.* 150: 178-83.
- Huber R., Kurr M., Jannasch H.W., Stetter K.O. 1989. A novel group of abyssal methanogenic archaeobacteria (*Methanopyrus*) growing at 110° C. *Nature* 342: 833-4.
- Kurr M., Huber R., König H., Jannasch H.W., Fricke H., Trincone A., Kristjansson J.K., Stetter K.O. 1991. *Methanopyrus kandleri*, gen. et sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110° C. *Arch. Microbiol.* 156: 239-47.

24. Burregraf S., Jannasch H.W., Nicolaus B., Stetter K.O. 1990. *Archeoglobus profundus* sp. nov., represents a new species within the sulfate reducing archaeobacteria. *System. Appl. Microbiol.* 13 : 24-8.
25. Jannasch H.W., Wirsen C.O., Molyneux S.J., Langworthy T.A. 1988. Extremely thermophilic fermentative archaeobacteria of the genus *Desulfurococcus* from deep-sea hydrothermal vents. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 1203-9.
26. Pledger R.J., Baross J.A. 1989. Characterization of an extremely thermophilic archaeobacterium isolated from a black smoker polychaete at the Juan de Fuca ridge. *System. Appl. Microbiol.* 12 : 249-56.
27. Pledger R.J., Baross J.A. 1991. Preliminary description and nutritional characterisation of a chemoorganotrophic archaeobacterium growing at temperature of up to 110° C isolated from a submarine hydrothermal vent. *J. Gen. Microbiol.* 137 : 203-11.
28. Pley U., Schipka J., Gambacorta A., Jannasch H.W., Fricke H., Rachel R., Stetter K.O. 1991. *Pyrodictium abyssi* sp. nov. represents a novel heterotrophic marine archaeal hyperthermophile growing at 110° C. *System. Appl. Microbiol.* 14 : 245-53.
29. Jannasch H.W., Wirsen C.O., Molyneux S.J., Langworthy T.A. 1992. Comparative physiological studies on hyperthermophilic Archaea isolated from deep-sea hot vents with emphasis on *Pyrococcus* strain GB-D. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 3472-81.
30. Erauso G., Reysenbach A.L., Godfroy A., Meunier J.R., Crump B., Partensky F., Baross J.A., Marteinsson V., Barbier G., Pace N.R., Prieur D. 1993. *Pyrococcus abyssi* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.* 160 : 338-50.
31. Canganella F., Jack Jones W. 1994. Microbial characterization of thermophilic Archaea isolated from the Guaymas basin hydrothermal vent. *Curr. Microbiol.* 28 : 299-306.
32. Kobayashi T., Kwak Y.S., Akiba T., Kudo T., Horikoshi K. 1994. *Thermococcus profundus* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *System. Appl. Microbiol.* 17 : 232-6.
33. Desbruyères D., Gaill F., Laubier L., Fouquet Y. 1985. Polychaetous annelids from hydrothermal vent ecosystems: an ecological overview. *Bull. Biol. Soc. Wash.* 6 : 103-16.
34. Jannasch H.W. 1985. The chemosynthetic support of life and the microbial diversity at deep-sea hydrothermal vents. *Proc. R. Soc. Lond.* 225(B) : 277-97.
35. Saulnier-Michel C., Gaill F., Hily A., Albéric P., Cosson-Mannevy M.A. 1990. Structure and functions of the digestive tract of *Alvinella pompejana*, a hydrothermal vent polychaete. *Can. J. Zool.* 68 : 722-32.
36. Tünncliffe V. 1991. The ecology of hydrothermal vents: ecology and evolution. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 29 : 319-407.
37. Michard G., Albarède F., Michard A., Minster J.F., Charlou J.L., Tan N. 1984. Chemistry of solutions from the 13° N East Pacific Rise hydrothermal site. *Earth Planet. Sc. Lett.* 67 : 297-307.
38. Von Damm K.L., Edmond J.M., Grant B., Measures C.I., Walden B., Weiss R.F. 1985. Chemistry of submarine hydrothermal solutions at 21° N, East Pacific Rise. *Geochim. Cosmochim. Acta* 49 : 2197-220.
39. Grimont F., Chevrier D., Grimont P.A.D., Lefevre M., Guesdon J.L. 1989. Acetylaminofluorene-labelled ribosomal RNA for use in molecular epidemiology and taxonomy. *Res. Microbiol.* 140 : 447-554.