



**Diversité phylogénétique et fonctionnelle des
communautés microbiennes incultivées des sédiments
marins de la marge de Sonora, Bassin de Guaymas
(Golfe de Californie)**

Adrien Vigneron

► **To cite this version:**

Adrien Vigneron. Diversité phylogénétique et fonctionnelle des communautés microbiennes incultivées des sédiments marins de la marge de Sonora, Bassin de Guaymas (Golfe de Californie). Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2012. Français. <NNT : 2012BRES0072>. <tel-01356066>

HAL Id: tel-01356066

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01356066>

Submitted on 24 Aug 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



université de bretagne
occidentale



THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Ecologie Microbienne

École Doctorale des Sciences de la Mer

Adrien Vigneron

Préparée à l'UMR 6197, Ifremer-CNRS-UBO
Laboratoire de Microbiologie des
Environnements Extrêmes

Diversité phylogénétique et
fonctionnelle des
communautés microbiennes
incultivées des sédiments
marins de la Marge de
Sonora, Bassin de Guaymas
(Golfe de Californie).



Thèse soutenue le 12 décembre 2012

devant le jury composé de :

Pierre Galand (Rapporteur)

Directeur de recherche, Banyuls/Mer

Karen Lloyd (Rapporteur)

Assistant Professeur, University of Knoxville

Timothy Vogel (Examineur)

Professeur, Université de Lyon 1

Mohamed Jebbar (Examineur)

Professeur, Université de Bretagne Occidentale

Georges Barbier (Examineur)

Professeur, Université de Bretagne Occidentale

Christian Jeanthon (Examineur)

Directeur de recherche, Roscoff

Laurent Toffin (Examineur)

Chargé de recherche, Ifremer Brest

Anne Godfroy (Examineur)

Directrice du Laboratoire de Microbiologie des Environnements
Extrêmes

Sommaire :

I. Préambule	10
II. Introduction.....	13
I. Les sédiments marins	14
1) Généralités.....	14
2) Les sédiments côtiers intertidaux.....	15
3) Les sédiments abyssaux	15
4) Les bois coulés et carcasses de baleines	16
5) Les zones d'émissions de fluides froids	17
6) Les sites hydrothermaux marins profonds	18
7) Les sédiments marins profonds	20
8) Cas particulier du Bassin de Guaymas	21
II. Les processus microbiens associés aux sédiments marins profonds	22
1) Généralités sur la chimiotrophie.....	23
2) Le cycle du méthane.....	23
a) La méthanogénèse	24
b) L'oxydation anaérobie du méthane.....	25
c) L'oxydation aérobie du méthane.....	27
3) Le cycle du soufre	28
a) la réduction des sulfates.....	28
b) La réduction du soufre élémentaire, disproportionation et comproportionation	29
c) L'oxydation des sulfures.....	30
4) Le cycle de l'azote	30
a) La fixation de l'azote.....	31
b) La dénitrification.....	31
c) la nitrification	31
d) L'oxydation anaérobie de l'ammonium	32
III. Les acteurs microbiens incultivés des sédiments marins	32
1) Généralités sur la diversité des microorganismes marins	32
2) Les lignées bactériennes incultivées des sédiments marins	34
a) Les Proteobacteria.....	35

b) Les Chloroflexi	39
c) Les Bacteroidetes	40
d) Les Verrucomicrobia	40
e) Les Planctomycetes	41
f) Les divisions candidates	42
3) Les archées incultivées des sédiments marins	43
a) ANME-1	45
b) ANME-2	46
c) ANME-3	47
d) GoM Arc 1.....	48
e) MBG-E.....	49
f) MBG-D.....	49
g) TMEG	50
h) SAGMEG	50
i) MBG-B.....	50
j) MHVG.....	51
k) RC-V.....	52
l) DHVE-8.....	52
m) MG-I	52
n) MG-II.....	53
o) MBG-A	53
p) MCG	53

III. Matériels et méthodes 56

I. Echantillonnage	57
1) Site d'étude.....	57
a) Vasconcelos.....	59
b) Kullenberg (BCK1)	60
2) Prélèvements et conditionnements.....	60
a) Site Vasconcelos.....	60

b) Kullenberg (BCK1)	63
3) Mesures physico-chimiques et géochimiques	63
a) Géochimie des sédiments	63
b) Mesures de températures in situ	64
II. Outils Moléculaires	64
1) Extraction des acides nucléiques et purifications	64
a) Extractions des acides nucléiques totaux	64
b) Purification de l'ADN	64
c) Purification de l'ARN	65
2) Réactions d'amplification par PCR et RT-PCR	66
a) Amplification par PCR	66
b) Réaction de RT-PCR	66
3) ARISA	66
4) Banques de clones et analyses phylogénétiques	68
a) Construction des banques de clones	68
b) Analyse phylogénétique	68
5) Puce fonctionnelle et phylogénétique GeoChip 4	69
6) PCR quantitative avec la technologie Sybr Green	70
a) Création d'amorces spécifiques	70
b) Validation des amorces	74
c) Réalisation de la gamme étalon	75
d) Concentration en amorce et efficacité de Q-PCR	77
e) Préparation des échantillons pour la quantification	77
7) Liste des amorces utilisées dans ce travail de thèse	79
III. Observations microscopiques	81
IV. Mesures d'activités	83
V. Cultures d'enrichissements de méthanogènes	83
IV. Résultats / Results	86
Article 1:	91
Article complémentaire :	105
Article 2 :	117

Article 3 :	134
V. Discussion Générale	148
I. Diversité phylogénique et fonctionnelle des communautés microbiennes de la marge de Sonora 149	
1) Les communautés bactériennes	149
2) Les communautés archées.....	151
II. Le cycle du méthane, processus majeur dans les sédiments de la marge de Sonora 153	
1) Les acteurs microbiens et leurs métabolismes.....	153
a) Les méthanogènes.....	153
b) Les ANME-1.....	154
c) Les ANME-2.....	155
d) Les ANME-3.....	156
e) De nouveaux acteurs archéens ?.....	157
f) Les partenaires bactériens de l'AOM.....	157
g) Les acteurs inconnus des horizons sédimentaires profonds.....	159
2) L'agrégat, organe complexe de l'AOM.....	159
3) Facteurs environnementaux influençant le cycle du méthane dans les sédiments de surface de la marge de Sonora.....	162
VI. Bilan et perspectives	165
VII. Références bibliographiques.....	165
VIII. Posters.....	165

Table des illustrations

Figure 1 : Représentation schématique des différents processus associés aux sédiments marins.	15
Figure 2 : Carcasse de baleine colonisée par un tapis bactérien de couleur jaune.....	17
Figure 3 : Photographie d'une zone d'émissions de fluides froids associée à des bassins hypersalés en Mer de Méditerranée.	18
Figure 4 : Photographie d'une partie de la zone hydrothermale du bassin de Guaymas, présentant des sédiments et cheminées hydrothermales colonisés par des tapis microbiens colorés.....	19
Figure 5 : Localisation des zones de suintements froids (points noirs) et des sources hydrothermales (points rouges) répertoriées sur la planète en 2010.....	20
Figure 6 : Vue satellite du bassin de Guaymas dans le Golfe de Californie (Mexique).	22
Figure 7 : Biogéographie des consortia responsables du processus microbien de l'AOM dans les écosystèmes marins, visualisés par la technique de FISH. En rouge les archées ANME, en vert les bactéries sulfato-réductrices. Source : Max Planck Institute (http://www.mpg.de/)	26
Figure 8 : : Schéma résumant les différentes interactions possibles dans le processus syntrophique d'oxydation anaérobie du méthane. En vert sont représentées les bactéries sulfato-réductrices et leurs métabolismes, en rouge les ANMEs.....	27
Figure 9 : Arbre phylogénétique des principaux groupes bactériens, basé sur l'analyse du gène de l'ARNr 16S. En gris sont figurés les 26 lignées bactériennes sans représentants cultivés.	35
Figure 10 : Photographie des tapis microbiens présents au niveau des sources d'émissions de fluides du Bassin de Guaymas (Campagne Ifremer "BIG" 2010).	37
Figure 11 : Observation par la technique de FISH de différents groupes de <i>Delta-Proteobacteria</i> : A) amas monospécifique de SEEP SRB-2, ou en agrégats avec des archées ANME en rouge. B) SEEP SRB-1 en vert, associées à des archées ANME en rouge. C) <i>Desulfobulbus</i> , en vert, associées aux ANMEs D) <i>Desulfosarcina/Desulfococcus</i> <i>Delta-Proteobacteria</i> , en vert, associées à des archées ANME en rouge.....	38
Figure 12 : Arbre phylogénétique des principaux groupes de <i>Delta-Proteobacteria</i> , basé sur l'analyse du gène de l'ARNr 16S. Les groupes observés dans les consortia impliqués dans l'oxydation anaérobie du méthane apparaissent en vert.....	39
Figure 13 : Observation des <i>Chloroflexi</i> filamenteuses en flocculats autour de la matière organique par la technique FISH.	40
Figure 14 : Observation des <i>Planctomycetes</i> Anammox (violet) par la technique de FISH.....	42
Figure 15 : Observation des bactéries NC10 (rose) par la technique de FISH.	43
Figure 16 : Arbre phylogénétique des archées incultivées des sédiments marins froids, basé sur l'analyse du gène de l'ARNr 16S.....	45
Figure 17 : Observation des archées ANME-1 (rouge) par la technique de FISH.....	46

Figure 18 : Observation des archées ANME-2 (rouge) par la technique de FISH. A) ANME-2c B) ANME-2a.....	47
Figure 19 : Observation des archées ANME-3 (rouge) par la technique de FISH.....	48
Figure 20 : Observation des MBGB par la technique de FISH.....	51
Figure 21 : Observation des archées appartenant au groupe des MCG par la technique de FISH..	54
Figure 22 : Photographies des différents assemblages faunistiques des zones d'émissions de fluides froids de la marge de Sonora. A) Tapis microbiens blancs ; B) Colonie de bivalves <i>Vesicomysidae</i> C) Buisson de vestimentifères <i>Siboglinidae</i>	58
Figure 23 : Carte bathymétrique de la marge de Sonora. Les points verts représentent les points remarquables correspondants aux sites répertoriés le long de la marge de Sonora au cours de la campagne "BIG". BCK1 : BIG carottier Kullenberg n°1	59
Figure 24 : A) Photographies du tapis microbien et de la macrofaune associée de l'habitat "Vasconcelos" présentant une cavité en haut à droite d'où s'échappe des petites bulles de gaz et d'huile visibles. B) et C) photos prises à bord, vue du dessus de la carotte de tapis bactérien B) et de la macrofaune C).....	60
Figure 25 : Représentation schématique des habitats sur le site "Vasconcelos", répertoriant les numéros de plongées (PL1755, PL1756 et PL1758), les marqueurs définissant le site d'étude (BIG18 et BIG19), le numéro des carottes analysées (CT) ainsi que le nom des habitats sélectionnés (White MAT12, White MAT14 et Edge White MAT14). L'échelle représente approximativement 1 mètre.....	61
Figure 26 : Plan d'échantillonnage et de conditionnement des prélèvements pour le site "Vasconcelos".	62
Figure 27 : Plan d'échantillonnage et de conditionnement des prélèvements du carottier Kullenberg BCK1.	63
Figure 28 : Distribution de la longueur des IGS selon les différents groupes bactériens.....	67
Figure 29 : Procédure expérimentale mise en place lors des expériences de puces fonctionnelles (FGA).....	70
Figure 30 : Cultures d'enrichissement des communautés méthanogènes.....	84
Figure 31 : Observation des communautés méthanogènes au microscope à épifluorescence (x1000, UV).....	85
Figure 32 : Arbre phylogénétique, basé sur l'analyse de l'ARNr 16S, des communautés archées détectées dans les sédiments de la marge de Sonora. En bleu sont indiqués les groupes archéens détectés dans les sédiments de surface associés aux émissions de fluides froids, en rouge les groupes archéens détectés dans les sédiments profonds et en rose les groupes archéens détectés dans les sédiments de surface non influencés par des sorties de fluides. Le métabolisme hypothétique des membres de ces groupes, supposé d'après l'étude de leur distribution, leur morphologie ou la détection de gènes de fonctions est indiqué en vert.	152

Figure 33 : Schéma hypothétique des interactions probables au sein des consortia d'AOM et des rôles possibles de la matrice extracellulaire. En encadré rouge, le processus d'AOM par les ANME (rouge) et les bactéries sulfato-réductrices (vert). La croissance des cellules s'effectue à l'intérieur de la matrice organique, celle-ci favorisant la communication et les échanges interspécifiques (flèches noires) et protégeant les cellules des stress environnementaux tels que la présence d'oxygène (encadré blanc). La matrice extracellulaire pourrait également avoir un rôle dans l'exclusivité du partenaire lors de l'interaction (encadré vert) en cloisonnant le consortium. 162

Figure 34 : Schéma hypothétique, récapitulatif des processus microbiens associés à l'AOM identifiés à partir des échantillons de sédiments de surface associés aux migrations de fluides froids de la marge de Sonora. En encadrés bleu sont proposés les processus de méthanogénèse possibles ; en rouge, orange et jaune, la localisation des groupes d'ANMEs détectés (ANME-1 en jaune, ANME-2 en rouge et ANME-3 en orange) ; en vert le processus de sulfo-oxydation au niveau des tapis bactériens de surface et en marron celui de la diagénèse précoce. Les doubles flèches noires indiquent la présence probable d'une interaction ou d'une compétition entre les microorganismes. Les flèches grises représentent les migrations de fluide enrichi en méthane. Les flèches bleues correspondent aux diffusions de sulfate et les marrons aux flux présumés de matière organique..... 164

I. PREAMBULE

Ce travail de thèse d'écologie microbienne a été réalisé dans le cadre du projet "Diversité et interactions microbiennes" de l'Ifremer, dans le laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LMEE, UMR 6197), à l'Ifremer centre de Bretagne. La direction et l'encadrement scientifique ont été réalisés par Anne Godfroy, directrice de l'unité et Laurent Toffin. Les sédiments marins, étudiés dans ce travail, ont été échantillonnés en Juin 2010 lors de la campagne océanographique française *BIG*, au niveau de zones d'émissions de fluides froids de la marge continentale de Sonora, dans le bassin de Guaymas situé dans le Golfe de Californie (Mexique).

Les marges continentales constituent une zone de transition entre les plaques tectoniques continentales et océaniques. Bien que moins impressionnants que les phénomènes hydrothermaux associés aux dorsales océaniques, des remontées de fluides, résultant de la compaction des roches et des sédiments sont également présents au niveau de ces structures géologiques particulières. Ces fluides riches en sulfures, en hydrocarbures et en méthane ont, contrairement aux fluides hydrothermaux, des températures généralement proches de 4°C. Ces fluides froids émergent à la surface du sédiment au niveau de zones dites d'émissions de fluides froids ou "cold seeps", formant occasionnellement des structures géologiques particulières (volcan de boue, dépressions ou pockmark ...). Ces fluides alimentent des communautés microbiennes et animales denses et variées, endémiques de ces écosystèmes et adaptées aux conditions de température (<5°C) et de pression (environ 170 bars au niveau des sédiments de la marge de Sonora) de l'océan profond. Ces communautés, dont les métabolismes sont essentiellement basés sur l'utilisation des composés chimiques contenus dans les fluides, jouent un rôle important dans l'équilibre des cycles biogéochimiques de la planète et dans la régulation des émissions de méthane, gaz à effet de serre puissant, dans l'hydrosphère puis l'atmosphère. Par conséquent, l'étude de la biodiversité et des processus biologiques et biochimiques mis en œuvre dans les écosystèmes chimiosynthétiques associés aux zones d'émissions de fluides froids est indispensable pour la description et la préservation de la biodiversité, la compréhension du fonctionnement des écosystèmes dans le contexte actuel de réchauffement climatique de la planète et de projet d'exploitation des grands fonds océaniques (pétrole profond, hydrates de méthane ...).

Les travaux entrepris dans le cadre de cette thèse se proposaient de caractériser, par différentes approches moléculaires mais également culturelles, les microorganismes présents et métaboliquement actifs au sein des sédiments associés à la zone d'émissions de fluides froids de la marge de Sonora. Les diversités phylogénétique et fonctionnelle microbiennes (archéenne et bactérienne) ont donc été étudiées à partir d'échantillons de sédiments de surface situés au niveau des sorties de fluides mais également dans les horizons sédimentaires plus profonds de la marge de Sonora.

Le premier chapitre de ce manuscrit est consacré à la définition du contexte de l'étude, à travers la présentation des écosystèmes sédimentaires marins, des principaux cycles biogéochimiques et des communautés microbiennes associées.

Les techniques moléculaires et culturales développées et utilisées lors de ce travail sont ensuite détaillées dans un chapitre de matériels et méthodes.

Les résultats obtenus sont ensuite présentés et discutés sous la forme de trois publications, soumises ou en cours de correction, complétées par une étude mettant en œuvre une approche culturale. Ces résultats sont enfin synthétisés et mis en perspectives dans un chapitre de conclusion générale.

II. INTRODUCTION

I. Les sédiments marins

1) Généralités

Les mers et océans couvrent plus des deux tiers de la surface de notre planète soit environ 361 millions de kilomètres carrés (Desbruyères, 2010). Sous cette immense étendue d'eau, le plancher océanique est souvent considéré comme étant un environnement désertique, obscur et pauvre en ressources organiques et énergétiques. En effet, la matière organique provenant des continents ou résultant de la production planctonique de surface est généralement dégradée et décomposée au cours de sa sédimentation dans la colonne d'eau. Cependant, à l'échelle des temps géologiques, une quantité considérable de matière organique et inorganique atteint néanmoins le plancher océanique. Cette matière organique, constituée des déjections des organismes planctoniques, de cadavres, de squelettes d'organismes planctoniques (micro algues unicellulaires telles que les diatomées, eucaryotes unicellulaires, protozoaires ou mollusques gastéropodes) et de particules agglomérées plus ou moins digérées par des microorganismes de la colonne d'eau sédimente vers le plancher océanique sous l'action de la gravité, formant ainsi la neige marine (Turner, 2002). L'accumulation de ces matériaux sur le plancher océanique conduit alors à la formation des sédiments marins. Les sédiments marins abyssaux (à des profondeurs comprises entre 2000 et 5000 mètres sous la surface de l'eau) couvrent 88% des océans et représenteraient uniquement 2% du carbone marin total (Dunne et al., 2007). En effet, la majorité du carbone disponible est localisée au niveau des sédiments côtiers ou des frontières de plaques tectoniques (marges continentales, dorsales océaniques). Au niveau des zones d'activités tectoniques, des sorties de fluides enrichis en métaux, hydrocarbures et composés réduits permettent le développement de véritables oasis de vie (Jorgensen and Boetius, 2007). Par ailleurs, la sédimentation ponctuelle d'importantes quantités de matière organique (bois coulés ou carcasses de baleines par exemple) enrichissent le sédiment en carbone et entraînent également l'apparition de biomasses microbiennes conséquentes et opportunistes sur le plancher océanique (Goffredi et al., 2008). Ces populations microbiennes sont néanmoins généralement restreintes aux premiers mètres voire centimètres du sédiment (Parkes et al., 2000). Cependant, certains microorganismes métaboliquement actifs ont également été détectés à des profondeurs dépassant le kilomètre sous la surface du plancher océanique (Roussel et al., 2008). De part leur étendue et leur profondeur, les sédiments marins

représentent un immense réservoir de microorganismes intervenant dans la plupart des cycles biogéochimiques (carbone, soufre, azote) régulant notre planète.

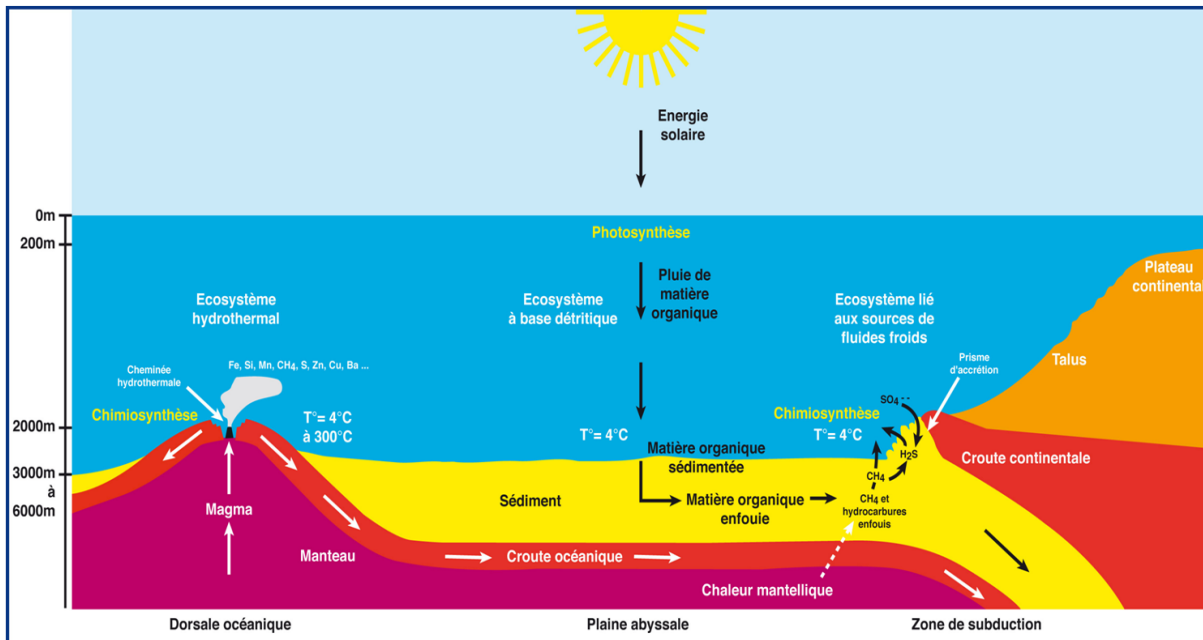


Figure 1 : Représentation schématique des différents processus associés aux sédiments marins.

2) Les sédiments côtiers intertidaux

Les sédiments côtiers intertidaux, c'est-à-dire sujets aux phénomènes de marée, représentent 12% de la surface immergée de la planète et sont considérés comme des sédiments riches en matière organique, dus aux apports terrigènes de composés dégradables déposés quotidiennement (Dunne et al., 2007; Durbin and Teske, 2011). Ces apports soutiennent des activités microbiennes importantes ainsi qu'une forte production primaire (Stevens et al., 2005a). L'oxygène est consommé dès les premiers millimètres et les gradients géochimiques sont généralement précisément localisés dans le sédiment (Engelen and Cypionka, 2009). La diversité microbienne dans ces sédiments semble toutefois fortement influencée par la lithologie, la porosité et la composition des couches sédimentaires (Musslewhite et al., 2003; Webster et al., 2007).

3) Les sédiments abyssaux

Les sédiments abyssaux représentent 88% de la surface des océans et sont perçus comme un environnement pauvre en matière organique avec une faible biomasse ($\leq 10^6$ cellules par mL) (Durbin and Teske, 2011). En effet, les microorganismes présents dans la colonne d'eau et les courants marins dégradent les particules organiques terrigènes ou issues de la production algale et très peu de matière organique sédimente au niveau du plancher océanique (Turner, 2002). Ces environnements perçoivent néanmoins un faible apport en carbone saisonnier *via* la sédimentation de micro-algues et autres microorganismes planctoniques photosynthétiques (Lampitt et al., 2001). De ce fait, les activités microbiennes au niveau de ces environnements sembleraient être majoritairement restreintes à la zone oxygénée du sédiment (Durbin and Teske, 2011). Les communautés microbiennes observées dans les sédiments abyssaux sont généralement différentes de celles observées dans les échantillons riches en matière organique et présentent des groupes microbiens méconnus. (Engelen and Cypionka, 2009; Moeseneder et al., 2012)

4) Les bois coulés et carcasses de baleines

Au niveau du plancher océanique, limité en apports carbonés (paragraphe I.3), la sédimentation de substrats organiques massifs tels que les bois coulés ou les carcasses de cétacés génère l'apparition d'écosystèmes particuliers composés d'organismes opportunistes. Des communautés animales et microbiennes vont se développer au niveau de ces substrats particuliers mais également dans les sédiments sous-jacents pour former de véritables oasis de vie (Goffredi et al., 2008). Le sédiment autour des carcasses de baleines ou des bois coulés s'enrichit en matière organique et permet le développement de divers microorganismes associés à la dégradation des graisses ou des bois, qui libèrent d'autres composés tel que l'hydrogène sulfuré, à leur tour utilisés par d'autres microorganismes (Goffredi and Orphan, 2010). Les écosystèmes associés aux carcasses et aux bois coulés pourraient également faciliter la dispersion des espèces microbiennes des autres écosystèmes marins profonds en servant de pierres de gué ponctuel sur le plancher océanique (Smith and Baco, 2003).



Figure 2 : Carcasse de baleine colonisée par un tapis bactérien de couleur jaune.

5) Les zones d'émissions de fluides froids

Les zones d'émissions de fluides froids (ou "cold seeps") sont retrouvées au niveau des marges continentales, frontières entre une plaque continentale et océanique. Les marges continentales sont des environnements dynamiques présentant une activité géodynamique intense dans le cas des marges actives, qui va entraîner la migration et la remontée en surface de fluides sous pression. La compaction des roches sédimentaires par les phénomènes de tectonique des plaques va produire un fluide enrichi en hydrocarbures, qui au contact avec l'eau de mer, va se modifier chimiquement et s'enrichir en composés réduits. Les fluides ainsi créés vont remonter à la surface sous l'effet de la pression *via* des zones poreuses ou des failles (Levin, 2005). Dans le cas de remontées massives, la libération du fluide peut être associée à la formation d'édifices géologiques impressionnants, tels que les volcans de boue, les pockmarks ou encore les zones de glissements. Les volcans de boues sous-marins sont généralement circulaires avec des diamètres allant de plusieurs mètres à quelques kilomètres (Niemann et al., 2006; Losekann et al., 2007; Omoregie et al., 2008; Lazar et al., 2012). Ils possèdent un centre actif à partir duquel les fluides riches en gaz et en boues sont expulsés à partir de couches sédimentaires sous-jacentes, parfois profondes de plusieurs kilomètres. Les volcans de

boues sous-marins présentent parfois de violentes éruptions, mais la plupart du temps, leur expansion est calme et continue (Dimitrov, 2003). Les pockmarks, à l'inverse des volcans de boues sont des dépressions coniques issues de dégazages importants (Ondreas et al., 2005). De nombreuses communautés microbiennes se développent au niveau des sorties de fluides, utilisant les composés (hydrocarbures, méthane, hydrogène sulfuré) du fluide comme sources de carbone et d'énergie.



Figure 3 : Photographie d'une zone d'émissions de fluides froids associée à des bassins hypersalés en Mer de Méditerranée.

6) Les sites hydrothermaux marins profonds

Les zones hydrothermales sont localisées au niveau des sites à activité volcanique et/ou tectonique tels que le long des dorsales ou au niveau des points chauds. Les activités volcaniques génèrent en ces points des failles et des anfractuosités dans les sédiments permettant à l'eau de mer de s'infiltrer sur plusieurs kilomètres (Edmond et al., 1982). A l'approche de la chambre magmatique, cette eau va se réchauffer et remonter vers la surface du fait de la pression générée. L'eau à haute température va alors lessiver les roches et se charger en éléments métalliques et gaz dissous. La composition du fluide hydrothermal va donc varier selon la nature des roches traversées et va entraîner d'une part la formation de structures par précipitation des minéraux au contact de l'eau de mer

froide et d'autre part le développement de diverses communautés microbiennes et animales symbiotiques (Baross and Hoffman, 1985). Situées dans les zones d'accrétions du plancher océanique nouvellement formé, les zones hydrothermales sont généralement très peu recouvertes de sédiments. Toutefois, dans certains environnements particuliers, présentant un important taux de sédimentation lié à une très forte production primaire de surface, tel que le bassin de Guaymas (voir ci-dessous), la zone d'émission de fluide hydrothermal peut être ensevelie sous une épaisse couche de sédiments (Simoneit et al., 1990). La percolation du fluide surchauffé à travers les horizons sédimentaires entraîne alors des processus géochimiques particuliers qui vont modifier la composition du fluide.



Figure 4 : Photographie d'une partie de la zone hydrothermale du bassin de Guaymas, présentant des sédiments et cheminées hydrothermales colonisés par des tapis microbiens colorés.

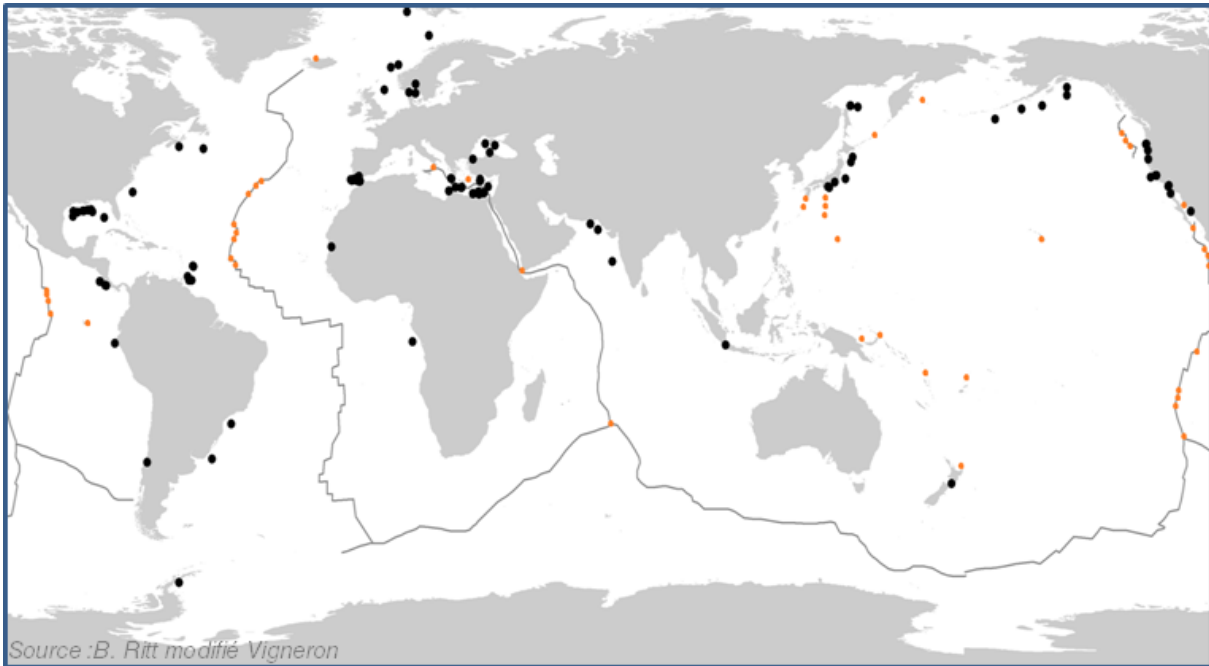


Figure 5 : Localisation des zones de suintements froids (points noirs) et des sources hydrothermales (points rouges) répertoriées sur la planète en 2010.

7) Les sédiments marins profonds

Les sédiments profonds de sub-surface, dont les échantillons proviennent généralement de campagnes de forages (IODP, Integrated Ocean Drilling Program) peuvent atteindre plusieurs centaines de mètres sous la surface et ainsi correspondre à plusieurs siècles d'histoire géologique (Parkes et al., 2000; Parkes et al., 2005; Webster et al., 2009). Comparés aux sédiments de surfaces, des paramètres tels que l'âge du sédiment ou bien la lithologie doivent être pris en compte lors des analyses (Inagaki et al., 2003). De plus, le gradient thermique lithosphérique (environ 30°C par kilomètre de profondeur (Kallmeyer et al., 2012)), la porosité généralement faible et les conditions de fortes pressions rendent les échantillons de sédiments profonds extrêmement sensibles et délicats. Ces environnements profonds présentent également des concentrations en matière organique et en nutriments faibles limitant à la fois les densités cellulaires et les activités microbiennes (D'Hondt et al., 2002). De ce fait, très peu d'études sont disponibles sur les communautés microbiennes des sédiments marins profonds. Il a néanmoins été démontré que des microorganismes pouvaient survivre jusqu'à 1626 mètres sous la surface

des sédiments, correspondant à environ 111 millions d'années, et à une température proche de 100°C (Roussel et al., 2008).

8) Cas particulier du Bassin de Guaymas

Le Bassin de Guaymas, étudié dans ce travail de thèse, est situé dans le Golfe de Californie (Mexique). Il s'étend sur 1200 kilomètres de longueur et environ 150 kilomètres de largeur. Il présente la particularité d'une part de regrouper à la fois des zones d'émissions de fluides froids et des sites hydrothermaux, séparés uniquement par quelques dizaines de kilomètres et d'autre part d'être amandé par une substantielle neige marine. En effet, le bassin de Guaymas est alimenté à la fois par de conséquents apports terrigènes provenant de deux fleuves importants : le Sierra Madre et le Colorado mais également par une sédimentation de matériel planctonique riche en matière organique, de l'ordre de 2,7 m/1000 ans (Simoneit et al., 1990). La couche de sédiments dans le fond du bassin peut ainsi atteindre 500 mètres d'épaisseur au niveau de la marge continentale et de la dorsale océanique. La diffusion des fluides à travers ce sédiment riche en matière organique entraîne la formation d'hydrocarbures et d'acides organiques variés enrichissant le fluide (Simoneit et al., 1996). Si la partie hydrothermale du bassin a été plusieurs fois explorée et analysée (Simoneit et al., 1990; Simoneit et al., 1996; Teske et al., 2002; Dhillon et al., 2003; Dhillon et al., 2005; Paull et al., 2007; Biddle et al., 2012; McKay et al., 2012), les communautés microbiennes de la Marge de Sonora, présentant des zones d'émissions de fluides froids, n'ont jamais été étudiées auparavant. Ces deux environnements aux températures de fluide contrastées (>100°C et 4°C) sont colonisés par des assemblages faunistiques comparables : des étendues de bivalves, des buissons de vers tubicoles ainsi que des tapis bactériens blancs ou colorés. La similarité visuelle ainsi que la proximité géographique de ces habitats laisseraient suggérer qu'un éventuel transfert de communautés animales et/ou microbiennes pourrait être possible et que ces deux sources d'émissions de fluides pourraient être alimentées par un réservoir commun enfoui profondément dans les sédiments.



Figure 6 : Vue satellite du bassin de Guaymas dans le Golfe de Californie (Mexique).

II. Les processus microbiens associés aux sédiments marins profonds

Dans les sédiments marins profonds, l'absence de lumière rend tout mécanisme de photosynthèse impossible. Le développement de microorganismes repose donc sur un processus énergétique indépendant de la lumière, appelé chimiosynthèse et reposant sur l'assimilation de carbone grâce à l'énergie chimique libérée lors de réactions d'oxydoréduction. Différents couples redox sont disponibles dans les sédiments marins selon leur diffusion et leur consommation par les microorganismes capables de les utiliser, formant ainsi des gradients géochimiques au sein du sédiment. Il existe généralement une superposition de zones à potentiel redox décroissant avec la profondeur, les accepteurs d'électrons les plus énergétiquement favorables tel que l'oxygène étant utilisés les plus rapidement dans le sédiment (Froelich et al., 1979). La localisation de ces zones géochimiques différentes dépend d'une part de la qualité et de la quantité de matière organique présente et d'autre part des flux de fluides présents dans le sédiment. Différentes communautés et activités microbiennes vont donc coloniser les sédiments en

fonction de leur capacité à utiliser les accepteurs et donneurs d'électrons disponibles (Engelen and Cypionka, 2009).

1) Généralités sur la chimiotrophie

Le métabolisme est l'ensemble des réactions biochimiques au sein d'une cellule permettant la dégradation des nutriments (catabolisme) afin de produire de l'énergie et des molécules organiques simples, qui serviront à la synthèse de macromolécules, au renouvellement des constituants cellulaires et à la croissance cellulaire (anabolisme). En l'absence de lumière, les communautés dites chimiotrophes, réalisant la chimiosynthèse, produisent leur énergie grâce à l'oxydation des composés réduits. On distingue deux types de chimiotrophie, l'organotrophie et la lithotrophie. Les organismes organotrophes tirent leur énergie de l'oxydation de composés organiques alors que les lithotrophes oxydent des composés inorganiques réduits tels que le fer (Fe^{2+}), l'ammonium (NH_4^+), l'hydrogène sulfuré (H_2S) ou l'hydrogène (H_2). De même, une distinction est faite selon la source de carbone utilisée par les microorganismes pour synthétiser leur biomasse. Les organismes autotrophes utilisent des sources de carbone inorganique (CO_2 , CO , CH_4) alors que les hétérotrophes ont besoin d'une source de carbone organique (Madigan, 2008). La composition en composés réduits des fluides émis va donc influencer les communautés microbiennes présentes, impliquées dans différents cycles biogéochimiques tels que le cycle du méthane, du soufre ou encore de l'azote.

2) Le cycle du méthane

Le méthane présent dans les fluides froids peut avoir plusieurs origines. La formation du méthane peut être un processus abiotique, il est alors issu de la maturation de la matière organique enfouie dans des conditions de température et de pression élevées, on parle de méthane thermogénique (Schaefer et al., 1999). Le méthane peut également être produit de manière microbiologique par des microorganismes méthanogènes (Liu and Whitman, 2008). Le méthane libéré au niveau des suintements froids a rarement une seule origine et constitue généralement un mélange d'origine biogénique et thermogénique. Les sédiments marins représentent un important réservoir de méthane ; 85 à 300 tonnes de méthane seraient produites par an selon des estimations (Valentine, 2002). La libération d'une telle quantité de ce gaz, à effet de serre 25 fois plus puissant que le CO_2 , entraînerait des changements climatiques radicaux (Knittel and Boetius, 2009). Cependant, 90% de ce

méthane est consommé dans les sédiments marins par les microorganismes méthanotrophes (Knittel and Boetius, 2009). Il est donc important d'identifier les différents microorganismes et les processus impliqués dans le cycle du méthane, ainsi que les facteurs environnementaux influençant la distribution et l'activité de ces communautés microbiennes.

a) La méthanogénèse

La production microbiologique du méthane ou méthanogénèse est un processus anaérobie important dans le cycle global du carbone (Liu and Whitman, 2008). La méthanogénèse représente l'étape finale de la dégradation anaérobie de la matière organique. Elle conduit à une reminéralisation du carbone organique sous forme de CO₂ et CH₄. C'est un processus exclusivement réalisé par des archaebactéries anaérobies strictes. La matière organique complexe est initialement dégradée par des organismes détritiformes de surface. Les polymères organiques issus de cette première dégradation sont ensuite transformés, par différents groupes microbiens hétérotrophes fermentaires, en sucres simples, acides gras volatils et alcools au cours du processus de diagenèse précoce (Lazar, 2009). Ces métabolites secondaires sont alors dégradés par d'autres communautés microbiennes acétogènes qui vont libérer de l'acétate, de l'hydrogène et du CO₂, constituant les différents substrats utilisables par les méthanogènes (Ferry and Lessner, 2008). Cette succession de communautés impliquées dans la production de méthane à partir de la matière organique entraîne souvent la formation d'agrégats entre différentes espèces microbiennes. Des consortia syntrophiques entre les microorganismes fermenteurs secondaires, produisant les substrats de la méthanogénèse et les méthanogènes peuvent se former (Schink, 1997; Schink, 2006). Les fermenteurs secondaires syntrophes bactériens (*Syntrophobacter*, *Geobacter* ...) fournissent les substrats tel que l'H₂ utilisable par les méthanogènes. En retour, les méthanogènes servent d'accepteurs terminaux d'électrons et recyclent ainsi le pouvoir réducteur des bactéries syntrophes, essentiel pour leur développement (Morita et al., 2011). Les méthanogènes se répartissent en trois groupes trophiques selon leur substrat catabolique utilisé pour la production de méthane. Ainsi, les méthanogènes dits hydrogénotrophes produisent le méthane à partir d'hydrogène et de CO₂, même si la plupart de ces méthanogènes peuvent également utiliser le formate ou des alcools secondaires comme substrats ($4 \text{ H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$). Les méthanogènes méthylotrophes utilisent des substrats à groupements

méthylés (composé méthylé + $n\text{H}_2\text{O} \rightarrow n\text{CH}_4 + n\text{CO}_2 + n\text{NH}_4$). Enfin, les méthanogènes acétoclastes utilisent l'acétate pour produire du méthane et du CO_2 ($\text{CH}_3\text{COOH} - \text{CH}_4 + \text{CO}_2$) (Liu and Whitman, 2008). Quelque soit le substrat utilisé, la méthanogénèse est un processus complexe qui fait intervenir plusieurs complexes enzymatiques. La méthyl co-enzyme M reductase (MCR), codée en partie par le gène *mcrA*, est une enzyme clé de ce processus qui catalyse la réaction finale de méthanogénèse (Rospert et al., 1991; Weiss and Thauer, 1993; Scheller et al., 2010; Thauer, 2011). Le gène *mcrA* est une cible privilégiée dans les analyses moléculaires de diversité des méthanogènes. En effet, les topologies des arbres phylogénétiques basés sur les séquences génétiques du gène *mcrA* et celui de l'ARNr 16S, classiquement utilisé dans les études de taxinomie bactérienne, sont similaires (DeLong, 2000). Ainsi, le gène *mcrA* constitue un marqueur phylogénétique alternatif ciblant les communautés méthanogènes. Basé sur les analyses des séquences génétiques de *mcrA* et de l'ARNr 16S, les méthanogènes ont été regroupées au sein des archaebactéries en différents groupes phylogénétiques: *Methanosarcinales*, *Methanocellales*, *Methanococcales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanopyrales* (Sakai et al., 2009) et récemment *Methanoplasmatales* (Paul et al., 2012).

b) L'oxydation anaérobie du méthane

L'oxydation anaérobie du méthane (Anaerobic Oxydation of Methane ou AOM en anglais) est un processus important dans les sédiments marins anoxiques (D'Hondt et al., 2002). Elle constitue un biofiltre naturel capable de limiter les émissions de méthane dans la colonne d'eau et l'atmosphère. Environ 90% du méthane produit dans les sédiments marins sont consommés lors de l'oxydation anaérobie du méthane (Knittel and Boetius, 2009). C'est un processus complexe généralement associé à la sulfato-réduction faisant intervenir différentes communautés microbiennes : les archées anaérobies méthanotrophes (ANME) (cf. Paragraphe III.3.abc) et des partenaires bactériens, généralement sulfato-réducteurs (SRB) (cf Paragraphe III.2.a) suivant la réaction globale : $\text{CH}_4 + \text{SO}_4^{2-} - \text{HCO}_3^- + \text{HS}^- + \text{H}_2\text{O}$ (Boetius et al., 2000). L'AOM peut également être couplée à d'autres processus de réduction bactérienne tels que la réduction des nitrates (Raghoebarsing et al., 2006), du manganèse ou du fer (Beal et al., 2009). L'AOM a donc lieu dans les sédiments anoxiques riches en méthane mais également en accepteurs d'électrons nécessaires aux partenaires bactériens. Cet horizon sédimentaire particulier, présentant à la fois la source de carbone et l'accepteur d'électron de la réaction est, dans le cas ou

l'accepteur d'électron est le sulfate, situé au niveau de la zone de transition méthane / sulfate (ZTMS ou SMTZ en anglais).

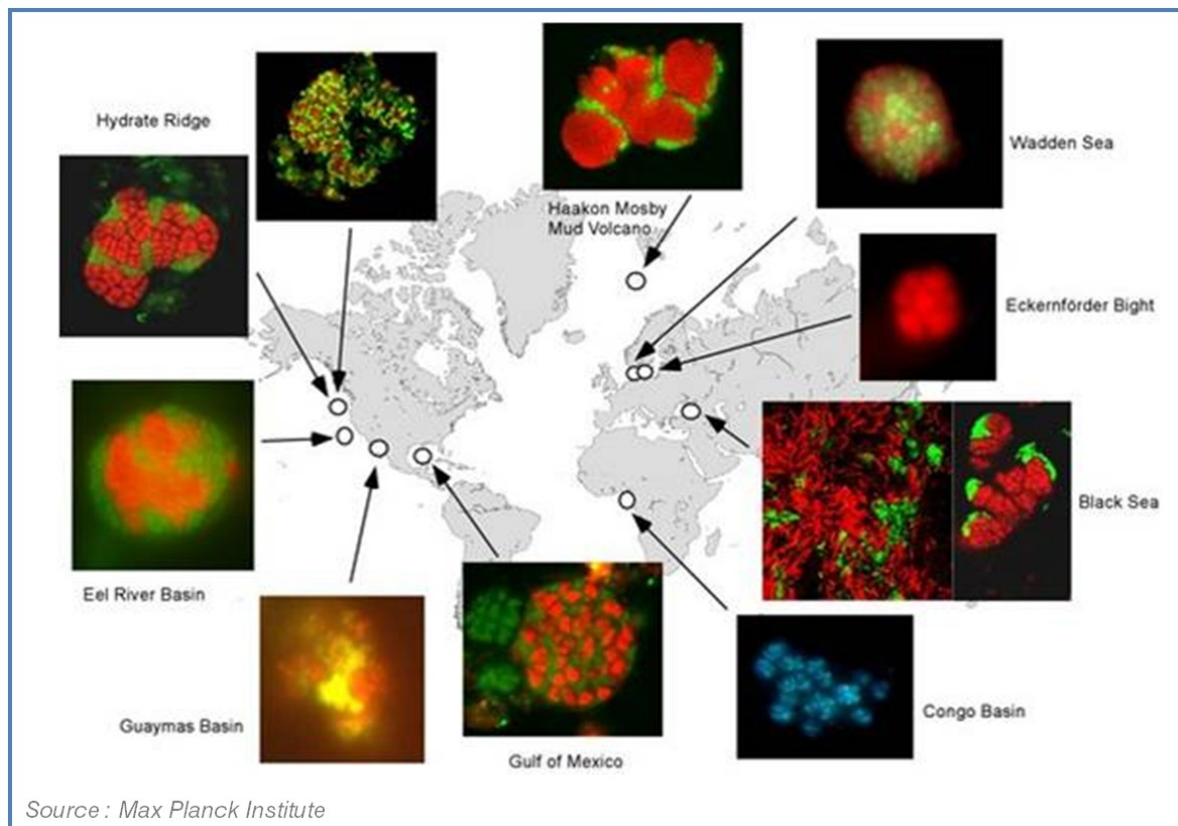


Figure 7 : Biogéographie des consortia responsables du processus microbien de l'AOM dans les écosystèmes marins, visualisés par la technique de FISH. En rouge les archées ANME, en vert les bactéries sulfato-réductrices. Source : Max Planck Institute (<http://www.mpg.de/>)

En dépit d'une vaste géo-localisation des habitats favorables à l'AOM dans les sédiments marins, le mécanisme précis reste mal connu. Les ANMEs pourraient consommer le méthane par un processus de méthanogénèse inverse, les gènes codant ce processus ayant été détectés (Meyerdierks et al., 2005), et ainsi libérer du CO₂ et de l'hydrogène. L'hydrogène produit lors de cette réaction serait alors utilisé par les bactéries sulfato-réductrices comme source d'énergie, rendant ainsi énergétiquement favorable la réaction d'oxydation du méthane par les ANMEs (Figure 8A). Une autre hypothèse serait la formation d'acétate par les ANMEs à partir de méthane et de CO₂ qui serait alors utilisée par les bactéries sulfato-réductrices (Figure 8B) (Knittel and Boetius, 2009). Enfin, une dernière hypothèse serait que les ANMEs soient capables à la fois de l'oxydation du méthane et de la réduction du soufre élémentaire (S⁰). Celles-ci seraient alors associées

avec des bactéries capables de comproportionation (réduction de sulfate et de sulfure en soufre élémentaire (cf paragraphe II.3b) générant le soufre élémentaire pour les ANMEs (Figure 8C) (Milucka, 2011). Ce dernier mécanisme n'a pour l'instant jamais été observé en milieu naturel, et reste encore très spéculatif. En effet, la présence de la voie métabolique de réduction du soufre chez les ANMEs, indispensable pour ce processus, n'a été que partiellement détectée (Meyerdierks et al., 2010). Par ailleurs, le mécanisme d'AOM n'est pas restreint aux agrégats ANME/SRB. Certaines ANMEs seules semblent être en effet capables de réaliser l'oxydation anaérobie du méthane (cf paragraphe ANME-1). De même, les bactéries NC10 peuvent également oxyder le méthane sans partenaire microbien, en couplant l'AOM avec la réduction des nitrates (cf paragraphe Candidate Division) (Raghoebarsing et al., 2006; Ettwig et al., 2009). Quelque soit le processus exact, l'oxydation anaérobie du méthane couplée avec la sulfato-réduction, libère de l'hydrogène sulfuré qui va ainsi enrichir les fluides interstitiels en composés réduits.

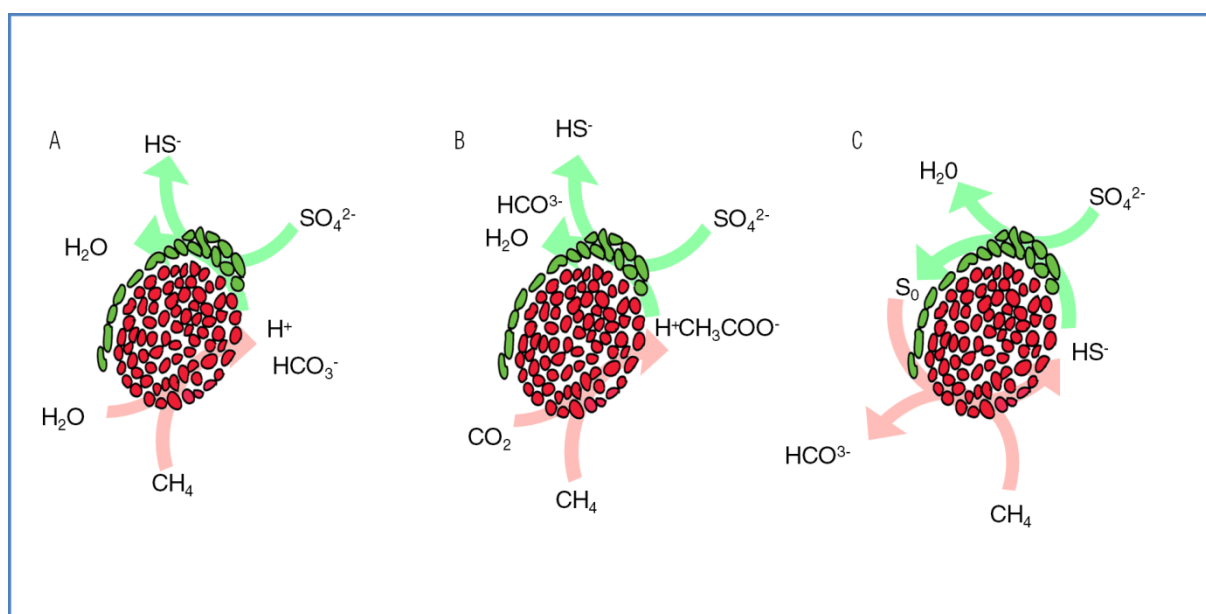


Figure 8 : : Schéma résumant les différentes interactions possibles dans le processus syntrophique d'oxydation anaérobie du méthane. En vert sont représentées les bactéries sulfato-réductrices et leurs métabolismes, en rouge les ANMEs.

c) L'oxydation aérobie du méthane

L'oxydation aérobie du méthane est un processus mineur de consommation du méthane, réalisé par des bactéries aérobies strictes dans les couches oxygénées du sédiment ou en syntrophie avec certains organismes invertébrés de surface (crevette

hydrothermale *Rimicaris exoculata* (Guri et al., 2012), bivalves *Bathymodiolus* (Duperron et al., 2005)). Il existe trois classes principales de méthanotrophes : le type I et le type X sont taxonomiquement affiliés aux gamma-proéobactéries alors que les méthanotrophes de type II sont affiliés aux alpha-protéobactéries (Trotsenko and Murrell, 2008). Le méthane est utilisé à la fois comme source d'énergie et de carbone. Le méthane est oxydé en méthanol par respiration aérobie grâce à une enzyme mono oxygénase codée partiellement par le gène *pmoA* (McDonald and Murrell, 1997), fréquemment ciblé dans les études de communautés méthanotrophes aérobies.

3) Le cycle du soufre

Le soufre est l'un des éléments les plus abondants dans les sédiments marins, stocké sous forme de minéraux précipités sulfatés (gypse, CaSO_4) et sulfurés (pyrite, FeS_2) (Crepeau, 2010). Dans les sédiments marins, les sulfures (H_2S) proviennent de la réduction des sulfates (SO_4^{2-}) par les bactéries sulfato-réductrices, de la réduction du soufre élémentaire (S^0) par les bactéries sulfo-réductrices ou de la réduction d'autres composés soufrés tel que le thiosulfate (S_2O_3) par des bactéries thiosulfato-réductrices (Jørgensen and Bak, 1991). Les sulfures peuvent être ensuite ré-oxydés en sulfates par des bactéries sulfo-oxydantes.

a) la réduction des sulfates

Le sulfate (SO_4^{2-}) est la forme la plus oxydée du soufre et l'un des principaux anions présents dans l'eau de mer avec des concentrations voisines de 28 mM (Lazar, 2009). La réduction du sulfate et des formes oxydées intermédiaires du soufre par les bactéries peut servir à la synthèse de la biomasse. Le soufre sera alors intégré dans les acides aminés bactériens, on parle de réduction assimilatrice des composés soufrés. Le sulfate peut également être réduit pour la production d'énergie, il sert alors d'accepteur d'électrons dans les réactions d'oxydations anaérobies réalisées par les microorganismes sulfato-réducteurs où le donneur d'électron est généralement de l'hydrogène (H_2) ou de la matière organique (Leloup et al., 2007; Leloup et al., 2009), suivant la réaction globale : $\text{SO}_4^{2-} + \text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 2 \text{HCO}_3^- + 3 \text{H}^+$. On parle alors de réduction dissimilatrice. De l'hydrogène sulfuré est alors libéré dans l'environnement (Fan et al., 2012). Seule la réduction dissimilatrice du sulfate permet la minéralisation de la matière organique. Une importante diversité morphologique et physiologique de sulfato-réducteurs est connue, représentant un

potentiel métabolique important (Barton and Fauque, 2009). En effet, si la plupart des bactéries sulfato-réductrices (Sulfate Reducing Bacteria ou SRB en anglais) utilisent l'hydrogène comme donneur d'électrons, certains sulfato-réducteurs peuvent également oxyder différents composés organiques tels que des hydrocarbures, des acides gras volatils ou des sucres (Dhillon et al., 2003). Cette diversité métabolique remarquable fait ainsi le lien entre le cycle du soufre et celui du carbone, notamment au niveau de l'oxydation anaérobie du méthane couplée à la sulfato-réduction. Phylogénétiquement, les microorganismes sulfato-réducteurs sont majoritairement affiliés à la classe des *Delta-proteobacteria* (Dhillon et al., 2003; Schreiber et al., 2010; Kleindienst et al., 2012). Il existe également des espèces d'archées sulfato-réductrices appartenant au genre *Archaeoglobus* mais ces microorganismes ont pour l'instant été observés uniquement à des températures élevées (Zellner et al., 1989). La réduction du sulfate fait intervenir trois complexes enzymatiques dont l'adénylylsulfate réductase codée par le gène *aps* et la sulfite réductase codée par les gènes *dsrA* et *dsrB* (Schonheit and Schafer, 1995). La topologie des arbres phylogénétiques basés sur les gènes codant l'ARNr 16S et la sulfite réductase étant congruente, ces gènes spécifiques des bactéries sulfato-réductrices servent également de cible pour les études moléculaires des sulfato-réducteurs (Klein et al., 2001).

b) La réduction du soufre élémentaire, disproportionation et comproportionation

Le soufre peut être réduit en sulfure d'hydrogène par réduction assimilatrice ou dissimilatrice. Celui-ci est alors utilisé comme accepteur d'électrons dans l'oxydation anaérobie de l'hydrogène ou de composés organiques par des bactéries sulfo-réductrices (Fauque and Barton, 2012). C'est un processus fréquent dans les écosystèmes hydrothermaux, réalisé par des bactéries et des archées thermophiles affiliées à l'ordre des *Thermotogales* (Schut et al., 2012) ou des *Desulforomonales*, qui peuvent également utiliser des composés soufrés plus oxydés comme le thiosulfate.

La disproportionation, aussi connue sous le nom de dismutation est un type spécifique de réaction d'oxydo-réduction dans laquelle une espèce chimique est simultanément réduite et oxydée pour former deux produits différents. La disproportionation du soufre élémentaire génère donc à la fois du sulfate et du sulfure selon la réaction suivante: $4S^0 + 4H_2O \rightarrow SO_4^{2-} + 3H_2S + 2H^+$. C'est un processus microbien méconnu mais probablement important dans les sédiments anoxiques marins (Finster, 2008; Fauque and Barton, 2012). Inversement, la comproportionation est la formation d'un seul composé chimique à partir de

sa forme oxydée et réduite. La comproportionation du soufre élémentaire, suspectée dans les agrégats ANME/SRB, conduit à la production de soufre élémentaire à partir de sulfate et de sulfure. ($H^+ + SO_4^{2-} + 7HS^- \rightarrow 4S_2^{2-} + 4H_2O$) (Milucka, 2011). Ces deux mécanismes pourraient être réalisés par des bactéries affiliées aux mêmes groupes de Delta-protéobactéries que les bactéries sulfato-réductrices.

c) L'oxydation des sulfures

Les sédiments marins sont riches en composés soufrés plus ou moins réduits. Les microorganismes sulfo-oxydants utilisent ces derniers comme donneurs d'électrons en catalysant leur oxydation. L'accepteur d'électrons est généralement l'oxygène (énergétiquement le plus favorable) mais le nitrate peut également être utilisé. Cette réaction se produit donc dans la zone de transition oxic/anoxique où se trouvent les composés soufrés réduits et les différents accepteurs d'électrons (Crepeau, 2010). L'oxydation des sulfures ($HS^- + O_2 \rightarrow H_2O + SO_4^{2-}$) est réalisée par les microorganismes sulfo-oxydants vivants soit en symbiose avec diverses espèces animales (*Siboglinidae*, *Vesicomylidae*, *Mytilidae* ...) (Duperron et al., 2005), on parle alors de symbiotes thiotrophes, soit par des microorganismes libres. Ces bactéries libres, sulfo-oxydantes et filamenteuses de grandes tailles (quelques millimètres) appartiennent à l'ordre des *Thiotrichales* et forment d'épais tapis bactériens blancs ou colorés au niveau des sources d'émissions de sulfures (Teske et al., 1999; Grunke et al., 2010; Grunke et al., 2011). Il existe deux voies métaboliques pour l'oxydation de composés soufrés, la voie de la sulfite-oxydase (Meyer et al., 2007) et la voie de l'adénosine phosphate (APS) réductase (Meyer and Kuever, 2007a). Ainsi les gènes *soxB* et *aprA*, codant respectivement une partie des complexes enzymatiques de la sulfite-oxydase et de l'APS réductase, sont deux marqueurs fonctionnels utilisés pour l'identification de ces voies métaboliques et des microorganismes sulfo-oxydants (Meyer and Kuever, 2007b).

4) Le cycle de l'azote

L'azote est un élément essentiel au développement des microorganismes, il est toutefois souvent limitant dans les environnements marins. Il existe trois principaux processus de transformation microbienne de l'azote : la nitrification, la dénitrification et la fixation de l'azote. Très peu d'études portent sur le cycle de l'azote dans les sédiments

marins. Cependant, l'ensemble des gènes codant la production des complexes enzymatiques impliqués dans le cycle a été détecté dans des sédiments marins (Mehta et al., 2003; Zehr and Kudela, 2011; Wawrik et al., 2012).

a) La fixation de l'azote

La fixation de l'azote atmosphérique (N_2) est un processus essentiel du cycle de l'azote. Elle permet l'incorporation de l'azote gazeux dans les acides aminés et les protéines. Très peu de microorganismes sont capables de fixer l'azote mais ce processus a été retrouvé à la fois chez les bactéries (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Cyanobacteria*), notamment les bactéries symbiotiques des plantes, et chez les archées (quelques *Euryarchaeota* méthanogènes et ANME) (Leigh, 2000; Dekas et al., 2009). La fixation de l'azote en ammoniac ($N_2 + 8H^+ \rightarrow 2NH_3 + H_2$) est un processus strictement anaérobie qui fait intervenir le complexe enzymatique de la nitrogénase, énergétiquement très coûteux, codé et régulé par l'opéron *nif* comportant une vingtaine de gènes (Herbert, 1999; Raymond et al., 2004). L'ammoniac produit est ensuite converti en molécule organique et assimilé par les microorganismes.

b) La dénitrification

La dénitrification est la conversion du nitrate (NO_3^-) en azote. C'est la principale voie de formation biologique d'azote atmosphérique ($2 NO_3^- + 10 e^- + 12 H^+ \rightarrow N_2 + 6 H_2O$). C'est une voie métabolique présente chez de nombreuses espèces bactériennes appartenant aux *Alpha-Proteobacteria* (Knowles, 1982). Le nitrate est utilisé comme accepteur d'électrons lors de la respiration anaérobie des bactéries hétérotrophes. Le processus de dénitrification fait intervenir une cascade enzymatique de réductases codées et régulées par plusieurs gènes. Le nitrate est dans un premier temps réduit en nitrite (NO_2^-) par la nitrate réductase, codée par l'opéron *narGHI* puis en monoxyde d'azote (NO) par la nitrite réductase, codée par les gènes *nirKS*, en oxyde nitreux (N_2O) par la NO réductase (gènes *nor*) et enfin en diazote (N_2) par l'oxyde nitreux réductase (gènes *nos*). Ces gènes codant des enzymes réductases de la dénitrification sont utilisés comme marqueurs fonctionnels de la dénitrification (Bannert et al., 2011).

c) la nitrification

La nitrification est l'oxydation de l'ammonium en nitrate par les microorganismes nitrifiants. C'est un processus en deux étapes réalisé par des microorganismes différents (Herbert, 1999). La première étape est l'oxydation de l'ammonium en nitrite. Différents groupes microbiens peuvent être impliqués, certaines bactéries affiliées aux *Beta-* et *Gamma-Proteobacteria* (Aakra et al., 2001a; Aakra et al., 2001b) ainsi que les archées du groupe nouvellement défini *Thaumarchaeota* (cf paragraphe MG-I)(Spang et al., 2010; Brochier-Armanet et al., 2012). L'oxydation de l'ammonium est un processus aérobie faisant intervenir l'enzyme ammonium monooxygénase, codée par le gène *amoA*. La deuxième étape de la nitrification est l'oxydation du nitrite en nitrate. C'est un processus bactérien codé par les gènes *norAB* principalement réalisé par les espèces appartenant au genre *Nitrobacter* (Lees and Simpson, 1957). Une grande partie des microorganismes nitrifiants peuvent également utiliser des substrats azotés différents tel que l'urée qu'ils dégraderont pour former de l'ammonium (Herbert, 1999; Alonso-Sáez et al., 2012).

d) L'oxydation anaérobie de l'ammonium

Récemment une nouvelle voie métabolique a été décrite, l'oxydation anaérobie de l'ammonium ou Anammox (Jetten et al., 2003; Kuypers et al., 2003; Byrne et al., 2009; Yoshinaga et al., 2011). Les bactéries Anammox, phylogénétiquement regroupées au sein des *Planctomycetes*, utilisent pour leur croissance l'énergie de l'oxydation de l'ammonium (NH_3) en azote atmosphérique (N_2), en présence de nitrite. Plus de 200 gènes semblent être codés pour ce mécanisme énergétique complexe impliquant des hydrazines (N_2H_4) (Strous et al., 2006)

III. Les acteurs microbiens incultivés des sédiments marins

1) Généralités sur la diversité des microorganismes marins

Les microorganismes marins benthiques, phylogénétiquement répartis au sein des *Bacteria* et des *Archaea*, présentent une importante densité et diversité taxonomique et fonctionnelle dans les sédiments, constituant une biomasse et un réseau métabolique considérable. En effet, le nombre de cellules total dans les sédiments à récemment été estimé par des comptages cellulaires à $2,9 \times 10^{29}$ cellules (Kallmeyer et al., 2012). Bien qu'il ait été montré que l'abondance des cellules microbiennes diminue de manière

logarithmique en fonction de la profondeur des sédiments (Parkes et al., 2002), et ce, probablement en lien avec la disponibilité décroissante en accepteurs d'électrons énergétiquement favorables et en substrats carbonés (Engelen and Cypionka, 2009; Kallmeyer et al., 2012), des microorganismes ont néanmoins été détectés jusqu'à 1626 mètres de profondeur sous le plancher océanique (Roussel et al., 2008). Cette dispersion à travers les couches sédimentaires suggère des capacités d'adaptation et une diversité de fonctions métaboliques importante. Très peu de microorganismes des sédiments marins ont été cultivés du fait de la complexité de leur milieu de vie. En effet, les paramètres de salinité, d'alcalinité et plus particulièrement de pression sont des facteurs importants difficilement simulables en laboratoire. Les températures froides entraînent également des temps de croissance importants. De plus, les microorganismes en milieu marin, comme dans tout environnement complexe, développent de nombreuses interactions entre eux allant jusqu'à l'association syntrophique en consortium. Dans ces conditions, l'isolement de ces microorganismes en culture pure est extrêmement laborieuse. De nouvelles techniques d'enrichissement et de culture dans des microbilles existent pour permettre à la fois un isolement monospécifique des bactéries et le maintien des interactions interspécifiques (Zengler et al., 2002; Alain and Querellou, 2009) mais sont difficilement adaptables aux sédiments marins. Afin de s'affranchir des difficultés culturelles, la plupart des études actuelles portant sur la diversité microbienne reposent sur l'étude de gènes marqueurs phylogénétiques et reflets de l'évolution, comme ceux codant pour l'ARN ribosomique 16S (Olsen and Woese, 1993). L'amplification et le séquençage des gènes codant l'ARNr 16S ont ainsi permis de détecter dans les environnements naturels de nombreuses séquences génétiques correspondant à de "nouveaux" microorganismes, au point où il est maintenant considéré que les microorganismes identifiés par les techniques culturelles représentent moins de 1% des communautés microbiennes environnementales (Rappé and Giovannoni, 2003). De nombreux microorganismes incultivés ont ainsi été reportés grâce à l'utilisation d'outils moléculaires haut débit, tel que le pyroséquençage, permettant d'obtenir des milliers de séquences par échantillon (Ahmadian et al., 2006). Les quantités considérables de données de séquences plus ou moins partielles d'ARNr 16S qui en résultent appartiennent à de nombreuses lignées microbiennes distinctes, dont la fonction environnementale, la niche écologique et l'écophysiologie nous échappent encore. D'autres approches, visant à comprendre le rôle écologique de ces microorganismes présents, consistent à rechercher des gènes codant des protéines clés intervenant dans les

processus métaboliques, ou gènes de fonctions. La présence d'un gène de fonction permet ainsi de détecter la présence de microorganismes possédant cette fonction et d'émettre des hypothèses quant aux fonctions métaboliques des organismes incultivés. De même, l'incorporation et le suivi de substrats isotopiques, ou le séquençage de parties entières de génomes environnementaux ont ainsi pu révéler certaines particularités métaboliques de quelques microorganismes tels que les symbiontes obligatoires d'animaux marins (Woyke et al., 2006). La quantification par PCR quantitative du nombre de copies des gènes cibles présents dans les échantillons ainsi que l'observation et le dénombrement *ex situ* de microorganismes spécifiques grâce à l'utilisation de sondes moléculaires fluorescentes (Fluorescent *in situ* hybridization, FISH) permettent une identification des niches écologiques et une localisation précise des espèces microbiennes au sein des échantillons reflétant généralement des besoins ou des restrictions environnementales particulières. De plus, la visualisation par fluorescence permet également d'observer la morphologie et les éventuelles interactions entre les microorganismes et donne ainsi une indication quant à leur mode de vie. La compréhension des écosystèmes ainsi que l'identification des acteurs microbiens impliqués nécessite donc des approches variées et complémentaires.

2) Les lignées bactériennes incultivées des sédiments marins

Les microorganismes affiliés au domaine *Bacteria* représentent généralement la composante microbienne majeure dans les sédiments marins avec des concentrations cellulaires supérieures à 10^9 cellules par gramme de sédiment en surface (Knittel et al., 2003; Knittel and Boetius, 2009). Cette abondance cellulaire élevée reflète une grande diversité taxonomique et fonctionnelle répartie selon les gradients géochimiques et la disponibilité en accepteurs d'électrons. Si certains groupes phylogénétiques possèdent des représentants cultivés, l'utilisation des outils de biologie moléculaire, basés sur le marqueur phylogénétique ARNr 16S, a largement étendu la diversité bactérienne des environnements sédimentaires marins. Au début des années 2000, 52 lignées bactériennes étaient répertoriées et la moitié seulement possédait un représentant cultivé (Rappé and Giovannoni, 2003). Si les études des gènes de fonction et de génomes entiers ont permis d'inférer certaines fonctions métaboliques à quelques lignées bactériennes incultivées, de nombreux groupes phylogénétiques restent méconnus. Ces groupes taxonomiques détectés, aux métabolismes inconnus, sont répertoriés sous différentes "Divisions candidates" (OP11, OD1, JS1, WS6 ...). Les principaux groupes bactériens incultivés et

détectés dans les sédiments marins profonds ou associés aux zones d'émission de fluides froids sont présentés, à travers une liste non exhaustive, dans les paragraphes suivants.

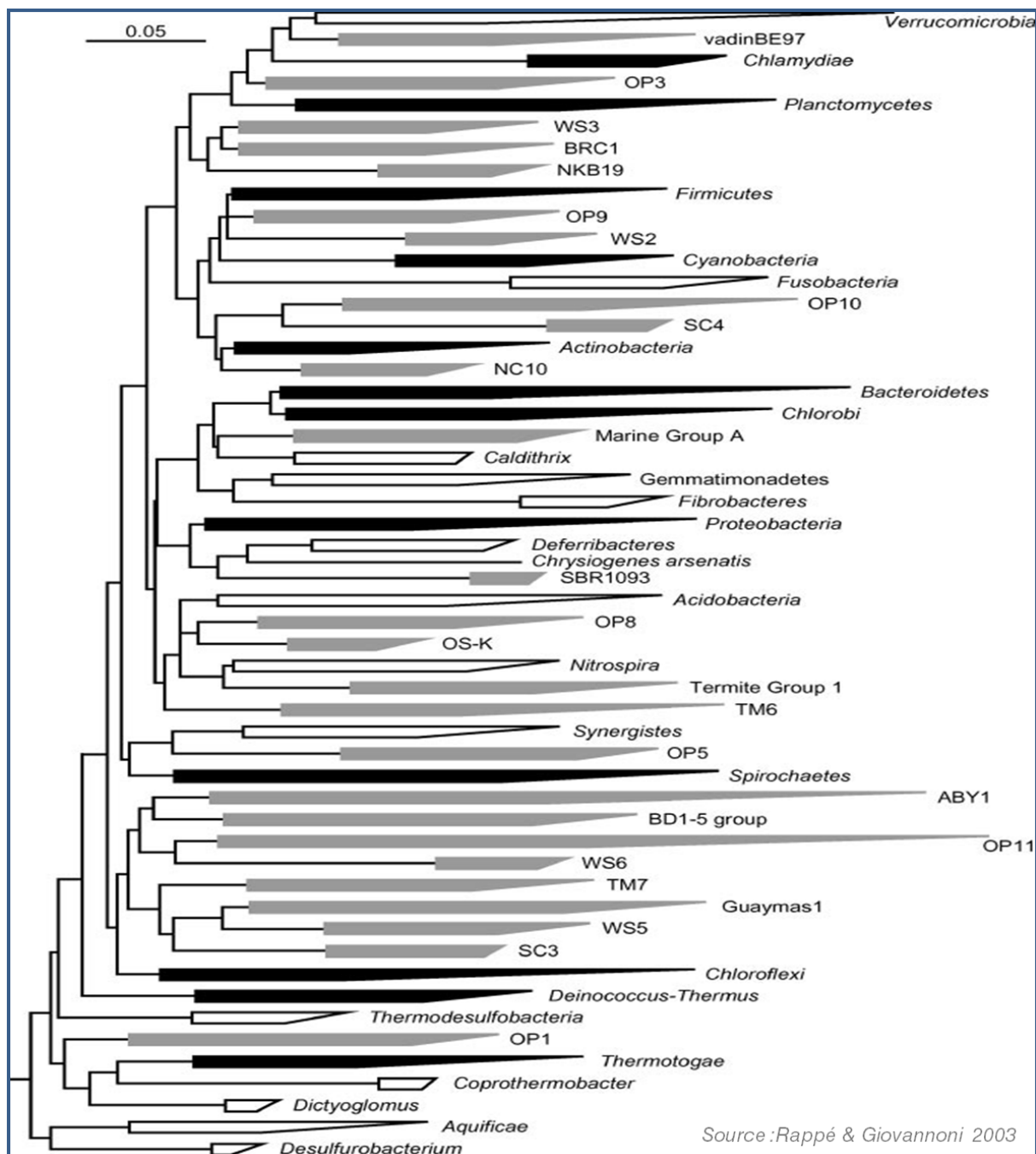


Figure 9 : Arbre phylogénétique des principaux groupes bactériens, basé sur l'analyse du gène de l'ARNr 16S. En gris sont figurés les 26 lignées bactériennes sans représentants cultivés.

a) Les Proteobacteria

Les *Proteobacteria* représentent un groupe bactérien phylogénétiquement et physiologiquement divers. Le groupe des *Proteobacteria* est subdivisé en différents sous-groupes selon leurs caractéristiques génétiques. On distingue, à l'heure actuelle, 6 sous-groupes de *Proteobacteria*: les *Alpha-proteobacteria*, *Beta-Proteobacteria*, *Gamma-Proteobacteria*, *Delta-Proteobacteria*, *Epsilon-Proteobacteria* (Stackebrandt et al., 1988) et dernièrement les *Zeta-Proteobacteria* (Emerson et al., 2007). Ces bactéries présentent des métabolismes variés qui leur permettent de coloniser de nombreux environnements. Seul des membres appartenant aux *Gamma-*, *Epsilon-* et *Delta-Proteobacteria* sont classiquement observés dans les sédiments marins associés aux émissions de fluides froids (Pachiadaki et al., 2011). Les *Proteobacteria* sont très rarement détectées dans les sédiments profonds pauvres en matière organique. Les *Zeta-Proteobacteria* forment une nouvelle division au sein des *Proteobacteria* et semblent être impliquées dans l'oxydation des composés ferreux (Emerson et al., 2007). Ce groupe reste néanmoins fortement minoritaire dans les inventaires moléculaires et ne sera pas abordé par la suite.

❖ Les Epsilon-Proteobacteria

Les *Epsilon-Proteobacteria*, identifiées dans les sédiments marins, sont généralement des autotrophes aérobies associées avec la macrofaune de surface et phylogénétiquement affiliées au genre *Sulfurovum*. Ces bactéries seraient capables d'oxyder les sulfures ou le thiosulfate présent dans les fluides (Yamamoto et al., 2010).

❖ Les Gamma-Proteobacteria

Les *Gamma-Proteobacteria* sont morphologiquement et physiologiquement très diverses. Les principaux groupes de *Gamma-Proteobacteria* détectés dans les sédiments associés aux sorties de fluides sont soit autotrophes microaérophiles oxydant différents composés, soit impliqués dans la dégradation des hydrocarbures (Head and Swannell, 1999; Conrad, 2009). On retrouve parmi les *Gamma-Proteobacteria* certains méthanotrophes aérobies qui peuvent être associés en symbiose à la macrofaune de surface (Duperron et al., 2005), mais également des bactéries géantes filamenteuses affiliées à l'ordre des *Thiotrichales* formant des tapis microbiens colorés (Crepeau et al., 2011; Grünke et al., 2011; McKay et al., 2012). Les *Thiotrichales*, des genres *Beggiatoa* et *Thiotrix*, sont des bactéries autotrophes sulfo-oxydantes se développant au niveau des sorties de fluides riches en sulfures et capables de se mouvoir dans le sédiment pour y

puiser les sulfures (Grünke et al., 2011). Leur présence sur les fonds océaniques constitue donc un excellent indicateur visuel de sorties de fluides riches en sulfures. Malgré de nombreux efforts, très peu de représentants des *Beggiatoa* ont été cultivés. La couleur des tapis formés par ces bactéries filamenteuses sulfo-oxydantes pourrait être expliquée par la présence de granules de soufre dans leur cytoplasme. Cependant, une récente étude a démontré qu'il existerait un lien entre la couleur des filaments et leur affiliation phylogénétique (McKay et al., 2012).

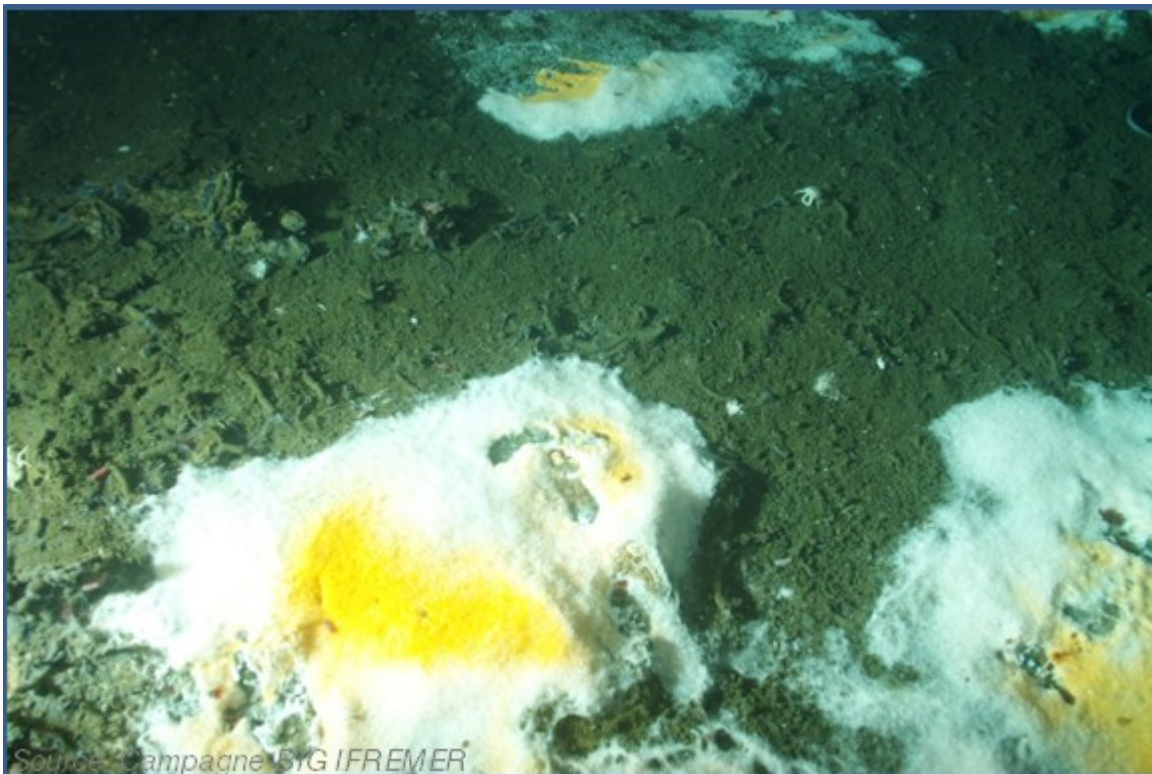


Figure 10 : Photographie des tapis microbiens présents au niveau des sources d'émissions de fluides du Bassin de Guaymas (Campagne Ifremer "BIG" 2010).

❖ Les Delta-Proteobacteria

Les *Delta-Proteobacteria* représentent un groupe important dans les environnements riches en hydrocarbures et en sulfate. De ce fait, les *Delta-Proteobacteria* sont fréquemment retrouvées métaboliquement actives au niveau des zones de sorties de fluides. De nombreux sous-groupes de *Delta-Proteobacteria*, regroupés au sein de deux familles : les *Desulfobacteriaceae* et les *Desulfobulbaceae*, ont été détectés dans les sédiments associés aux zones d'émissions de fluides froids (Schreiber et al., 2010; Kleindienst et al., 2012). Ces bactéries, impliquées dans la réduction de composés soufrés,

peuvent également intervenir dans la dégradation des hydrocarbures en condition anaérobie (Dhillon et al., 2003; Kleindienst et al., 2012). Actuellement, quatre lignées de *Delta-Proteobacteria* ont été observées associées à l'oxydation anaérobie du méthane en consortia avec les ANMEs : les SEEP SRB1a, affiliées au groupe des *Desulfosarcina/Desulfococcus* (DSS) et à la famille des *Desulfobacteraceae*, les deux groupes de *Desulfobulbus* (DBB), affiliés à la famille des *Desulfobulbaceae* et récemment le groupe des SEEP SRB2 (Knittel et al., 2003; Schreiber et al., 2010; Kleindienst et al., 2012). Certaines *Delta-Proteobacteria* seraient également capables de disproportionation du soufre élémentaire et d'autres de comproportionation du sulfate et du sulfure (Milucka, 2011). Les métabolismes précis des *Delta-Proteobacteria* restent méconnus et ces bactéries semblent présenter une flexibilité métabolique importante, centrée sur la réduction du sulfate selon les ressources environnementales.

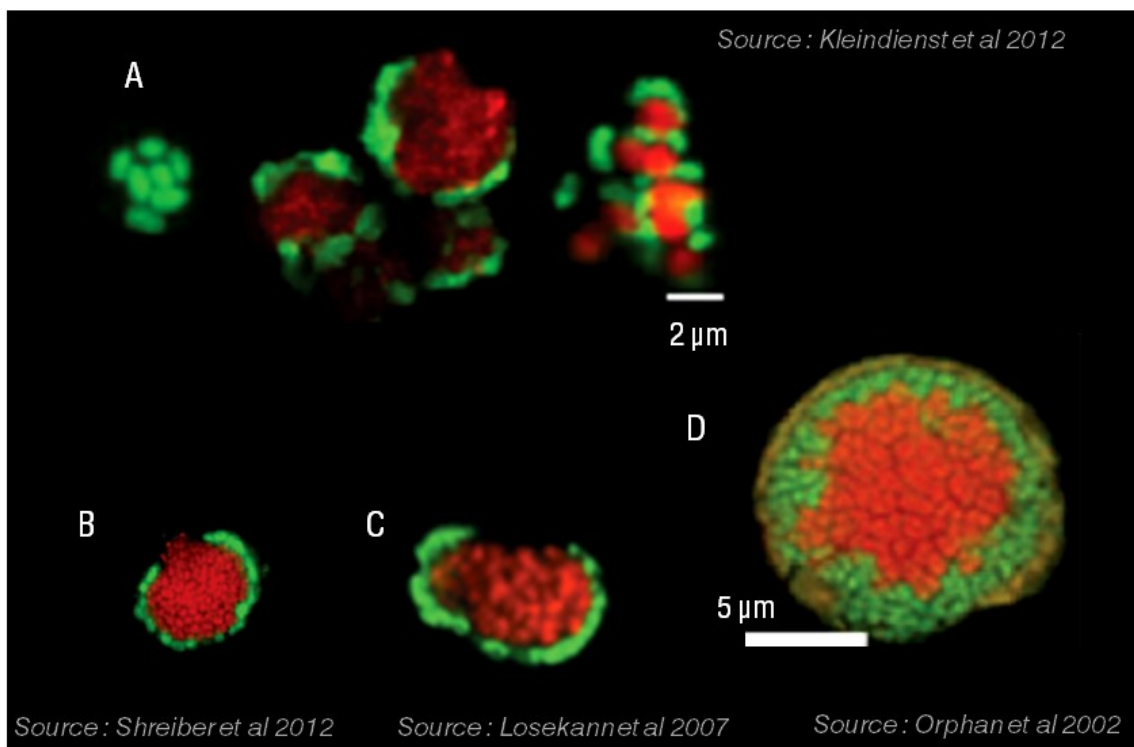


Figure 11 : Observation par la technique de FISH de différents groupes de *Delta-Proteobacteria* : A) amas monospécifique de SEEP SRB-2, ou en agrégats avec des archées ANME en rouge. B) SEEP SRB-1 en vert, associées à des archées ANME en rouge. C) *Desulfobulbus*, en vert, associées aux ANMEs D) *Desulfosarcina/Desulfococcus* *Delta-Proteobacteria*, en vert, associées à des archées ANME en rouge.

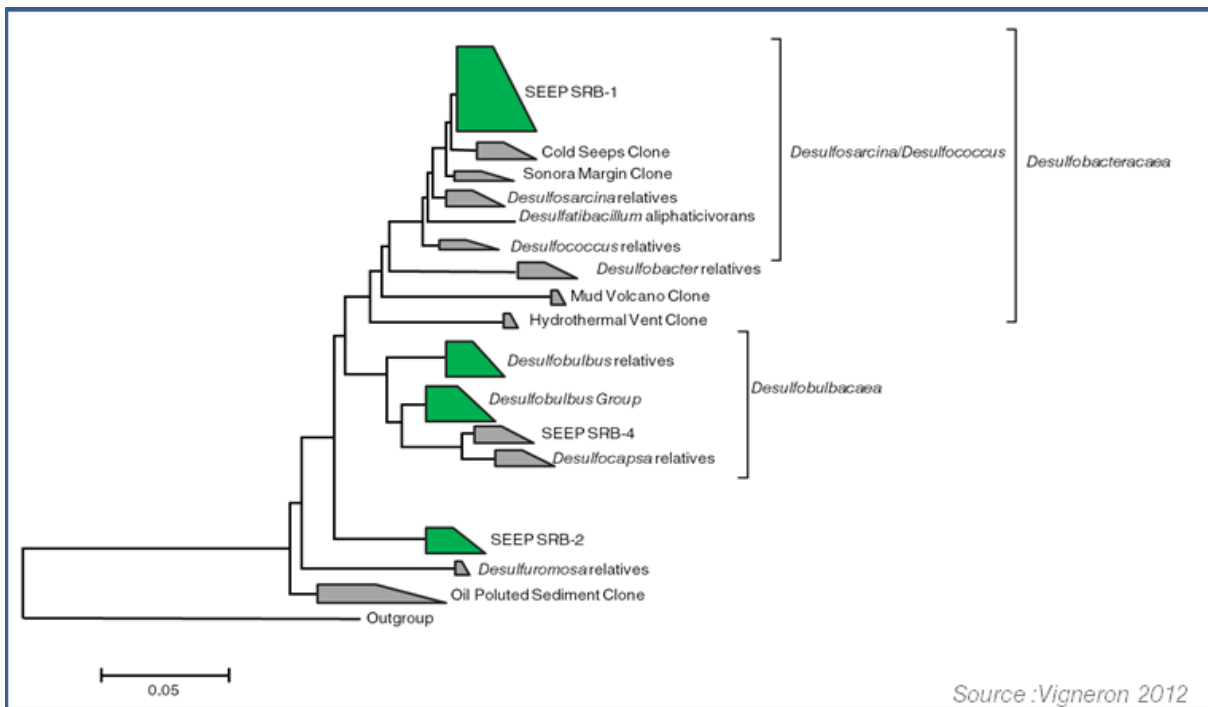


Figure 12 : Arbre phylogénétique des principaux groupes de *Delta-Proteobacteria*, basé sur l'analyse du gène de l'ARNr 16S. Les groupes observés dans les consortia impliqués dans l'oxydation anaérobie du méthane apparaissent en vert.

b) Les *Chloroflexi*

Les *Chloroflexi*, aussi connues sous le nom de bactéries vertes non sulfureuses, constituent, d'après la séquence génétique de leur ARNr 16S, un groupe phylogénétiquement ancien au sein du domaine des *Bacteria* et présentent une forte diversité métabolique et phénotypique (Rappé and Giovannoni, 2003). Les *Chloroflexi* sont divisées en sous-groupes, dont certains possèdent des représentants cultivés. Ainsi, les membres du subphylum des *Chloroflexus* sont des phototrophes aérobies, alors que les *Chloroflexi* du subphylum IV sont des bactéries filamenteuses anaérobies des environnements riches en matière organique, s'agglutinant autour de la matière organique en flocculats (Bjornsson et al., 2002; Kragelund et al., 2007). En revanche, les *Chloroflexi* membres du subphylum III et affiliées aux *Dehalococcoidetes*, apparaissent sous forme de petites coques anaérobies, capables de dégrader des composés chlorés (Löffler et al., 2012). Les *Chloroflexi* sont fréquemment observées dans les sédiments marins profonds, les subphylums III et IV seraient d'ailleurs majoritaires dans ces environnements (Inagaki et al., 2006; Reed et al., 2006; Webster et al., 2007; Durbin and Teske, 2011).

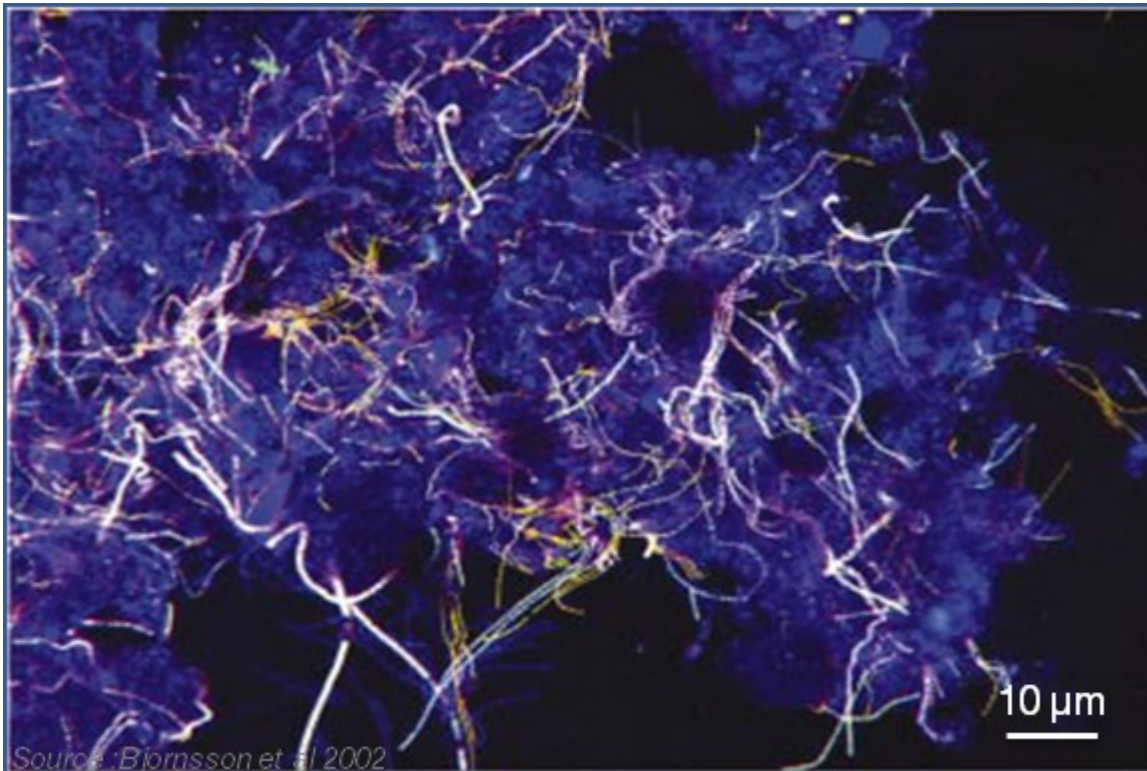


Figure 13 : Observation des *Chloroflexi* filamenteuses en flocculats autour de la matière organique par la technique FISH.

c) Les *Bacteroidetes*

Le groupe des *Bacteroidetes* rassemble de nombreux genres bactériens (*Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Bacteroidetes*, *Cytophaga*). Ce sont des chimioorganotrophes connus pour dégrader la matière organique dans de nombreux environnements et notamment dans l'eau de mer (Stevens et al., 2005b). Les *Bacteroidetes* semblent être impliquées dans la dégradation de nombreux composés provenant des apports de surface tels que la cellulose, la chitine ou d'autres polymères (Kirchman, 2002; Stevens et al., 2005b).

d) Les *Verrucomicrobia*

Les *Verrucomicrobia*, communément détectées dans les sols (Sangwan et al., 2005), sont généralement faiblement représentées dans les sédiments marins (Freitas et al., 2012). Le phylum des *Verrucomicrobia* est subdivisé en cinq groupes phylogénétiques distincts, dont trois ne possèdent pas de représentant cultivé (Rappé and Giovannoni, 2003). En 2007, une nouvelle espèce de *Verrucomicrobia*, *Acidimethylosilex fumarolicum*,

capable de méthanotrophie aérobie à pH extrêmement bas et haute température a été identifiée (Pol et al., 2007). Cependant, la plupart des séquences détectées dans les environnements marins associés aux émissions de fluides froids appartiennent au groupe 5 qui ne comporte pas de représentant cultivé (Rappé and Giovannoni, 2003). Enfin, certains membres des *Verrucomicrobia* pourraient être impliqués dans la dégradation de divers polysaccharides issus des débris d'algues marines (Martinez-Garcia et al., 2012).

e) *Les Planctomycetes*

Les *Planctomycetes* représentent un groupe répandu dans de nombreux environnements (sols, sédiments, eaux douces, eaux salées, environnement hydrothermal)(Wagner and Horn, 2006). Les *Planctomycetes* sont répartis en 4 genres: *Pirellula*, *Planctomyces*, *Isosphaera* et *Gemmata* (Rappé and Giovannoni, 2003). Les *Planctomycetes* ont la particularité de présenter des structures intracellulaires, tel que l'anammoxosome, compartimentant la bactérie (Fuerst, 2005). La fonction écologique des *Planctomycetes* reste méconnue. Néanmoins, certaines *Planctomycetes*, voisines du groupe des *Pirellula*, sont capables de réaliser l'oxydation anaérobie de l'ammonium (Anammox) dans divers environnements (Schmid et al., 2000; Jetten et al., 2003; Strous et al., 2006; Byrne et al., 2009).

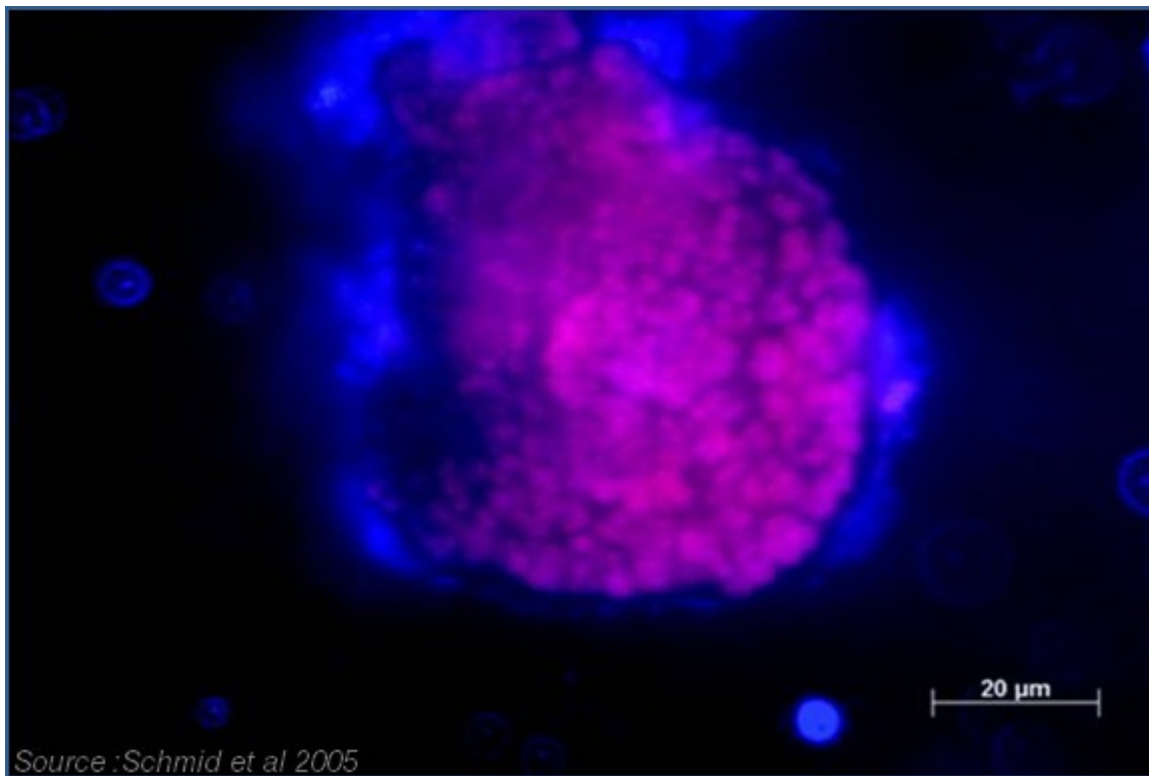


Figure 14 : Observation des *Planctomycetes Anammox* (violet) par la technique de FISH

f) *Les divisions candidates*

De nombreuses séquences affiliées à des "divisions candidates" ont été détectées dans les sédiments marins (Dojka et al., 2000; Rappé and Giovannoni, 2003; Harris et al., 2004; Webster et al., 2004). Leur rôle environnemental, leur niche écologique et leur physiologie sont généralement inconnus. Ces groupes ont été définis à partir de l'identification de séquences de l'ARNr 16S inédites. Parmi les divisions candidates présentes dans les sédiments marins, la division candidate JS1 a été observée pour la première fois dans les sédiments profonds de la mer du Japon (Rochelle et al., 1994). Les JS1 ont depuis été détectées dans de nombreux environnements marins, au niveau des sources hydrothermales, dans les sédiments associés aux émissions de fluides froids, ainsi que les sédiments côtiers et profonds (Webster et al., 2004; Webster et al., 2007; Webster et al., 2009; Biddle et al., 2012). Malgré de nombreuses études rapportant la présence et l'activité métabolique des JS1, leur écophysiologie reste méconnue. Les JS1 semblent être anaérobies strictes et préféreraient les environnements fortement réduits. Des enrichissements de JS1 ont suggéré une utilisation de l'acétate ou un rôle dans la dégradation de la matière organique dans les environnements riches en sulfures mais

aucune culture n'est actuellement disponible pour nous renseigner sur la fonction environnementale de ces divisions candidates (Phelps et al., 1998; Webster et al., 2004). Une autre division candidate particulièrement intéressante est le groupe NC10, qui, de part leurs séquences d'ARNr 16S divergentes, échappent fréquemment aux inventaires moléculaires. Les NC10, ou *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* seraient capables de réaliser l'oxydation anaérobie du méthane couplée à la réduction des nitrates (Raghoebarsing et al., 2006; Ettwig et al., 2009). Le processus métabolique de ces bactéries a récemment été découvert après l'analyse de leur génome. Les NC10 réduiraient les nitrites et nitrates pour produire de l'oxygène intracellulaire qui permettrait par la suite l'oxydation du méthane (Ettwig et al., 2010). Ce processus inédit, initialement observé dans les eaux souterraines polluées par les nitrates, a également été observé dans des sédiments anoxiques lacustres et marins.

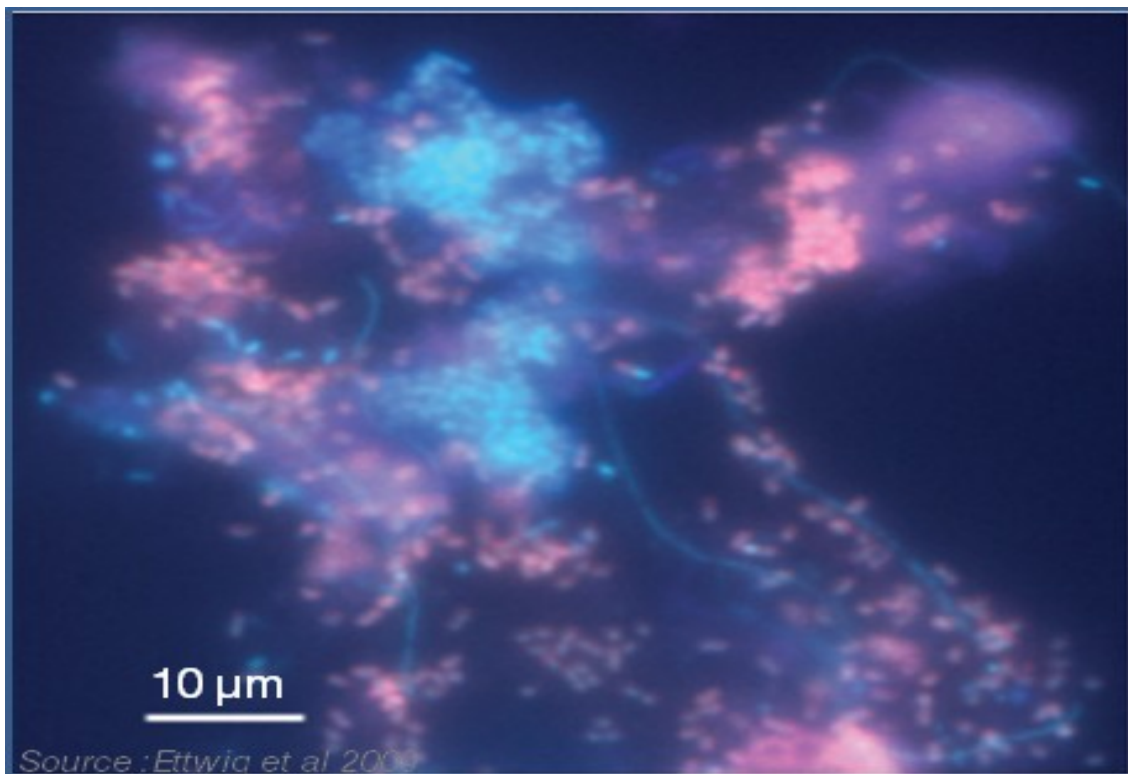


Figure 15 : Observation des bactéries NC10 (rose) par la technique de FISH.

3) Les archées incultivées des sédiments marins

De part les caractéristiques physiologiques et métaboliques des premières espèces isolées, les archées (ou archaeobactéries) ont longtemps été considérées comme

spécifiques des milieux extrêmes. Cependant, la multiplication des études de diversité microbienne a conduit à étendre de plus en plus leurs habitats (DeLong and Pace, 2001). Très peu d'archées des sédiments marins ont été isolées et cultivées. De ce fait, les fonctions assumées et les métabolismes associés à ces microorganismes restent encore méconnus. La plupart des archées isolées et cultivées issues des sédiments marins des zones d'émissions de fluides froids sont des méthanogènes. Cependant, elles ne représentent qu'une faible fraction de la biomasse archéenne des sédiments marins (DeLong and Pace, 2001). Cette biomasse archéenne, généralement inférieure à la biomasse bactérienne (0.01~30% (Inagaki et al., 2006)) représente néanmoins une composante microbienne importante dans les sédiments marins des zones de suintements froids (Knittel et al., 2005). En effet, les quantifications par PCR quantitative et les comptages cellulaires estiment la concentration d'archées à environ 10^7 cellules par gramme de sédiment. Les concentrations en archées sont nettement moins élevées au niveau des planchers océaniques avec des valeurs proches de 10^5 cellules par millilitre de sédiment (DeLong et al., 1999). Les principaux groupes d'archées incultivées détectés dans les sédiments marins froids sont présentés, à travers une liste non descriptive, dans les paragraphes suivants.

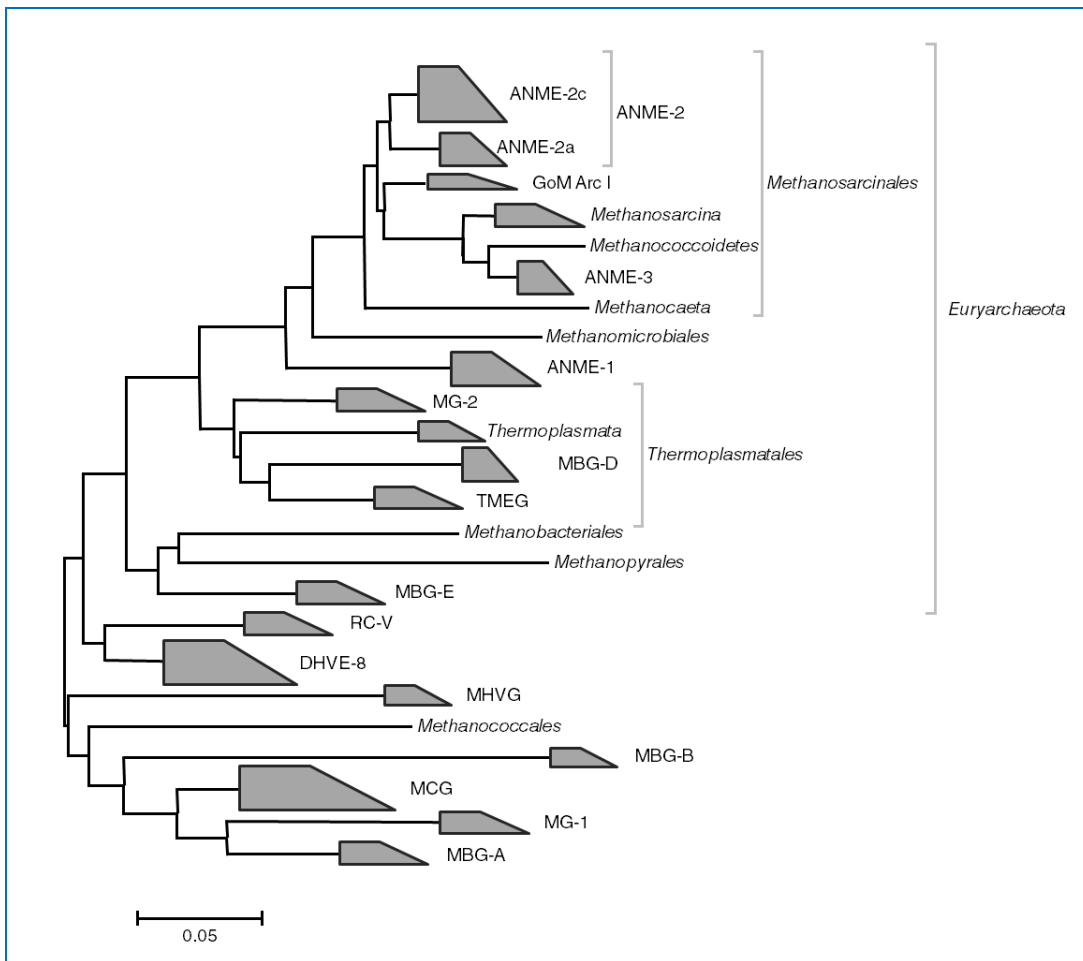


Figure 16 : Arbre phylogénétique des archées incultivées des sédiments marins froids, basé sur l'analyse du gène de l'ARNr 16S.

a) ANME-1

Les archées "ANAerobic MEthanotrophs" ANME-1, phylogénétiquement proches des *Methanomicrobiales*, ont été observées dans de nombreux habitats de suintements froids (Orphan et al., 2002; Knittel et al., 2005; Lloyd et al., 2006; Lloyd et al., 2010b; Pachiadaki et al., 2010; Lazar et al., 2011; Lloyd et al., 2011; Pachiadaki et al., 2011; Yanagawa et al., 2011; Maignien et al., 2012) et sont généralement associées à l'oxydation anaérobie du méthane par un processus de méthanogénèse inverse dans les environnements anoxiques et fortement réduits (Biddle et al., 2012). Cependant, la fonction écologique des ANME-1 reste actuellement débattue. En effet, l'oxydation anaérobie du méthane est un processus généralement observé en partenariat avec la réduction d'accepteurs d'électrons, tel que le sulfate, générant la formation d'agrégats et de consortia. Si les ANME-1 ont été observées

en agrégats avec des bactéries sulfato réductrices (Orphan et al., 2002; Orcutt et al., 2005; Maignien et al., 2012), elles ont également été observées sans partenaire ou en amas monospécifiques (Orphan et al., 2002; Knittel et al., 2005; Niemann et al., 2006; Omoregie et al., 2008). La présence de ces amas d'ANME-1, dans des horizons sédimentaires présentant des activités de production de méthane, a conduit à l'hypothèse d'une activité de méthanogénèse pour les ANME-1 (Lloyd et al., 2011). Il serait également possible que le métabolisme des ANME-1 repose sur un processus d'oxydation anaérobie du méthane indépendant de bactéries sulfato-réductrices et mettant en œuvre des voies métaboliques particulières. Enfin, la présence de gènes impliqués dans l'assimilation du sulfate a également été observée dans le génome des ANME-1 sans toutefois pouvoir déterminer si cette voie métabolique était fonctionnelle (Meyerdierks et al., 2010).

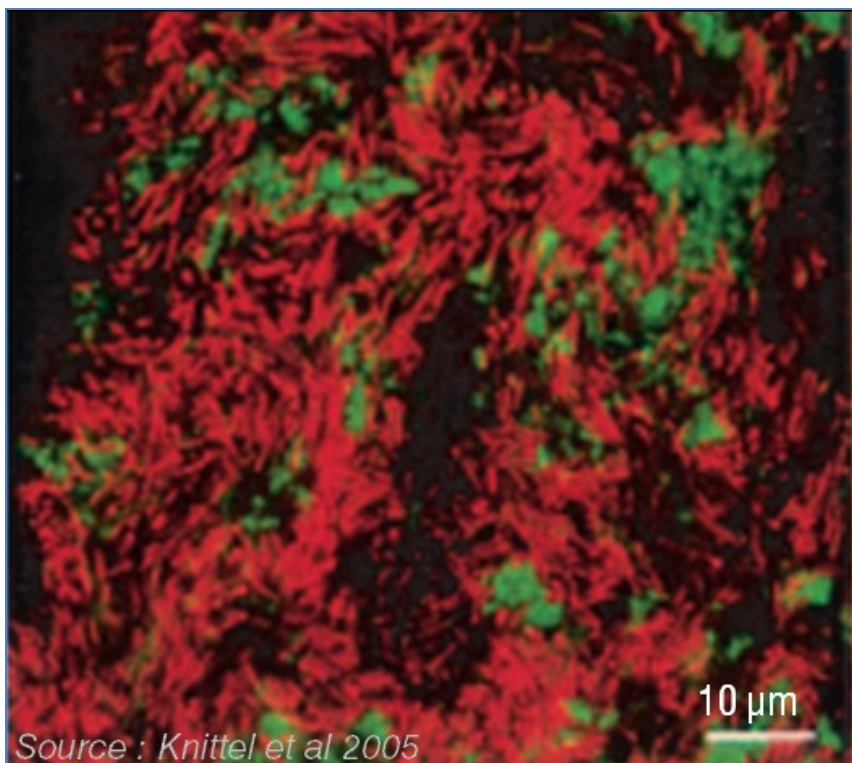


Figure 17 : Observation des archées ANME-1 (rouge) par la technique de FISH.

b) ANME-2

Les archées ANME-2 appartiennent au groupe des *Methanosarcinales*, elles ont été détectées au niveau des zones de sorties de fluides et semblent coloniser préférentiellement les horizons sédimentaires supérieurs, malgré un métabolisme strictement anaérobie. Les études portant sur l'ARN ribosomal 16S, subdivisent les ANME-

2 en plusieurs sous-groupes (ANME-2a, ANME-2b, ANME-2c) mais leur fonction d'oxydation anaérobie du méthane semble être confirmée (Orphan et al., 2001; Orphan et al., 2002). Les ANME-2 semblent oxyder le méthane au sein d'agrégats structurés où elles sont associées avec des bactéries leur fournissant un pouvoir réducteur (Knittel and Boetius, 2009). Ce sont généralement des bactéries sulfato-réductrices, même si d'autres bactéries, non identifiées pour le moment, ont également pu être observées au sein de ces consortia (Pernthaler et al., 2008). Les ANME-2, observées dans des environnements riches en sulfate pourraient également fixer le diazote et le transférer à leurs partenaires bactériens (Dekas et al., 2009).

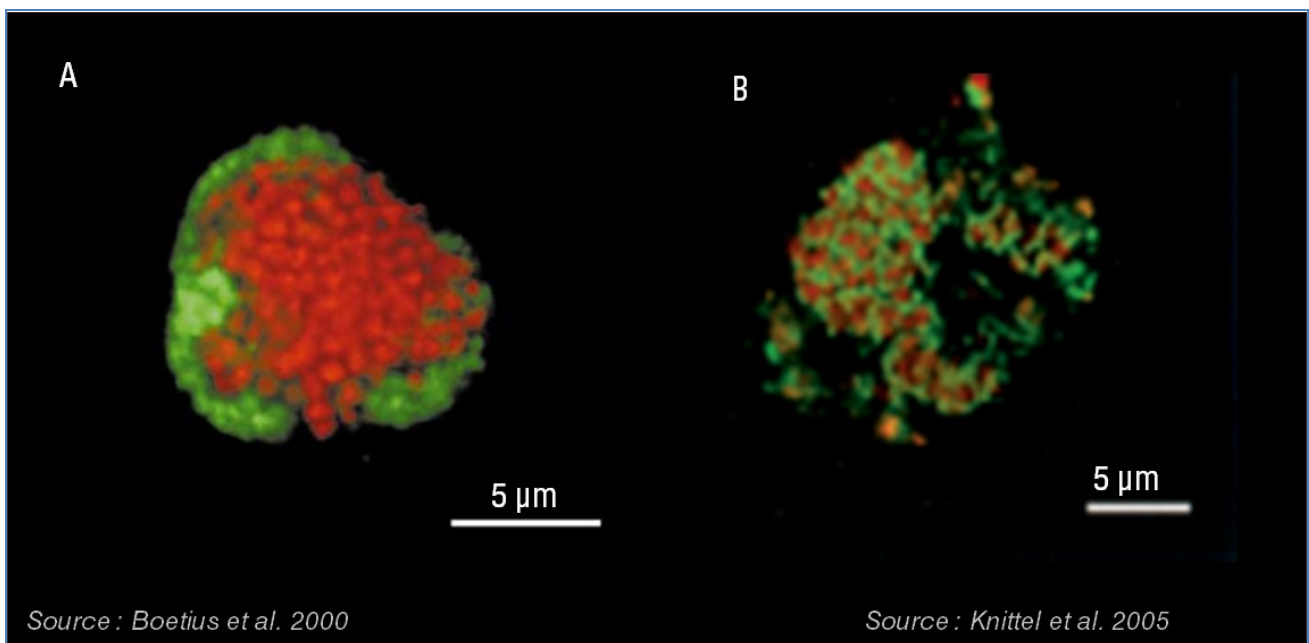


Figure 18 : Observation des archées ANME-2 (rouge) par la technique de FISH. A) ANME-2c B) ANME-2a.

c) ANME-3

Les ANME-3 appartiennent également au groupe des *Methanosarcinales* et sont phylogénétiquement proches du groupe de méthanogènes *Methanococcoïdes*. Les ANME-3 ont initialement été observées dans les sédiments du volcan de boue Haakon Mosby (Mer de Norvège), formant des agrégats d'apparences similaires à ceux formés par les ANME-2 avec des bactéries sulfato-réductrices (Niemann et al., 2006; Losekann et al., 2007). Un rôle d'oxydation anaérobie du méthane a donc été suggéré. Cependant, d'autres

études ont détecté les ANME-3 en amas monospécifiques ou sous forme de cellules isolées dans les sédiments du delta profond du Nil (Mer Méditerranée) (Omoregie et al., 2008). Ainsi, l'écophysiologie des ANME-3 reste discutée. Néanmoins, il semblerait que la distribution des ANME-3, dans les sédiments de la Mer de Norvège comme de la Mer Méditerranée, soit limitée aux zones sous-jacentes aux sédiments de surface.

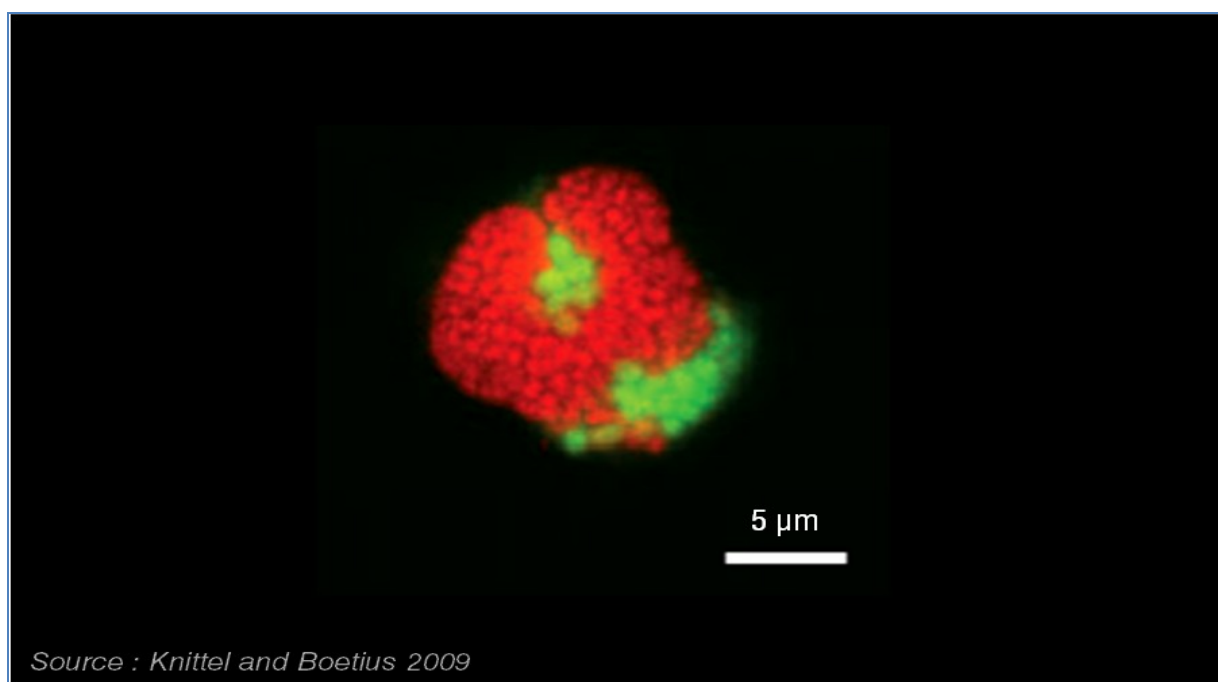


Figure 19 : Observation des archées ANME-3 (rouge) par la technique de FISH.

Ces trois lignées de méthanotrophes anaérobies ont été retrouvées dans de nombreuses zones d'émissions de fluides froids (Knittel and Boetius, 2009). Cependant, les trois groupes d'ANMEs ont uniquement été détectés simultanément dans les sédiments de 6 sites étudiés parmi les 42 recensés en 2009 : les volcans de boue de "Amsterdam" (Mer Méditerranée) et "Haakon Mosby" (Mer de Norvège), le bassin sédimentaire de l'Eel River (Océan Pacifique) et du Golfe du Mexique, les sédiments de la marge de Cascadia (Océan Pacifique) et de la fosse de Nankai (Mer du Japon). Cela suggèrerait des besoins environnementaux différents pour ces lignées d'ANMEs, peu fréquents dans les sédiments marins associés aux sorties de fluides froids (Knittel and Boetius, 2009).

d) GoM Arc 1

Les GoM Arc I, anciennement appelées ANME-2d, constituent un nouveau groupe d'archées récemment décrit. Détectées au niveau des suintements froids du Golfe du Mexique et dans le Golfe de Cadiz (Mills et al., 2004; Lloyd et al., 2006), elles sont phylogénétiquement affiliées aux *Methanosarcinales* et proches des ANME-2. Aucune fonction environnementale n'a pour le moment été proposée même si leur position phylogénétique suggèrerait une implication dans le cycle du méthane (Lloyd et al., 2006).

e) MBG-E

Le groupe des "Marine Benthic Group E" est un groupe monophylétique appartenant au phylum des *Euryarchaeota* (Vetriani et al., 2003). Il représente généralement une composante mineure des inventaires moléculaires et aucune étude ne lui a été consacrée spécifiquement. Les membres du MBG-E sont toutefois détectés dans les sédiments de zones non actives, tel que les sédiments du plancher océanique de la Mer de Chine (Wang, 2010). Le rôle écologique des membres du MBG-E reste donc inconnu mais leur présence dans certains sédiments profonds, riches en composés ferreux (Suzuki et al., 2004), suggèrerait que ces microorganismes pourraient avoir un métabolisme basé sur l'oxydation du fer (Takai, 2010).

f) MBG-D

Les "Marine Benthic Group D", phylogénétiquement proches des *Thermoplasmatales* et membres du phylum des *Euryarchaeota*, ont été détectées dans de nombreux sédiments de suintements froids ainsi qu'en concentrations importantes dans les sédiments marins et lacustres profonds (Teske and Sorensen, 2008). Plusieurs études ont proposé une affinité particulière des MBG-D pour les sédiments à forte salinité sans toutefois limiter leur distribution aux sédiments marins hypersalés (Lloyd et al., 2006; Omoregie et al., 2008; Lazar et al., 2011). Leur fonction environnementale est actuellement discutée. Leur activité métabolique dans des sédiments (Biddle et al., 2006) ainsi que dans des enrichissements (Beal et al., 2009) présentant une activité d'oxydation anaérobie du méthane suggèrerait une implication directe (par oxydation dissimilatrice) ou indirecte, dans le processus d'AOM (Biddle et al., 2006). Cependant, leur détection dans d'autres

environnements pauvres en méthane indiquerait plutôt un métabolisme basé sur la dégradation de la matière organique ou des cellules mortes (Borrel et al., 2012).

g) TMEG

Les archées membres du "Terrestrial Miscellaneous Euryarcheotal Group" ont initialement été détectées dans les eaux anoxiques des mines terrestres d'Afrique du Sud (Takai et al., 2001b). Cependant, la présence de ce groupe a également été signalée dans divers environnements dont les sédiments marins riches en matière organique et méthane. Ce groupe phylogénétiquement proche des MBGD et MG-II appartient aux *Thermoplasmatales* et représente généralement une minorité des archées dans les inventaires moléculaires (Teske and Sorensen, 2008).

h) SAGMEG

Les membres du "South African Goldmine Euryarchaeotal Group" ont été détectés dans les eaux anoxiques des mines terrestres profondes d'Afrique du Sud (Takai et al., 2001b). Par la suite, des membres du SAGMEG, métaboliquement actifs, ont été observés dans de nombreux sédiments marins profonds riches en méthane (Inagaki et al., 2003; Parkes et al., 2005; Biddle et al., 2006; Inagaki et al., 2006; Reed et al., 2006; Teske, 2006). Leur fonction environnementale reste méconnue mais leur activité métabolique dans les environnements riches en méthane pourrait suggérer une implication dans le cycle du méthane.

i) MBG-B

Les membres du "Marine Benthic Group B" aussi connus sous l'appellation de "Deep Sea Archaeal Group" (DSAG) ont été observés en fortes concentrations dans un grand nombre d'échantillons marins anoxiques caractérisés par de faibles densités cellulaires (Inagaki et al., 2003; Biddle et al., 2006; Sorensen and Teske, 2006). Les MBG-B présentent une morphologie de cellule en coque de très petite taille (0,3 μm) (Knittel et al., 2005). Le métabolisme des MBG-B reste méconnu. Comme pour les MBG-D, leur présence et leur activité au niveau de sédiments présentant des activités d'AOM

suggéreraient une implication directe ou indirecte dans le processus. Un rôle dans le métabolisme du soufre a également été proposé (Tourova et al., 2002). Cependant, aucune preuve n'est pour l'instant disponible (Biddle et al., 2006). Leur présence et leur activité dans de nombreux échantillons dépourvus de méthane pourraient suggérer un autre métabolisme.

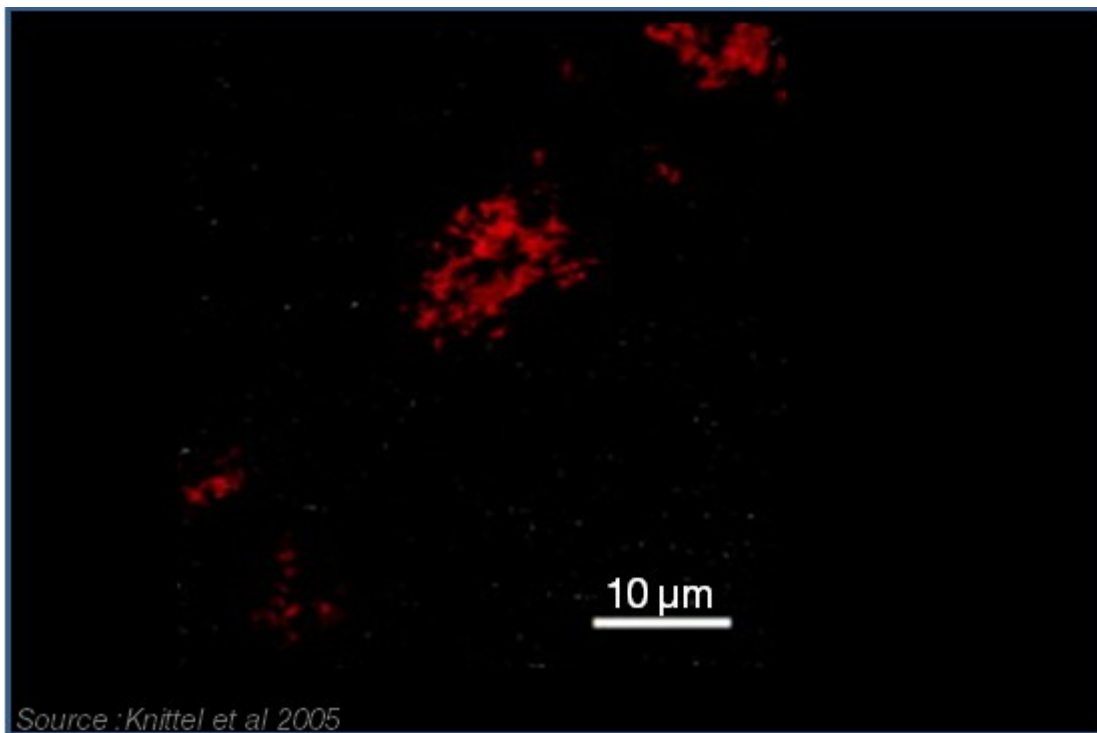


Figure 20 : Observation des MBGB par la technique de FISH.

i) MHVG

Les archées du "Marine Hydrothermal Vent Group", ont été détectées principalement dans des environnements hydrothermaux tel que les cheminés hydrothermaux du bassin de Manus (Nouvelle Guinée) (Takai et al., 2001a) ou encore au niveau de la ride médio-atlantique (Perner et al., 2007). L'analyse de la composition nucléotidique de la séquence de l'ARNr 16S a suggéré une température optimale de croissance proche de 88°C, suggérant une origine hydrothermale des MHVG (Kato, 2010). Cependant des séquences affiliées aux MHVG ont également été détectées dans des sédiments froids de sub-surface de la Mer d'Okhotsk (Inagaki et al., 2003; Dang et al., 2010), suggérant l'existence de différentes lignées de MHVG. Cependant, très peu d'études ont rapporté la présence des

MHVG, de ce fait, leur rôle ainsi que leur distribution au sein des sédiments restent très peu explorés (Takai and Horikoshi, 1999; Inagaki et al., 2003).

k) RC-V

Initialement, les représentants non cultivés du groupe "Rice Cluster V" ont été identifiés dans les sols anoxiques des rizières (Grosskopf et al., 1998). Les RC-V ont depuis été détectées dans de nombreux environnements tels que les eaux côtières (Galand et al., 2006) et les sédiments oxiques et anoxiques lacustres (Glissman et al., 2004). Des RC-V ont également été détectées métaboliquement actives dans les sédiments hypersalés riches en méthane (Lazar et al., 2011). Phylogénétiquement, les RC-V, proches du phylum des *Euryarchaeota*, présentent une forte diversité intra-spécifique, suggérant une flexibilité importante de métabolisme (Lazar, 2009). Un rôle dans la décomposition de la matière organique a été suggéré (Wu et al., 2002; Chin et al., 2004; Lazar et al., 2011).

l) DHVE-8

Les membres du "Deep-sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotal group 8", phylogénétiquement proches mais distincts des *Euryarchaeota*, ont initialement été identifiés au niveau de sources hydrothermales de l'océan Pacifique (Nercessian et al., 2003). D'autres études ont détecté la présence et l'activité métabolique des DHVE-8 dans les sédiments marins riches en hydrocarbures, associés aux sorties de fluides froids (Lloyd et al., 2010b). Le rôle écologique des DHVE-8 reste néanmoins méconnu.

m) MG-I

Les archées MG-I (Marine Group I), membres du phylum des *Thaumarchaeota*, sont fréquemment détectées au niveau des sédiments de surface des planchers océaniques (Durbin and Teske, 2011), dans les zones de basse température des écosystèmes hydrothermaux (Crepeau et al., 2011) ainsi que dans la colonne d'eau (Massana et al., 1997; DeLong, 2006; Alonso-Sáez et al., 2012). Les MG-I, dont deux espèces sont actuellement cultivées représentent la majorité du picoplancton procaryote (*Nitrosopumilus maritimus* et *Cenarchaeum symbiosum*). Ces membres cultivés des MG-I sont des archées

aérobies planctoniques autotrophes, présentant un métabolisme basé sur l'oxydation de l'ammonium en nitrite (Konneke et al., 2005). Cependant, d'autres membres du MG-I, regroupés dans les sous-groupes des MG- γ et δ , ont été détectés dans les sédiments marins anoxiques (Teske and Sorensen, 2008). Cette découverte suggèrerait l'existence de lignées de MG-I anaérobies au potentiel métabolique différent des représentants cultivés. Cette hypothèse a par la suite été démontrée *via* l'analyse de la composition carbonée des membranes lipidiques des MG-I (Ingalls et al., 2006) et le séquençage entier du génome de ces lignées (Alonso-Sáez et al., 2012). Certains membres des MG-I ont ainsi présenté un métabolisme mixotrophe, basé sur la dégradation de molécules d'urée (Martin-Cuadrado et al., 2008; Alonso-Sáez et al., 2012).

n) MG-II

Comme pour les "Marine Group I", les membres du "Marine Group II", affiliées au phylum des *Euryarchaeota*, ont été détectés à la fois dans la colonne d'eau et dans les sédiments marins profonds. Les MG-II représentent le deuxième groupe de picoplancton archéen en terme d'abondance dans les océans, derrière les MG-I. L'abondance des MG-II peut toutefois être plus importante, notamment au niveau des eaux de surface riches en matière organique (DeLong, 2006). Leur rôle écologique reste toutefois méconnu.

o) MBG-A

Les archées du "Marine Benthic Group A", phylogénétiquement proches des *Crenarchaeota* ont été retrouvées dans les sédiments marins froids (Vetriani et al., 2003). Les MBG-A sont généralement très minoritaires dans les inventaires moléculaires. La fonction écologique des MBG-A reste inconnue.

p) MCG

Le "Miscellaneous Crenarchaeotal Group" (MCG) a initialement été affilié au super phylum des *Crenarchaeota* (Inagaki et al., 2003). Cependant, de récentes études ont reclassé le groupe au sein du phylum des *Thaumarchaeota* (Kubo et al., 2012). Le rôle écologique des membres du MCG, morphologiquement identifiés comme de petites coques

au diamètre inférieur à 0,5 μm , reste méconnu. Une hypothèse d'oxydation dissimilatrice du méthane a été suggérée (Biddle et al., 2006). Cependant, de récentes études ont souligné le caractère quasi ubiquiste des MCG dans les sédiments marins anoxiques y compris dans des sédiments dépourvus de méthane (Teske and Sorensen, 2008; Kubo et al., 2012). Les sources de carbone et d'énergie utilisées par ces archées semblent donc être plus variées. Ces observations ont conduit à une révision de leur métabolisme supposé et à l'hypothèse d'un rôle dans la dégradation de la matière organique sédimenté (Kubo et al., 2012). Par ailleurs, de nombreuses séquences ont été affiliées aux MCG, et plusieurs sous-groupes ont été définis. Cette diversité phylogénétique pourrait suggérer une écophysiologie flexible ainsi qu'une large diversité métabolique (Kubo et al., 2012).

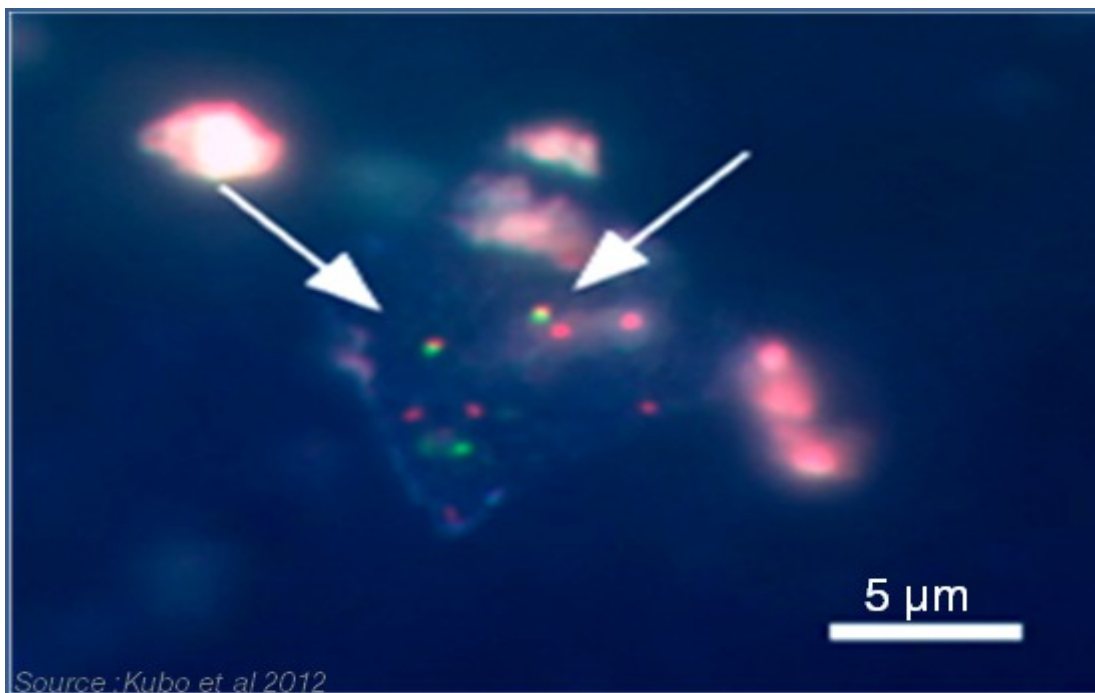


Figure 21 : Observation des archées appartenant au groupe des MCG par la technique de FISH.

Les environnements marins présentent ainsi une diversité conséquente de microorganismes méconnus aux fonctions environnementales variées, reposant sur les ressources disponibles dans ces milieux. Très peu de microorganismes des sédiments marins ont été cultivés. Les informations sur leur métabolisme ou leur écophysiologie proviennent en grande partie d'études moléculaires (gènes fonctionnels ou métagénomés). Celle-ci reposent principalement sur l'analyse des séquences génétiques

environnementales, bien que certaines études moléculaires soient également basées sur l'analyse de la composition lipidique des membranes microbiennes. Dans le cadre de ce travail de thèse, différentes techniques ont été mises au point afin d'accéder à l'identité, à la distribution, à la quantification ou encore à la visualisation de ces microorganismes. Les méthodes, perfectionnées et utilisées lors de ce travail de thèse, sont décrites dans le chapitre suivant de matériels et méthodes, après une présentation de l'échantillonnage réalisé au niveau des sites d'études de la marge de Sonora du bassin de Guaymas, lors de la campagne océanographique BIG en juin 2010.

III. MATRIELS ET METHODES



De nombreuses remarques et astuces ont été placées dans ce chapitre pour éclairer certains points ou aider à la réalisation de l'expérimentation.

I. Echantillonnage

1) Site d'étude

La marge de Sonora, localisée sur une faille transformante du bassin de Guaymas, dans le Golfe de Californie, présente des zones d'activités d'émissions de fluides froids (suintements froids ou Cold Seeps) jusqu'à présent inexplorées. Divers assemblages faunistiques ont été observés, notamment des tapis microbiens, des champs de bivalves Vesicomydés ou encore des buissons de vers tubicoles (Figure 22). Plusieurs sites d'intérêt, présentés sur la carte (Figure 23), ont été échantillonnés lors de la campagne océanographique française BIG (Biodiversité et Interaction à Guaymas) en juin 2010 avec le navire *L'Atalante*. Les études présentées dans ce manuscrit sont basées sur les prélèvements réalisés par le submersible habité *Nautile* au niveau de différents habitats du site "Vasconcelos" ainsi que sur le carottage de surface effectué par carottier gravitationnel Kullenberg (BCK1).

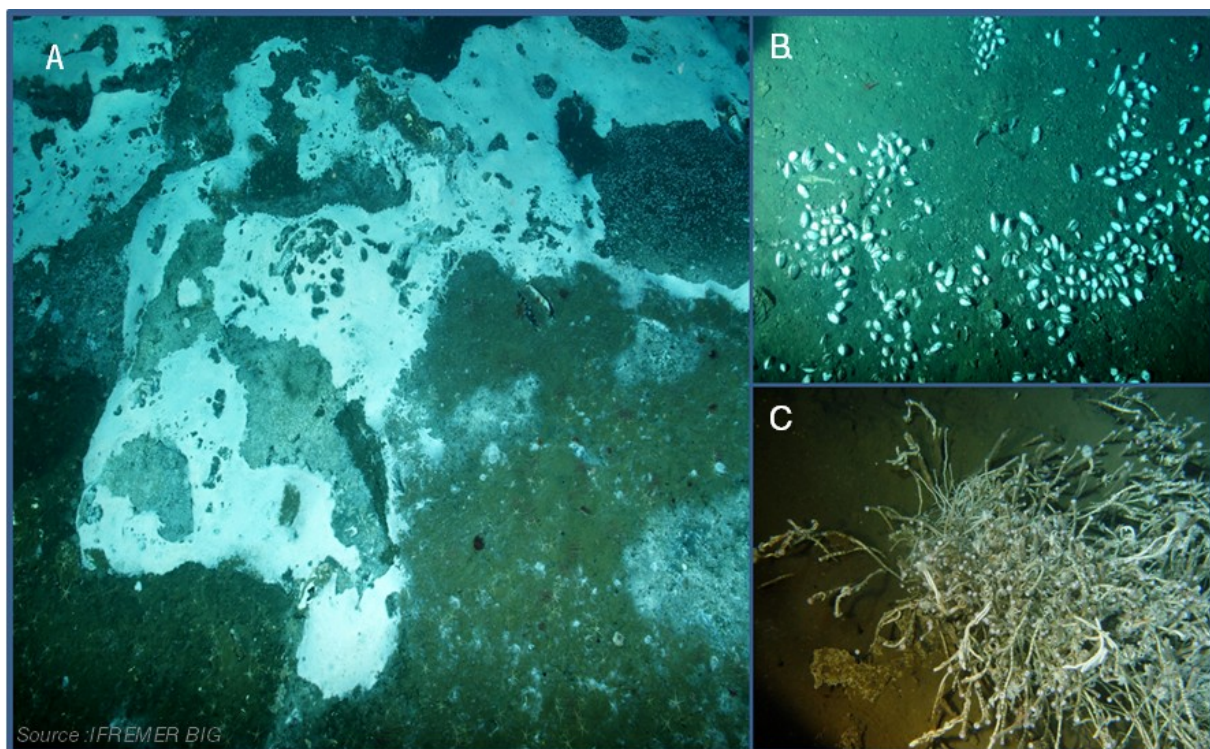


Figure 22 : Photographies des différents assemblages faunistiques des zones d'émissions de fluides froids de la marge de Sonora. A) Tapis microbiens blancs ; B) Colonie de bivalves *Vesicomysidae* C) Buisson de vestimentifères *Siboglinidae*.

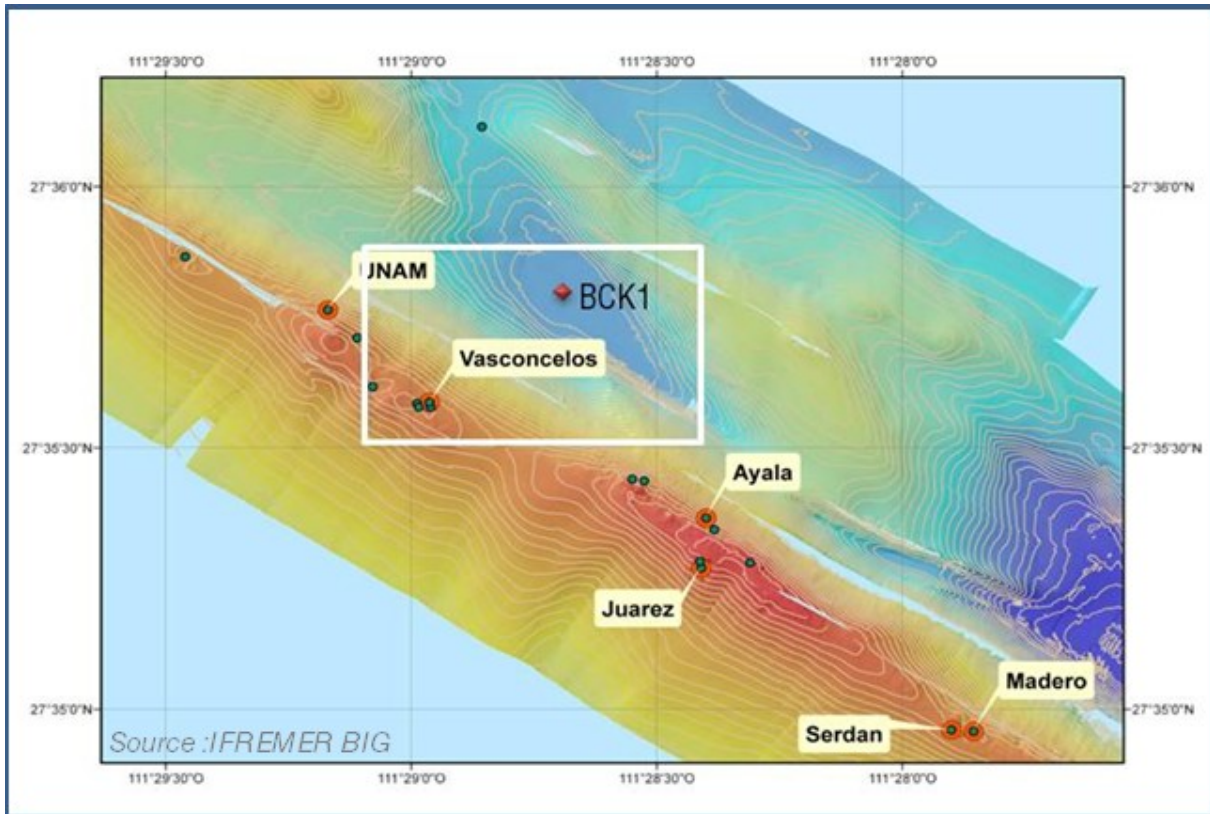


Figure 23 : Carte bathymétrique de la marge de Sonora. Les points verts représentent les points remarquables correspondants aux sites répertoriés le long de la marge de Sonora au cours de la campagne "BIG". BCK1 : BIG carottier Kullenberg n°1

a) *Vasconcelos*

Le site "Vasconcelos", référencé par les marqueurs de plongées BIG 18 et BIG 19 (N 27 35.5770; W 111 28.9840), est caractérisé par une mosaïque de tapis microbiens blancs entourés occasionnellement par un assemblage faunistique gris composé de polychètes et de gastéropodes. De petites bulles de gaz huileuses ont été observées à certains endroits des tapis microbiens, confirmant la présence de sorties de fluides froids (température *in situ* mesurée autour de 3°C) riches en hydrocarbures. Les études détaillées par la suite se sont concentrées sur l'un des tapis microbiens les plus étendus horizontalement, encerclé en partie par la macrofaune et présentant une cavité de sortie de fluides visible (Figure 24). Un tapis microbien blanc, voisin et plus restreint, a également été étudié.

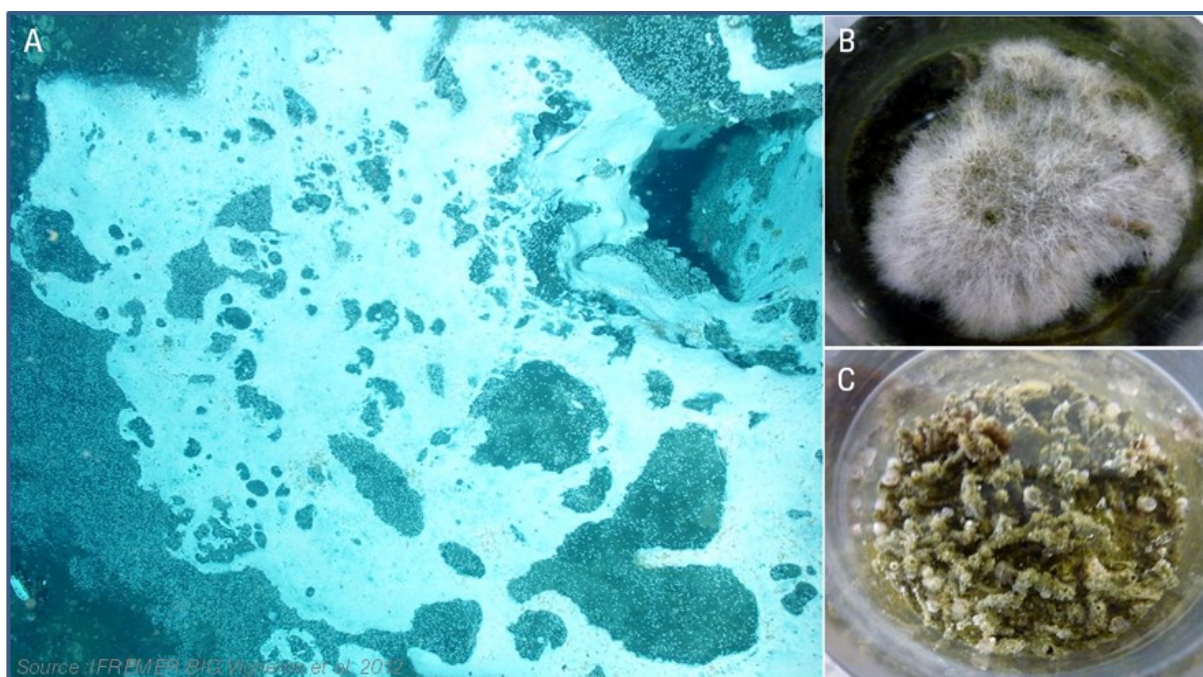


Figure 24 : A) Photographies du tapis microbien et de la macrofaune associée de l'habitat "Vasconcelos" présentant une cavité en haut à droite d'où s'échappe des petites bulles de gaz et d'huile visibles. B) et C) photos prises à bord, vue du dessus de la carotte de tapis bactérien B) et de la macrofaune C).

b) Kullenberg (BCK1)

Le site de carottage du Kullenberg est distant de quelques centaines de mètres de la zone active "Vasconcelos" (Figure 2). La carotte, d'une longueur totale de 10 mètres a été prélevée dans l'axe de la zone de suintements froids selon les indications de Yves Fouquet, les données bathymétriques et l'identification de panaches de gaz sous-marins par le sondeur du navire.

2) Prélèvements et conditionnements

a) Site Vasconcelos

Les prélèvements de sédiments associés aux tapis microbiens ont été effectués à l'aide de carottiers tubes de 25 cm de long et 5 cm de diamètre, manipulés par le bras robotisé du submersible *Nautille*. Pour chaque habitat, la stratégie d'échantillonnage, décidée et respectée dans la mesure du possible, comprenait des prélèvements en triplicata des habitats sélectionnés, afin de mettre en œuvre les expériences culturelles et de biologie moléculaire. L'échantillonnage comprenait également un carottage dédié aux mesures

géochimiques ainsi qu'un carottage dédié aux mesures d'activités microbiennes. Le tapis microbien principal de "Vasconcelos" ainsi que sa macrofaune adjacente a ainsi pu être échantillonné. Malheureusement, les tapis plus restreints n'ont pu accueillir l'ensemble des prélèvements et certains carottages nécessaires à l'étude ont du être réalisés dans des tapis microbiens avoisinants. (Figure 25).

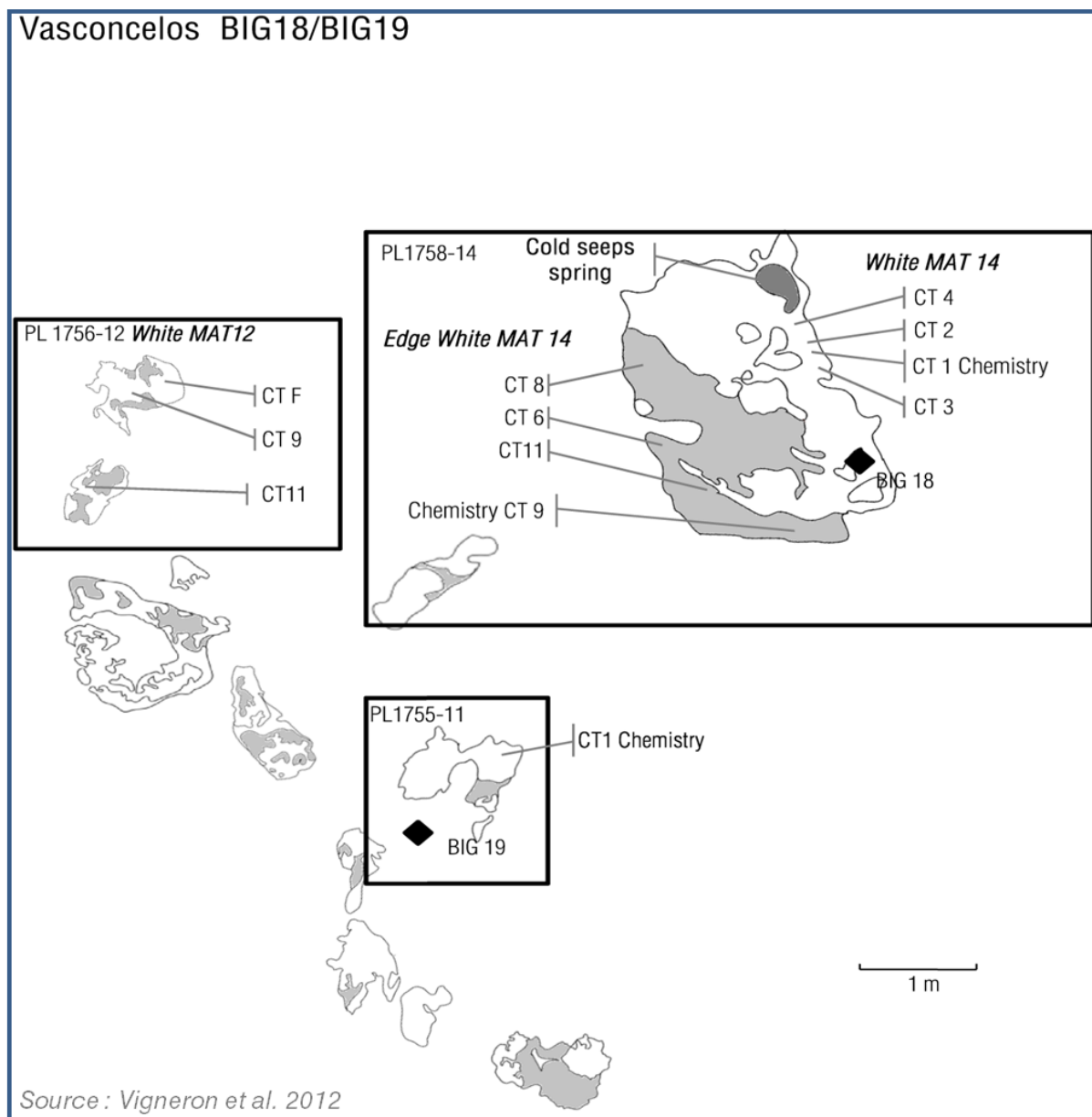


Figure 25 : Représentation schématique des habitats sur le site "Vasconcelos", répertoriant les numéros de plongées (PL1755, PL1756 et PL1758), les marqueurs définissant le site d'étude (BIG18 et BIG19), le numéro des carottes analysées (CT) ainsi que le nom des habitats sélectionnés (*White MAT12*, *White MAT14* et *Edge White MAT14*). L'échelle représente approximativement 1 mètre.

Une fois à bord, les échantillons ont été immédiatement placés en chambre froide (~8°C) puis sectionnés par horizon et conditionnés selon le plan suivant (Figure 26) :

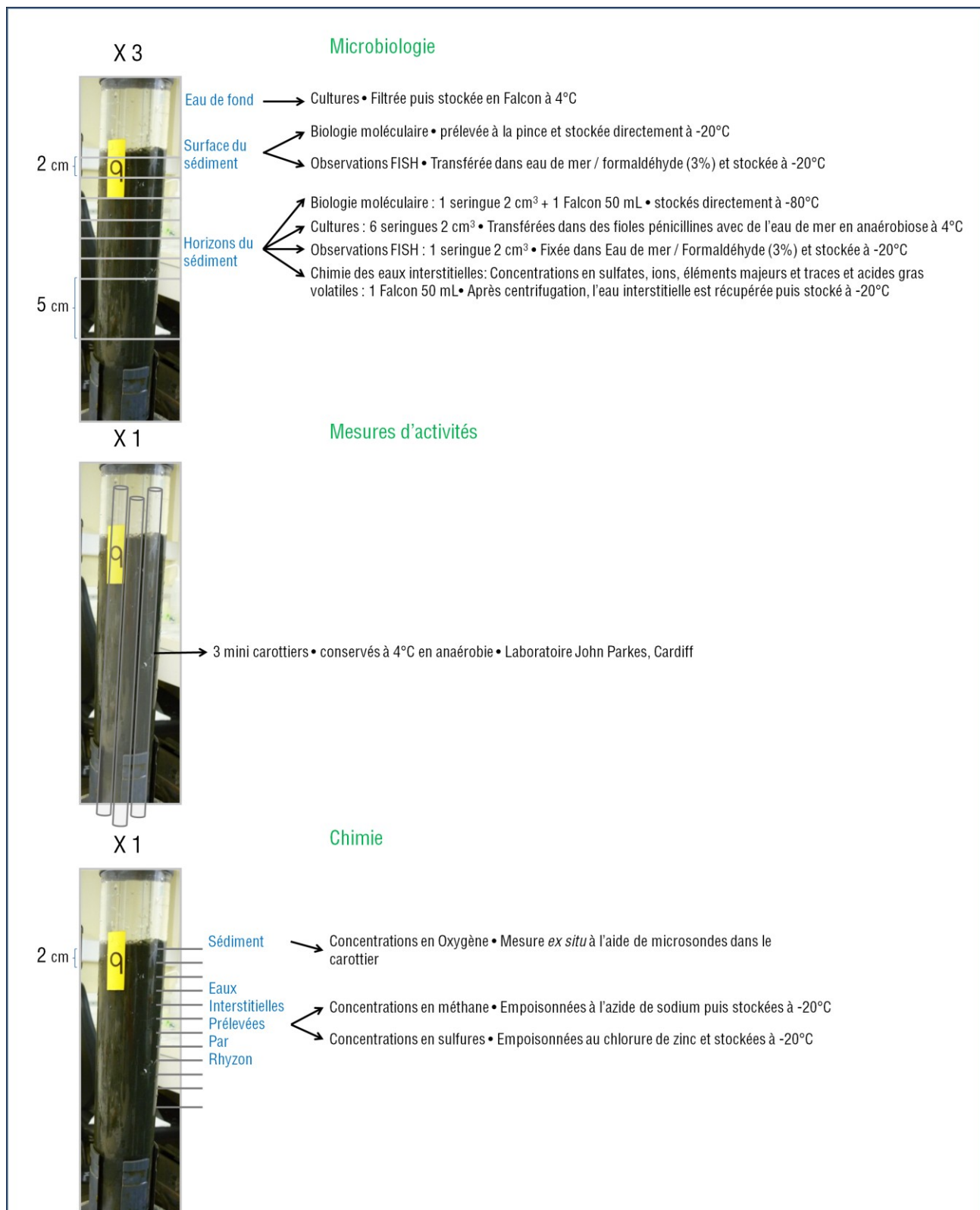


Figure 26 : Plan d'échantillonnage et de conditionnement des prélèvements pour le site "Vasconcelos".

b) Kullenberg (BCK1)

La stratégie précédente pouvant être réalisée uniquement sur les petits carottages des sédiments de surface, une stratégie d'échantillonnage légèrement différente a été employée pour le carottier long BCK1. Immédiatement après la remontée à bord du carottier, le sédiment prélevé a été sous-échantillonné tous les 50 centimètres, selon le plan expérimental suivant, afin de permettre l'ensemble des expérimentations.

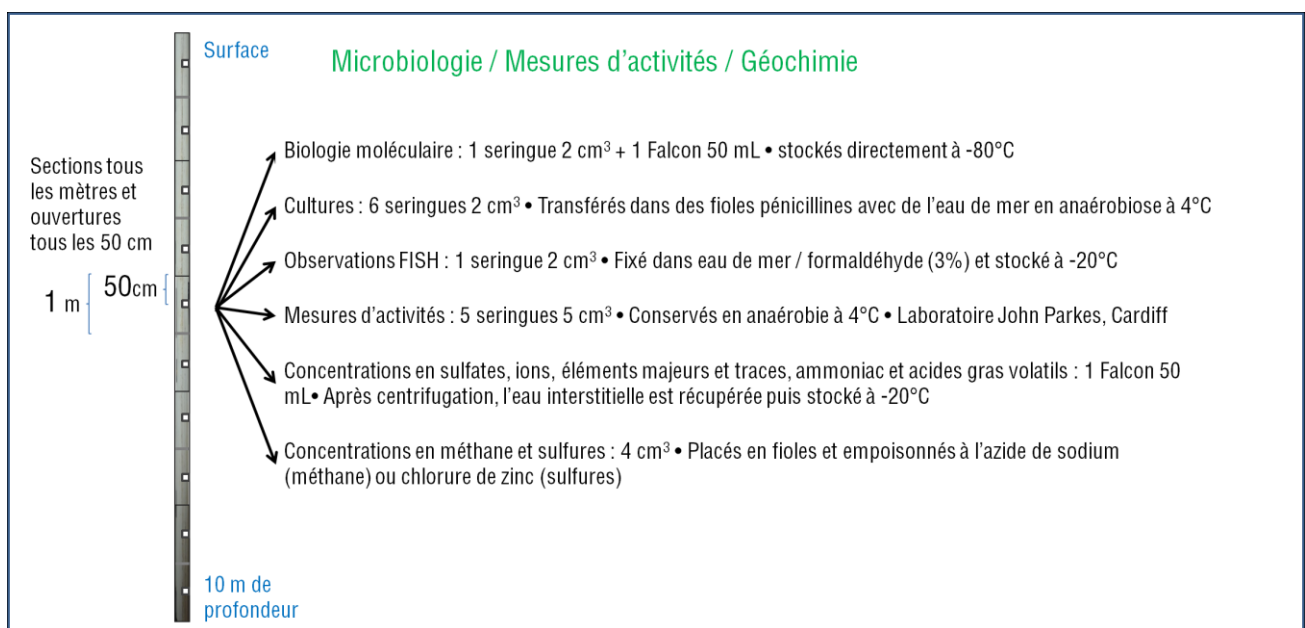


Figure 27 : Plan d'échantillonnage et de conditionnement des prélèvements du carottier Kullenberg BCK1.

3) Mesures physico-chimiques et géochimiques

a) Géochimie des sédiments

L'ensemble des mesures géochimiques ont été réalisées par les différentes équipes de chimistes et de géochimistes de l'Ifremer. Les mesures de concentrations en oxygène, méthane, sulfures ont été réalisées par Jean-Claude Caprais (Ifremer, EEP/Environnement profond). Les mesures de concentrations en sulfate, acides gras volatils et ions majeurs ont

été réalisées par Patricia Pignet (Ifremer, EEP/ Microbiologie des environnements extrêmes).

Les concentrations en oxygène dissous dans les sédiments ont été déterminées à bord grâce à des microsondes à oxygène, enfoncées progressivement dans le sédiment. Les teneurs en méthane dans les sédiments ont été déterminées par chromatographie en phase gazeuse par la technique de Headspace. Les concentrations en sulfate, ions majeurs et acides gras volatils ont été déterminées par chromatographie échangeuse d'ions (Lazar et al., 2010) et le dosage des sulfures et de l'ammoniac par spectrophotométrie (Fonselius et al., 2007).

Les valeurs isotopiques ponctuelles du méthane ont été déterminées par la société isolab b.v. (Pays Bas) sur les échantillons les plus profonds du site "Vasconcelos" et du Kullenberg BCK1 par spectrométrie de masse, couplée à la chromatographie gazeuse.

b) Mesures de températures in situ

Les mesures de température ont été réalisées dans les sédiments de surface grâce à une lance thermique T-Rov autonome (NKE, Electronics), insérée dans les sédiments de chaque habitat *via* le bras robotisé du sous-marin Nautil. La température *in situ* des sédiments profonds prélevés par carottier Kullenberg a été mesurée grâce à des sondes de température THP (Micrel) réparties le long du carottier métallique de 12 mètres.

II. Outils Moléculaires

1) Extraction des acides nucléiques et purifications

a) Extractions des acides nucléiques totaux

Les acides nucléiques totaux (ADN et ARN) ont été extraits en duplicata à partir de 2,5 grammes de sédiments congelés par le protocole d'extraction de lyse chimique dans un tampon phosphate hypersalin, développé par J. Zhou et ses collègues (Zhou et al., 1996) avec les modifications mises au point dans notre laboratoire par C. Lazar et J. Dinasquet (Lazar, 2009).

b) Purification de l'ADN

La purification de l'ADN est une étape essentielle en vue des analyses moléculaires. L'extraction des acides nucléiques selon le protocole utilisé est efficace mais de nombreux composés peuvent être co-extraits. C'est notamment le cas des acides humiques ou des métaux lourds qui peuvent inhiber les activités enzymatiques indispensables à l'amplification du matériel génétique par PCR (Polymerase Chain Reaction). Plusieurs protocoles ont été mis au point et testés pour minimiser au maximum la perte d'informations génétiques lors de la purification. Si parmi les différents kits de purification commerciaux disponibles, le Kit Wizard de Promega, utilisé dans cette étude, montrait de bons rendements de purification, une autre technique, proposée par K. Lloyd et ses collègues (Lloyd et al., 2010a), reposant sur une purification sur gel de polyacrylamide, a été testée. Lors d'une migration d'une heure sur gel de polyacrylamide (3,3%), les extraits se décomposent en plusieurs fractions; l'ADN de haut poids moléculaire reste dans le puits de dépôt alors que les acides humiques et autres composés migrent à travers le gel formant un "smire" coloré. Cette technique permet la séparation de l'ADN et des substances contaminantes mais la difficulté consiste à récupérer efficacement l'ADN purifié du gel. Que ce soit par les techniques simples utilisées classiquement tel que le broyage du gel et l'incubation dans de l'eau stérile à 4°C pendant une nuit ou par les techniques de lyse chimique du gel puis de re-précipitation de l'ADN décrite par les auteurs, les rendements d'extraction de l'ADN sont restés insuffisant.



La présence de métaux lourds dans la solution d'ADN extrait, fréquente lors d'extraction d'ADN d'environnements pollués par exemple, peut également empêcher la visualisation lors d'une excitation de l'ADN en présence de Bromure d'Ethidium (BET) aux rayonnements UV. Les métaux lourds s'insérant dans l'ADN de manière similaire à l'intercalant phosphorescent, il convient parfois d'utiliser un autre agent révélateur.

c) Purification de l'ARN

Les ARN ont été purifiés à partir de la préparation d'acides nucléiques totaux, obtenue après l'étape d'extraction. Des aliquotes de 100µL d'acides nucléiques totaux ont été purifiées à l'aide du Kit RNA II de Macherey Nagel selon les instructions du fabricant. La présence éventuelle de traces d'ADN résiduel a été vérifiée par PCR en ciblant le gène codant l'ARNr 16S bactérien et archéen à partir des préparations d'ARN extraits ainsi qu'à partir des dilutions 1/10, 1/20, 1/30, 1/50, 1/100. En cas d'amplification positive d'ADN,

démontrant la présence d'ADN contaminant, une étape supplémentaire de traitement à la DNase à 37°C pendant 30min a été rajoutée selon les instructions du fabricant puis les PCRs de contrôle réitérées. Les ARN purifiés ont ensuite été conservés à -80°C.

2) Réactions d'amplification par PCR et RT-PCR

a) Amplification par PCR

Les amplifications d'ADN ont été réalisées selon les protocoles du fabricant avec la polymérase *Go Taq* (Promega) ou le Kit de PCR Quantitative de Quanta Biosciences dans le cas d'amplifications difficiles. L'ADN a été amplifié dans un mélange réactionnel final de 25µL contenant 5 µL de tampon 5X, 2 µL d'une solution à 25mM de MgCl₂, 0,5 µL d'une solution à 10 mM de dNTPs chacun, 0,1µL d'une solution à 100 mM de chaque amorce (cf paragraphe II.7) et 0,12 µL de polymérase *GoTaq® Flexi* à 5 U.µL⁻¹. Les produits d'amplification PCR sont ensuite observés sur un gel d'agarose 1% puis dans le cas de clonage, rassemblés et purifiés grâce au kit Nucleospin® Extract II (Macherey Nagel).

b) Réaction de RT-PCR

La transcription inverse des ARN d'intérêt et leur amplification ont été réalisées pour les ARNr 16S archéens à l'aide du kit OneStep QRT-PCR de Quanta Biosciences suivant les instructions du fabricant. Les amplifications de l'ARNr 16S bactérien, réalisées *via* ce même kit ainsi que par tous autres kits "OneStep" testés, ont présenté des amplifications pour les témoins négatifs. La réalisation de RT-PCR en deux étapes avec les réactifs correspondant a permis d'éviter ces contaminations probablement dues à un défaut de purification des enzymes des kits OneStep. Les ARN ont donc été rétro-transcrits en ADN complémentaires *via* le kit cDNA synthesis de Quanta Biosciences selon les instructions du fabricant puis les ADNc néoformés ont été amplifiés comme décrit précédemment.

3) ARISA

La région intergénique *rrs-rrl*, reflet de l'évolution et située entre le gène de l'ARNr 16S et celui de l'ARNr 23S, présente des variations en terme de séquence et de longueur selon les espèces microbiennes. La méthode d'empreinte moléculaire ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analsis) amplifie et analyse la longueur de cette région non codante et permet de comparer la structure des communautés microbiennes d'un

échantillon. Les régions intergéniques *rrs-rrl* des communautés bactériennes et archéennes ont été amplifiées par PCR (Table 1). L'amplification comprend 30 cycles de polymérisation composés de 30 sec à 95°C, 30 sec à 55°C et 1 min 20 à 72°C. L'amplification se termine par une phase d'élongation de 15 minutes à 72°C. Les ADN produits lors de la réaction de PCR sont observés sur un gel d'agarose 2% puis quantifiés par Nanodrop et calibrés à 50 ng μL^{-1} . Ces ADN sont ensuite chargés sur une puce DNAChip 1000 d'Agilent pour une séparation en électrophorèse microfluidique à l'aide du Bioanalyzeur 2100 (Agilent). Un électrophorégramme est ainsi obtenu et l'ensemble des valeurs d'intensité des bandes composant l'électrophorégramme est ensuite exporté puis analysé statistiquement grâce au logiciel R implémenté du module complémentaire ade4TkGUI (Thioulouse and Dray, 2007). Ce module fournit une interface dynamique simplifiée qui permet d'obtenir une représentation graphique des résultats issus des analyses de covariance (PCA, RDA).

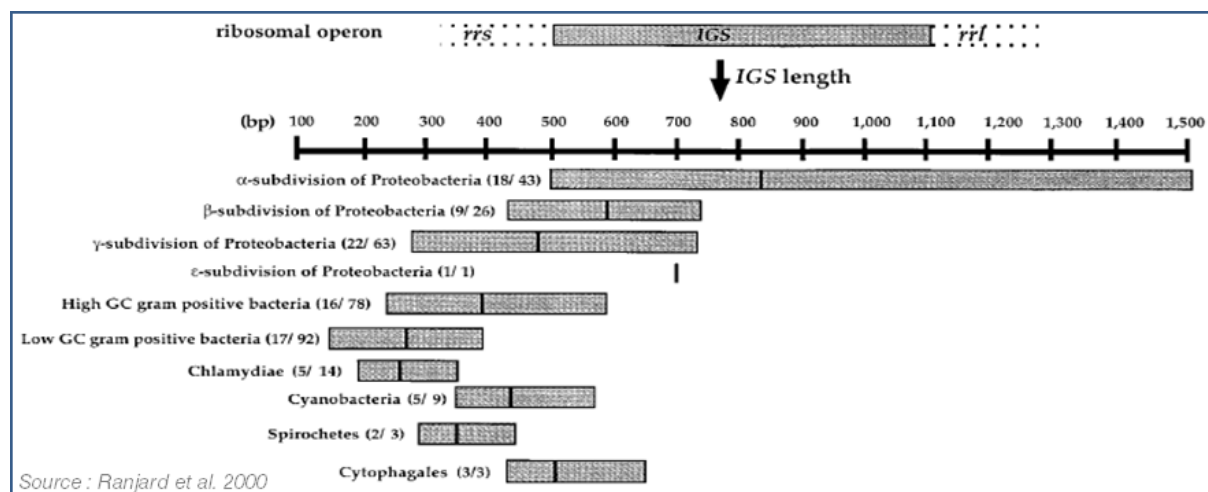


Figure 28 : Distribution de la longueur des IGS selon les différents groupes bactériens.



De nombreux messages d'erreurs peuvent survenir lors des premières utilisations du logiciel R. Les problèmes résident généralement dans la mise en forme du jeu de données fourni. R n'accepte que les fichiers textes "séparateur tabulation", le format d'écriture du Bioanalyzeur étant en anglais et en mode "séparateur virgule", il convient de transformer les virgules en tabulation puis les points en virgule avant de sauvegarder en fichier texte. Un autre message d'erreur fréquent indiquant un nombre de colonnes différent du nombre de variables sera corrigé en renommant les titres des variables du fichier. Le nom des

variables ne doit pas comporter d'espaces, de points ou de virgules, synonymes de tabulations pour le logiciel.

4) Banques de clones et analyses phylogénétiques

Dans ce travail de thèse, la diversité phylogénétique des communautés microbiennes a été obtenue par séquençage des gènes codant l'ARNr 16S, après amplification par PCR et clonage.

a) Construction des banques de clones

Les amplicons obtenus après PCR ou RT-PCR ont été réunis puis purifiés sur gel d'agarose 1% avec le kit DNA extraction de Macherey Nagel suivant les instructions du fabricant. Les banques de clones ont ensuite été construites par transformation de cellules d'*E. coli* thermo-compétentes avec le kit TOPO XL Cloning kit de Invitrogen. Les extractions de plasmides, leurs purifications et le séquençage des gènes d'intérêt ont été réalisés par GATC Biotech (Germany).



L'efficacité du clonage dépend en grande partie de la concentration en ADN mais également de son intégrité, en particulier dans le cas d'utilisation de kits de clonage permettant l'insertion du segment d'ADN dans le vecteur sans ligase (Kit TOPO XL par exemple). Dans le cas de clonage d'amplicons conservés à -20°C une nouvelle étape d'élongation permet de restaurer l'intégrité des fragments d'ADN et ainsi d'augmenter considérablement l'efficacité du clonage.

b) Analyse phylogénétique

L'édition des séquences obtenues au cours de cette thèse a été réalisée avec le logiciel BioEdit. Les séquences ont été alignées entre elles grâce au module ClustalW ou le programme Mafft v6. dans le cas de jeux de données de séquences importants (Kato et al., 2002). L'analyse phylogénétique des séquences a été effectuée grâce au logiciel MEGA 4 en analyse de distance Neighbour-Joining avec la correction à deux paramètres de Kimura et le mode "Pairwise deletion" pour la gestion des espaces libres dans l'alignement (Kimura, 1980). La robustesse des embranchements a été testée par ré-échantillonnage ou "bootstrap" (1000) (Felsenstein, 1985). Les séquences présentant plus

de 97% de similarité ont été regroupées au sein d'une même unité taxonomique (OTU) *via* l'application web cdhit_454 (http://weizhong-lab.ucsd.edu/cdhit_454/cgi-bin/index.cgi).



L'application cd_hit454, initialement créée pour alléger le traitement des données de pyroséquençage regroupe les séquences selon un pourcentage de similarité seuil. Il permet la création de fichiers Fasta de séquences consensus représentatives des différents groupes de séquences formés et indique également le nombre de séquences regroupées sous un même cluster.

5) Puce fonctionnelle et phylogénétique GeoChip 4

Les puces à gènes fonctionnels (FGA) ou GeoChip, sont des outils puissants, précis et quantitatifs pour caractériser et suivre les communautés microbiennes. Cette technique de métagénomique permet de détecter et de quantifier divers gènes fonctionnels dans un échantillon environnemental tout en tenant compte de la phylogénie. La puce fonctionnelle utilisée dans ce travail a été développée et utilisée par l'équipe de Jizhong Zhou à l'institut de Génomique Environnementale de l'Université de l'Oklahoma. Elle a été conçue pour détecter les gènes clés impliqués dans différentes fonctions microbiennes telles que celles intervenant dans le cycle du carbone, de l'azote, du soufre ou encore du phosphore ainsi que dans les mécanismes de résistance aux métaux, aux antibiotiques ou à différents stress. Les expérimentations par puces fonctionnelles se déroulent en 3 étapes schématisées Figure 29. Le point critique reste la préparation de l'ADN, en effet, cette technique requiert une quantité et une qualité d'ADN élevées difficilement compatibles avec les échantillons marins profonds. Rapidement, l'ADN extrait est marqué par un fluorochrome puis hybridé sur la puce comportant les diverses sondes spécifiques. Après hybridation, la fluorescence est détectée et quantifiée par un scanner puis les données sont récupérées, triées selon un seuil de détection, normalisées et analysées en fonction des différents paramètres environnementaux disponibles.

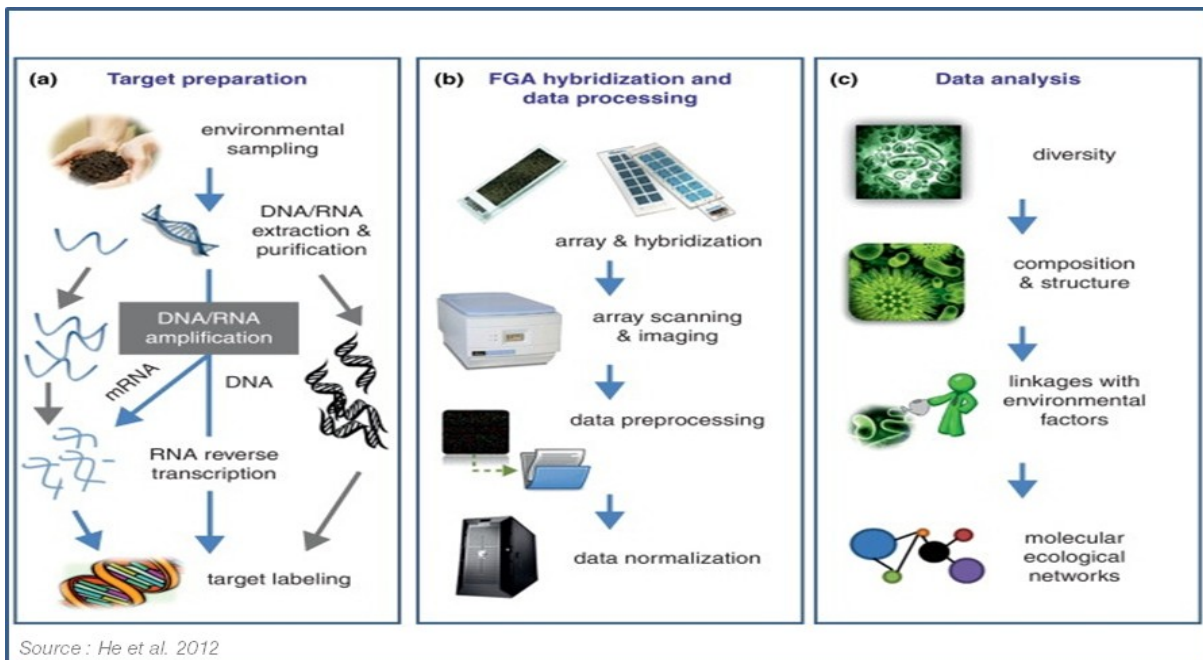


Figure 29 : Procédure expérimentale mise en place lors des expériences de puces fonctionnelles (FGA).

6) PCR quantitative avec la technologie Sybr Green

La technique de PCR Quantitative, lorsqu'elle est réalisée précautionneusement, permet d'obtenir, en plus de l'aspect quantitatif, un aperçu précis de la répartition et de l'évolution d'une communauté microbienne dans un échantillon de sédiment par exemple. Les différentes étapes décrites en détail ci-dessous doivent permettre de réaliser correctement le suivi d'une population microbienne d'intérêt.

a) Création d'amorces spécifiques

La création d'amorce pour les expérimentations de PCR quantitative nécessite une attention particulière et contribue grandement à la réussite de la quantification du gène ou de la population microbienne d'intérêt. Des règles simples sont à respecter afin de garantir une efficacité et une spécificité d'amplification optimale.

L'efficacité de la réaction d'amplification est un paramètre important pour une quantification correcte du gène cible. Calculée à partir de la gamme étalon, cette efficacité d'amplification permet de s'assurer qu'à chaque cycle d'amplification de PCR une nouvelle copie d'ADN a été formée et ainsi de pouvoir correctement relier le nombre de copies à chaque cycle

d'amplification avec le nombre initial de copies présentes dans l'échantillon. Avec une efficacité insuffisante (<90%) la quantité de gène cible présent dans l'échantillon peut être fortement biaisée et conduire à de fausses interprétations. Si certains paramètres tels que la concentration en sels ou en amorces influent sur l'efficacité de la réaction, le "design" des amorces reste le facteur prépondérant.

Les principaux paramètres entrant en jeu dans la réussite de la quantification sont, bien entendu, la spécificité des amorces pour le gène cible, la température d'hybridation ainsi que la longueur et la composition en nucléotides de ces amorces et la taille de l'amplicon.

Tableau 1 : Table récapitulative des paramètres importants pour la conception d'amorces de PCR Quantitative. Tm : Température Melting (Température d'hybridation ou de demi dissociation des amorces).

Paramètres	Valeur optimale	Valeurs Tolérées	Remarques
Tm des amorces	60°C	58-62°C	Permet une spécificité d'amplification optimale et une unification des phases d'hybridation et d'élongation lors de la PCR
ΔTm des amorces	<0.5°C	<1°C	La différence de Tm entre les deux amorces doit être minime pour une efficacité de réaction optimale (Crucial en cas de réactions réalisées avec une enzyme Fast Polymerase)
Longueur des amorces	20 pb	[16-24]	Compromis entre rapidité d'hybridation des amorces à l'ADN et discrimination du gène d'intérêt
Taux de GC des amorces	50%	[20-80%]	Le taux de GC importe peu, attention toutefois à ne pas avoir de répétitions de bases G ou C aux extrémités des amorces.
Bases dégénérées	0	1	Parfois nécessaires, à réduire au maximum, diminue fortement l'efficacité de la réaction
Longueur de l'amplicon	150pb	[100-400]	Compromis entre efficacité optimale pour les fragments de petite taille (indispensable en cas de réactions Fast) et longueur nécessaire pour une étude de phylogénie sur les amplicons.

Plusieurs logiciels et applications sont disponibles sur internet pour aider à la création d'amorces (Primer3, GeneFisher, Primer-Blast, Primer3Plus, Primaclade, PriFi, RealTimeDesign, QuantPrime ...). Tous ces logiciels permettent d'obtenir des amorces de qualité mais présentent tous des avantages et des inconvénients. La plupart de ces sites et logiciels repose sur la programmation de Primer3. Créé par l'université du Massachusetts, le site possède un programme très puissant de calcul de création d'amorces tout en permettant un contrôle des oligonucléotides souhaités. De nombreux paramètres tels que la longueur du produit désiré, la taille et la Tm de chaque amorce, la composition en GC ou encore la présence de modifications en 5' ou 3' peuvent être imposés lors de la génération

des amorces. La multitude des paramètres réglables entraîne cependant une complexité d'utilisation et d'exécution regrettable au premier abord. De plus, Primer3, mais également plusieurs autres de ces logiciels ne prennent pas en charge la variabilité intraspécifique de l'ADN. En effet, Primer3 génère les amorces en s'appuyant sur une séquence unique et n'accepte pas les bases dégénérées des séquences consensus. Si les bases dégénérées sont à proscrire dans la séquence nucléotidique des amorces, réduisant fortement l'efficacité de la réaction, elles sont parfois nécessaires voir indispensables en écologie microbienne lors du ciblage de populations bactériennes à l'échelle du groupe, du genre ou du taxon ou encore lors de quantification de gènes fonctionnels. Face à ces inconvénients, Primaclade, un autre site internet (<https://131.204.120.103/srsantos/primaclade/primaclade.cgi>), reposant toutefois sur les méthodes de calcul de Primer3, semble mieux adapté à la création d'amorces destinées à l'étude de populations microbiennes ou de gènes fonctionnels environnementaux présentant une certaine divergence nucléotidique intra-spécifique. Ce site internet, actuellement hébergé sur les serveurs de The Santos Lab, a été développé par The Kellogg Lab de l'Université du Missouri. Cette application génère des amorces en se basant non plus sur une séquence unique mais sur un fichier Fasta de plusieurs séquences nucléotidiques alignées. Le programme de Primaclade est conçu pour utiliser l'algorithme de Primer3 sur chacune des séquences du fichier Fasta source puis de compiler tous les résultats sur une même page. L'interface et les paramètres réglables sont simplifiés, proposant uniquement les facteurs essentiels: le maximum de bases dégénérées autorisées par amorce, le nombre de trous ("gaps") permis dans l'alignement, les régions dans la séquence nucléotidique à exclure lors de l'analyse (utile en cas de différences dans la longueur des séquences), la température de Tm des amorces ainsi que leur taux de GC. Primaclade génère une liste d'amorces correspondant aux paramètres choisis, réparties le long de la séquence consensus et colorées selon le niveau de dégénération de l'oligonucléotide. Enfin, l'utilisation de Primaclade est optimale pour des fichiers Fasta compilant moins de 10 séquences avec moins de 29% de divergence. Dans le cas de fichiers regroupant plus de séquences, il est possible de fournir un fichier Fasta déjà constitué de séquences consensus comme peut le créer l'application cdhit_454 précédemment décrite.

Toutes les amorces créées, validées et utilisées avec succès dans cette étude ont été générées *via* l'application web Primaclade configurée selon les paramètres optimaux.

Une fois conçues, les amorces sont sélectionnées en fonction de leur spécificité pour le gène cible. Pour ce faire, l'utilisation de logiciels ou d'applications sur internet se révèle utile. Cette vérification *in silico* consiste d'une part à simuler une réaction de PCR avec les amorces néoformées puis dans un deuxième temps de comparer ces oligonucléotides avec les bases de données en ligne à l'aide du logiciel BLAST afin de vérifier la stringence des amorces. Parmi les logiciels réalisant les réactions de PCR virtuelles, Oligocheck s'est révélé le plus adapté. Oligocheck est une petite application Java créée par Kevin Ashelford (également programmeur d'autres petits logiciels gratuits très utiles tels que Primrose, OrientationChecker, Pintail, TmCheck ou encore Mallard) permettant de simuler une PCR sur une base de données de séquences de notre choix tout en contrôlant le taux de mésappariement amorce/ADN. Ainsi, les amorces sélectionnées dans ces études ne présentaient aucun mésappariement avec la séquence nucléotidique ciblée et au moins trois avec les autres séquences non souhaitées de telle manière qu'une amplification non spécifique nécessiterait au total six mésappariements entre les amorces et la région ciblée de l'ADN. Pour parfaire cette sélection, le logiciel Blast du NCBI, configuré pour les oligonucléotides de petite taille, permet de vérifier la spécificité des oligonucléotides sur l'ensemble des génomes répertoriés.

L'efficacité de la réaction d'amplification est enfin dépendante de la conformation tridimensionnelle des amorces en solution. La structure secondaire des oligonucléotides doit répondre à certaines contraintes. En effet les amorces ne doivent pas présenter de repliements spontanés trop importants ni former d'homodimères ou d'hétérodimères entre eux. Une nouvelle fois un site internet, OligoAnalyzer (<http://eu.idtdna.com/analyze/applications/oligoanalyzer/default.aspx>) permet de contrôler la conformation des amorces. Toutes les amorces utilisées ont été sélectionnées pour présenter le minimum de repliements ou de dimères. Un seuil d'énergie de liaison ΔG inférieur au dixième de l'énergie totale nécessaire à l'appariement base à base de l'hybridation amorce/ADN cible a été fixé comme seuil de tolérance pour la formation de structures secondaires.



La T_m des amorces générées est un paramètre crucial pour la stringence et l'efficacité de la réaction de Q-PCR. De nombreux sites ou logiciels proposent de déterminer la T_m des oligonucléotides et les résultats peuvent fortement varier d'un site à l'autre selon la technique de calcul utilisée ! Les concentrations en sels et en amorces

modifient également fortement la valeur de T_m , il est important de rentrer les valeurs les plus adaptées. Une valeur de 1 μM pour la concentration en amorces est généralement nécessaire et la concentration en sels dans les réactifs est disponible sur les manuels d'utilisation de ces produits. Le problème s'accroît avec la présence de bases dégénérées dans la séquence nucléotidique des amorces. T_m Calculator de Applied Biosystems (<http://www6.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/>) permettant un calcul similaire à celui de Primaclade a été utilisé dans ces études sans toutefois prendre en compte les bases non conventionnelles. Malgré toutes ces précautions, il arrive que, lors de la synthèse des nucléotides, les valeurs de T_m présentées par le fournisseur diffèrent de celles attendues, sans toutefois affecter le rendement et l'efficacité de la réaction de Q-PCR.

b) Validation des amorces

Une fois les amorces conçues, la spécificité et la stringence de la réaction doivent être testées avant les expérimentations quantitatives. Pour cela, le moyen le plus rapide et le plus fiable est de cribler une banque de clones préalablement réalisée et séquencée et ainsi retrouver le gène cible parmi tous les clones. Une amplification par PCR à partir d'un clone (15min à 94°C pour ouvrir les cellules puis 30 cycles composés de 15 s à 94°C, 30 sec à 60°C et 30 sec à 72°C puis 6 min d'élongation à 72°C) permet de tester rapidement les amorces sur différents clones environnementaux et de confirmer la spécificité d'hybridation des amorces. Si aucune banque de clones préalablement séquencée n'est disponible, il suffira simplement de séquencer les plasmides des clones présentant une amplification avec le couple d'amorce pour s'assurer de la spécificité des oligonucléotides.



Les conditions de spécificité et de stringence lors d'une PCR sur clones sont différentes d'une PCR à partir d'échantillons environnementaux. En effet, lors d'une PCR sur clones, le gène cible est en quantité importante et quasiment sans interférence avec d'autres ADN, contrairement aux échantillons environnementaux où le gène cible sera à la fois noyé dans un ensemble de génomes complexes et en présence d'éléments perturbateurs des réactions enzymatiques (inhibiteurs, sels ...). De ce fait, les conditions de spécificité d'une PCR sur clones seront grandement augmentées comparé à une PCR à partir d'échantillons environnementaux. Un criblage efficace de la banque de clones

garantira à coup sûr une spécificité élevée lors d'amplifications à partir d'échantillons complexes.

c) Réalisation de la gamme étalon

Afin de pouvoir relier de manière correcte les valeurs d'amplifications obtenues dans les échantillons avec le nombre initial de copies du gène cible, une gamme étalon doit être réalisée. Deux types de gammes étalon peuvent être mises en place selon le matériel génétique disponible. Dans le cas où il existe un représentant cultivé du groupe recherché et au génome connu, une série de dilutions de l'ADN génomique peut être employée. Dans le cas où aucun représentant n'est cultivé, la gamme étalon devra être construite à partir de dilutions de plasmides contenant le gène cible. Ces deux techniques peuvent conduire à des résultats différents, dus en partie aux différences d'accessibilité à l'ADN pour les polymérases entre un clone circulaire de petite taille et un ADN génomique long avec des structures secondaires. Les résultats obtenus pour les deux techniques sont donc difficilement comparables.

❖ Gamme étalon à partir d'ADN génomique

Pour réaliser une gamme étalon à partir d'ADN génomique, il est nécessaire d'une part de posséder une espèce microbienne cultivée possédant le gène d'intérêt (16S rDNA ou gène fonctionnel) et d'autre part de connaître la taille précise du génome de cette espèce ainsi que le nombre de copies du gène cible par cellule. A partir de la concentration en ADN génomique initiale, le nombre de copies du gène cible en solution est déterminé selon l'équation 1 suivante :

$$\text{Copies du gène / } \mu\text{L} = \frac{\text{Nombre d'Avogadro} \times (6.02214 \times 10^{23} \times [\text{ADNg}])}{\text{Masse molaire de l'ADN double brin} \times (660 \times \text{Taille du génome / nbr de copies par génome}) \times \text{Paires de bases}} \text{ g/}\mu\text{L}$$

La gamme étalon aux concentrations souhaitées est ensuite réalisée à partir de cette solution mère diluée en série.



La liste des espèces microbiennes dont la taille du génome est disponible peut être consultée sur internet à l'adresse suivante : <http://www.cbs.dtu.dk/databases/DOGS/index.php>

❖ Gamme étalon plasmidique

Dans le cas de quantification de groupes taxonomiques sans représentant cultivé, l'alternative est de réaliser la gamme étalon à partir d'une solution de plasmides possédant le gène cible inséré. Pour cela, il est nécessaire dans un premier temps de disposer d'un clone possédant le gène cible. On peut également cribler une banque de clones non séquencée avec les amorces ciblant le gène pour identifier une colonie possédant le plasmide avec le gène d'intérêt. Le plasmide doit ensuite être récupéré et isolé soigneusement, soit à l'aide d'une étape d'extraction puis de purification du plasmide (Miniprep), soit grâce à l'utilisation de kits commerciaux. L'efficacité de ces techniques d'extraction de plasmides n'est jamais parfaite et une purification du plasmide sur gel est souvent nécessaire pour s'affranchir totalement de l'ADN ou de l'ARN de la cellule hôte. Une contamination de l'ADN plasmidique en acides nucléiques autres entraînerait une surestimation de la quantité d'ADN en solution et donc un biais dans la création de la gamme étalon et la quantification. Une fois la concentration en plasmides possédant le gène d'intérêt connue, le nombre de copies du gène en solution est déterminée selon l'équation 2 suivante :

$$\text{Copies du gène / } \mu\text{L} = \frac{\text{Nombre d'Avogadro} \times (6.02214 \times 10^{23} \times [\text{ADNg}])}{\text{Masse molaire de l'ADN double brin} \times (660 \times (\text{Taille du vecteur} + \text{Gène cible})) \times \text{Paires de bases}} \quad \text{g}/\mu\text{L}$$

Comme précédemment, la gamme étalon aux concentrations souhaitées est ensuite réalisée à partir de cette solution mère puis de dilutions en série. Cinq concentrations différentes sont généralement suffisantes pour garantir une bonne gamme étalon. Il est également important de constituer la gamme étalon dans un intervalle de concentrations comprenant les valeurs des échantillons.



Les gammes étalon réalisées à partir d'ADN plasmidiques doivent être manipulées avec une extrême précaution, étant donné le faible poids moléculaire des plasmides et leur grande quantité, ils peuvent être une source de contaminations tenaces pour les PCR. Les gammes étalon se conservent très mal que ce soit à 4°C ou à -20°C, il convient donc de les utiliser rapidement après leur préparation.

d) Concentration en amorce et efficacité de Q-PCR

Comme décrits précédemment, l'efficacité de la réaction d'amplification doit être optimale pour s'assurer d'une quantification correcte. Si l'efficacité dépend fortement du "design" des amorces, leur concentration peut altérer ou augmenter la processivité de la polymérase et ainsi affecter l'efficacité de la Q-PCR. Si les fabricants de réactifs Q-PCR préconisent une concentration finale de chaque amorce avoisinant 0,3 µM, cela demeure généralement insuffisant pour une quantification sur échantillons environnementaux. Si les amorces créées ne forment aucune structure secondaire ou dimère, la concentration en amorces peut être augmentée jusqu'à 1,2 µM ce qui augmentera l'efficacité de PCR. Un excès d'amorces peut toutefois inhiber la réaction enzymatique et conduire à une perte d'efficacité. Il est donc conseillé, pour chaque couple d'amorces néoformées, de réaliser une série de tests avec des concentrations d'amorces croissantes à partir d'une gamme étalon en duplicata et d'en déduire les efficacités des réactions résultantes. (Tableau 2)

Tableau 2 : Plan expérimental recommandé pour tester les concentrations en amorces pour la mise au point de la PCR Quantitative avec un nouveau couple d'amorces.

Concentration finale de chaque amorce										
	1,1µM	1,1µM	0,9µM	0,9µM	0,6µM	0,6µM	0,3µM	0,3µM	0,1µM	0,1µM
Nombre de copies de gène cible	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸
	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷
	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴

e) Préparation des échantillons pour la quantification

La présence d'acides humiques ou de métaux lourds, fréquemment co-extraits avec l'ADN inhibent les réactions enzymatiques. Les quantifications par PCR peuvent donc être

fortement sous-estimées voir rendues impossibles en cas de fortes concentrations en inhibiteurs et de faibles quantités d'ADN cibles. La première étape est de tester l'ADN brut. Le but étant de trouver une concentration en ADN égale pour tous les échantillons à analyser où la réaction de PCR ne serait pas inhibée. Cette recherche s'effectue en réalisant une gamme de dilutions des échantillons qui sera alors soumise à une réaction de PCR quantitative. Dans un échantillon exempt de tout inhibiteur (dans une gamme étalon plasmidique par exemple), les valeurs de quantifications seront proportionnelles à la quantité initiale d'ADN et respecteront ainsi l'effet de la dilution. Dans le cas d'un échantillon avec présence d'inhibiteurs, les résultats obtenus ne seront pas proportionnels à la quantité de départ pour toutes les dilutions. Les amplifications à partir des concentrations d'ADN les plus élevées seront certainement inhibées et le facteur de dilution ne sera pas respecté. Il est néanmoins possible que pour les dilutions les plus faibles (~1 ng d'ADN) les quantifications retrouvent leur proportionnalité avec la valeur initiale et que le facteur de dilution soit respecté. C'est le signe de l'absence de produits inhibiteurs, les échantillons devront donc être dilués à cette concentration pour les PCR quantitatives afin d'obtenir des résultats de quantifications non biaisés par un effet inhibiteur de composés environnementaux.



Il est préconisé de déposer 5 μ L d'échantillon par réaction pour minimiser les erreurs de pipetage. Il convient donc d'ajuster convenablement la concentration des échantillons.

Dans le cas d'échantillons très contaminés ou avec une biomasse faible les essais de dilutions resteront infructueux, la solution sera alors de purifier l'ADN. Cela conduira certes à l'élimination d'une grande partie des inhibiteurs enzymatiques mais également à l'élimination d'une partie significative d'ADN génomique. Il en résultera une sous-estimation des valeurs de quantifications. Une fois l'ADN purifié, un nouveau test d'amplification des échantillons en gamme de concentrations permettra de définir la concentration optimale en ADN pour la quantification par PCR des échantillons.



Toutes les concentrations en ADN (concentrations en ADN plasmidique ou en ADN génomique issu de cultures ou d'échantillons environnementaux) dans les études présentées dans ce manuscrit ont été mesurées par spectrophotométrie *via* un Nanodrop. Cinq mesures ont été réalisées pour chaque échantillon dans une gamme de

concentrations optimales pour les mesures (15-200 ng/μL). Pour obtenir les faibles concentrations en ADN nécessaires à la Q-PCR, l'ADN a été dilué soigneusement. Idéalement les concentrations en ADN doivent être mesurées par d'autres méthodes indépendantes telle que la quantification au Qu-bit® (Life Technologies).

7) Liste des amorces utilisées dans ce travail de thèse

La liste des amorces utilisées dans les études présentées dans ce manuscrit, ainsi que les températures d'hybridation et concentrations adéquates sont répertoriées ci-dessous.

Tableau 3 : Table récapitulative des différentes amorces utilisées dans de travail de thèse.

Nom	Fonction	Groupe ciblé	Séquence (5' - 3')	Taille Amplicon (bp)	Temp. hybridation (°C)	Amorces conc. (mM)	Références
A8F A915R	Clonage Séquencage	Archées	CGG-TTG-ATC-CTG-CCG-GA GTG-CTC-CCC-CGC-CAA-TTC-CT	900	57	0.4	(Teske et al 2002)
E338 E1407	Clonage Séquencage	Bactéries	ACT-CCT-ACG-GGA-GGC-AGC GAC-GGG-CGG-TGW-GTR-CAA	1100	54	0.4	(Cambon-Bonavita et al. 2009)
A915F A71R (23S)	ARISA	ITS Archéen	AAA-GGA-ATT-GGC-GGG-GGA-GCA-C TCG-GYG-CCG-AGC-CGA-GCC-ATC-C	Variable	55	0.4	(Casamayor et al 2002)
ITSf ITSreub	ARISA	ITS Bactérien	GTC-GTA-ACA-AGG-TAG-CCG-TA GCC-AAG-GCA-TCC-ACC	Variable	55	0.4	(Casamayor et al 2002)
ARC-787F ARC-1059R	Q-PCR	<i>Archaea</i>	ATT-AGA-TAC-CCS-BGT-AGT-CC GCC-ATG-CAC-CWC-CTC-T	273	60	0.5	(Yu et al 2005)
BACT-1369F BACT-1492R	Q-PCR	<i>Bacteria</i>	CGG-TGA-ATA-CGT-TCY-CGG GGW-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T	142	58	0.6	(Suzuki et al 2000)
Mcc495F McocR	Q-PCR	<i>Methanococcales</i>	TAA-GGG-CTG-GGC-AAG-T GGA-TCA-ACA-CAT-TTC-ACC-GC	186	61	1.1	(Yu et al 2005) (Vigneron et al 2012)
MBT-857F MBT-1196R	Q-PCR	<i>Methanobacteriales</i>	CGW-AGG-GAA-GCT-GTT-AAG-T TAC-CGT-CGT-CCA-CTC-CTT	343	60	0.3	(Yu et al 2005) (Yu et al 2005)
MmicF MmicR	Q-PCR	<i>Methanomicrobiales</i>	GTG-ATA-AGG-GAA-CCY-CGA-G GCT-ACG-RAC-GCT-TTA-AGC-C	126	61	0.9	(Vigneron et al 2012) (Vigneron et al 2012)
MsarF Msar2R	Q-PCR	<i>Methanosarcinales</i>	GTA-CCT-ACT-AGC-CDA-CRA-CGG GCT-ACR-GAC-CCT-TTA-GAC-CC	244	64	0.9	(Vigneron et al 2012) (Vigneron et al 2012)
MpyrF MpyrR	Q-PCR	<i>Methanopyrales</i>	GGC-TAA-TCC-CCG-ATA-GGC CTT-GTC-TCA-GTC-CCC-GTC-TC	151	61	0.8	(Vigneron et al 2012) (Vigneron et al 2012)
ANME1F ANME1R	Q-PCR	ANME1	GCT-TTC-AGG-GAA-TAC-TGC TCG-CAG-TAA-TGC-CAA-CAC	200	60	1.1	(Lloyd et al 2011) (Lloyd et al 2011)
ANME2aF ANME2aR	Q-PCR	ANME2a	ACG-GAT-ACG-GGT-TGT-GAG-AG CTT-GTC-TCA-GTC-CCC-GTC-TC	151	60	1.1	(Vigneron et al 2012) (Vigneron et al 2012)
ANME2cR ANME2cF	Q-PCR	ANME2c	TCC-TCT-GGG-AAA-TCT-GGT-TG TCG-TTT-ACG-GCT-GGG-ACT-AC	224	60	1.1	(Vigneron et al 2012) (Vigneron et al 2012)
ANME3F ANME3R	Q-PCR	ANME3	GGA-TTG-GCA-TAA-CAC-CGG TAT-GCT-GGC-ACT-CAG-TGT-CC	234	60	1.1	(Vigneron et al 2012) (Vigneron et al 2012)
MBGB-302F MBGB-423R	Q-PCR	MBGB	CGA-TAA-TCG-ATA-GGG-GCC-GT TGG-GTA-ACC-CCG-TCA-CA	138	60	1	(Vigneron et al 2012) (Vigneron et al 2012)
MBGD-345F MBGD-552R	Q-PCR	MBGD	ATA-TCT-GAG-ACA-CGA-TAT-CRG-G CAC-CAC-TTG-AGC-TGC-AGG-TA	227	60	1	(Vigneron et al 2012) (Vigneron et al 2012)
MCG-528F MCG-780R	Q-PCR	MCG	CGG-TAA-TAC-CAG-CTC-TCC-GAG TTC-GCT-CCC-CCA-GCT-T	268	60	0.9	(Kubo et al 2012) (Vigneron et al 2012)
DSS-314F DSS-474R	Q-PCR	<i>Desulfosarcinales</i> <i>Desulfococcales</i>	ACT-TGA-GTA-TGG-GAG-AGG-GAA-G ACC-TAG-TGT-TCA-CCG-TTT-ACT-GC	180	60	1	(Vigneron et al 2012) (Vigneron et al 2012)
DBB-314F DBB-474R	Q-PCR	<i>Desulfobulbacea</i>	GCT-TGA-GTA-TGG-GAG-GGG-A CAC-CTA-GTT-CTC-ATC-GTT-TAC-AGC	180	60	1	(Vigneron et al 2012) (Vigneron et al 2012)
SRB2-314F SRB2-474F	Q-PCR	SEEP SRB-2	ACT-TGA-GTA-CCG-GAG-AGG-GA CCT-AGT-GCC-CAT-CGT-TTA-GG	180	60	1	(Vigneron et al 2012) (Vigneron et al 2012)
JS1-318F JS1-410R	Q-PCR	Candidate div. JS1	GAC-TTG-AGG-TTA-GAA-GAG-GAA-AGT-G GAG-ATA-GAC-CAG-AAA-GCC-GC	102	60	1.1	(Vigneron et al 2012) (Vigneron et al 2012)

III. Observations microscopiques

Toutes les techniques d'observation décrites ci-dessous, permettant la visualisation des communautés microbiennes dans les échantillons de sédiment ont été employées sur les échantillons conditionnés à bord. Pour cela, 2 cm³ de sédiment ont été fixés dans une solution d'eau de mer et de formaldéhyde (3%) pendant 4 h à 4°C puis rincés deux fois dans du tampon PBS 1X avant d'être conservés dans une solution de PBS/Ethanol (1/1).

1) Hybridation Fluorescente *in situ* (FISH)

Les mises au point expérimentales et les observations par microscopie et hybridation *in situ* ont été réalisées en collaboration avec Perrine Cruaud (étudiante en thèse au Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, Ifremer). Le protocole de FISH à partir d'échantillons de sédiment, décrit par Thierry Nadalig et Marie-Anne Cambon-Bonavita (Cambon-Bonavita et al., 2009), a été modifié et optimisé pour une hybridation et une visualisation optimale des sondes fluorescentes. Les sondes utilisées lors de ces travaux sont décrites en Table 4. Les échantillons fixés au formaldéhyde et conservés dans le PBS:Ethanol (1/1) ont été dilués au 100ème puis 20 µL ont été immobilisés sur un filtre polycarbonate 0,2 µm (Merk Millipore) grâce à une colonne de filtration. Les filtres, une fois séchés sur papier Whatman ont été imbibés de tampon d'hybridation contenant du formaldéhyde et les sondes désirées (Table 4), puis incubés 3 h à 44°C dans un four à hybridation. Les filtres ont ensuite été plongés 20 min à 46°C dans une solution de rinçage puis séchés sur du papier Whatman avant d'être montés entre lame et lamelle dans une solution d'antifading (Citifluor) et de 4',6' -diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1 µM). L'ensemble a été conservé à -20°C avant observation. Les observations ont été effectuées à l'aide du microscope Zeiss Imager Z.2 équipé de la source HXP 120C et des modules Colibri et Apotome.

Tableau 4 : Table récapitulative des différentes sondes FISH utilisées.

Nom	Groupe ciblé	Séquence (5'-3')	Références
ARCH915	Archées	GTG-CTC-CCC-CGC-CAA-TTC-CT	(Amann et al 1990)
EUB338	Bactéries	GCT-GCC-TCC-CGT-AGG-AGT	(Amann et al 1990)
ANME1-350	ANME-1	AGT-TTT-CGC-GCC-TGA-TGC	(Boetius et al 2000)
ANME2-712	ANME-2	TTC-GCC-ACA-GAT-GGT-CCC	(Knittel and Boetius 2009)
ANME3-1249	ANME-3	TCG-GAG-TAG-GGA-CCC-ATT	(Losekann et al 2010)
ANME3-1249H3	ANME-3 Helper	GTC-CCA-ATC-ATT-GTA-GCC-GGC	(Losekann et al 2010)
ANME3-1249H5	ANME-3 Helper	TTA-TGA-GAT-TAC-CAT-CTC-CTT	(Losekann et al 2010)
MCG-493	MCG	CTT-GCC-CTC-TCC-TTA-TTC-C	(Kubo et al 2012)
Delta-495	Delta protéobactéries	AGT-TAG-CCG-GCG-CTT-CCT	(Loy et al 2002)
DSS-658	<i>Desulfosarcinales</i> <i>Desulfococcales</i>	TCC-ACT-TCC-CTC-TCC-CAT	(Manz et al 1997)
DBB-660	<i>Desulfobulbaceae</i>	GAA-TTC-CAC-TTT-CCC-CTC-TG	(Devereux et al 1992)
SEEP SRB2	Delta protéobactéries SEEP SRB2	TCC-ACT-TCC-CTC-TCC-GGT	(Kleindienst et al 2012)
SEEP SRB4	Delta protéobactéries SEEP SRB4	CCC-CCT-CCA-GTA-CTC-AAG	(Losekann et al 2010)
DSBAC-357	Syntrophobacterales	CCA-TTG-CGC-AAA-ATT-CCT-CAC	(Lücker et al 2007)
JS1-150	Candidate div. JS1	CAT-AAT-TAG-CCG-GAG-CTT-TCT-CT	(Vigneron et al 2012)



S'il est important de manipuler à l'abri d'une lumière directe pour préserver la fluorescence des sondes, il est également important de minimiser les temps de latence entre les différentes étapes après hybridation, en particulier lors de l'utilisation de sondes marqués avec le fluorochrome Cy 5. En effet, ce fluorochrome est très sensible et un temps de latence à sec et à température ambiante peut conduire à une disparition très rapide du signal lors de l'observation.

2) Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les observations par microscopie électronique à balayage ont également été réalisées avec Perrine Cruaud (Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, Ifremer). Les sédiments n'ayant pas été fixés spécifiquement pour la microscopie électronique à bord, les expérimentations ont été réalisées sur les sédiments fixés au formaldéhyde, destinés aux observations FISH. Les sédiments préalablement fixés ont été traités aux ultra-sons 40 fois pendant 1 sec à 40% d'intensité maximum (VibraCell, BioBlock) puis immobilisés sans compression sur un filtre polycarbonate 0,2 µm (Milipore) à l'aide de seringues et d'unités de filtration. Les filtres ont ensuite été métallisés après un séchage de 24 h sur du papier Whatman, sans étape de point critique. Les annotations

pour localiser les zones d'intérêt à analyser sur les filtres ont été réalisées avant filtration à l'aide d'un stylo à encre non liquide et à pointe fine. La préparation des échantillons fixés sur filtres ainsi que la mise en œuvre du microscope ont été réalisées par Nicolas Gayet (Laboratoire Environnement Profonds, Ifremer).

IV. Mesures d'activités

Les mesures d'activités de méthanogénèse et de production de CO₂ ont été réalisées par l'équipe de John Parkes à l'Université de Cardiff au Pays de Galles. Différents conditionnements ont été utilisés à bord pour permettre des mesures d'activité *in situ*. La technique consistant à insérer des mini carottiers tubes à l'intérieur des carottiers n'a malheureusement pas été fonctionnelle et ce pour deux raisons. D'une part, le planté de ces mini carottiers perturbe fortement le sédiment et d'autre part, il modifie également la porosité du sédiment compliquant considérablement les estimations de volume de sédiment pour les mesures chimiques associées. La technique "classique" de prélèvement grâce à des seringues coupées à leur extrémité, réalisée sur le carottier long Kullenberg s'est avérée mieux adaptée. Les échantillons conservés en anaérobiose dans des fioles pénicillines ont été inoculés avec un substrat marqué par des isotopes stables (Triméthylamine, acétate, CO₂) et incubés pendant 4 à 7 jours à la température *in situ* puis les fractions de méthane et CO₂ marqués ont été mesurées puis reportées à la concentration initiale en substrat dans l'environnement.

V. Cultures d'enrichissements de méthanogènes

Des cultures d'enrichissements des populations méthanogènes ont été réalisées en milieux spécifiques à partir d'échantillons conservés en fioles anaérobies à 4°C. Quatre milieux anaérobies différents ont été réalisés, selon le milieu de base M141 de la DSMZ (http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium141.pdf), mais en présence de sources de carbone et des accepteurs d'électrons différents. Afin d'enrichir les communautés méthanogènes méthylotrophes le milieu M141 a été enrichi, sous atmosphères d'N₂/CO₂ (80:20), en tri-méthylamide (TMA, 20 mM) ou en acétate (10 mM) pour cibler les communautés acétoclastes. Enfin, un milieu M141 non enrichi et un milieu M141 avec acétate sous atmosphère d'H₂/CO₂ (80:20) (200kPa) ont été réalisés afin d'enrichir les communautés autotrophes réductrices de carbone inorganique. L'inoculation a été réalisée avec 1 cm³ d'échantillon dans 9 mL de milieu (pH 7), la suspension mélangée

puis diluée jusqu'au 1/100. Les cultures ont été incubées à 12°C puis observées régulièrement pendant deux ans. La production de méthane a été suivie par chromatographie gazeuse grâce au micro MTI M200 Gas Chromatograph et les cultures observées au microscope à épifluorescence (UV). Les cultures présentant un enrichissement positif ont été prélevées pour les analyses de biologie moléculaire et de FISH.



Figure 30 : Cultures d'enrichissement des communautés méthanogènes.



Les archées méthanogènes présentent dans leur paroi le cytochrome F420 qui fluoresce en bleu ciel sous excitation aux ultra-violets et permet ainsi leur détection rapide en microscopie à épifluorescence (Figure 10). Attention toutefois car les archées méthanotrophes anaérobies (ANME), phylogénétiquement très proches des méthanogènes, mais également d'autres groupes archéens (MGI, *Thaumarchaeota* ou *Geoarchaeota*) possèdent également ce cytochrome membranaire (M Kozubal, présentation orale ISME symposium).

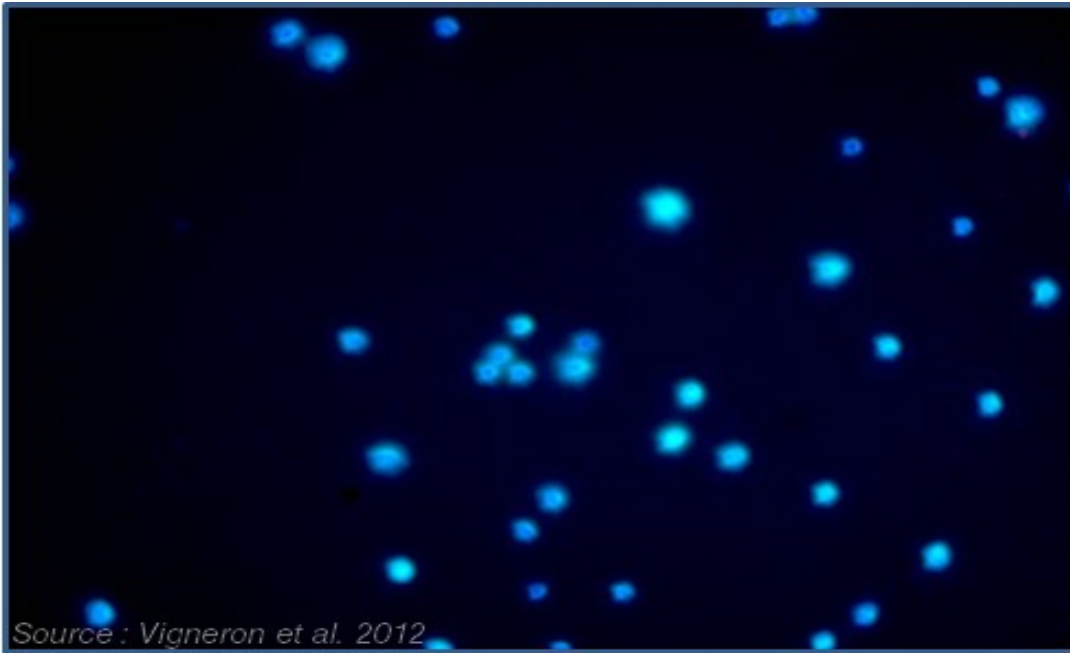


Figure 31 : Observation des communautés méthanogènes au microscope à épifluorescence (x1000, UV).

IV. RESULTATS / RESULTS

De part la proximité entre la zone hydrothermale et la zone de suintements froids, le bassin de Guaymas, alimenté par de riches apports terrigènes et planctoniques, constitue un environnement unique, riche en hydrocarbures, méthane et sulfures, permettant le développement de diverses communautés microbiennes et animales chimiosynthétiques, complexes et aux écophysiologies méconnues. Les sédiments associés aux zones d'émissions de fluides froids du bassin de Guaymas ayant été jusqu'à présent microbiologiquement inexplorés, l'objectif principal de ce projet de thèse était d'initier la description de la diversité aussi bien taxinomique que fonctionnelle des communautés microbiennes présentes au niveau des sédiments associés aux zones d'émissions de fluides froids de la marge de Sonora. Le second objectif de ce travail était ensuite l'identification, par l'utilisation de techniques culturales et moléculaires, des différents acteurs microbiens encore méconnus, impliqués dans le cycle du méthane, ainsi que des paramètres environnementaux, influençant la distribution et l'activité de ces communautés microbiennes. Enfin, ce projet de thèse visait également à l'exploration des communautés et des fonctions microbiennes présentes dans les horizons sédimentaires plus profonds sous-jacents aux zones d'émissions de fluides froids.

Dans ce but, plusieurs prélèvements de sédiment ont été effectués lors de la campagne océanographique française "BIG" en juin 2010. Les sédiments de surface (0 - 20 cm de profondeur), présentant divers assemblages faunistiques visibles (tapis microbiens, macrofaune) et caractéristiques des sites de sorties de fluides froids, ont été échantillonnés à l'aide de carottiers tubes manipulés par le sous marin Nautille (Ifremer). Un carottage gravitaire (Kullenberg BCK1) a également été effectué au niveau d'un site choisi grâce aux relevés bathymétriques et à la visualisation de panaches de gaz dans la colonne d'eau par le sondeur de pêche du navire. Ce prélèvement permet d'accéder aux communautés microbiennes enfouies profondément (jusqu'à 9 m de profondeur) dans les sédiments de la marge de Sonora.

La stratégie expérimentale adoptée dans ce travail de thèse, reposait sur une approche pluridisciplinaire couplant des approches de biologie moléculaire et des techniques de microscopie sur la totalité des prélèvements effectués. Les résultats ainsi obtenus ont ensuite été analysés en fonction des communautés de surface observées et de la géochimie des sédiments.

Ainsi, la diversité, mais également la distribution et l'écophysiologie des archées métaboliquement actives dans les sédiments de surface de la marge de Sonora ont été décrites. Un intérêt particulier a été porté sur les populations archéennes impliquées dans le cycle du méthane (méthanogènes et méthanotrophes anaérobies), qui se sont avérées constituer la composante majeure des communautés d'archées. Ces résultats, détaillés et discutés, font l'objet d'un premier article actuellement en révision (Article 1).

En complément, les communautés microbiennes méthanogènes cultivables ont été étudiées sur les échantillons de sédiments de surface de la marge de Sonora. Des cultures d'enrichissement ont été réalisées à l'aide de milieux de culture spécifiques, afin d'accéder aux populations méthanogènes viables dans les sédiments (Article complémentaire) et d'effectuer une comparaison avec les résultats obtenus précédemment par les techniques de biologie moléculaire.

Par la suite, la densité, la diversité, et l'écophysiologie des bactéries métaboliquement actives ont été étudiées. Les acteurs bactériens impliqués dans le processus d'oxydation anaérobie du méthane ont été recherchés puis étudiés. La relation syntrophique entre les archées ANMEs précédemment décrites et les partenaires bactériens observés au sein des consortia d'AOM a également été approfondie. Les résultats obtenus au cours de ces travaux sont discutés et présentés dans une seconde publication soumise (Article 2).

Enfin, les communautés microbiennes des horizons sédimentaires plus profonds de la marge de Sonora ont été étudiées. Les populations microbiennes impliquées dans la production et l'oxydation du méthane ont dans un premier temps été recherchées. La distribution et les fonctions métaboliques des microorganismes incultivés dominants ont ensuite été étudiées. Ces travaux, présentés dans un dernier article en préparation, ont fait l'objet de collaborations internationales et constituent une approche moléculaire innovante pour l'étude des communautés microbiennes incultivées.

Due to the proximity of the hydrothermal and cold seep areas, the Guaymas Basin, fueled by substantial terrigenous and planktonic inputs, provides an unique environment, enriched in hydrocarbon, methane and sulfides. This special feature allows the development of various, complex and misunderstood microbial and animal communities. The cold seep sediments of the Guaymas Basin remaining so far microbiologically unexplored. The main objective of this thesis was to explore, for the first time, the phylogenetic and functional diversity of the metabolically active microorganisms in the cold seeps of the Sonora Margin. The second objective of this work was the identification of the different microbial actors involved in the methane cycle using both molecular and cultivation approaches, as well as the environmental parameters monitoring the distribution and activity of these communities. Finally, this thesis also aimed to explore the microbial communities and functions in the deepest sediment horizons underlying the cold seep area.

For this purpose, several sediment samples were carried out during the French oceanographic cruise "BIG" in June 2010. The surface sediment (0 to 20 centimeters below the surface), colonized by typical diverse communities (microbial mats, macrofauna), were sampled by using push cores handled by the submersible *Nautilie*. A gravity core (Kullenberg BCK1) was also performed near the cold seep area, according to the detection of gas plumes in the water column, in order to study the microbial communities in the deeply buried sediments (down to 9 mbsf) of the Sonora Margin.

The strategy used in this work was based on a pluridisciplinary approach coupling molecular methods and microscopy, applied on every samples. The obtained results were then analyzed according to surface communities and sediment geochemistry.

Therefore, the diversity, the distribution and the ecophysiology of metabolically active archaeal communities and more particularly those involved in methane cycle (methanogens and ANME) at the Sonora Margin shallow sediments (0-20 cmbsf) were described and detailed in the first article (Currently under review).

Additionally, the diversity of cultured methanogenic community was analyzed on these surface sediments. Enrichments were carried out using specific media in order to access to methanogenic populations and to compare with the previous molecular results.

Then, the density, diversity and ecophysiology of active bacterial communities were studied at the Sonora Margin cold seeps. Bacterial actors physically involved in the AOM process

were investigated. Syntrophic relationship between *Archaea* and *Bacteria* in AOM consortia was also studied. This work was discussed and presented in a second article (submitted).

Finally, the microbial communities of the deepest sediment horizons of the Sonora Margin were investigated. The microbial populations involved in the production and the oxidation of methane have been searched and then the diversity, distribution and ecological function of the dominant uncultured microbial lineages have been investigated. This study, presented in the third publication, was done through international collaborations and constituted in an innovative approach for the understanding of uncultured microbial communities.

Article 1: "Archaeal and anaerobic methane oxidizer communities in the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin (Gulf of California)"

Vignerot Adrien, Cruaud Perrine, Pignet Patricia, Caprais Jean-Claude, Cambon-Bonavita Marie-Anne, Godfroy Anne et Toffin Laurent

Deuxième soumission à ISME Journal, actuellement en cours de révision.

Introduction à l'étude

Le plancher océanique, au niveau de la marge continentale de Sonora, est caractérisé par divers habitats faunistiques. Ces habitats, formant une mosaïque composée de tapis microbiens et de communautés animales (bivalves, vestimentifères ...), se développent en surface des sédiments grâce à l'utilisation de composés réduits. Ces assemblages biologiques constituent ainsi des indicateurs de sorties de fluides froids, riches en composés réduits, hydrocarbures, méthane et sulfures. Les nombreuses études réalisées sur ce type d'écosystème ont révélé la présence dans les sédiments sous-jacents, d'une importante biomasse microbienne, dont les produits du métabolisme (principalement H₂S, CO₂, H₂) enrichissent le fluide et alimentent les assemblages faunistiques de surface. Ces communautés microbiennes des sédiments anoxiques sont majoritairement impliquées dans la production et/ou la consommation du méthane. Dans les habitats similaires des marges continentales associés à des émissions de fluides froids, ces processus microbiens sont réalisés par des communautés archéennes encore incultivées, à l'exception de certaines espèces de méthanogènes. Pour la majorité de ces communautés microbiennes incultivées, l'écophysiologie et le métabolisme sont encore méconnus. Cette première étude a donc été consacrée à l'étude de la diversité, de l'abondance et de la distribution des communautés d'archées présentes et métaboliquement actives, dans les sédiments superficiels associées aux émissions de fluides froids de la marge de Sonora. L'influence des paramètres physico-chimiques environnementaux, ainsi que celle des communautés colonisant les sédiments supérieurs, sur la distribution et l'écophysiologie des communautés impliquées dans le cycle du méthane ont également été abordées dans cette étude.



ORIGINAL ARTICLE

Archaeal and anaerobic methane oxidizer communities in the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin (Gulf of California)

Adrien Vigneron^{1,2,3}, Perrine Cruaud^{1,2,3}, Patricia Pignet¹, Jean-Claude Caprais⁴, Marie-Anne Cambon-Bonavita^{1,2,3}, Anne Godfroy^{1,2,3} and Laurent Toffin^{1,2,3}

¹DEEP/LM2E, IFREMER, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, Technopôle Brest Iroise, Plouzané, France; ²Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, IUEM UMR6197, Université de Bretagne Occidentale, Plouzané, France; ³CNRS, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, Technopôle Brest Iroise, Plouzané, France and ⁴IFREMER, Laboratoire Environnements Profonds, UMR6197, Technopôle Brest Iroise, Plouzané, France

Cold seeps, located along the Sonora Margin transform fault in the Guaymas Basin, were extensively explored during the 'BIG' cruise in June 2010. They present a seafloor mosaic pattern consisting of different faunal assemblages and microbial mats. To investigate this mostly unknown cold and hydrocarbon-rich environment, geochemical and microbiological surveys of the sediments underlying two microbial mats and a surrounding macrofaunal habitat were analyzed in detail. The geochemical measurements suggest biogenic methane production and local advective sulfate-rich fluxes in the sediments. The distributions of archaeal communities, particularly those involved in the methane cycle, were investigated at different depths (surface to 18 cm below the sea floor (cmbsf)) using complementary molecular approaches, such as Automated method of Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA), 16S rRNA libraries, fluorescence *in situ* hybridization and quantitative polymerase chain reaction with new specific primer sets targeting methanogenic and anaerobic methanotrophic lineages. Molecular results indicate that metabolically active archaeal communities were dominated by known clades of anaerobic methane oxidizers (archaeal anaerobic methanotroph (ANME)-1, -2 and -3), including a novel 'ANME-2c Sonora' lineage. ANME-2c were found to be dominant, metabolically active and physically associated with syntrophic *Bacteria* in sulfate-rich shallow sediment layers. In contrast, ANME-1 were more prevalent in the deepest sediment samples and presented a versatile behavior in terms of syntrophic association, depending on the sulfate concentration. ANME-3 were concentrated in small aggregates without bacterial partners in a restricted sediment horizon below the first centimetres. These niche specificities and syntrophic behaviors, depending on biological surface assemblages and environmental availability of electron donors, acceptors and carbon substrates, suggest that ANME could support alternative metabolic pathways than syntrophic anaerobic oxidation of methane.

The ISME Journal advance online publication, 28 February 2013; doi:10.1038/ismej.2013.18

Subject Category: Microbial ecology and functional diversity of natural habitats

Keywords: ANME; AOM; *Archaea*; FISH; Q-PCR; Sonora Margin

Introduction

At continental margins, large amounts of sedimented organic matter are progressively degraded and transformed into deeply buried hydrocarbons, such as methane. In localized areas, named cold seeps, these hydrocarbons rise in a fluid to the seafloor and form oases of elevated microbial biomass and various faunal assemblages (Jorgensen and Boetius,

2007). According to recent estimates, more than 90% of the emitted methane is metabolized by chemosynthetic archaeal anaerobic methanotroph (ANME) and bacterial sulfate reducer consortia during sulfate reduction coupled to anaerobic oxidation of methane (AOM) in sediments (see Knittel and Boetius (2009) and references therein). ANME clades are phylogenetically divided into three distinct lineages (ANME-1, ANME-2 and ANME-3) affiliated to the Methanosarcinales and Methanomicrobiales orders (Knittel and Boetius, 2009). Metagenomic and metaproteomic studies of ANME communities support the existence of a reverse methanogenesis metabolic pathway for AOM (Meyerdierks *et al.*, 2005, 2010). The products

Correspondence: L. Toffin, DEEP/LM2E, IFREMER, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, Technopôle Brest Iroise, BP70, Plouzané 29280, France.
E-mail: laurent.toffin@ifremer.fr
Received 17 September 2012; revised 8 January 2013; accepted 10 January 2013

of these anaerobic microbial metabolisms (sulfide or incompletely oxidized organic compounds) are assimilated by mat-forming giant sulfide-oxidizing *Bacteria*, such as *Beggiatoa* spp. (Lloyd *et al.*, 2010; Grünke *et al.*, 2011; McKay *et al.*, 2012) or invertebrate symbiosis-involved microorganisms (Cambon-Bonavita *et al.*, 2009). However, much remains to be understood about the AOM mediated by ANME. For instance, the diversity and habitat preference of involved microorganisms or the environmental parameters that impact on these archaeal groups' distribution need to be defined.

The methane-rich hydrothermal sediments of Guaymas Basin, with a high sedimentation rate (2.7 mm per year), were the first hydrothermal vent habitats in which AOM was demonstrated and have since been studied extensively (Simoneit *et al.*, 1996; Teske *et al.*, 2002; Dhillon *et al.*, 2003, 2005; Page *et al.*, 2008; Holler *et al.*, 2011; Biddle *et al.*, 2012; McKay *et al.*, 2012). In contrast, a nearby cold seep area, which harbors local patches of microbial mats and various faunal assemblages (clams, tubeworms), was observed few kilometers away from hydrothermal sites on a transform fault located on the Sonora Margin (Simoneit *et al.*, 1990; Paull *et al.*, 2007), but remains unsampled for microbiology.

To characterize for the first time microbial communities on the Sonora Margin and to understand the structure and function of the observed microbial ecosystems (two microbial mats and surrounding macrofauna), phylogenetic, microscopic and quantitative analyses of archaeal communities involved in methane cycling and in cold seep processes were undertaken and completed using geochemical analyses.

Materials and methods

Site description and sampling

Sediment push core samples were collected in triplicate at cold hydrocarbon-rich seeps from the Sonora Margin using the manned submersible *Nautilie* on dives 1755-11, 1756-12 and 1758-14 at 1574 m depth during the cruise 'BIG' (RV *L'Atalante*, June 2010). The sediments, located near marker BIG18 at 'Vasconcelos' site (27°35.5770N; 111°28.9840W) (Supplementary Material and Figure 1), highly supplied by visible sinking organic matter, were covered with patchy thick white *Beggiatoa* mats occasionally surrounded by grey mat-like macrofauna assemblage. Four different sampling locations were included in this study: (i) White MAT 12 (WM12), a sediment covered with a white microbial mat <1 m wide; (ii) White MAT 14 (WM14), a larger white microbial mat area where gas bubbles and fluids were expelled through a hole; (iii) the Edge of White MAT 14 (EWM14), colonized by dense populations of grey polychaetes and gastropods (M Rabillier and K Olu, personal communications) assumed to be, respectively, deposit feeders and grazers (Fauchald and Jumars, 1979; Waren and Ponder, 1991)

(Supplementary Material and Figure 2); and (iv) outside of the active area, that is, the reference site (27°25.483N; 111°30.0759W). At each location, except for WM12 due to its narrow diameter, additional cores were collected on each habitat for methane and sulfide analyses (Supplementary Material and Figure 1). Autonomous temperature sensors (T-Rov; NKE Electronics, Hennebont, France) indicated *in situ* temperatures around 3 °C from the surface water to the 40 cm below the sea floor (cmbsf) on each habitat before sampling.

On board, sediment cores were immediately transferred to the cold room. Sediments recovered from WM14 and EWM14 consisted of a dark olive-green ooze in the upper 5 cm and color became lighter with depth. In contrast, sediments color from WM12 was black throughout the core. Gas bubbles were noted immediately after recovery. Sediment cores were subsampled aseptically for molecular analyses in 2- or 5-cm-thick layers using 2 ml cutoff syringes. Sediment subsamples were then frozen at -80 °C for nucleic acid extractions. Sediments (2 g) were collected from each layer and fixed for 4 h in phosphate-buffered saline/formaldehyde (3% final) at 4 °C, washed two times with phosphate-buffered saline and stored in an ethanol/phosphate-buffered saline (1:1, vol vol⁻¹) buffer at -20 °C until analysis by fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

Porewater analyses

Sediment samples were processed on board for porewater chemical analyses. Porewater for sulfate analysis was obtained by spinning down 10 cm³ of sediments per horizon or using Rhizon samplers on closest geochemical cores for hydrogen sulfide and methane (Supplementary Material and Figure 1). Porewater samples were fixed with: zinc chloride (1:1, vol vol⁻¹) for sulfide and 50 µl of sodium azide for methane analyses and nitric acid for sulfate. Sulfate concentrations were measured by ion exchange chromatography as described previously (Lazar *et al.*, 2012). Hydrogen sulfide concentrations were determined by colorimetry (Fonselius *et al.*, 2007). Methane concentrations were quantified by using the headspace technique (HSS 86.50, Dani Instruments, Milan, Italy) and a gas chromatograph (Perichrom 2100, Alpha MOS, Toulouse, France) equipped with flame-ionization detector (Sarradin and Caprais, 1996).

The stable isotope composition of methane was measured by ISOLAB b.v. company (Neerijnen, The Netherlands) in the deepest sediment section (12–17 cmbsf) of the WM14 core CT4 using a MAT Finnigan delta S mass spectrometer (San Jose, CA, USA) coupled to a gas chromatograph by a GC/C II interface.

RNA and DNA extractions from sediments, PCR and RT-PCR amplifications, cloning and sequencing
Total nucleic acids (DNA and RNA) were directly extracted in duplicate from 2.5 g of sediments (Zhou

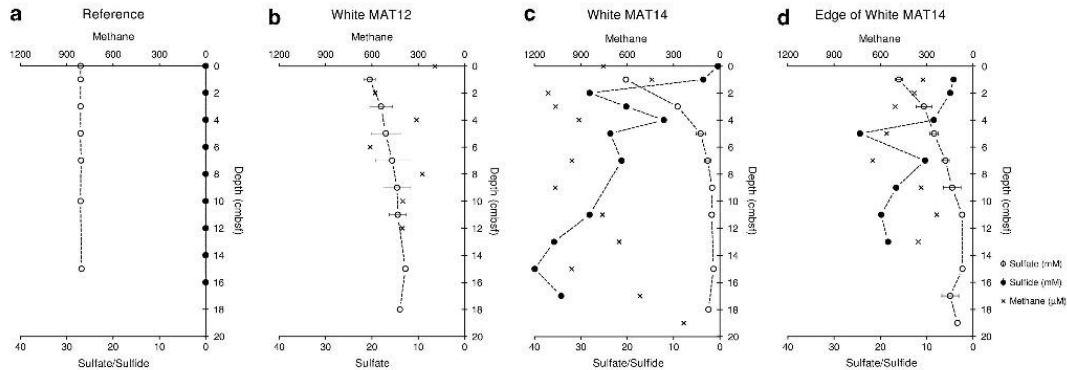


Figure 1 Geochemical profiles in cold seep sediments of Sonora Margin, Guaymas Basin. Dissolved methane (cross), sulfate (open circle) and sulfide (black circle) concentrations in porewaters. Sediment cores were from (a) Reference, (b) White MAT12, (c) White MAT14 and (d) the Edge of White MAT14.

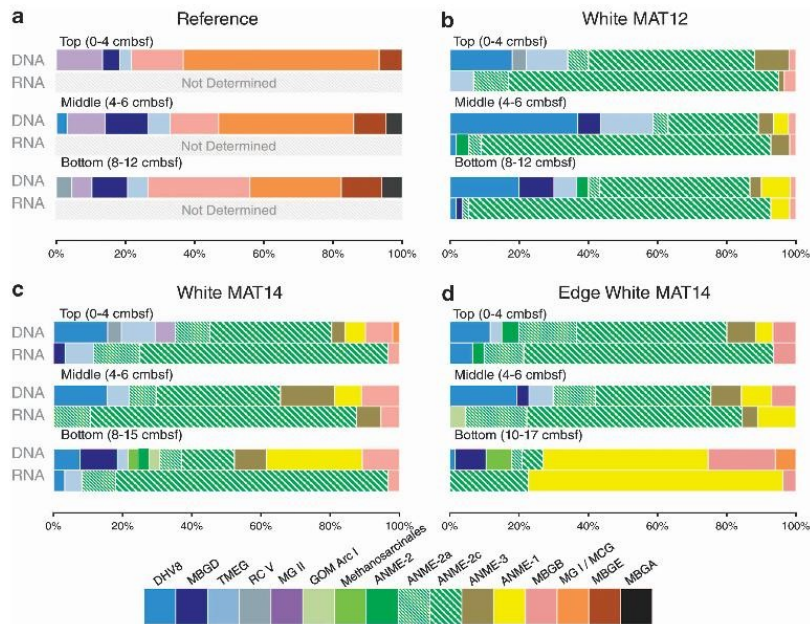


Figure 2 Phylogenetic affiliations of archaeal 16S rRNA genes and 16S rRNA-derived sequences at different depths for cold seep sediments of the Sonora Margin: (a) Reference, (b) White MAT12, (c) White MAT14 areas and (d) the Edge of White MAT 14. Shades of green, brown and yellow denote putative methane-oxidizing or methane-producing groups. 'Not determined' means that no amplification was obtained. DHVE8, Deep-Sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotal Group 8; MBG-D, -A, -E, -B Marine Benthic Group-D, -A, -E, -B; MCG, Miscellaneous Crenarchaeotic Group; MG II/I, Marine Group II/I; RCV, Rice Cluster V; TMEG, Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotal Group; ANME, Anaerobic Methanotrophs; GOM Arc I, Golf of Mexico Archaea group I.

et al., 1996) with modifications, pooled and purified (Lazar *et al.*, 2010). Total RNA were purified using Nucleospin RNA II Kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) before reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR). Aliquots of rRNA were reverse transcribed using the Quanta qScript Kit according to the manufacturer's protocol (Quanta Bioscience, Gaithersburg, MD, USA). All PCR reactions were

monitored as detailed previously (Lazar *et al.*, 2010), with appropriate annealing temperature for primers listed in Table 1. Gene libraries from 16S rRNA genes (named 16S rDNA in the text) and crDNA templates (named 16S rRNA and used as a proxy for the detection of metabolically active populations) were constructed from pooled and gel-purified triplicate reactions into TOPO XL PCR Cloning Kit

Table 1 PCR primers used for PCR, ARISA and real-time PCR of 16S rDNA genes

Name	Function	Target group	Sequence (5'—3')	Amplicon size (bp)	Annealing temp. (°C)	Primer conc. (mM)	Ref.
A8F	Cloning	Most of Archaea	CGG-TTG-ATC-CTG-CCG-GA	900	57	0.4	Teske <i>et al.</i> (2002)
A915R	Sequencing		GTG-CTC-CCG-CCG-CAA-TTC-CT				
A915F	ARISA	ITS of Archaea	AAA-GGA-ATP-GGC-GGG-GGA-GCA-C	Variable	55	0.4	Casamayor <i>et al.</i> (2002)
A71R (23S)			TCG-GYG-CCG-AGC-CGA-GCC-ATC-C				
Mcc495F	Q-PCR	Methanococcales	TAA-GGG-CTG-GGC-AAG-T	186	61	1.1	Yu <i>et al.</i> (2005)
MccocR			GGA-TCA-ACA-GAT-TTC-ACC-GC				This study
MBT857F	Q-PCR	Methanobacteriales	CGW-AGG-GAA-GCT-GTT-AAG-T	343	60	0.3	Yu <i>et al.</i> (2005)
MBT1196R			TAC-CGT-CGT-CCA-CTC-CTT				Yu <i>et al.</i> (2005)
MmicF	Q-PCR	Methanomicrobiales	GTG-ATA-AGG-GAA-CCY-CGA-G	126	61	0.9	This study
MmicR			GCT-ACG-RAC-GCT-TTA-AGC-C				This study
MsarF	Q-PCR	Methanosarcinales	GTA-CCT-ACT-AGC-CDA-CRA-CGG	244	64	0.9	This study
Msar2R			GCT-ACR-GAC-CCT-TTA-GAC-CC				This study
MpyrF	Q-PCR	Methanopyrales	GGC-TAA-TGC-CCG-ATA-GGC	151	61	0.8	This study
MpyrR			CTT-GTC-TCA-GTC-CCC-GTC-TC				This study
ANME-1F	Q-PCR	ANME-1	GCT-TTC-AGG-GAA-TAC-TGC	200	60	1.1	Lloyd <i>et al.</i> (2011)
ANME-1R			TGC-CAG-TAA-TGC-CAA-CAC				Lloyd <i>et al.</i> (2011)
ANME-2aF	Q-PCR	ANME-2a	ACG-GAT-ACG-GGT-TGT-GAG-AG	151	60	1.1	This study
ANME-2aR			CTT-GTC-TCA-GTC-CCC-GTC-TC				This study
ANME-2cR	Q-PCR	ANME-2c	TCC-TCT-GGG-AAA-TCT-GGT-TG	224	60	1.1	This study
ANME-2cF			TCG-TTT-ACG-GCT-GGG-ACT-AC				This study
ANME-3F	Q-PCR	ANME-3	GGA-TTG-GCA-TAA-CAC-CGG	234	60	1.1	This study
ANME-3R			TAT-GCT-GGC-ACT-CAG-TGT-CC				This study
ARC787F	Q-PCR	Archaea	ATT-AGA-TAC-CCS-BGT-AGT-CC	273	60	0.5	Yu <i>et al.</i> (2005)
ARC1059R			GCC-ATG-CAC-CWC-CTC-T				
BACT1369F	Q-PCR	Bacteria	CGG-TGA-ATA-CGT-TCY-CGG	142	58	0.6	Suzuki <i>et al.</i> (2000)
BACT1492R			GGW-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T				

Abbreviations: ANME, archaeal anaerobic methanotroph; ARISA, Automated method of Ribosomal Intergenic Spacer Analysis; ITS, Intergenic Transcribed Spacer; Q-PCR, quantitative polymerase chain reaction.

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA). Sequencing was performed on an ABI3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using M13 universal primers by GATC Biotech (Constance, Germany). Sequences were analyzed using the NCBI BLASTn search program GenBank (Altschul *et al.*, 1990) and aligned with the closest representative sequences using ClustalW function within BioEdit v.7.1 program (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA). Sequences data were analyzed with the MEGA4.0.2 program (Tamura *et al.*, 2007) and checked manually for chimera. Phylogenetic trees were calculated by neighbor-joining analysis (Saitou and Nei, 1987) using the Kimura two-parameter correction matrix (Kimura, 1980) and pairwise deletion parameter. The robustness of inferred topology was tested by bootstrap resampling (1000) (Felsenstein, 1985). Sequences have been deposited in the EMBL database under the following accession numbers: HE774517–HE774603.

ARISA

An Automated method of Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA) was carried out for a rapid

monitoring of microbial diversity and community composition in all sediment samples (Fisher and Triplett, 1999). ARISA-PCR was performed with primers targeting the archaeal 16S–23S intergenic spacer region (Table 1). PCR conditions were as follows: denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s and extension for 1 min 20 s at 72 °C for 35 cycles, followed by a final extension step at 72 °C for 15 min. A measure of 1 μM of each PCR reaction mixture was analyzed according to the manufacturer's protocol on a DNA 7500 Chip with an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA). All data were recovered and analyzed using the R Software with the ade4TkGUI package (Thioulouse and Dray, 2007).

Quantitative real-time PCR

Quantitative measurements were duplicated for each cores. Amplifications were performed with a 7300 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a final volume of 25 μl using PerfeCTa SYBR Green SuperMix ROX (Quanta Bioscience), 1 ng of crude DNA template and primers with appropriate concentrations and annealing temperatures (Table 1) according to the manufacturer's

instructions. Primer concentrations were optimized to minimize the secondary structure formations and to maximize the reaction efficiency. Annealing temperatures were adjusted for amplification specificity. As published primer pairs appeared inefficient for quantitative (Q-PCR), new primer sets specific for methanogenic and anaerobic methanotrophic communities, were designed using ARB package (Ludwig *et al.*, 2004) and web-based application Primaclade (Gadberry *et al.*, 2005) (Table 1). Primers were checked for specificity using *Oligocheck* software (Cardiff University, Cardiff, UK) and tested by PCR. Standard curves were obtained in triplicate with dilutions ranging from 0.001 to 100 nM of DNA extracted from pure cultures of representative groups (Supplementary Materials and Table 1). As no pure culture is available for ANME, standards were made from 10-fold serial dilutions (10^5 – 10^9 copies per μ l) of plasmids containing environmental 16S rRNA genes of anaerobic methanotrophs. The R^2 of standard curves obtained by real-time PCR were up to 0.997 and efficiency of the reaction up to 90%. Samples were diluted until the crossing point decreased log-linearly with sample dilution, indicating the absence of inhibition effect. The specificity of the primer sets was confirmed by control sequencing of the amplification products. Q-PCR results were expressed in copy number per gram of sediment.

Fluorescence *in situ* hybridization

A measure of 20 μ l of a 100-fold dilution of fixed sediment subsamples were immobilized on 0.22 μ m GTTP polycarbonate filters (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Hybridization conditions were optimized to maximize fluorescence signal and probe specificity. Filters were incubated for 3 h at 44 °C, with hybridization buffer containing 40% formamide and labeled probes (Table 2) before washing at 46 °C for 20 min (Snaidr *et al.*, 1997). Finally, filters were fixed on slides and treated with antifading/ 4',6-diamidino-2-phenylindole solution (SlowFade Gold; Invitrogen). Observations and imaging were performed using an epifluorescence microscope Apotome with Axio Imager Z2 equipped with a COLIBRI system (Zeiss, Göttingen, Germany)

Results

Geochemical characterization

In WM14 and EWM14 sediments, porewater sulfate concentrations decreased rapidly from 22 mM in the surface layer to 2 and 5 mM respectively, at 5 cmbsf (Figures 1c and d), corresponding to the observed sediment color change. In contrast, WM12 sulfate concentrations decreased slightly from 22 mM at the surface to 12 mM by 18 cmbsf (Figure 1b). Sulfate concentrations in reference sediments remained constant to 28 mM with analyzed depth (Figure 1a).

Porewater sulfide concentrations increased quickly with depth and reached 40 mM in the WM14 core and 20 mM in the EWM14 core at the deepest sediment layers (Figure 1c). Peaks of sulfide (28 and 25 mM) were measured at 2 and 5 cmbsf for WM14 and EWM14, respectively (Figures 1c and d). Reference core sulfide concentrations remained under the detection limit (Figure 1a).

Methane porewater concentrations might have been underestimated owing to outgassing during core retrieval. Therefore, no clear methane profiles representing a 'sulfate-methane transition' could be inferred. The highest methane concentrations (almost 1.2 mM) were measured in WM14 cores, probably influenced by proximity to the fluid seep hole (Supplementary Material and Figure 1). Methane concentrations in the EWM14 were lower (0.7 mM) and varied according to depth (Figure 1d). Methane was not detected in the reference sediment core.

At the bottom (15–17 cmbsf) of WM14, $\delta^{13}\text{C-CH}_4$ signature was -63% , which could be interpreted as a dominant proportion of biogenic methane, mixed with abiotic and thermogenic methane (Damm and Budeus, 2003).

ARISA fingerprints

ARISA was used as a rapid method to compare archaeal community structure across the different samples. ARISA fingerprints displayed up to 10 different archaeal phylotypes throughout WM12, WM14 and EWM14 sediment cores, suggesting a low archaeal diversity. In all the sediment cores, community patterns were similar, with an observable shift in archaeal population composition at 4 cmbsf

Table 2 Oligonucleotide probes used for fluorescence *in situ* hybridization

Name	Target group	Sequence (5'–3')	Ref.
ARCH915	Most of <i>Archaea</i>	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	Amann <i>et al.</i> (1990)
EUB338	Most of <i>Bacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Amann <i>et al.</i> (1990)
ANME-1-350	ANME-1	AGTTTTCCGGCCTGATGC	Boetius <i>et al.</i> (2000)
ANME-2-712	ANME-2	TTGCCACAGATGGTCCC	Knittel and Boetius (2009)
ANME-3-1249	ANME-3	TCCGAGTAGGGACCCATT	Losekann <i>et al.</i> (2007)
ANME-3-1249H3	ANME-3 helper	GTCCCAATCATGTAGCCCGC	Losekann <i>et al.</i> (2007)
ANME-3-1249H5	ANME-3 helper	TTATGAGATTACCATCTCCTT	Losekann <i>et al.</i> (2007)

Abbreviation: ANME, archaeal anaerobic methanotroph.

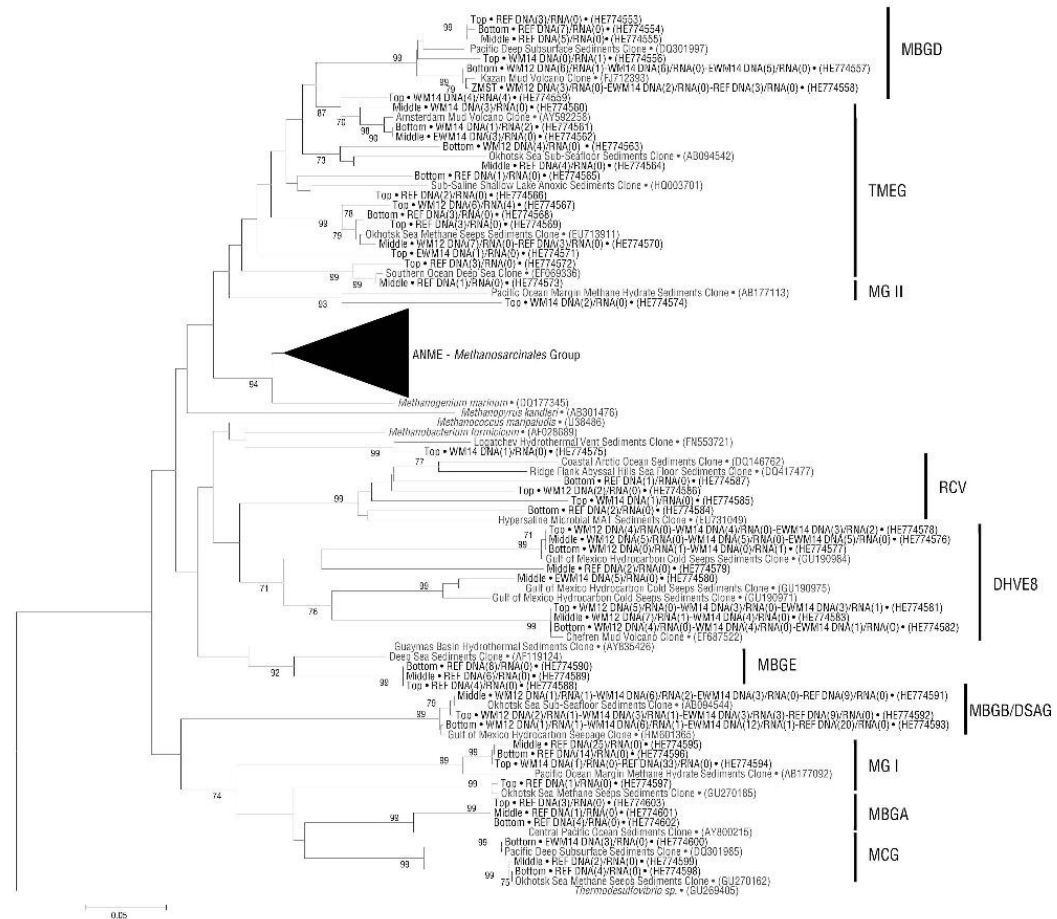


Figure 3 Neighbor-joining distance phylogeny of the archaeal 16S rRNA genes and rRNA-derived sequences in sediments of the Sonora Margin cold seeps based on the Kimura 2 parameters method with 1000 replicates, including 825 homologous positions. Only bootstrap values up to 70% are shown. The scale bar indicates five substitutions per 100 nucleotides. Sequences amplified from sections 0 to 4 cmbsf are labeled 'Top', sequences from 4 to 6 cmbsf are 'Middle' and sequences from 8 cmbsf to end are tagged 'Bottom'. Only one representative sequence (> 97% identical) is shown. Number within parantheses show the number of clones analyzed from RNA or DNA clone libraries. DHVE8, Deep-Sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotal Group 8; EWM14, Edge of White MAT14; MBG-D/E/B/C, Marine Benthic Group D/E/B/C; MCG, Miscellaneous Crenarchaeotic Group; MG II/I, Marine Group II/I; RCV, Rice Cluster V; TMEG, Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotal Group; ANME, Anaerobic Methanotrophs; REF, Reference site; WM12, White MAT12; WM14, White MAT14.

as shown in Supplementary Material and Figure 3a for WM12. Reconstructed ARISA electrophoregrams, compared using principal component analysis (Supplementary Material and Figure 3b), highlighted a very low archaeal community structure evolution between 6 and 22 cmbsf EWM14 sediment layers and a close archaeal communities composition in the deepest sediment layers of each habitat. Principal component analysis revealed a relatively low variability between replicate cores for each habitat. Therefore, only one sediment core was selected per habitat to construct 16S rRNA gene libraries from RNA and DNA.

Also based on both ARISA analysis and geochemical data, six 16S rRNA gene libraries (from DNA and cDNA) of pooled sediment layers (top, middle and bottom) were constructed for each habitat.

Phylogenetic diversity of metabolically active Archaea

A total of 1204 partial archaeal 16S rRNA sequences were obtained. Archaeal 16S rRNA gene libraries showed a relative low diversity (that is, 5–6 phylogenetic lineages for rRNA and 7–11 for rDNA) (Figures 2 and 3). The most frequently retrieved sequences were affiliated to uncultured ANME.

samples from the reference site but were rarely detected in the cold seep habitats (Figures 2 and 3). Finally, only seven sequences affiliated to the *Methanoarchaea* genus *Methanosarcina* were found in the deepest layers of WM14 and EWM14, where sequences related to the emergent group of GOM Arc I were also detected (Figure 4).

Quantitative real-time PCR

Owing to the very few data available on microorganisms from cold seeps (pure culture or metagenomic analysis), the number of 16S rRNA genes (rDNA) copy per cell remains undetermined. To compare microbial populations abundance in our samples, we postulated a single 16S rRNA gene copy number for each quantified population.

Archaeal and bacterial abundance obtained by Q-PCR suggested an overall dominance of bacterial communities in sediment cores excepted in EWM14 sediments (Figure 5). In the first WM (WM12 and WM14) sediment layers (0–2 cmbsf), *Bacteria* were almost 20-fold more abundant than *Archaea* with $\sim 5 \times 10^8$ and $\sim 9 \times 10^9$ 16S rDNA copies per g of sediment, respectively. In WM14, archaeal 16S rDNA copy numbers increased with depth ($\sim 3.4 \times 10^9$ copies per g at the WM14 deepest layers), while *Bacteria* 16S rDNA copy numbers decreased ($\sim 3.8 \times 10^9$ copies per g). In contrast, in EWM14 sediments, *Archaea* gene copies remained constant ($\sim 2 \times 10^8$ copies per g) and *Bacteria* concentration decreased rapidly to non-active site bacterial concentration. *Archaea* abundance was twofold higher in WM12 than in other habitats and increased to 7.8×10^9 16S rDNA copies per g with depth. At the reference site, *Bacteria* 16S rDNA copies were 10-fold more abundant than archaeal gene copies throughout the entire sediment core and never exceed 2.2×10^9 and 2.9×10^8 16S rDNA copies per g for *Bacteria* and *Archaea*, respectively.

The *Methanosarcinales*, which include the ANME-2 and -3 phylogenetic clusters, dominated the archaeal community in WM sediments by rRNA gene copy abundance (10^9 16S rDNA copies per g). In EWM14 sediments, the *Methanosarcinales* remained the most abundant methanogenic order, representing 75% of *Archaea* in the upper layer (6.7×10^8 copies per g) and 30% below 8 cmbsf (2×10^8 copies per g). 16S rDNA genes copy numbers of *Methanococcales* and *Methanomicrobiales* orders were close to 10^7 copies per g without significant changes. 16S rDNA copy numbers of *Methanobacteriales*, close to the Q-PCR detection limit in the upper sediment section, increased with depth but remained low (4.8×10^6 copies per g). *Methanopyrales* representatives, previously isolated in the Guaymas Basin hydrothermal fields, were not detected in cold seep sediments.

Owing to the difference in the standard calibration process (plasmid and/or genomic DNA dilutions), 16S rRNA gene copy numbers of ANMEs

could not be directly compared with previous quantifications. However, we were able to compare depth distribution of ANME representative sequences throughout the sediment cores. Quantifications highlighted ANME community concentrations fivefold more elevated in WM12 sediment cores, strongly dominated by ANME-2c (4.9×10^{11} 16S rDNA copies per g). ANME-2c representatives also dominated WM14 surface and intermediate sediment layers (0–8 cmbsf) and EWM14 surface layers (0–4 cmbsf) with a maximum of 1.5×10^{11} and 8.5×10^{10} 16S rDNA copies per g, respectively (Figure 5). ANME-1 16S copy numbers significantly increased with depth ($\sim 1.3 \times 10^{11}$ copies per g for WM14 and EWM14 and 2.35×10^{11} for WM12), dominating the WM14 bottom sediment ANME communities and appeared to be the unique ANME population below 8 cmbsf in EWM14. ANME-2a quantifications showed a similar depth distribution as those of ANME-2c but with lower concentrations. Specific DNA sequences of ANME-3 were also present in the intermediate sediment layers of all cold seep samples with a maximum of 5×10^{10} and 4×10^{10} 16S rDNA copies per g for WM14 and EWM14 sediments and 9.5×10^{10} 16S rDNA copies per g for WM12 cores.

Structure and morphologies of ANME aggregates

FISH observations using archaeal and bacterial probes revealed a high diversity of cell aggregates in size (5–50 μm in diameter), form (regular and irregular balls, chains, and so on) and organization (proportion and/or localization of *Archaea* and *Bacteria*) (Figure 6). Using more specific probes, ANME-2/*Bacteria*-labeled aggregates were found to be dominant in the surface and middle sediment horizons of WM14 and throughout WM12. Microscopic observations of ANME-2/bacterial aggregates showed a wide range of spatial organization, including mixed, concentric or intermediate aggregates (Figure 6D₁–D₃). Archaeal cells hybridized with ANME-1 probes were detected in the deeper sediment layers of WMs and seemed to be widely dominant in the deeper sediment layers of EWM14. ANME-1 were observed in EWM14 and WM14 as rod chains without detectable bacterial partner either as a single chain or in unstructured heaps (Figure 6B₁). In contrast, in WM12 deepest sediments, ANME-1 have also been observed in straight aggregates with bacterial partners (Figure 6B₂). Cells labeled with ANME-3 probes were detected in small aggregates (<10 μm) without any detectable bacterial partner in intermediate sediment layers (Figure 6C).

Discussion

The occurrence of dominant populations of ANME clusters, detected by FISH, Q-PCR and gene

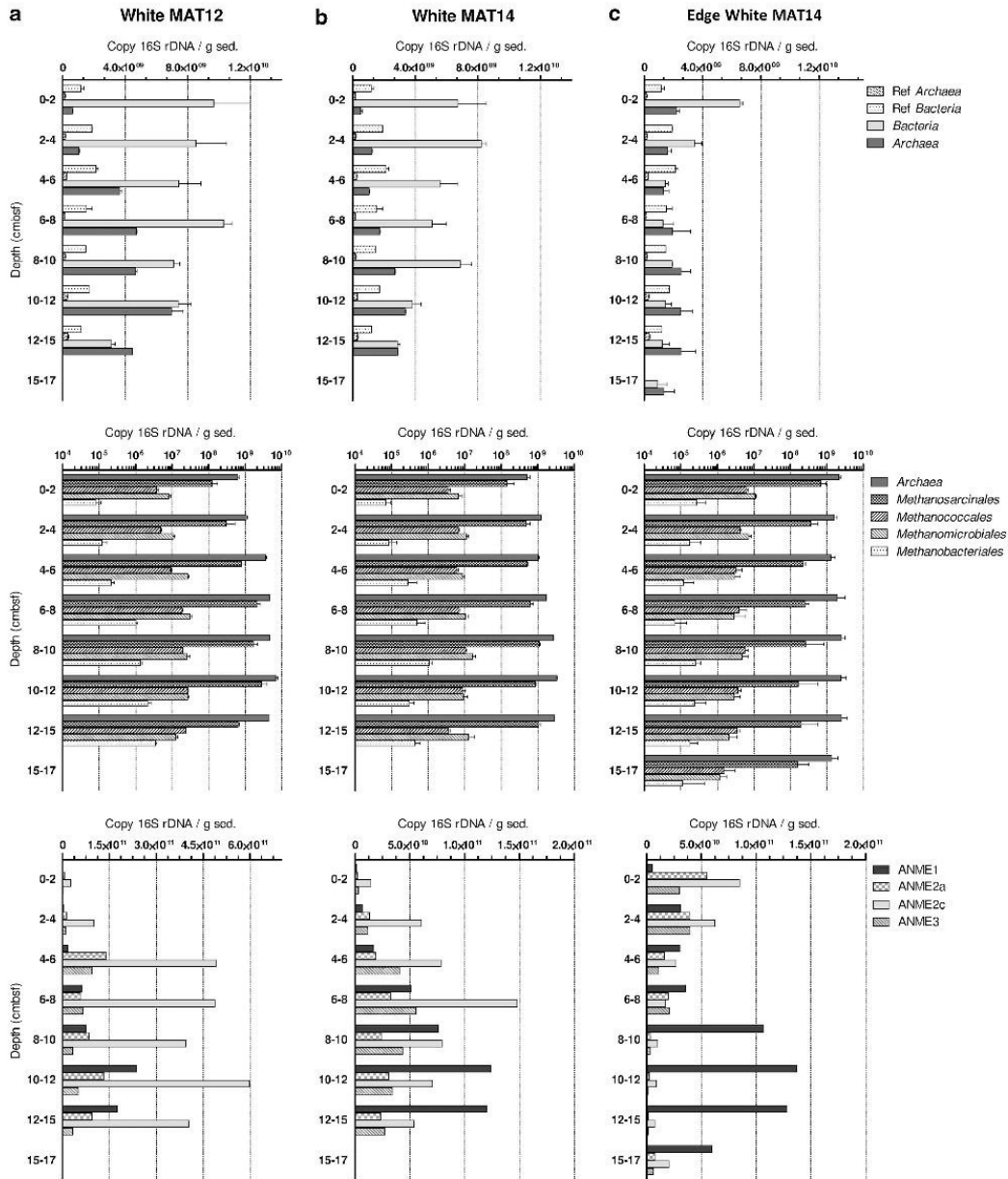


Figure 5 DNA copy numbers of the 16S rDNA gene per gram of sediment for *Bacteria*, *Archaea*, methanogens and anaerobic methanotrophs, from cores of (a) White MAT12, (b) White MAT14 and (c) Edge White MAT14 in function of depth (0–17 cmbsf) in cold seep sediments of the Sonora Margin. Quantification of specific DNA sequences of methanogenic populations are in logarithmic scale.

libraries, combined with geochemical gradients, is the first evidence that AOM represented a major microbial process on the Sonora Margin cold seeps. ANME-1, -2 and -3, anaerobic methane-oxidizing

populations commonly retrieved in the active microbial cold seep communities (see Knittel and Boetius (2009) and reference therein), were metabolically active in our samples, as indicated by their

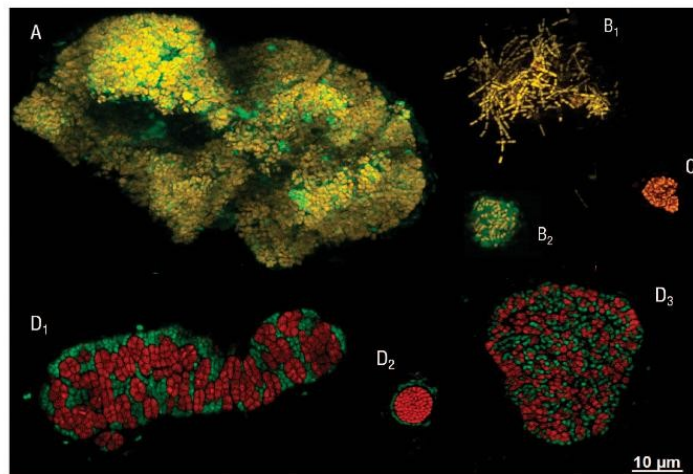


Figure 6 Individual cells and cell aggregates of *Archaea*, *Bacteria* and ANMEs visualized with fluorescently labeled oligonucleotide probes. Each aggregates shown were taken from different pictures. (A, B₁ and B₂) are maximal image projection pictures, which superposed several stacks in a same representation. (A) Large Archaeal/Bacterial aggregate labeled with ARC915 (yellow) and EUB338 (green) probes observed in the deepest sediment layer of the White MAT14. (B₁) Heap of monospecific and single ANME-1 archaeal rods in chain labeled with ANME-1-350 (yellow) probe visualized at the deepest sediment layer of the Edge White MAT14. (B₂) Straight aggregate of ANME-1 (ANME-1-350 (yellow) and *Bacteria* (EUB338 (green)). (C) Tightly associated cluster of ANME-3 cells, stained with the ANME-3-1249 (orange) obtained from White MAT14. (D₁–D₃) Various ANME-2/*Bacteria* aggregates labeled with ANME-2-712 (red) and EUB338 (green) probes. Scale is 10 µm.

16S rRNA detection, and represented almost the whole active archaeal diversity. This co-occurrence of the three ANME clades has only been reported in few studies (Heijs *et al.*, 2005; Pernthaler *et al.*, 2008; Lloyd *et al.*, 2010). However, ANME populations presented different distributions according to the visual and geochemical patterns of the sampled habitats.

Diversity and distribution of ANMEs

ANME-2c dominated both 16S libraries (rRNA and rDNA), quantifications and FISH observations in sediments characterized by higher sulfate concentrations (first sediment layers of WM14 and EWM14; the entire sulfate-rich WM12 sediment cores), suggesting a major role of these ANME representatives in AOM processes at the Sonora Margin. All ANME-2 observed by FISH formed morphologically diverse (size, form and spatial organization) aggregates with *Bacteria*, as previously reported for AOM (Knittel and Boetius, 2009). This apparently obligatory association of ANME-2c with presumably sulfate-reducing *Bacteria* gains metabolic energy for both partners (metabolic exchanges improvement due to cell proximity; Stams and Plugge, 2009). However, this obligatory relationship would also restrict those consortia to a specific ecological niche where both electron acceptors and carbon sources for consortia partners were available. If methane was available throughout the sediment cores, sulfate could be limiting (only detected in

the WM14 and EWM14 upper sediments layers and in the entire WM12 cores). The observed ANME-2c consortia distribution in WMs could thereby be explained by the bacterial partner requirement for sulfate. Thus, the dense populations of sulfate-dependent ANME-2c consortia, observed throughout WM12 sediments, could be linked to the advective import of seawater sulfate as previously suggested for the Guaymas Basin (Biddle *et al.*, 2012). These particular environmental conditions also seemed to allow the development of the new 'ANME-2c Sonora' representatives below 4 cmbsf. However, in EWM14 sediments, ANME-2c were restricted to the upper sediment layers despite a slightly deeper penetration of sulfate. This ANME-2c sulfate-independent distribution in EWM14 sediments indicated that other parameters, such as non-methane hydrocarbon degradation (Orcutt *et al.*, 2008), fluid flow regimen (Niemann *et al.*, 2006; Losekann *et al.*, 2007) or a sediment perturbation by surface assemblages could be involved in ANME-2 distribution. Here, surface colonizers (*Beggiatoa* mats and macrofauna) could be considered as influent factor. *Beggiatoa* mats, by their gliding mobility through the sediment, could micro-oxygenate the first sediment layers and then inhibit the ANME-2 consortia or be competitive, such as DHVE-8 with ANME-2 bacterial partners, for substrates, such as acetate in the shallow sediment layers. Otherwise, the EWM14 surface deposit feeders probably modified the structure and/or the composition of the underlying sediments (organic matter



degradation, substrate availabilities, for instance) and then vertically changed the ANME-2 ecological niche.

Molecular data also highlighted the presence and activity of ANME-1 relatives in each core, in increasing proportion with depth as observed previously (Knittel *et al.*, 2005; Yanagawa *et al.*, 2011). ANME-1 were detected in larger proportion in WM12 sediments and as unique ANME community in EWM14 deepest sediment layers. Moreover, FISH observations highlighted a versatile ANME-1 behavior in terms of bacterial association. The EWM14 and WM14 ANME-1 communities were detected as single or heaps of rods-in-chain. In contrast, ANME-1 were also observed in straight aggregates with bacteria in WM12 deepest sediments. Combined with geochemical data, these results confirmed that ANME-1 preferred completely anoxic and highly sulfidic sediments (Biddle *et al.*, 2012) and suggested that ANME-1 ecophysiology could depend on environmental conditions and more particularly on sulfate concentrations. In sulfate-poor and methane-rich EWM14 sediments, ANME-1 could support a bacterial-independent AOM as suggested previously (Orphan *et al.*, 2002; Maignien *et al.*, 2012), using a different metabolic pathway providing terminal electron acceptors for AOM, such as the use of extracellular proteins, as mentioned by recent metaproteomic analyses (Stokke *et al.*, 2012). Such metabolism, independent of bacterial association and then metabolic bacterial requirements, could occur and be more competitive than syntrophic AOM in EWM14 sediments. ANME-1 metabolism could also persist in sulfate-depleted WM14 sediments, perhaps by switching to methanogenesis, as suggested previously (Meyerdierks *et al.*, 2010; Lloyd *et al.*, 2011; Stokke *et al.*, 2012). In contrast, advective sulfate inputs in WM12 deepest sediments could induce another ANME-1 metabolic shift to a bacterial-dependent AOM in straight consortia as previously observed in sulfate-rich cold seeps (Orcutt *et al.*, 2005), which could be more energetically effective.

ANME-3-related sequences were present throughout the entire sediment cores with a slight increase of 16S copy numbers restricted to the 4–8 cmbsf sediment horizon. Furthermore, ANME-3 communities were shown to be active only in this sediment layer. This suggests that ANME-3 might be restricted to this sediment horizon, as previously reported in submarine mud volcano (Losekann *et al.*, 2007), just below the surface layers influenced by surface communities. ANME-3 were previously detected in syntrophic consortia with sulfate-reducer *Bacteria* (Niemann *et al.*, 2006; Losekann *et al.*, 2007). However, our FISH observations with the same probe highlighted some unstructured aggregates with no direct contact with bacterial partners, which is consistent with the support of another metabolism independent of bacterial association for ANME-3 (Losekann *et al.*, 2007; Omeregic *et al.*, 2008). Again,

another metabolic pathway other than syntrophic AOM, such as methanogenesis or use of metabolic products from the surface layers as substrates or electrons acceptors, could be considered for ANME-3 aggregates in Sonora Margin sediments.

Methane hypothetical origins

As we mentioned above, methanogenesis was often suggested for single ANME, due to their phylogenetic proximity with methanogens and recent metagenomic studies. In cold seep sediments, methane is a preponderant factor, fueling the AOM aggregates, and its origin in the sediments also remained misunderstood.

Methane isotopic ratio suggested a dominant biogenic methane origin, involving methanogens populations. However, abiotic and thermogenic methane origin from deeper sediment layers could not be excluded. Confirming a biogenic origin, sequences relatives to methanogenic *Archaea* were detected in gene libraries. *Methanosarcinales* gene copy numbers were high, but anaerobic methanotrophs (ANME-2 and ANME-3) are affiliated to the *Methanosarcinales* group and could represent most of this population rather than the true methanogens. Nevertheless, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales* and *Methanobacteriales* 16S rDNA gene numbers were detected by Q-PCR in the sediment. Even if methanogen 16S rDNA concentrations were low, methanogenic enrichments (culture conditions as described in Lazar *et al.*, 2011b) also confirmed the presence of active methanogen communities (data not shown). Taken together, these results suggest that AOM fueling methane could be produced by small phylogenetically diverse populations of methanogens, eventually supplemented by other unknown or poorly understood microbial populations involved in methane production, such as ANME-1 in the shallow sediment layers. Alternatively, methane could also be produced by larger methanogenic populations in much deeper sediments.

Conclusion

In the anoxic sediments of cold seep environments, the geochemically rich emitted fluids coupled with surface inputs (sulfate and organic carbon) allow the development of complex microbial ecosystems mainly based on methane and sulfur cycles (methanogenesis, AOM, sulfate reduction). If ANME communities were frequently detected and appeared to be ubiquitous in cold seep environments (Knittel and Boetius, 2009), their distributions and their precise functions remained misunderstood. The Sonora Margin cold seeps, by their visually and/or geochemically different habitats, presented a unique opportunity to access the environmental parameters and key factors involved in archaeal distribution and ecophysiology. On the basis of our sampling

- Holler T, Widdel F, Knittel K, Amann R, Kellermann MY, Hinrichs KU *et al.* (2011). Thermophilic anaerobic oxidation of methane by marine microbial consortia. *ISME J* **5**: 1946–1956.
- Jorgensen BB, Boetius A. (2007). Feast and famine–microbial life in the deep-sea bed. *Nat Rev Microbiol* **5**: 770–781.
- 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.
- Knittel K, Boetius A. (2009). Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annu Rev Microbiol* **63**: 311–334.
- Knittel K, Losekann T, Boetius A, Kort R, Amann R. (2005). Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Appl Environ Microbiol* **71**: 467–479.
- Lazar CS, Dinasquet J, Pignet P, Prieur D, Toffin L. (2010). Active archaeal communities at cold seep sediments populated by Siboglinidae tubeworms from the Støregga Slide. *Microb Ecol* **60**: 516–527.
- Lazar CS, John Parkes R, Cragg BA, L'Haridon S, Toffin L. (2012). Methanogenic activity and diversity in the centre of the Amsterdam Mud Volcano, Eastern Mediterranean Sea. *FEMS Microbiol Ecol* **81**: 243–254.
- Lazar CS, L'Haridon S, Pignet P, Toffin L. (2011a). Archaeal populations in hypersaline sediments underlying orange microbial mats in the Napoli mud volcano. *Appl Environ Microbiol* **77**: 3120–3131.
- Lazar CS, Parkes RJ, Cragg BA, L'Haridon S, Toffin L. (2011b). Methanogenic diversity and activity in hypersaline sediments of the centre of the Napoli mud volcano, Eastern Mediterranean Sea. *Environ Microbiol* **13**: 2078–2091.
- Lloyd KG, Albert DB, Biddle JF, Chanton JP, Pizarro O, Teske A. (2010). Spatial structure and activity of sedimentary microbial communities underlying a *Beggiatoa* spp. mat in a Gulf of Mexico hydrocarbon seep. *PLoS One* **5**: e8738.
- Lloyd KG, Alperin MJ, Teske A. (2011). Environmental evidence for net methane production and oxidation in putative ANaerobic MEthanotrophic (ANME) archaea. *Environ Microbiol* **13**: 2548–2564.
- Losekann T, Knittel K, Nadalig T, Fuchs B, Niemann H, Boetius A *et al.* (2007). Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea. *Appl Environ Microbiol* **73**: 3348–3362.
- Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar *et al.* (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**: 1363–1371.
- Maignien L, Parkes RJ, Cragg B, Niemann H, Knittel K, Coulon S *et al.* (2012). Anaerobic oxidation of methane in hypersaline cold seep sediments. *FEMS Microbiol Ecol* **83**: 214–231.
- McKay LJ, MacGregor BJ, Biddle JF, Albert DB, Mendlovitz HP, Hoer DR *et al.* (2012). Spatial heterogeneity and underlying geochemistry of phylogenetically diverse orange and white *Beggiatoa* mats in Guaymas Basin hydrothermal sediments. *Deep Sea Res Part I* **67**: 21–31.
- Meyerdierks A, Kube M, Kostadinov I, Teeling H, Glockner FO, Reinhardt R *et al.* (2010). Metagenome and mRNA expression analyses of anaerobic methanotrophic archaea of the ANME-1 group. *Environ Microbiol* **12**: 422–439.
- Meyerdierks A, Kube M, Lombardot T, Knittel K, Bauer M, Glockner FO *et al.* (2005). Insights into the genomes of archaea mediating the anaerobic oxidation of methane. *Environ Microbiol* **7**: 1937–1951.
- Niemann H, Losekann T, de Beer D, Elvert M, Nadalig T, Knittel K *et al.* (2006). Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. *Nature* **443**: 854–858.
- Omeregge EO, Mastalerz V, de Lange G, Straub KL, Kappler A, Roy H *et al.* (2008). Biogeochemistry and community composition of iron- and sulfur-precipitating microbial mats at the Chefern mud volcano (Nile Deep Sea Fan, Eastern Mediterranean). *Appl Environ Microbiol* **74**: 3198–3215.
- Orcutt B, Boetius A, Elvert M, Samarkin V, Joye SB. (2005). Molecular biogeochemistry of sulfate reduction, methanogenesis and the anaerobic oxidation of methane at Gulf of Mexico cold seeps (vol 69, pg 4267, 2005). *Geochim Cosmochim Acta* **69**: 5633–5633.
- Orcutt B, Samarkin V, Boetius A, Joye S. (2008). On the relationship between methane production and oxidation by anaerobic methanotrophic communities from cold seeps of the Gulf of Mexico. *Environ Microbiol* **10**: 1108–1117.
- Orphan VJ, House CH, Hinrichs KU, McKeegan KD, DeLong EF. (2002). Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proc Natl Acad Sci USAm* **99**: 7663–7668.
- Pachiadaki MG, Kallionaki A, Dahlmann A, De Lange GJ, Kormas KA. (2011). Diversity and spatial distribution of prokaryotic communities along a sediment vertical profile of a deep-sea mud volcano. *Microb Ecol* **62**: 655–668.
- Pachiadaki MG, Lykousis V, Stefanou EG, Kormas KA. (2010). Prokaryotic community structure and diversity in the sediments of an active submarine mud volcano (Kazan mud volcano, East Mediterranean Sea). *FEMS Microbiol Ecol* **72**: 429–444.
- Page A, Tivey MK, Stakes DS, Reysenbach AL. (2008). Temporal and spatial archaeal colonization of hydrothermal vent deposits. *Environ Microbiol* **10**: 874–884.
- Paul CK, Ussler W, Peltzer ET, Brewer PG, Keaten R, Mitts PJ *et al.* (2007). Authigenic carbon entombed in methane-soaked sediments from the northeastern transform margin of the Guaymas Basin, Gulf of California. *Deep Sea Res Part I* **54**: 1240–1267.
- Pernthaler A, Dekas AE, Brown CT, Goffredi SK, Embaye T, Orphan VJ. (2008). Diverse syntrophic partnerships from deep-sea methane vents revealed by direct cell capture and metagenomics. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 7052–7057.
- Saitou N, 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. (1996). Analysis of dissolved gases by headspace sampling gas chromatography with column and detector switching. Preliminary results. *Anal Commun* **33**: 371–373.
- Simoneit BR, Leif RN, Ishiwatari R. (1996). Phenols in hydrothermal petroleum and sediment bitumen from Guaymas Basin, Gulf of California. *Organic Geochem* **24**: 377–388.
- Simoneit BRT, Lonsdale PF, Edmond JM, Shanks WC. (1990). Deep-water hydrocarbon seeps in Guaymas Basin, Gulf of California. *Appl Geochem* **5**: 41–49.



- Snaidr J, Amann R, Huber I, Ludwig W, Schleifer KH. (1997). Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2884–2896.
- Stams AJM, Plugge CM. (2009). Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* **7**: 568–577.
- Stokke R, Roalkvam I, Lanzen A, Hafliadason H, Steen IH. (2012). Integrated metagenomic and metaproteomic analyses of an ANME-1-dominated community in marine cold seep sediments. *Environ Microbiol* **14**: 1333–1346.
- Suzuki MT, Taylor LT, DeLong EF. (2000). Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4605–4614.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**: 1596–1599.
- Teske A, Hinrichs KU, Edgcomb V, Gomez AD, Kysela D, Sylva SP *et al.* (2002). Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1994–2007.
- Teske A, Sorensen KB. (2008). Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? *ISME J* **2**: 3–18.
- Thioulouse J, Dray S. (2007). Interactive multivariate data analysis in R with the ade4 and ade4TkGUI packages. *J Statist Softw* **22**: 1–14.
- Waren A, Ponder WF. (1991). New species, anatomy, and systematic position of the hydrothermal vent and hydrocarbon seep Gastropod Family Provannidae Famn (Caenogastropoda). *Zool Scr* **20**: 27–56.
- Yanagawa K, Sunamura M, Lever MA, Morono Y, Hiruta A, Ishizaki O *et al.* (2011). Niche separation of methanotrophic archaea (ANME-1 and -2) in methane-seep sediments of the Eastern Japan Sea Offshore Joetsu. *Geomicrobiol J* **28**: 118–129.
- Yu Y, Lee C, Kim J, Hwang S. (2005). Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng* **89**: 670–679.
- Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* **62**: 316–322.

Article complémentaire : "Evidence of active methanogen communities in shallow sediments of the Sonora Margin cold seeps"

Vignerot Adrien, L'Haridon Stephane, Godfroy Anne, Roussel Erwan, Cragg Barry, Parkes John et Toffin Laurent

Introduction à l'étude

Les communautés archéennes des sédiments de la marge de Sonora ont été caractérisées par des techniques de biologie moléculaire. Les résultats obtenus ont démontré la prédominance de populations archées ANMEs, probablement impliquées dans l'oxydation anaérobie du méthane. Malgré la détection de méthane dans tous les horizons sédimentaires de surface, dont la signature isotopique suggère une origine microbienne, les populations méthanogènes semblent ne représenter qu'une infime proportion de la communauté archéenne. Plusieurs hypothèses ont alors été suggérées concernant l'origine de ce méthane. Il pourrait être produit au niveau des sédiments de surface par des populations méthanogènes peu abondantes mais très actives, ou provenir d'horizons sédimentaires plus profonds. Afin de discuter ces hypothèses, une étape de mise en cultures en milieux spécifiques a été réalisée à partir des sédiments de surface, permettant l'enrichissement des microorganismes méthanogènes. La diversité des communautés méthanogènes cultivables obtenue est présentée et discutée dans cette étude complémentaire.

Evidence of Active Methanogen Communities in Shallow Sediments of the Sonora Margin Cold Seeps

Adrien Vigneron,^{a,b,c,e} Stéphane L'Haridon,^{b,c} Anne Godfroy,^{a,b,c} Erwan G. Roussel,^{a,b,c,d} Barry A. Cragg,^d R. John Parkes,^d Laurent Toffin^{a,b,c}

Ifremer, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, Technopôle Brest Iroise, Plouzané, France^a; Université de Bretagne Occidentale, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, Technopôle Brest Iroise, Plouzané, France^b; CNRS, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, Technopôle Brest Iroise, Plouzané, France^c; School of Earth and Ocean Sciences, Cardiff University, Cardiff, United Kingdom^d; School of Civil Engineering and Geosciences, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, United Kingdom^e

In the Sonora Margin cold seep ecosystems (Gulf of California), sediments underlying microbial mats harbor high biogenic methane concentrations, fueling various microbial communities, such as abundant lineages of anaerobic methanotrophs (ANME). However, the biodiversity, distribution, and metabolism of the microorganisms producing this methane remain poorly understood. In this study, measurements of methanogenesis using radiolabeled dimethylamine, bicarbonate, and acetate showed that biogenic methane production in these sediments was mainly dominated by methylotrophic methanogenesis, while the proportion of autotrophic methanogenesis increased with depth. Congruently, methane production and methanogenic *Archaea* were detected in culture enrichments amended with trimethylamine and bicarbonate. Analyses of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) fingerprinting and reverse-transcribed PCR-amplified 16S rRNA sequences retrieved from these enrichments revealed the presence of active methylotrophic *Methanococoides burtonii* relatives and several new autotrophic *Methanogenium* lineages, confirming the cooccurrence of *Methanosarcinales* and *Methanomicrobiales* methanogens with abundant ANME populations in the sediments of the Sonora Margin cold seeps.

In cold seep ecosystems, sediments are colonized by various dense microbial and sometimes macrofaunal populations, forming a mosaic of patchy habitats on the seafloor (1, 2). The metabolism of these organisms, based on chemosynthesis, is mainly fueled by seep fluids, rich in reduced compounds and hydrocarbons, such as methane (3). Most of the methane is consumed microbiologically by anaerobic and aerobic methanotrophic communities before reaching the water column, forming an efficient biofilter (4). In marine sediments and typically in cold seep ecosystems, methanogenesis driven by archaeal communities accumulates large amounts of methane, which can be trapped in gas hydrates. Microbial populations involved in methane production (methanogens) are phylogenetically affiliated with 7 orders within the phylum *Euryarchaeota*, which comprises the *Methanosarcinales*, *Methanocellales*, *Methanomicrobiales*, *Methanococcales*, *Methanopyrales*, *Methanobacteriales* (5), and the recently described *Methanoplasmatales* (6), also known as *Methanomassilicoccales* (7). Furthermore, deeply branching uncharacterized orders have been recently detected (8). Enrichment cultures from methane-rich environments, such as marine sediments, mangroves, animal guts, or wastewater bioreactors, previously showed that methanogens could use different substrates for methane production under anaerobic conditions (9–18). In marine sediments, methylated compounds (e.g., methylamine, dimethylamine, trimethylamine [TMA], methanol, dimethylamine-sulfate, and dimethylsulfide), volatile fatty acids (formate and acetate), bicarbonate, and, more recently, choline and glycine betaine (19, 20) have been identified as primary carbon substrates for methanogenesis. These compounds can be metabolized through three different specific methanogenic pathways: methanogenesis from H₂-CO₂, acetate-dependent methanogenesis, and methylotrophic methanogenesis (21).

Located in the Guaymas Basin (Gulf of California), the Sonora

Margin cold seep ecosystem is composed of various visible faunal assemblages and white microbial mats (22–24). Sediments underlying the microbial mats and their periphery are characterized by high methane concentrations (around 900 μM and 500 μM, respectively) (23). The carbon isotopic signature of this methane (δ¹³C-CH₄ = -63‰ to -90‰) suggests that significant amounts of biogenic methane are produced by methanogenic populations. However, in contrast to the adjacent high-temperature hydrothermal sediments of the Guaymas Basin, from which several hyperthermophilic methanogens were isolated (25–27), no methanogens were detected by microscopic and rRNA sequence surveys of recent Sonora Margin sediments (23). However, 16S rRNA gene sequences related to known methanogenic lineages were detected only rarely in previous studies using clone libraries (23) and 454 pyrosequencing (24). Furthermore, quantitative measurements using real-time quantitative PCR (qPCR) with 16S rRNA gene primer sets specifically targeting putative methanogenic groups suggested that *Methanomicrobiales* and *Methanococcales* represented only a minority of the microbial community (0.1 to 1% of the total archaeal 16S rRNA gene copy

Received 19 January 2015 Accepted 5 March 2015

Accepted manuscript posted online 13 March 2015

Citation Vigneron A, L'Haridon S, Godfroy A, Roussel EG, Cragg BA, Parkes RJ, Toffin L. 2015. Evidence of active methanogen communities in shallow sediments of the Sonora Margin cold seeps. *Appl Environ Microbiol* 81:3451–3459. doi:10.1128/AEM.00147-15.

Editor: G. Voordouw

Address correspondence to Adrien Vigneron, avignero@gmail.com.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.00147-15

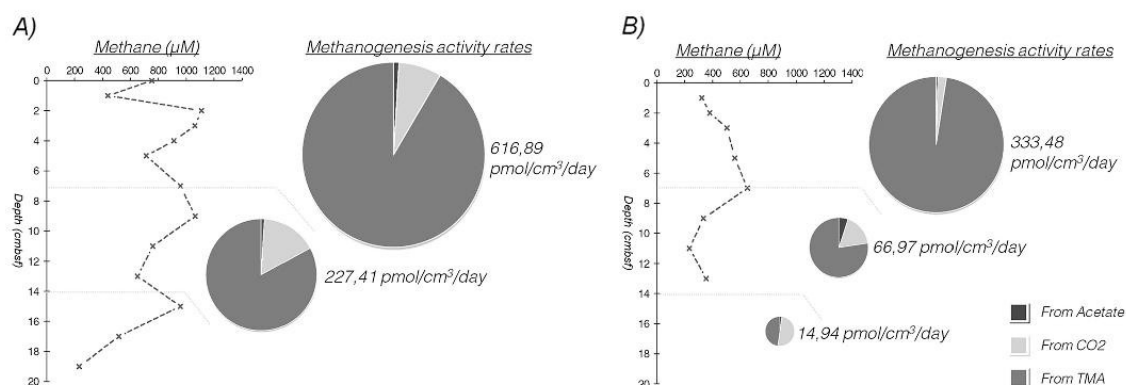


FIG 1 Sediment depth profiles of methane concentrations and methanogenesis rates. (A) White Mat 14. (B) Edge of White Mat 14. The relative proportions of acetate, bicarbonate, and dimethylamine methanogenesis rates are represented in pie charts for each sediment section. The size of the pie chart is proportional to the total methanogenesis rate. The methane concentrations are from Vigneron et al. (23).

number) in the shallow sediment layers (0 to 17 cm below seafloor [cmbsf]) (23). In contrast, *Methanosarcinales* related to anaerobic methanotrophs (ANME), previously found to be active and abundant in these sediments (23), dominated throughout the shallow sediments of the Sonora Margin (30 to 92% of the total archaeal 16S rRNA gene copy number). Thus, the activity and biodiversity of methanogenic microbial populations remained unclear.

In this study, we investigated the production of biogenic methane in the Sonora Margin cold seeps by analyzing major metabolic pathways for methane production in marine environments. The phylogenetic and metabolic diversity of methanogenic communities was explored using enrichment cultures and activity measurements designed to target acetotrophic, hydrogenotrophic, and methylotrophic methanogens.

MATERIALS AND METHODS

Sediment samples. Sediment samples were collected from Sonora Margin cold seeps during the oceanographic cruise BIG (Ifremer) with the R.V. *L'Atalante* and the D.S.V. *Nautile* in June 2010. Two different habitats from the Vasconcelos site (27°35.577'N, 111°28.984'W), sampled in triplicate using 20-cm-long push cores (PC), were selected for enrichment cultures and activity measurements: (i) an extended white microbial mat (White Mat 14 [WM14]; PC1, PC2, and PC3), characterized by an average methane concentration of 900 µM throughout the core (Fig. 1), and (ii) the surrounding macrofauna (Edge of White Mat 14 [EWM14]; PC6, PC8, and PC11), characterized by an average methane concentration of 500 µM (Fig. 1) (23). Before each sampling, autonomous temperature sensors (T-Rov; NKE Electronics, Hennebont, France) recorded *in situ* temperatures around 3°C from the sediment surface down to 40 cmbsf on each habitat. On board, the sediment cores were transferred in a cold room immediately after retrieval and sectioned aseptically in 2-cm-thick layers. For enrichment cultures, 6 cm³ of each sediment layer was transferred into 50-ml vials containing 10 ml of sterile and anoxic artificial seawater (DSMZ medium 246a). The vials were crimp sealed with butyl rubber septum stoppers and aluminum crimp tops (Bellco Glass Inc., Vineland, NJ, USA) and then flushed with N₂ and stored at 4°C under a 200-kPa N₂-CO₂ (80:20) gas atmosphere. For activity measurements, PC2 and PC6 were subsampled using triplicate mini-push cores. These mini-push cores were hermetically sealed under an N₂ gas atmosphere in aluminum bags (Grüber-Folien, Germany) and stored at 4°C for processing in the laboratory.

Culture media for enrichment of methanogens. Two sediment cores from each habitat (WM14 PC1 and PC3; EWM14 PC8 and PC11) were used to inoculate independent duplicate enrichments. Methanogenic enrichments were performed anaerobically in 50-ml vials. Medium 141 from DSMZ was used with slight modifications: organic substrates were omitted, except yeast extract with a final concentration of 0.2 g liter⁻¹. The medium was prepared and sterilized under an 80% N₂ and 20% CO₂ gas atmosphere. In order to enrich CO₂-reducing, aceticlastic, and methylotrophic methanogens, four separate enrichment media supplemented with H₂-CO₂ (80:20; 200 kPa), acetate (10 mM) under an H₂-CO₂ or N₂-CO₂ gas atmosphere, and TMA (20 mM) were used. One milliliter of sediment suspension from different sections (0 to 6 cmbsf, 6 to 10 cmbsf, and 10 to 15 cmbsf) of each core was inoculated into 9 ml of medium (pH 7). The slurries were mixed and serially diluted to 10⁻³. A total of 136 cultures were prepared, including uninoculated medium used as a negative control for each condition (Table 1). In order to enhance microbial growth, all the cultures were incubated at 12°C, higher than the average *in situ* temperature (3°C). The cultures were periodically checked (every month) for methane production for 2 years. The methane concentrations in the vial headspaces of the cultures were determined by using a micro MTI M200 gas chromatograph (SpectraLab, Markham, Canada) equipped with an MS-5A capillary column and a Poraplot U capillary column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) via sterile needle. The presence of putative methanogenic communities from methane-producing enrichments was confirmed by epifluorescence microscopy (model BX60, equipped with a U-RFL-T UV supply unit; Olympus, USA). Enrichments were stopped when more than 50 UV-autofluorescent cells per microscope field (magnification, ×1,000) were detected. Renewal of carbon and energy sources (200 kPa of H₂-CO₂ or 10 mM acetate) was anaerobically and sterilely carried out after 1 year of incubation.

Methanogenic-activity measurements. Potential rates of methanogenesis were monitored on anaerobically stored subsamples using ¹⁴C-radiolabeled substrates, 3 months postcruise, at Cardiff University, United Kingdom. Subsamples were pooled in 42 cm³ of sediment slurries, corresponding to 7-cm-thick sediment layers (0 to 7 cm and 7 to 14 cm for WM14 and 0 to 7 cm, 7 to 14 cm, and 14 to 21 cm for EWM14), and then dispensed into 20-ml vials before injection of labeled substrates. Triplicate vials were monitored with addition of radiotracers [¹⁴C]bicarbonate [19 µl containing 74 kBq], [¹⁴C]acetate [19 µl containing 397 kBq], and [¹⁴C]dimethylamine [19 µl containing 176 kBq] for each sediment section. Additional vials were monitored without radiotracers as negative controls. The vials were incubated at close to *in situ* temperatures (4°C).

TABLE 1 Enrichment conditions and levels of dilution applied to samples

Enrichment conditions	Enrichment ^a											Dilution
	WM14						EWM14					
	PC3			PC4			PC8			PC11		
	Z1	Z2	Z3	Z1	Z2	Z3	Z1	Z2	Z3	Z1	Z2	
Trimethylamines		+	+		+	+	+	+	+	+	+	10 ⁻¹
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10 ⁻²
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10 ⁻³
Acetate												10 ⁻¹
												10 ⁻²
												10 ⁻³
H ₂ -CO ₂	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	10 ⁻¹
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10 ⁻²
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10 ⁻³
H ₂ -CO ₂ with acetate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10 ⁻¹
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10 ⁻²
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10 ⁻³

^a +, positive enrichment (methane production and detection of UV autofluorescent cells); empty cells, no methane accumulation in the headspace; Z1, 0 to 6 cmbsf; Z2, 6 to 10 cmbsf; Z3, 10 to 15 cmbsf.

with magnetic agitation. Activity measurements were terminated by addition of 1 M NaOH, and the vials were processed as described previously (28). Methanogenesis rates were calculated based on the proportion of labeled gas produced from the ¹⁴C substrate, the incubation period, an assumed sediment porosity of 70%, and the measured cold pool size of the substrate. Because the incubation conditions were not identical to the original sediment conditions, the measured rates might differ from those *in situ*.

RNA extraction, purification, and reverse transcription. Total RNA from methane-producing enrichments was extracted and purified from 2 ml of enrichment culture using a Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's recommendations. Absence of residual DNA was checked by PCRs before reverse transcription. Total RNA was reverse transcribed using a Quanta qScript kit (Quanta Bioscience, Gaithersburg, MD, USA) according to the manufacturer's protocol.

PCR-DGGE of 16S rRNA. PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was used to monitor the archaeal diversity in positive enrichments. Archaeal reverse-transcribed 16S rRNA was amplified by PCR using the archaeal primers A8F (5'-CGG TTG ATC CTG CCG GA-3') and A1492R (5'-GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (29). All PCRs were carried out in a final volume of 25 µl using the GoTaq polymerase kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's recommendations. The PCR conditions were 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 for 30 cycles. PCR amplicons were checked on agarose gels, and then, the PCR products were reamplified with primers 340F (5'-CCC TAC GGG GYG CAS CAG-3'), containing a GC clamp at the 5' end (30), and 519R (5'-TTA CCG CGG CKG CTG-3') (31). PCRs were carried out as described previously (14). Positive and negative controls were used in all PCR amplifications.

DGGE was carried out as described previously (14). DGGE profiles were analyzed using PyElph 1.4 software (32). At least one enrichment per DGGE fingerprint pattern was selected for amplification, cloning, and sequencing of the reverse-transcribed archaeal 16S rRNA.

Methanogenic diversity based on 16S rRNA. 16S rRNA sequences from reverse-transcribed RNA of positive enrichments selected after DGGE were amplified using the A8F-A915R primers (33, 34). The PCR conditions were as follows: 30 cycles of a denaturation step at 94°C for 40

s, annealing at 57°C for 1 min 30 s, and extension at 72°C for 3 min. The PCR products were purified on agarose gels and then cloned using a TOPO XL PCR cloning kit (Invitrogen, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's protocols. Sequencing of the inserts was carried out by GATC Biotech (Constance, Germany) using the M13 universal primers (M13f, 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTG-3'; M13r, 5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'). Sequences were analyzed using the NCBI BLAST search program in GenBank (35) and aligned with the closest representative sequences using the Mafft program (36). The sequence data were analyzed with the MEGA 4.0.2 program (37). Phylogenetic trees were estimated by maximum-likelihood and neighbor-joining methods using RAxML 7.2.8 (38) with GTRCAT approximation of the model and the Kimura two-parameter correction matrix coupled to pairwise deletion parameters, respectively. The robustness of the inferred topology was tested by bootstrap resampling (1,000 replicates).

Nucleotide sequence accession numbers. The sequences from the study were deposited in the EMBL database under the following accession numbers: HG973458 to HG973475.

RESULTS

Potential activity measurements. Methanogenic activities were 54 to 29% higher in WM14 sediments than in EWM14 sediments. In both sediment cores, the total methanogenesis rate decreased with depth (Fig. 1), but more rapidly throughout EWM14 sediments (80% decrease) than WM14 sediments (63% decrease). In WM14 sediments, although methylotrophic methanogenesis significantly decreased with depth (560 to 180 pmol cm⁻³ day⁻¹; *t* test *P* value, 0.04), it consistently represented the major methanogenesis processes (91 to 83% of the total methanogenesis). In contrast, although hydrogenotrophic methanogenesis was relatively steady (36 to 49 pmol cm⁻³ day⁻¹; *t* test *P* value, 0.58) throughout WM14, it represented a higher proportion of the total methanogenesis at depth (0 to 7 cmbsf, 8%; 7 to 14 cmbsf, 16%). However, acetoclastic methanogenesis remained low (5 pmol cm⁻³ day⁻¹) throughout WM14 sediments, representing 1% of the total methanogenesis. In EWM14 sediments, although methylotrophic methanogenesis also dominated methanogenic processes in the

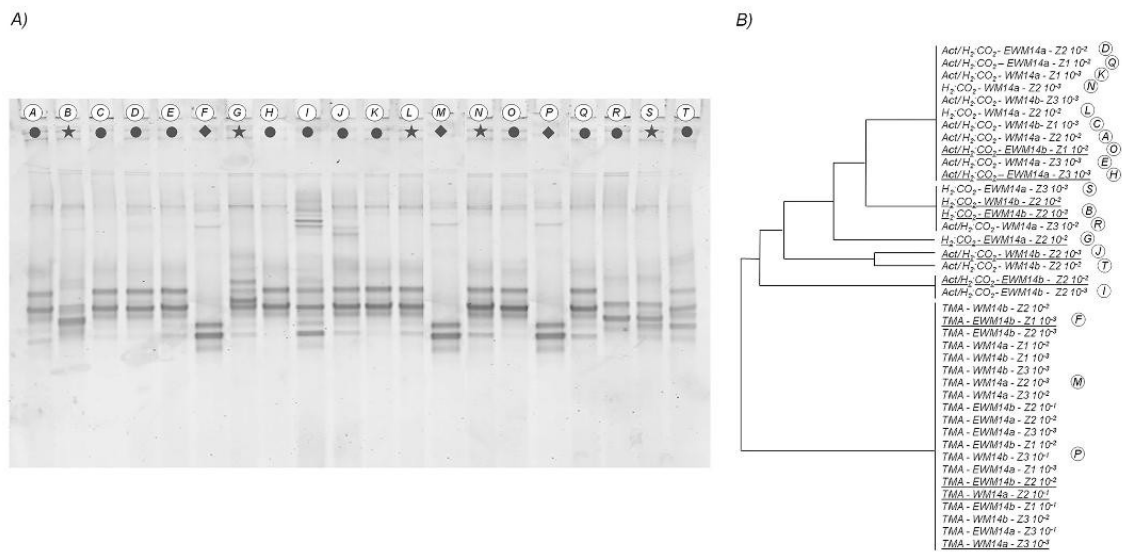


FIG 2 DGGE analysis of archaeal 16S rRNA diversity. (A) DGGE profiles for 20 samples represented by letters (A to T) in the dendrogram in panel B. The different media are represented by symbols: dots, acetate/H₂-CO₂; stars, H₂-CO₂; diamonds, trimethylamines. (B) Dendrograms from cluster analysis of DGGE profiles. The underlined samples were selected for analysis of the phylogenetic diversity of methanogens. Act, acetate; WM14a, WM14PC3; WM14b, WM14PC4; EWM14a, EWM14PC8; EWM14b, EWM14PC11; Z1, 0 to 6 cmbsf; Z2, 6 to 10 cmbsf; Z3, 10 to 15 cmbsf.

upper sediment section (98% of the total methanogenesis), it decreased markedly (analysis of variance [ANOVA] P value, 0.001) with depth, representing only 48% of the total methanogenesis (7 pmol cm⁻³ day⁻¹) in sediments below 14 cmbsf. In contrast, hydrogenotrophic methanogenesis in EWM14 sediments remained relatively constant (~8 pmol cm⁻³ day⁻¹; ANOVA P value, 0.87), representing the major methanogenesis processes (50%) at the bottom of the core. Aceticlastic methanogenesis was consistently low throughout EWM14 sediments, with rates around 2 pmol cm⁻³ day⁻¹ (2% of the total methanogenesis).

Methanogenic enrichments. After 2 years of incubation, positive methane production and growth of methanogens were recorded in 90 enrichments, representing 33 different substrate and sample combinations (Table 1). Methane production or cell growth was not detected in the negative controls. TMA, acetate with H₂-CO₂, and H₂-CO₂ were found to stimulate growth of methanogenic communities from all WM14 (microbial mat) and EWM14 (macrofauna) sediment layers. Methane production was not detected with acetate as the sole carbon and electron donor for both WM14 and EWM14 sediments. Methanogens were detected by epifluorescence microscopy by targeting the fluorescent coenzyme F420 (39). F420 is not restricted to methanogens, as it has also been detected in anaerobic methanotrophic communities and archaeal Marine Group 1 (40). However, UV autofluorescent cells were detected only in enrichments where methane production occurred, strongly suggesting that these UV-autofluorescent cells were methanogens. UV-autofluorescent free coccoid-shaped cells were widespread in the samples regardless of the enrichment conditions. Unusual cell morphologies, such as long and thick spiral UV-fluorescent cells, were detected only occasionally at the beginning of the enrichment procedure in cultures amended with H₂-CO₂ (data not shown).

Archaeal community structure. Forty representative enrichments from all 33 different positive culture conditions were analyzed using RT-PCR-DGGE (Fig. 2A). The archaeal community structures grouped in seven different clusters, mainly correlated with the carbon substrates used (Fig. 2). In order to phylogenetically identify the active methanogens, 16S rRNA clone libraries from 11 positive enrichment cultures were analyzed (underlined in Fig. 2B). As the RT-PCR-DGGE profiles showed relatively limited archaeal diversity within the enrichments, only 10 clones per library were sequenced. For each clone library, all 10 sequences were highly similar to each other (97% sequence similarity). 16S rRNA sequences, amplified from enrichment cultures with TMA, were closely related to *Methanococcoides burtonii* and *Methanococcoides alaskense* (98% sequence similarity), within the order *Methanosarcinales*. In contrast, sequences obtained from enrichments with H₂-CO₂ and acetate or with H₂-CO₂ as carbon and energy sources were mainly distantly related to *Methanogenium cariaci* (96% sequence similarity) and could therefore represent a new species of *Methanogenium* (*Methanogenium* group 1) (Fig. 3). Sequences obtained from enrichment culture from WM14 (6 to 10 cmbsf) amended with acetate and H₂-CO₂ were closely related to *M. cariaci* (98% sequence similarity) (*Methanogenium* group 2) (Fig. 3). However, enrichment culture from EWM14 (6 to 10 cmbsf), also amended with H₂-CO₂, harbored a different methanogenic population, composed of sequences only very distantly related to *Methanogenium marinum* (93% sequence similarity; *Methanogenium* group 3) (Fig. 3).

DISCUSSION

Methanogenic populations in the Sonora Margin sediments. The methane isotopic ratio measured previously in these samples suggested that methane in the Sonora Margin shallow sediments

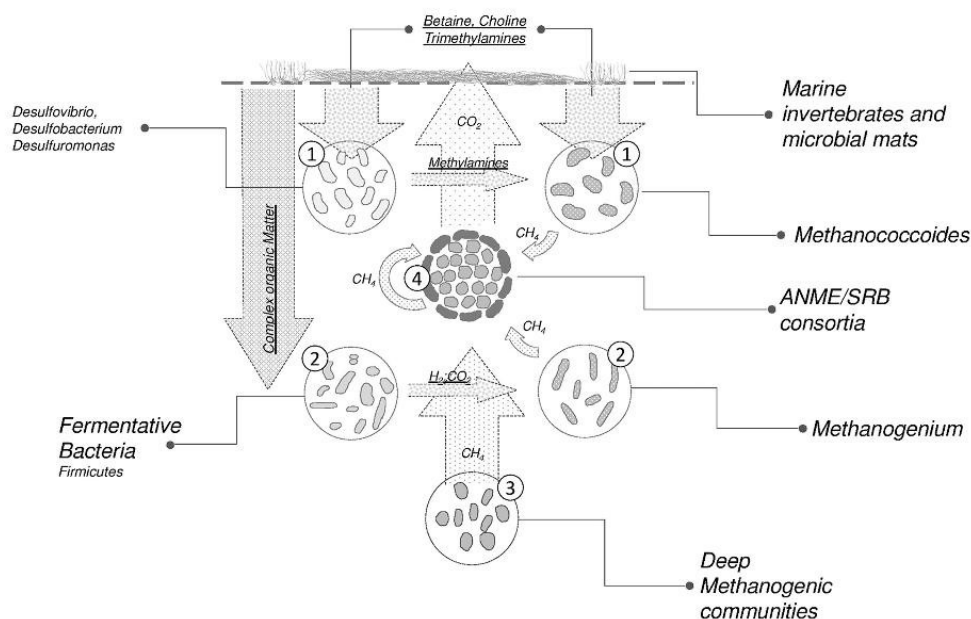


FIG 4 Hypothetical model (not to scale) of microbial methane cycling in the Sonora Margin cold seep sediments. Each microbial group is characterized by a specific function: group 1, methylotrophic methanogenesis by *Methanococoides* lineages directly from surface organism inputs or after primary degradation by various bacteria (*Desulfovibrio*, *Desulfobacterium*, and *Desulfuromonas*) previously detected in environmental samples (60); group 2, hydrogenotrophic methanogenesis by *Methanogenium* lineages after organic-matter degradation by fermentative bacteria (*Firmicutes*) previously detected in environmental samples (24, 60); group 3, methane production by the deepest methanogenic communities detected in the deepest (1 to 9 mbsf) sediments of the Sonora Margin cold seeps (46) and other, potentially unidentified methanogens; group 4, potential methanogenesis activity of ANME communities (68, 70). SRB, sulfate-reducing bacterium.

TMA, *N,N*-dimethylglycine, and *N,N*-dimethylethanolamine) (Fig. 4) (55). For example, TMA concentrations in marine sediments were previously shown to be related to the abundance of benthic invertebrates (56). Furthermore, degradation of choline and betaine to TMA has been reported for the deltaproteobacterial lineages *Desulfovibrio* (57), *Desulfobacterium* (58), and *Desulfuromonas* (59), detected previously by a 16S rRNA survey in the Sonora Margin sediments (60). However, it has recently been demonstrated that *Methanococoides* species can also directly utilize choline and betaine to produce methane and therefore bypass the need for the bacterial-degradation step (Fig. 4) (19, 61). Hence, the use of invertebrate-derived substrates might explain the widespread occurrence of *Methanococoides* in organic-rich marine environments, such as cold seeps (14, 42, 44, 45), tidal flats (47, 53, 62), whale fall (63), and mangrove sediments (64), usually colonized by benthic invertebrates. These results also support studies showing cooccurrence of sulfate reduction and methylotrophic methanogenesis in marine sediments (17, 65).

In contrast to methylotrophic methanogenesis, hydrogenotrophic methanogenesis rates were below those measured previously in seep and nonseep marine sediments (<0.4 to $30 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ day}^{-1}$ [28]) but were similar to hydrogenotrophic methanogenesis rates measured in the Amsterdam and Mercator mud volcanoes (42, 66). Although methylotrophic methanogenesis dominated in surface sediments, the proportion of hydrogenotrophic methanogenesis increased with depth, rep-

resenting up to 50% of the methane production at the bottom of the EWM14 core. In these organic-rich sediments, hydrogen could be produced by fermentation of organic matter by heterotrophic bacteria (49), such as members of the phylum *Firmicutes* (Fig. 4), previously detected in significant proportions in these environmental samples (24, 60). The presence of active hydrogenotrophic methanogenesis in these sediments was also supported by the growth of methanogens in enrichment cultures amended with $\text{H}_2\text{-CO}_2$. All the 16S rRNA sequences detected in these enrichments were affiliated with the genus *Methanogenium* (order *Methanomicrobiales*) and were detected previously using qPCR in the original environmental samples (23). The characterized *Methanogenium* strains are psychrophilic to thermophilic methanogens (0 to 62°C), mainly isolated from marine sediments, and can use formate or $\text{H}_2\text{-CO}_2$ as a substrate. Three distinct lineages of *Methanogenium* were identified (groups 1, 2, and 3 [Fig. 3]) in these enrichment cultures of Sonora Margin cold seep sediments. Sequences affiliated with *Methanogenium* group 1 were detected from all enrichments amended with $\text{H}_2\text{-CO}_2$ and formed a distinct phylogenetic group that might represent a new lineage. A second group (*Methanogenium* group 2), closely related to *M. cariaci* (98% sequence similarity) strains previously identified in other cold seep sediments (13, 44, 67), was detected only in enrichments from sediments underlying the white mat amended with acetate and $\text{H}_2\text{-CO}_2$. A third group of sequences (*Methanogenium* group 3) distantly related to *M. marinum* (93% sequence

similarity) was detected in only two enrichment cultures amended with acetate and H₂-CO₂ from EWM14 sediments (6 to 10 cmbsf) and could also represent a new genus within the order *Methanomicrobiales*. Similarly, different putative H₂-CO₂-utilizing *Methanomicrobiales* lineages related to *Methanocorpusculum*, *Methanoculleus*, and *Methanomicrobium* were also detected previously in the neighboring hot hydrothermal sediments of the Guaymas Basin (49). *Methanomicrobiales* were the only hydrogenotrophic methanogens detected in these shallow sediments, suggesting that members of this order could be responsible for most of the hydrogenotrophic methanogenesis in Sonora Margin sediments.

Acetate has been previously proposed as a significant substrate for methanogenesis in the hydrothermal sediments of the Guaymas Basin (49). However, rates of acetate methanogenesis in these cold seep sediments were very low (1/20 of H₂-CO₂ methanogenesis), as they were below the typical rates measured in these environments (28). Moreover, no methanogens were enriched with acetate as a sole carbon and energy source, although aceticlastic methanogens related to *Methanosarcina baltica* were previously detected in these sediments using different enrichment conditions (incubation temperature, 25°C) (20). Putative mesophilic aceticlastic methanogens were not detected, as opposed to the hydrothermal sediments of the basin (49), suggesting that aceticlastic methanogens in the Sonora Margin were at low abundance and therefore difficult to enrich. Aceticlastic methanogens in these sediments could also be outcompeted for acetate by sulfate-reducing communities detected previously (60) and associated with high sulfate concentrations (68).

Have we caught them all? In this study of shallow sediments of the Sonora Margin using culture-based approaches, four different methanogenic lineages were identified, whereas only one was detected from the same environmental samples, using culture-independent methods. This suggests that enrichment cultures can lower the detection limits of methanogens in these environments (14, 42). Moreover, detection of lineages affiliated with *Methanosarcinales* and *Methanomicrobiales* is consistent with previous culture-independent surveys of archaeal communities associated with the Sonora Margin shallow sediments (23, 24). Contrary to results from qPCR and pyrosequencing studies, the sizes of the amplicons in this culture-dependent study allowed phylogenetic identification and characterization of the methanogen community. However, members of the order *Methanococcales* were previously quantified in abundance similar to that of the *Methanomicrobiales* (21). Mesophilic species of the *Methanococcales* are known to be extremely sensitive to osmotic changes (26) and have also been detected in low proportion in the hydrothermal sediments of the Guaymas Basin (49). Hence, the lack of *Methanococcales* lineages in our enrichment cultures might be due to the sample depressurization during the core recovery or to unsuitable culture conditions (e.g., temperature and time of incubation). Thus, despite the identification of several methanogen lineages, all the lineages might not have been detected.

Several studies showed that Sonora Margin sediments harbor high concentrations of ANME lineages (1, 2, and 3) distributed throughout the upper 20 cm of sediments (23, 24, 60). Commonly proposed as methane oxidizers, some ANME lineages might also produce methane (68–70) and be physiologically versatile (23, 68). Despite their abundance in the environmental samples, ANME aggregates disappeared rapidly in the cultures, and no ANME sequences were detected from these methane-producing

enrichments. This might suggest that ANME were not methane producers under our culture conditions. However, we could not exclude the possibility that ANME lineages could use alternative methanogenic substrates, such as methanol, as recently proposed (68).

Together, these results indicated that the high methane concentrations measured in the Sonora Margin cold seeps are partially produced in the shallow sediments by active methanogens dominated by methylotrophic *Methanococoidetes*, whereas the proportion of CO₂-reducing methanogens related to *Methanogenium* increased with sediment depth (Fig. 4). Aceticlastic methanogens represented a minority of the methanogen community. However, the methanogenic contributions of other shallow, uncultured microorganisms and ANME lineages using different substrates, as well as deeply buried microorganisms, remain to be explored.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the crews of the research vessel *L'Atalante* and the submersible *Nautille* of the cruise BIG and to the scientific team for their help on board.

The cruise was funded by Ifremer (France) and benefited from a work permit in Mexican waters (DAPA/2/28100*/3803; 28 October 2009). This study was supported by an Ifremer Ph.D. grant.

REFERENCES

- Jørgensen BB, Boetius A. 2007. Feast and famine—microbial life in the deep-sea bed. *Nat Rev Microbiol* 5:770–781. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1745>.
- Lloyd KG, Albert DB, Biddle JF, Chanton JP, Pizarro O, Teske A. 2010. Spatial structure and activity of sedimentary microbial communities underlying a *Beggiatoa* spp. mat in a Gulf of Mexico hydrocarbon seep. *PLoS One* 5:e8738. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0008738>.
- Boetius A, Wenzhofer F. 2013. Seafloor oxygen consumption fuelled by methane from cold seeps. *Nat Geosci* 6:725–734. <http://dx.doi.org/10.1038/ngeo1926>.
- Hinrichs K-U, Boetius A. 2002. The anaerobic oxidation of methane: new insights in microbial ecology and biogeochemistry, p 457–477. In Wefer G, Billert D, Hebbeln D, Jørgensen BB, Schlüter M, Van Weering T (ed), *Ocean margin systems*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Sakai S, Imachi H, Sekiguchi Y, Tseng I-C, Ohashi A, Harada H, Kamagata Y. 2009. Cultivation of methanogens under low-hydrogen conditions by using the coculture method. *Appl Environ Microbiol* 75:4892–4896. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02835-08>.
- Paul K, Nonoh JO, Mikulski L, Brune A. 2012. “Methanoplasmatales,” Thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. *Appl Environ Microbiol* 78:8245–8253. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02193-12>.
- Iino T, Tamaki H, Tamazawa S, Ueno Y, Ohkuma M, Suzuki K, Igarashi Y, Haruta S. 2013. *Candidatus Methanogramum caenicola*: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of *Methanomassiliicoccales* fam. nov. and *Methanomassiliicoccales* ord. nov., for a methanogenic lineage of the class Thermoplasmata. *Microbes Environ* 28:244–250. <http://dx.doi.org/10.1264/jsm2.ME12189>.
- Lever MA, Teske AP. 2015. Methane-cycling archaeal diversity in hydrothermal sediment investigated by general and group-specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol* 81:1426–1441. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03588-14>.
- Bergmann I, Nettmann E, Mundt K, Klocke M. 2010. Determination of methanogenic *Archaea* abundance in a mesophilic biogas plant based on 16S rRNA gene sequence analysis. *Can J Microbiol* 56:440–444. <http://dx.doi.org/10.1139/W10-021>.
- Chong SC, Liu YT, Cummins M, Valentine DL, Boone DR. 2002. *Methanogenium marinum* sp. nov., a H₂-using methanogen from Skan Bay, Alaska, and kinetics of H₂ utilization. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:263–270. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1020535222281>.
- Dore J, Pochart P, Bernalier A, Goderel I, Morvan B, Rambaud JC. 1995. Enumeration of H₂-utilizing methanogenic *Archaea*, acetogenic and

- sulfate-reducing bacteria from human feces. *FEMS Microbiol Ecol* 17: 279–284. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.1995.tb00152.x>.
12. Juottonen H, Galand PE, Yrjala K. 2006. Detection of methanogenic *Archaea* in peat: comparison of PCR primers targeting the *mcrA* gene. *Res Microbiol* 157:914–921. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2006.08.006>.
 13. Kendall MM, Boone DR. 2006. Cultivation of methanogens from shallow marine sediments at Hydrate Ridge, Oregon. *Archaea* 2:31–38. <http://dx.doi.org/10.1155/2006/710190>.
 14. Lazar CS, Parkes RJ, Cragg BA, L'Haridon S, Toffin L. 2011. Methanogenic diversity and activity in hypersaline sediments of the centre of the Napoli mud volcano, Eastern Mediterranean Sea. *Environ Microbiol* 13: 2078–2091. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02425.x>.
 15. Scholten JCM, Murrell JC, Kelly DP. 2003. Growth of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea with methylated sulfur compounds: a commentary on the thermodynamic aspects. *Arch Microbiol* 179:135–144. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-002-0509-0>.
 16. Taketani RG, Yoshiura CA, Dias ACF, Andreote FD, Tsai SM. 2010. Diversity and identification of methanogenic archaea and sulphate-reducing bacteria in sediments from a pristine tropical mangrove. *Antonie Van Leeuwenhoek* 97:401–411. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-010-9422-8>.
 17. Oremland RS, Polcin S. 1982. Methanogenesis and sulfate reduction—competitive and noncompetitive substrates in estuarine sediments. *Appl Environ Microbiol* 44:1270–1276.
 18. Lyimo TJ, Pol A, Op den Camp HJ, Harhangi HR, Vogels GD. 2000. *Methanosarcina semesia* sp. nov., a dimethylsulfide-utilizing methanogen from mangrove sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:171–178. <http://dx.doi.org/10.1099/00207173-50-1-171>.
 19. Watkins AJ, Roussel EG, Parkes RJ, Sass H. 2014. Glycine betaine as a direct substrate for methanogens (*Methanococoides* spp.). *Appl Environ Microbiol* 80:289–293. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03076-13>.
 20. Watkins A. 2012. A survey of culturable methanogens in contrasting marine sediments, their substrates and physiological characteristics. Cardiff University, Cardiff, United Kingdom.
 21. Borrel G, O'Toole PW, Harris HMB, Peyret P, Brugère J-F, Gribaldo S. 2013. Phylogenomic data support a seventh order of methylotrophic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis. *Genome Biol Evol* 5:1769–1780. <http://dx.doi.org/10.1093/gbe/evt128>.
 22. Simoneit BRT, Lonsdale PF, Edmond JM, Shanks WC. 1990. Deep-water hydrocarbon seeps in Guaymas Basin, Gulf of California. *Appl Geochem* 5:41–49. [http://dx.doi.org/10.1016/0883-2927\(90\)90034-3](http://dx.doi.org/10.1016/0883-2927(90)90034-3).
 23. Vigneron A, Cruaud P, Pignet P, Caprais J-C, Cambon-Bonavita M-A, Godfroy A, Toffin L. 2013. Archaeal and anaerobic methane oxidizer communities in the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin (Gulf of California). *ISME J* 7:1595–1608. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2013.18>.
 24. Cruaud P, Vigneron A, Lucchetti-Miganeh C, Ciron PE, Godfroy A, Cambon-Bonavita MA. 2014. Influence of DNA extraction method, 16S rRNA targeted hypervariable regions, and sample origin on microbial diversity detected by 454 pyrosequencing in marine chemosynthetic ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 80:4626–4639. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00592-14>.
 25. Kurr M, Huber R, König H, Jannasch H, Fricke H, Trincone A, Kristjansson J, Stetter K. 1991. *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C. *Arch Microbiol* 156:239–247. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00262992>.
 26. Jones WJ, Paynter MJB, Gupta R. 1983. Characterization of *Methanococcus Maripaludis* sp. nov., a new methanogen isolated from salt-marsh sediment. *Arch Microbiol* 135:91–97. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00408015>.
 27. Jeanthon C, L'Haridon S, Reysebach A-L, 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. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-49-2-583>.
 28. Parkes RJ, Cragg BA, Banning N, Brock F, Webster G, Fry JC, Hornibrook E, Pancost RD, Kelly S, Knab N, Jørgensen BB, Rinna J, Weightman AJ. 2007. Biogeochemistry and biodiversity of methane cycling in subsurface marine sediments (Skagerrak, Denmark). *Environ Microbiol* 9:1146–1161. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01237.x>.
 29. Teske A, Hinrichs KU, Edgcomb V, Gomez AD, 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. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.4.1994-2007.2002>.
 30. Casamayor EO, Massana R, Benlloch S, Ovreas L, Diez B, Goddard VJ, Gasol JM, Joint I, Rodriguez-Valera F, Pedros-Alio C. 2002. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar salt-ern. *Environ Microbiol* 4:338–348. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00297.x>.
 31. Ovreas L, Forney L, Daae FL, Torsvik V. 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 63:3367–3373.
 32. Pavel AB, Vasile CI. 2012. PyElph—a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics* 13:9. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-13-9>.
 33. Kolganova TV, Kuznetsov BB, Tourova TP. 2002. Designing and testing oligonucleotide primers for amplification and sequencing of archaeal 16S rRNA genes. *Microbiology* 71:243–246. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1015122926687>.
 34. Teske A, Sorensen KB. 2008. Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? *ISME J* 2:3–18. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2007.90>.
 35. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
 36. Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T. 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res* 33: 511–518. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gki198>.
 37. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msm092>.
 38. Stamatakis A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22:2688–2690. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btl446>.
 39. Eirich LD, Vogels GD, Wolfe RS. 1979. Distribution of coenzyme F420 and properties of its hydrolytic fragments. *J Bacteriol* 140:20–27.
 40. Alonso-Sáez L, Waller AS, Mende DR, Bakker K, Farnelid H, Yager PL, Lovejoy C, Tremblay J-É, Potvin M, Heinrich F, Estrada M, Riemann L, Bork P, Pedrós-Alió C, Bertilsson S. 2012. Role for urea in nitrification by polar marine *Archaea*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:17989–17994. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1201914109>.
 41. Damm E, Budeus G. 2003. Fate of vent-derived methane in seawater above the Hakon Mosby mud volcano (Norwegian Sea). *Mar Chem* 82:1–11. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4203\(03\)00031-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4203(03)00031-8).
 42. Lazar CS, Parkes JR, Cragg BA, L'Haridon S, Toffin L. 2012. Methanogenic activity and diversity in the centre of the Amsterdam mud volcano, eastern Mediterranean Sea. *FEMS Microbiol Ecol* 81:243–254. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01375.x>.
 43. Orphan VJ, Hinrichs KU, Ussler W, 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. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.4.1922-1934.2001>.
 44. Pachiadaki MG, Kallionaki A, Dahlmann A, De Lange GJ, Kormas KA. 2011. Diversity and spatial distribution of prokaryotic communities along a sediment vertical profile of a deep-sea mud volcano. *Microb Ecol* 62: 655–668. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-011-9855-2>.
 45. Lanoil BD, La Duc MT, Wright M, Kastner M, Nealson KH, Bartlett D. 2005. Archaeal diversity in ODP legacy borehole 892b and associated seawater and sediments of the Cascadia Margin. *FEMS Microbiol Ecol* 54: 167–177. <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsec.2005.03.015>.
 46. Vigneron A, Cruaud P, Roussel EG, Pignet P, Caprais J-C, Callac N, Ciobanu M-C, Godfroy A, Cragg BA, Parkes JR, Van Nostrand JD, He Z, Zhou J, Toffin L. 2014. Phylogenetic and functional diversity of microbial communities associated with subsurface sediments of the Sonora Margin, Guaymas Basin. *PLoS One* 9:e104427. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0104427>.
 47. Roussel EG, Sauvadet A-L, Allard J, Chaduteau C, Richard P, Bonavita M-AC, Chaumillon E. 2009. Archaeal methane cycling communities associated with gassy subsurface sediments of Marennes-Oléron Bay (France). *Geomicrobiol J* 26:31–43. <http://dx.doi.org/10.1080/01490450802599284>.
 48. Orphan VJ, Jahnke LL, Embaye T, Turk KA, Perenthaler A, Summons RE, Des Marais DJ. 2008. Characterization and spatial distribution of methanogens and methanogenic biosignatures in hypersaline microbial mats of Baja California. *Geobiology* 6:376–393. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-4669.2008.00166.x>.

49. Dhillon A, Lever M, Lloyd KG, Albert DB, Sogin ML, Teske A. 2005. Methanogen diversity evidenced by molecular characterization of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes in hydrothermal sediments of the Guaymas Basin. *Appl Environ Microbiol* 71:4592–4601. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.8.4592-4601.2005>.
50. Omoregie EO, Niemann H, Mastalerz V, de Lange GJ, Stadnitskaia A, Masclé J, Foucher J-P, Boetius A. 2009. Microbial methane oxidation and sulfate reduction at cold seeps of the deep Eastern Mediterranean Sea. *Mar Geol* 261:114–127. <http://dx.doi.org/10.1016/j.margeo.2009.02.001>.
51. Lin Y-S, Biddle JF, Lipp JS, Orcutt BN, Holler T, Teske A, Hinrichs K-U. 2010. Effect of storage conditions on archaeal and bacterial communities in subsurface marine sediments. *Geomicrobiol J* 27:261–272. <http://dx.doi.org/10.1080/01490450903410423>.
52. Maignien L, Depreiter D, Foubert A, Reveillard J, De Mol L, Boeckx P, Blamart D, Henriot JP, Boon N. 2011. Anaerobic oxidation of methane in a cold-water coral carbonate mound from the Gulf of Cadiz. *Int J Earth Sci* 100:1413–1422. <http://dx.doi.org/10.1007/s00531-010-0528-z>.
53. Purdy KJ, Munson MA, Cresswell-Maynard T, Nedwell DB, Embley TM. 2003. Use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate function and phylogeny of sulphate-reducing bacteria and methanogenic archaea in a UK estuary. *FEMS Microbiol Ecol* 44:361–371. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00078-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00078-3).
54. John Parkes R, Brock F, Banning N, Hornibrook ERC, Roussel EG, Weightman AJ, Fry JC. 2012. Changes in methanogenic substrate utilization and communities with depth in a salt-marsh, creek sediment in southern England. *Estuar Coast Shelf Sci* 96:170–178. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2011.10.025>.
55. Sørensen J, Glob E. 1987. Influence of benthic fauna on trimethylamine concentrations in coastal marine sediments. *Mar Ecol Prog Ser* 39:15–21. <http://dx.doi.org/10.3354/meps039015>.
56. Wang X-C, Lee C. 1994. Sources and distribution of aliphatic amines in salt marsh sediment. *Org Geochem* 22:1005–1021. [http://dx.doi.org/10.1016/0146-6380\(94\)90034-5](http://dx.doi.org/10.1016/0146-6380(94)90034-5).
57. Fiebig K, Gottschalk G. 1983. Methanogenesis from choline by a coculture of *Desulfovibrio* sp. and *Methanosarcina barkeri*. *Appl Environ Microbiol* 45:161–168.
58. Hayward HR, Stadtman TC. 1959. Anaerobic degradation of choline. I. Fermentation of choline by an anaerobic, cytochrome-producing bacterium, *Vibrio cholonicus* n. sp. *J Bacteriol* 78:557–561.
59. Heijthuisen JHFG, Hansen TA. 1989. Betaine fermentation and oxidation by marine *Desulfuromonas* strains. *Appl Environ Microbiol* 55:965–969.
60. Vigneron A, Cruaud P, Pignet P, Caprais J-C, Gayet N, Cambon-Bonavita M-A, Godfroy A, Toffin L. 2014. Bacterial communities and syntrophic associations involved in anaerobic oxidation of methane process of the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin. *Environ Microbiol* 16:2777–2790. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.12324>.
61. L'Haridon S, Chalopin M, Colombo D, Toffin L. 2014. *Methanococoides vulcani* sp. nov., a marine methylophilic methanogen that uses betaine, choline and *N,N*-dimethylethanamine for methanogenesis, isolated from a mud volcano, and emended description of the genus *Methanococoides*. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:1978–1983. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.058289-0>.
62. Kim B-S, Oh H-M, Kang H, Chun J. 2005. Archaeal diversity in tidal flat sediment as revealed by 16S rDNA analysis. *J Microbiol* 43:144–151.
63. Goffredi SK, Wilpiseski R, Lee R, Orphan VJ. 2008. Temporal evolution of methane cycling and phylogenetic diversity of archaea in sediments from a deep-sea whale-fall in Monterey Canyon, California. *ISME J* 2:204–220. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2007.103>.
64. Lyimo TJ, Pol A, Jetten MSM, Op den Camp HJM. 2009. Diversity of methanogenic archaea in a mangrove sediment and isolation of a new *Methanococoides* strain. *FEMS Microbiol Lett* 291:247–253. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01464.x>.
65. Mitterer RM. 2010. Methanogenesis and sulfate reduction in marine sediments: a new model. *Earth Planet Sci Lett* 295:358–366. <http://dx.doi.org/10.1016/j.epsl.2010.04.009>.
66. Maignien L, Parkes RJ, Cragg B, Niemann H, Knittel K, Coulon S, Akhmetzhanov A, Boon N. 2013. Anaerobic oxidation of methane in hypersaline cold seep sediments. *FEMS Microbiol Ecol* 83:214–231. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01466.x>.
67. Kendall MM, Wardlaw GD, Tang CF, Bonin AS, Liu Y, Valentine DL. 2007. Diversity of archaea in marine sediments from Skan Bay, Alaska, including cultivated methanogens, and description of *Methanogenium boonei* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 73:407–414. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01154-06>.
68. Bertram S, Blumenberg M, Michaelis W, Siebert M, Krüger M, Seifert R. 2013. Methanogenic capabilities of ANME-archaea deduced from ¹³C-labelling approaches. *Environ Microbiol* 15:2384–2393. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.12112>.
69. Orcutt B, Samarkin V, Boetius A, Joye S. 2008. On the relationship between methane production and oxidation by anaerobic methanotrophic communities from cold seeps of the Gulf of Mexico. *Environ Microbiol* 10:1108–1117. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01526.x>.
70. Lloyd KG, Alperin MJ, Teske A. 2011. Environmental evidence for net methane production and oxidation in putative anaerobic methanotrophic (ANME) archaea. *Environ Microbiol* 13:2548–2564. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02526.x>.

Ces deux études ont donc mis en évidence, pour la première fois dans les sédiments de la marge de Sonora, l'activité métabolique et la présence en importantes concentrations de communautés archéennes impliquées dans le cycle du méthane. Les archées méthanogènes ont été estimées en faible proportion (environ 1%), comparées aux archées méthanotrophes anaérobies (ANME), mais métaboliquement actives et en partie cultivables. La présence simultanée de ces deux populations au métabolisme opposé semble être possible grâce à l'utilisation par les méthanogènes de substrats différents, non compétitifs (TMA) ou probablement en excès dans l'environnement (CO₂). La production et surtout l'oxydation du méthane semblent donc être des processus majeurs dans les sédiments associés aux sorties de fluides froids de la marge de Sonora. Cependant, la distribution et l'observation des communautés d'archées méthanotrophes ont mis en exergue des écophysiologies différentes pour les groupes d'ANME, dont la fonction est supposée similaire, selon les conditions environnementales (teneur en sulfate, communautés de surface). En effet, les populations d'ANME ont présenté des distributions différentes au sein de la colonne de sédiment échantillonné, révélant des besoins ou des restrictions spécifiques. Cette structuration des communautés en fonction de la profondeur d'enfouissement, favoriserait la cohabitation dans les sédiments des trois lignées d'ANME connues (-1,-2 et -3), bien qu'elles soient en compétition pour le même substrat carboné, le méthane. La nature des paramètres influençant ces distributions verticales reste encore à définir précisément. Plusieurs hypothèses telles qu'une sensibilité à l'oxygène ou encore des affinités différentes pour les composés réduits ont précédemment été proposées (Knittel et al., 2005; Roalkvam et al., 2011; Yanagawa et al., 2011; Biddle et al., 2012). Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent plutôt un rôle important du partenaire bactérien et de ses besoins énergétiques et carbonés dans la distribution spatiale des populations d'ANME. En effet, les groupes d'ANME observés en association physique avec des bactéries (ANME-2a et ANME-2c) sont présents dans des niches écologiques sédimentaires plus superficielles que les ANME-1, libres d'association bactérienne. Les besoins métaboliques des bactéries syntrophiques, probablement sulfato-réductrices, restreindraient alors les consortia d'ANME-2/bactéries dans les horizons sédimentaires favorables à leurs développements (riches en sulfate, composés organiques ou métabolites secondaires). Les ANME-1, au métabolisme indépendant de ces bactéries et donc de leur besoins métaboliques pourraient alors coloniser une niche écologique plus profonde,

dépourvue des populations d'ANME-2. Au niveau d'habitats particuliers tel que WM12, la diffusion d'importantes quantités de sulfate et sans doute d'autres composés de l'eau de mer, semble favoriser une répartition plus profonde des populations d'ANME-2 ainsi qu'une cohabitation avec des populations d'ANME-1 alors en consortia avec des bactéries. Ce passage d'un métabolisme indépendant des bactéries à un métabolisme syntrophique pour les ANME-1 semble être induit par la disponibilité en sulfate, dans ce cas non limitant dans le milieu. De même, les ANME-3, localisées sous les horizons sédimentaires influencés par les apports de surface (4 - 8 cmbsf) et observées sans partenaire bactérien, pourraient éviter la compétition avec les ANME-2 en utilisant par exemple d'autres composés dérivés de la matière organique sédimentée et/ou non compétitifs, à l'instar des populations méthanogènes (Oremland and Polcin, 1982). Ces résultats suggèrent ainsi que les groupes d'ANMEs, et plus particulièrement les ANME-1 et ANME-3, pourraient présenter une flexibilité métabolique selon les conditions environnementales présentes. Les ANME-1 et -3 seraient alors capables de mettre en œuvre d'autres voies métaboliques, que l'oxydation anaérobie du méthane, comme l'indiquerait la présence des voies enzymatiques de la méthanotrophie mais également de la méthanogénèse dans le génome des ANME-1 (Meyerdierks et al., 2010; Stokke et al., 2012). Ces résultats restent toutefois à confirmer notamment *via* l'étude des partenaires microbiens et de leurs métabolismes, considérés dans cette étude comme facteurs majeurs influençant la distribution des communautés d'ANME.

Article 2 : "Bacterial community and syntrophic associations involved in AOM process of the Sonora Margin cold seeps, Guaymas basin"

Vignerou Adrien, Cruaud Perrine, Patricia Pignet, Caprais Jean-Claude, Gayet Nicolas, Cambon-Bonavita Marie-Anne, Godfroy Anne et Toffin Laurent

Soumis à Environmental Microbiology, actuellement en cours d'expertise.

Introduction à l'étude

L'étude des communautés d'archées des sédiments de surface des zones d'émissions de fluides froids de la marge de Sonora a mis en évidence la présence d'ANMEs, probablement impliquées dans le processus d'oxydation anaérobie du méthane, associées en consortia plurispécifiques avec des bactéries. Ces partenaires bactériens sont fréquemment identifiés comme des sulfato-réducteurs affiliés aux *Delta-proteobacteria* (Knittel et al., 2005; Schreiber et al., 2010; Kleindienst et al., 2012). Cependant, d'autres bactéries non identifiées ont dans certains cas été observées en partenariat avec les ANMEs dans les sédiments de suintements froids (Pernthaler et al., 2008). Ainsi, la diversité totale, mais également le métabolisme, la distribution et l'écophysiologie de ces bactéries restent méconnus. De même, la spécificité des partenaires impliqués et les paramètres régulant l'architecture et la morphologie de ces agrégats restent fortement inexplorés. Cette seconde étude vise donc, dans un premier temps, à identifier les communautés bactériennes associées physiquement aux cellules d'ANMEs dans les sédiments de la marge de Sonora, puis à déterminer les différents paramètres influençant la répartition des partenaires bactériens et les modes d'association des microorganismes au sein de ces consortia.

Bacterial communities and syntrophic associations involved in anaerobic oxidation of methane process of the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin

Adrien Vigneron,^{1,2,3} Perrine Cruaud,^{1,2,3}
Patricia Pignet,^{1,2,3} Jean-Claude Caprais,⁴
Nicolas Gayet,⁴ Marie-Anne Cambon-Bonavita,^{1,2,3}
Anne Godfroy^{1,2,3} and Laurent Toffin^{1,2,3*}

¹Ifremer, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extr mes, ²Université de Bretagne Occidentale, ³CNRS, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extr mes, ⁴Ifremer, Laboratoire Etude des Environnements Profonds, Technop le Brest Iroise, Plouzan , France.

Summary

The Sonora Margin cold seeps present on the seafloor a patchiness pattern of white microbial mats surrounded by polychaete and gastropod beds. These surface assemblages are fuelled by abundant organic inputs sedimenting from the water column and upward-flowing seep fluids. Elevated microbial density was observed in the underlying sediments. A previous study on the same samples identified anaerobic oxidation of methane (AOM) as the potential dominant archaeal process in these Sonora Margin sediments, probably catalysed by three clades of archaeal anaerobic methanotrophs (ANME-1, ANME-2 and ANME-3) associated with bacterial syntrophs. In this study, molecular surveys and microscopic observations investigating the diversity of *Bacteria* involved in AOM process, as well as the environmental parameters affecting the composition and the morphologies of AOM consortia in the Sonora Margin sediments were carried out. Two groups of *Bacteria* were identified within the AOM consortia, the *Desulfosarcina/Desulfococcus* SEEP SRB-1a group and a *Desulfobulbus*-related group. These bacteria showed different niche distributions, association specificities and consortia architectures, depending on sediment surface communities, geochemical parameters and ANME-associated phylogeny. Therefore, the

syntrophic AOM process appears to depend on sulphate-reducing bacteria with different ecological niches and/or metabolisms, in a biofilm-like organic matrix.

Introduction

The cold seeps of the Guaymas Basin, located along a transform fault of the Sonora Margin, present different faunal assemblages (Simoneit *et al.*, 1990; Paull *et al.*, 2007) and white microbial mats (Vigneron *et al.*, 2013). The development of these communities at the cold seep water-sediment interface is supported by methane and sulphide-rich up-flowing fluids, and by seep-fuelled active methanogens and anaerobic methanotrophs (Boetius *et al.*, 2000; Jorgensen and Boetius, 2007). Archaeal anaerobic methanotrophs (ANME-1, ANME-2a, ANME-2c and ANME-3), distantly related to the orders *Methanosarcinales* and *Methanomicrobiales* (Orphan *et al.*, 2002; Knittel and Boetius, 2009), and probably involved in anaerobic oxidation of methane (AOM), have been found to be dominant in the shallow (0 to 17 cmbsf) Sonora Margin cold seep sediments (Vigneron *et al.*, 2013). ANME clades presented different distributions throughout these sediments. In sediments underlying two visible microbial mats called White Mat 12 (WM12) and White Mat 14 (WM14) (Fig. S1), ANME-2c were predominant in shallow sulphate-rich sediments, while ANME-1 dominated the deepest sulphate-depleted sediment layers and ANME-3 were restricted to a specific horizon below the first 4 cm of sediments (Fig. 3). ANME communities appeared to be favoured in sulphate-enriched sediments throughout sediment core WM12. Elsewhere, sulphate and methane porewater concentration profiles in sediments underlying macrofauna at the edge of WM14 (called EWM14) were similar to those found in sediments underlying microbial mats. However, in EWM14 sediment core, ANME-2c were restricted to the first sediment layers, while increasing population of ANME-1 appeared to be the sole ANME community in the deepest sediment layers (Fig. 3). These ANME lineages are differently associated with syntrophic bacteria, depending on their phylogenetic affiliation and the environmental conditions. In the Sonora

Received 14 January, 2013; accepted 31 October, 2013. *For correspondence. E-mail laurent.toffin@ifremer.fr; Tel. (+33) 2 98 22 43 96; Fax (+33) 2 98 22 47 57.

© 2013 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd

Margin sediments, ANME-2a and ANME-2c were always observed forming aggregates with bacteria, whereas ANME-1 formed tight associations with bacteria exclusively in sulphate-rich sediments of WM12 and ANME-3 were observed without bacterial partners. Previous studies indicated that such syntrophic relationship between ANME and bacterial partners, mainly affiliated with sulphate-reducing *Bacteria* (SRB), linked AOM and seawater sulphate reduction in archaeal/bacterial consortia (Orphan *et al.*, 2002; Knittel *et al.*, 2005; Niemann *et al.*, 2006; Pernthaler *et al.*, 2008; Knittel and Boetius, 2009; Schreiber *et al.*, 2010; Schubert *et al.*, 2011). The SRB, affiliated to the *Deltaproteobacteria* (Knittel *et al.*, 2003) form a large and diverse physiological group capable of degrading a wide range of organic and hydrocarbon-derived substrates (Dhillon *et al.*, 2003; Kniemeyer *et al.*, 2007), resulting in elevated sulphate reduction rates in cold seep sediments (Bowles *et al.*, 2011). To date, only four phylogenetic clusters were observed in AOM consortia from cold seeps: the two *Desulfobulbus*-related organism groups (Losekann *et al.*, 2007; Pernthaler *et al.*, 2008), the SEEP SRB-1a subgroup belonging to the *Desulfosarcina/Desulfococcus* group (DSS) (Boetius *et al.*, 2000; Knittel *et al.*, 2003; Schreiber *et al.*, 2010) and recently, the previously described group SEEP SRB-2 (Knittel *et al.*, 2003; Kleindienst *et al.*, 2012). Additionally, another *deltaproteobacterial* group, the Hotseep-1 cluster, was observed in ANME-1 consortia in the hydrothermal sediments of the Guaymas Basin (Holler *et al.*, 2011). However, other unidentified *Bacteria* have been observed using direct cell capture experimentation (Pernthaler *et al.*, 2008), and AOM has been demonstrated to be coupled with other metabolisms than sulphate reduction, such as iron, manganese or nitrate reduction (Raghoebarsing *et al.*, 2006; Beal *et al.*, 2009). Although these findings have led to the description of the AOM-driving and denitrifying bacteria *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* (Ettwig *et al.*, 2010), these results demonstrated that the diversity of AOM bacterial partners still needs to be completed. Furthermore, the ecophysiology of AOM-involved *Bacteria* and the exact mechanisms of this syntrophic association remain unclear. For example, the vertical distribution and the metabolic specificities of each bacterial partner in the sediments are poorly explored. In this study, we focused on unexplored bacterial communities of the Sonora Margin cold seep sediments and more particularly on *Bacteria* involved in AOM. The identity and distribution of active bacterial communities involved in AOM were studied using complementary phylogenetic, microscopic and quantitative analyses in conjunction with a previous molecular survey on archaeal communities and geochemical analyses (Vigneron *et al.*, 2013).

Results

Phylogenetic diversity of metabolically active Bacteria

A total of 658 RNA-derived bacterial sequences were analysed from the sediments underlying two white microbial mats (WM12, a thick mat harbouring elevated sulphate concentrations throughout the sampled sediments and WM14, an extended mat surrounding a visible fluid output), and the edge of WM14 (EWM14) colonized by macrofauna. Bacterial diversity was high in the 16S rRNA clone libraries (Simpson indexes: $1-H_{Simpson} = 0.9 \pm 0.05$), with more than 27 phylogenetic lineages, mainly distributed among the *Epsilon*, *Delta* and *Gammaproteobacterial* groups (Fig. 1 and Fig. S2). The number of sequences related to the *Epsilonproteobacteria*, and particularly affiliated to the *Sulfurovum* genus encompassing sulphur- and thiosulphate-oxidizers bacterium (Inagaki *et al.*, 2004), decreased with depth. The *Deltaproteobacteria* represented about a third of analysed sequences in WM12, WM14 and EWM14 sediment cores. The *Deltaproteobacteria* sequences were composed of diverse phylogenetic lineages (Fig. 2), including the known AOM-associated sulphate-reducing bacterial groups such as the DSS group (SEEP SRB-1a-f) (Schreiber *et al.*, 2010) and SEEP SRB groups (SRB-2, SRB-3, SRB-4) (Knittel *et al.*, 2003). SEEP SRB-1a were detected throughout the WM12 sediment core, in the middle (4–6 cmbsf) and bottom sediment layers of WM14 and only in the EWM14 surface sediment layer. In contrast, SEEP SRB-1b were only detected in the deepest sediment layers of EWM14. The syntrophic AOM partners within the family *Desulfobulbaceae*, previously described from mud volcano sediments (Losekann *et al.*, 2007), were detected throughout WM sediments and in higher proportion in core WM12. In contrast, in EWM14, *Desulfobulbus*-related sequences were only detected in the surface and middle sediment layers. SEEP SRB-2 sequences were detected in the deepest layers of WM12 and in higher proportion in EWM14 intermediate and deeper sediment layers. Sequences related to *Gammaproteobacteria*, previously detected in hydrocarbon-rich environments, were also found in high proportion in WM14 sediments and from 0 to 6 cmbsf in EWM14. Sequences related to the *Candidatus Maribeggiatoa* genus were found in the first centimetres of the WMs (WM14 and WM12) sediments, as well as in dominant proportion in the microbial mats themselves. Additionally, sequences related to uncultured bacterial candidate division Japan Sea 1 were only detected in the deepest sediment layers of EWM14 that was not covered by microbial mats. Finally, sequences affiliated to several groups of candidate divisions, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Actinobacterium*, *Acidobacterium*, *Chloroflexi* and *Verrucomicrobia*

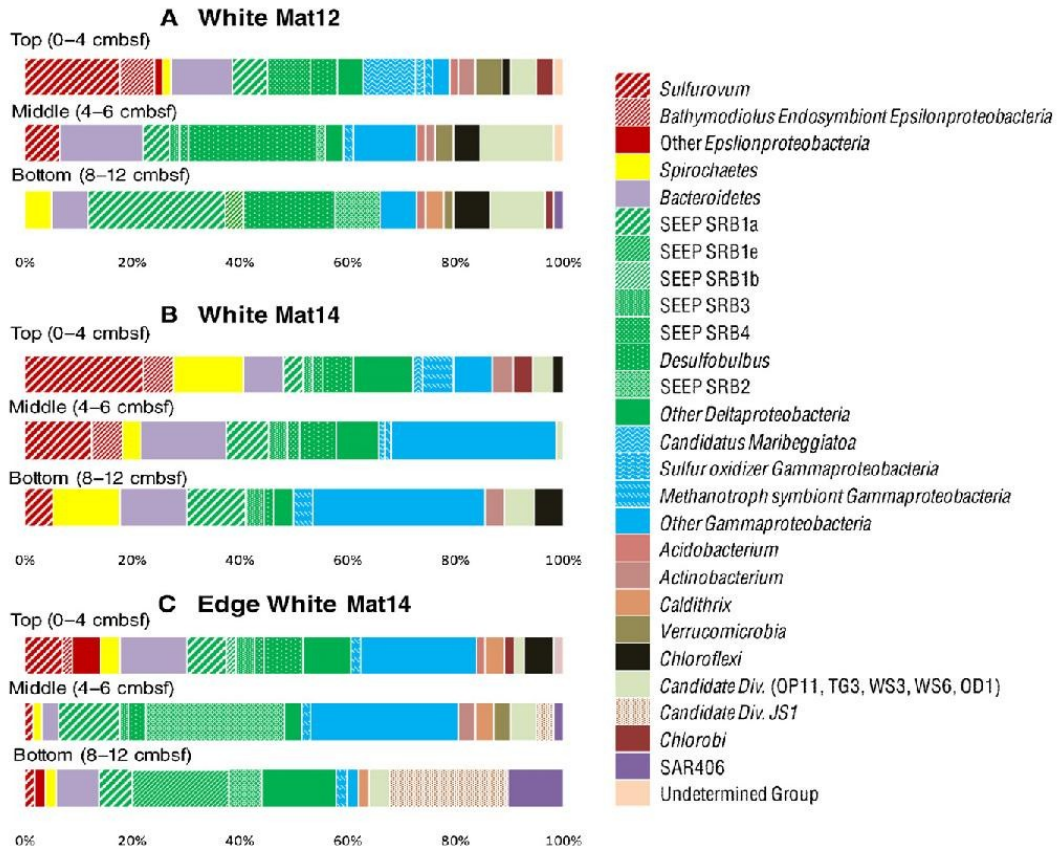


Fig. 1. Phylogenetic affiliations of bacterial 16S cDNA sequences for cold seep sediments of the Sonora Margin from Top (0 to 4 cmbsf), Middle (4 to 6 cmbsf) and Bottom (8 to 12 cmbsf). Shades of red, green and blue denote putative *Proteobacteria* (Epsilon, Delta and Gamma respectively). A, B and C correspond to the three selected habitats: White Mat 12, White Mat 14 and Edge of White Mat 14.

were also detected in all samples in lower proportions (Fig. 1 and Fig. S2).

Real-time PCR quantification of AOM bacterial partners

DSS, *Desulfobulbus* (DBB), SEEP SRB-2 and JS1 abundances were estimated by real-time polymerase chain reaction (PCR) every 2 cm from the water-sediment interface to 15 cmbsf (core length). These quantifications, targeting previously observed or suspected AOM-involved *Bacteria* (Losekann *et al.*, 2007; Cambon-Bonavita *et al.*, 2009; Harrison *et al.*, 2009; Knittel and Boetius, 2009; Schreiber *et al.*, 2010; Kleindienst *et al.*, 2012), highlighted significant differences between microbial lineage distributions within each habitat [one-way analysis of variance (ANOVA); for WM12, $P < 0.01$; WM14, $P < 0.01$; EWM14, $P < 0.01$] (Fig. 3). Overall, DSS members were

the dominant SRB, as previously reported in other cold seep environments (Kniemeyer *et al.*, 2007; Schreiber *et al.*, 2010). SRB-related 16S rDNA copies were more abundant in WM12 sediments (4.52×10^9 16S rDNA copies g^{-1}) where sulphate concentrations were high (22–13 mM). Significant differences in DBB and DSS depth distributions were also detected between the habitats (one-way ANOVA; for DSS, $P < 0.01$; DBB, $P < 0.01$). The number of DBB-related 16S rDNA copies increased with depth in WM12 and WM14 sediment cores, reaching a maximum of 2×10^9 16S rDNA copies g^{-1} of sediment around 6–10 cmbsf in WM12 and 5×10^8 copies g^{-1} in the 4–6 cmbsf WM14, then decreased deeper in the sediment. DBB 16S rDNA copy number was high (7.8×10^8 copies g^{-1}) in the first EWM14 sediment layers and then decreased with depth (1.2×10^7 copies g^{-1} in the bottom of the core) (Fig. 3). DSS 16S rDNA copy number in WMs

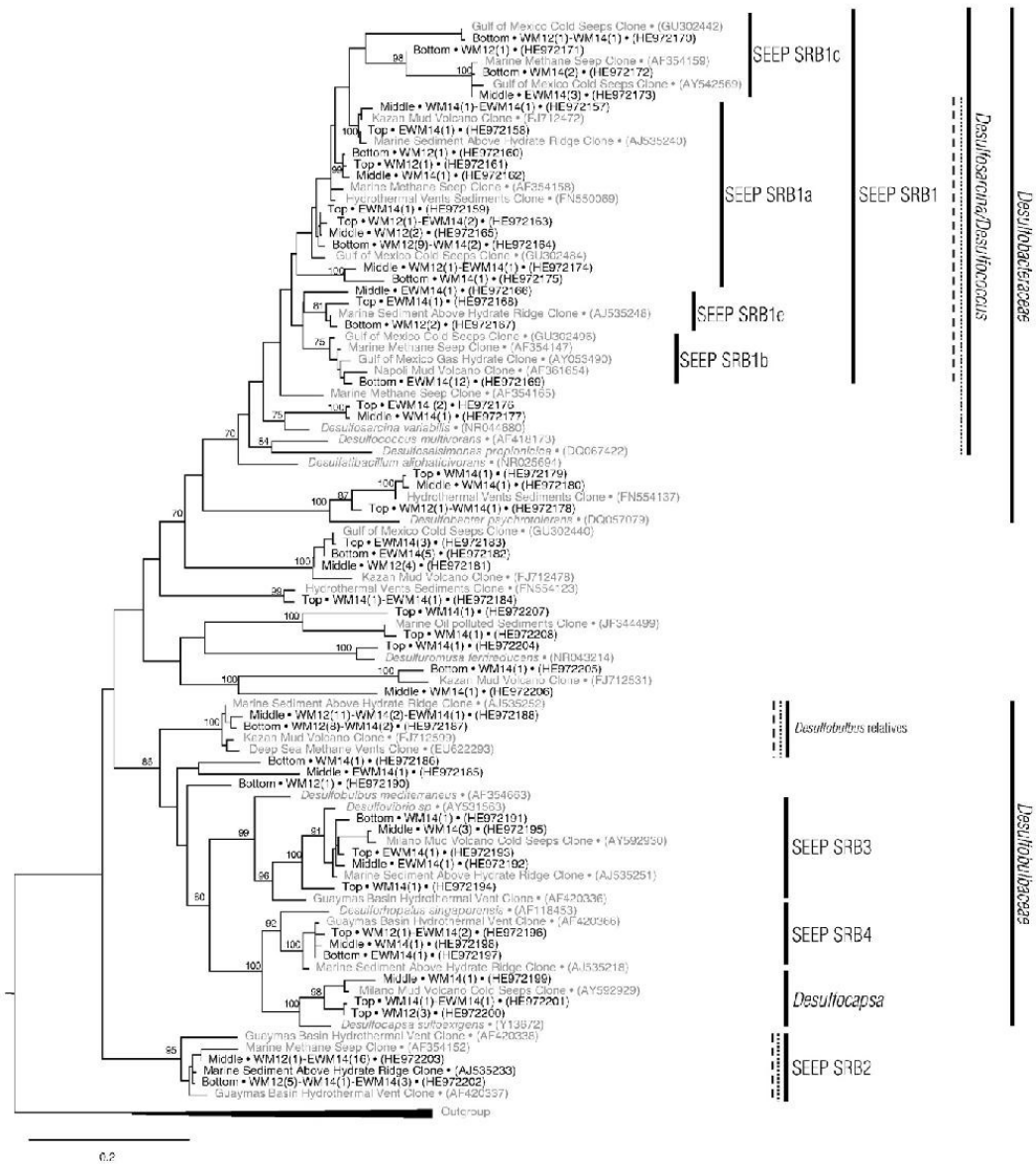
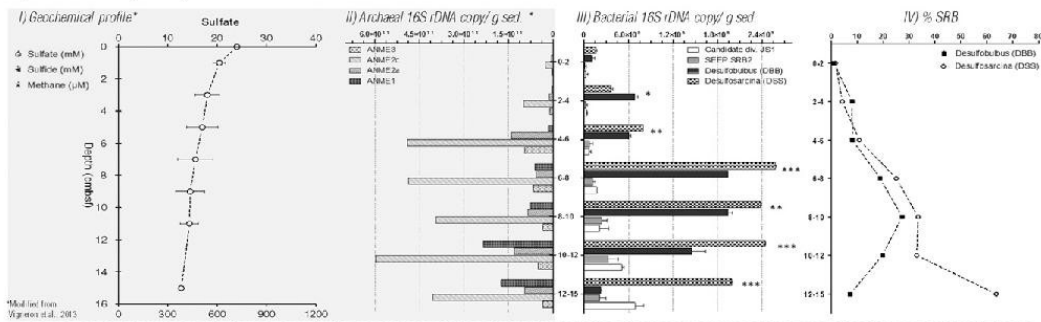
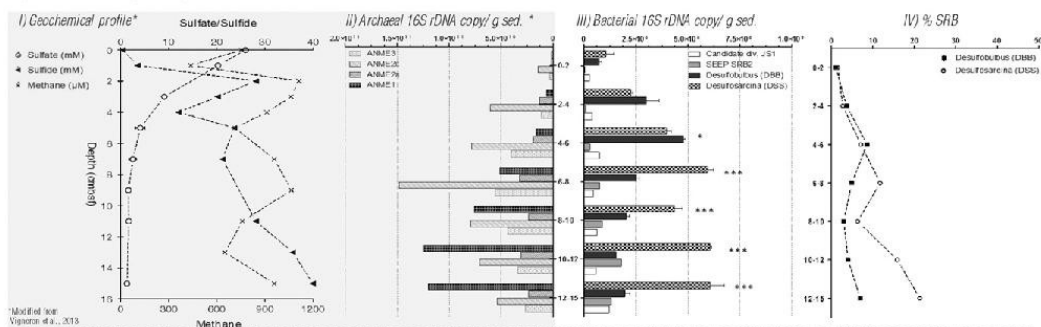


Fig. 2. Maximum likelihood phylogenetic tree of the bacterial *Deltaproteobacteria* 16S cDNA sequences in sediments of the Sonora Margin cold seeps performed using RAxML 7.2.8 and GTRCAT model approximation with 1,000 replicates. Only bootstrap values up to 70% are shown. Sequences amplified from sections 0 to 4 cmbsf are labelled 'Top', sequences from 4 to 6 cmbsf are 'Middle' and sequences from 8 cmbsf to end are tagged 'Bottom'. Only one representative sequence (> 97% identical) is shown. Number in brackets shown the number of clones analysed from RNA clone libraries. Dotted lines and dashes indicate sequences matching with corresponding Q-PCR primers and FISH probes respectively. WM12 = White Mat 12; WM14 = White Mat 14; EWM14 = Edge of White Mat 14.

A) White Mat 12 (WM12)



B) White Mat 14 (WM14)



C) Edge White Mat 14 (EWM14)

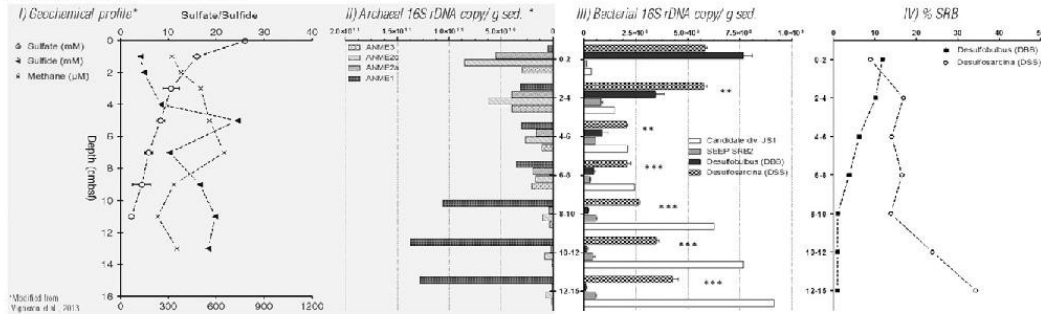


Fig. 3. (i) Geochemical description of the three selected habitats (A) White Mat 12 (WM12), (B) White Mat 14 (WM14) and (C) Edge White Mat 14 (EWM14). Dissolved methane (cross), sulphate (open square) and sulphide (black square) concentrations in porewaters. (ii) DNA copy numbers of the 16S rDNA gene per gram of sediment for ANME groups previously observed on the same samples in the Sonora Margin sediments (Vigneron *et al.*, 2013). (iii) DNA copy numbers of the 16S rDNA gene per gram of sediment for bacterial groups *Desulfosarcina/Desulfococcus*, *Desulfobulbus*, SEEP SRB-2 and candidate division JS1 in function of depth (0 to 15 cmbsf) in cold seep sediments of the Sonora Margin. Differences between DSS and DBB abundances were tested with *t*-test and labelled with ****P* < 0.0001, ***P* < 0.001 and **P* < 0.01. (iv) Proportion of sulphate-reducing bacteria to total bacterial community previously estimated by Q-PCR.

increased with depth until 6 cmbsf, reaching 2.6×10^9 and 6×10^8 copies g^{-1} in WM12 and WM14, respectively, then were fairly constant in the underlying sediment layers. However, in EWM14 sediments, DSS 16S rDNA copy numbers were high (5.8×10^8 copies g^{-1}) in the surface sediment layers (0–4 cmbsf) then fell to 2×10^8 copies g^{-1}

after 4 cmbsf and then increased slightly with depth (4×10^8 copies at the bottom of the core). In contrast to DSS and DBB, SEEP SRB-2 16S rDNA copy numbers were low in all samples (maximum of 3×10^8 copies g^{-1} in the bottom of WM12) (Fig. 3). SEEP SRB-2 16S rDNA concentrations increased slowly with depth in WMs,

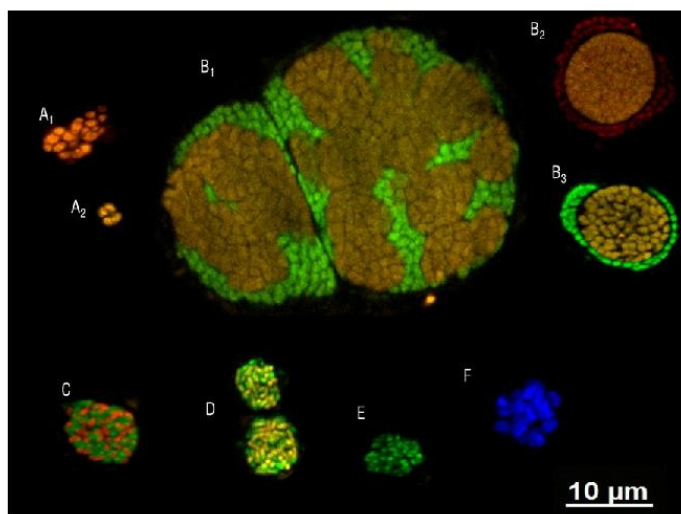


Fig. 4. Individual cells and cell aggregates of ANMEs and bacterial partners visualized with fluorescent-labelled oligonucleotide probes. Each presented aggregate was taken from different pictures. A₁ and A₂) Monophyletic aggregate and single tetrad of SEEP SRB-2 labelled with SEEP2-658 (orange). B) Aggregates of ANME-2c (ANME-2c-622 Yellow) and DSS cells (B1 and B3) or DBB cells (B2). C) Mixed aggregate of ANME-2a [ANME-2a-647/DSS (DSS-658 green)]. D) Tight aggregates of ANME-1 (ANME-1-350 Yellow) and DSS (DSS-658 Green). E) Homogeneous aggregate of DSS cells labelled with DSS-658 probe (Green). F) Monospecific clusters of *Gammaproteobacteria* cells labelled with GAM42a probe (blue). Scale is 10 µm. A, B and F were from WM14 middle sediment layer, C from WM12 middle sediment layer, D from the bottom sediment layer of WM12 and E from the deepest sediment layer of EWM14.

reaching 2×10^8 copies g^{-1} in WM14 and fluctuated around 5×10^7 copies g^{-1} throughout EWM14. However, no significant difference of SEEP SRB-2 distributions was detected between habitats (one-way ANOVA, $P = 0.088$). Quantification of candidate division JS1 16S rRNA gene copies indicated another population dynamic. JS1 16S rDNA copies in the sediment underlying WMs were low but increased with depth until reaching 6.9×10^8 copies g^{-1} for WM12 and 1.2×10^9 copies g^{-1} for WM14. In contrast, in EWM14 sediments, JS1 16S rDNA copy numbers increased rapidly with depth, from 3.3×10^7 copies g^{-1} in the surface sediment layer to 9×10^8 copies g^{-1} at 15 cmbsf (Fig. 3) and were higher than potential sulphate reducers-related copy numbers.

FISH visualization of bacterial partners in AOM consortia

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) observations revealed a high diversity of ANME-2/*Bacteria* consortia in size, shape and organization (Fig. 4B). In order to identify bacterial partners involved in the AOM process in Sonora Margin sediments and to observe the distribution of presumed SRB cells inside the aggregates according to the ANME phylogenetic affiliation, FISH experiments were carried out using specific probes targeting SRB (DSS685, DBB660, SEEP2-658, Table S2). SEEP SRB-2 *Bacteria*, previously reported as syntrophic AOM involved bacteria (Kleindienst *et al.*, 2012), were observed as single tetrads or in monospecific clusters but did not show direct physical association with ANME cells (Fig. 4A). Nevertheless, SEEP SRB-2 monospecific heaps were occasionally observed in proximity with ANME-1 clusters, probably

because of the experimental procedure. SEEP SRB-4 cells were observed as free-living bacteria. ANME-2c *Archaea* were associated with both DSS-hybridized and DBB-hybridized cells, and no clear relationship between SRB partner affiliation and morphological appearances of ANME-2c aggregates was observed (Fig. 4B). In contrast, ANME-2a formed exclusively intermingled aggregates with DSS-hybridized bacteria ($n = 124$) (Fig. 4C). Tight aggregates of ANME-1 were also observed exclusively associated with DSS-hybridized bacterial cells in WM12 deep sediment layers ($n = 74$) (Fig. 4D). Clusters of monospecific DSS-hybridized cells (Fig. 4E) were observed in EWM14 deep sediment layers when DBB-hybridized cells were only found associated with ANME-2c. Because only one SRB group per aggregate was detected, DSS and DBB appeared to be exclusive in a given aggregate. Additionally, no other eubacteria-labelled or unlabelled but DAPI-stained cells were detected in physical proximity of ANME consortia. *Gammaproteobacteria* were observed as large single cells clustered in heaps (Fig. 4F) without relationship with ANME.

SEM observations, microanalysis

In order to investigate the physical interaction between ANME and SRB during AOM association, AOM consortia previously localized by FISH (using ANME-2c and bacterial probes, Table S2) were observed using scanning electron microscopy (SEM) (Fig. 5). Sediments of WM12 harbouring higher numbers of ANME-2 and sulphate-reducer aggregates were observed. A high amount of sedimented broken diatoms and aggregate-like structures

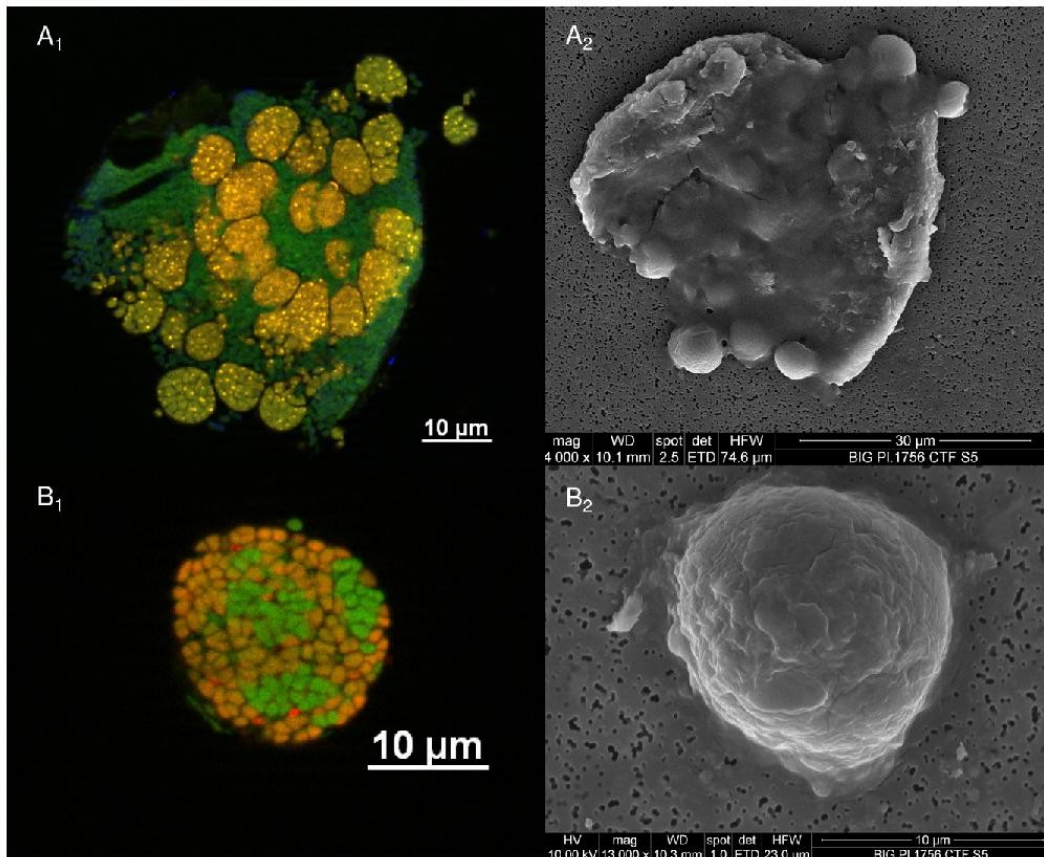


Fig. 5. FISH (A₁ and B₁) and SEM (A₂ and B₂) observations of ANME-2c/*Bacteria* aggregates on WM12 bottom sediment layers.

were detected. ANME-2c/bacterial aggregates appeared to be included in a complex and compact matrix. No individual cells or extracellular structures were detected. Microanalysis of these aggregate-like structures revealed a high proportion of organic compounds (55% C, 30% O, 0.39% K).

Discussion

Overall bacterial diversity at Sonora Margin sediments

Using quantitative PCR (Q-PCR) analysis, *Bacteria* have been shown to dominate microbial communities in WMs sediments (Vigneron *et al.*, 2013). 16S rRNA gene libraries also demonstrated a higher diversity among *Bacteria* in the sediment, as previously observed in similar cold seep ecosystems (Lloyd *et al.*, 2010; Orcutt *et al.*, 2010),

probably corresponding to the wide range of metabolic functions assumed by *Bacteria* in ecosystems (Pace, 1997). Indeed, bacterial populations were diverse in the Sonora Margin sediments, with sequences affiliated to *Deltaproteobacteria* likely involved in sulphate reduction coupled to the degradation of hydrocarbons or methane in cold seep ecosystems (Dhillon *et al.*, 2003; Knittel *et al.*, 2003; Pereyra *et al.*, 2010); *Epsilonproteobacteria* (*Sulfurovum*) and *Gammaproteobacteria* such as *Candidatus Maribeggiatoa*, potentially involved in sulphide oxidation (Crepeau *et al.*, 2011; Gr nke *et al.*, 2011; McKay *et al.*, 2012) and other uncultured lineages, were previously detected in oil-impacted sediments (Head and Swannell, 1999; Orcutt *et al.*, 2010; Pachiadaki *et al.*, 2010; 2011). Additionally, *Spirochaetes*, *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* and diverse candidate

divisions with undetermined metabolic roles in seep environments or potentially involved in organic matter degradation (Rapp and Giovannoni, 2003; Stevens *et al.*, 2005; Pachiadaki *et al.*, 2011) were detected.

Bacterial communities involved in syntrophic AOM

The diversity of bacteria involved in syntrophic AOM with ANME appeared to represent only a third of the total community. Indeed, uncultured lineages of *Gammaproteobacteria*, detected as predominant in gene libraries, were observed as monospecific clusters without any relationship to ANME, suggesting that they were likely not related to the AOM process. The distribution of bacterial lineages, previously suspected to be involved in AOM, was observed throughout the sediment cores in a centimetre scale. Thus, the candidate division JS1, previously detected in deep marine sediments, tidal flat sediments and hydrothermal vents (Webster *et al.*, 2004; 2007; Biddle *et al.*, 2012), and proposed as a possible partner in AOM (Cambon-Bonavita *et al.*, 2009; Harrison *et al.*, 2009; Roalkvam *et al.*, 2011) or in hydrocarbon-degrading and sulphate-reducing consortia (Phelps *et al.*, 1998), was detected in the EWM14 deepest sediment horizons. Specific quantifications of JS1 16S rDNA highlighted increasing 16S rDNA copy numbers with depth, confirming their strictly anoxic ecological niche (Webster *et al.*, 2004). The distribution of candidate division JS1 appeared to mirror the ANME-1 distribution, particularly in EWM14 sediments ($r=0.98$, $P<0.0001$) (Fig. 3). However, FISH observations could not validate any bacterial relationship with ANME-1 in EWM14 sediments. These similar distributions of candidate division JS1 and ANME-1 could be due to similar environmental needs/restrictions (methane-rich and reduced environments) rather than to a strict relationship between these microorganisms. The SRB *Deltaproteobacteria* group of SEEP SRB-2, recently observed as an AOM partner in the Black Sea microbial mats and in the Gulf of Mexico hydrocarbon seeps (Kleindienst *et al.*, 2012), was detected as metabolically active in our samples and quantified in low abundance throughout sediment cores without vertical zonation, as previously observed by FISH in the Tommeliten and Gulf of Mexico seeps and in the Guaymas hydrothermal sediments (Kleindienst *et al.*, 2012). However, our FISH observations could not confirm the physical association with ANMEs. Indeed, SEEP SRB-2 were only observed as single tetrads or monospecific clusters, suggesting that, in the Sonora Margin sediments, SEEP SRB-2 could assume another metabolism, as previously proposed (Kleindienst *et al.*, 2012). Likewise, by using previously designed SRB group-specific probes (Knittel *et al.*, 2003), the *Deltaproteobacteria* SEEP SRB-4 group was observed as free-

living single cells, as previously reported (Orcutt *et al.*, 2010). This would suggest that SEEP SRB-4 groups are more likely involved in hydrocarbon degradation than in AOM process, as previously suggested (Kleindienst *et al.*, 2012). Presence and metabolic activity of such AOM-independent sulphate reducers could thereby explain the higher sulphate reduction rates compared with the AOM rates, constantly measured in hydrocarbon-rich cold seeps (Bowles *et al.*, 2011). In contrast, our FISH observations showed that both DSS and DBB relatives were strongly associated in consortia with ANMEs, confirming previous studies (Losekann *et al.*, 2007; Pernthaler *et al.*, 2008). While the DSS/ANME-2 associations are ubiquitously detected in cold seep sediments (Knittel and Boetius, 2009), the Sonora Margin is only the second AOM environment after the Eel River seeps to harbour DBB/ANME-2 consortia (Pernthaler *et al.*, 2008). However, physical associations of other *Bacteria* than *Deltaproteobacteria* within AOM consortia, previously observed by Pernthaler *et al.*, 2008, could not be demonstrated in our samples. In sediments underlying WM14, the proportion of AOM-involved sulphate reducers relative to the total bacterial community, previously estimated by Q-PCR (Vigneron *et al.*, 2013), increased from 2% at the surface layers to 30% at the core bottom. These results are consistent with previous estimates of sulphate-reducer abundance in marine sediments and sulphate-methane transition zone, which ranged from 2% to 35% (Leloup *et al.*, 2007; 2009). Moreover, high sulphate concentrations throughout WM12 sediments seemed to enhance the relative SRB populations with proportions of up to 70% of the total bacterial community in the core bottom, resulting in an increase in associated ANME abundance. DSS and DBB abundances were comparable in sulphate-rich shallow sediments (0–6 cmbsf) (Fig. 3), as previously observed by FISH in Eel River cold seeps (Pernthaler *et al.*, 2008). However, quantification of 16S rDNA gene copy numbers, targeting the DSS and DBB groups, also highlighted significant differences in depth distribution below 6 cmbsf (Fig. 3), as previously presumed in a similar environment (Lloyd *et al.*, 2010). This difference in depth distribution might suggest that SRB involved in AOM could have different ecological niches and/or metabolisms despite the apparent same environmental function, as previously suggested (Pernthaler *et al.*, 2008).

DBB *Bacteria*, strictly observed in syntrophic relationship with ANME-2c, were restricted to the sulphate-rich surface sediment layers, except in the microbial mat-sediment interface layer, as previously observed in other underlying mat sediments of cold seep ecosystems (Losekann *et al.*, 2007; Pernthaler *et al.*, 2008; Lloyd *et al.*, 2010). Indeed, in EWM14 (without surficial microbial mat), DBB colonized the upper sediment layers,

water-sediment interface included, and a significant correlation was observed between DBB distribution and sulphate porewater concentrations ($r = 0.964$, $P = 0.0028$). This correlation was also observed in WM14 sediments when omitting the surface layer ($r = 0.886$, $P = 0.03$). This result, confirming the sulphate-dependent metabolism of DBB bacteria, would also suggest a probable interference between DBB and the microbial mat. Regarding these results, we hypothesize that DBB bacteria could require an organic carbon source, which could also be coveyed by *Maribeggiatoa* mats. This carbon source, probably derived from surface inputs, would limit the DBB abundance in the deepest WM12 sediment horizons despite the high sulphate concentrations. Thus, DBB bacteria could support a heterotrophic carbon metabolism, as previously observed in other *Desulfobulbus* family (Sorokin *et al.*, 2012), and participate in the AOM process by reducing the seawater sulphate. Alternatively, the giant filamentous *Maribeggiatoa* from the surface mats, by their movements or activities, could alter the shallow sediment layers and thereby modify the DBB vertical distribution (Salman *et al.*, 2013). The DBB requirements could partially explain the ANME-2c repartition observed in the Sonora Margin sediments, in particular in EWM14 sediments, where ANME-2c mirror the DBB distributions ($r = 0.967$, $P = 0.0004$) (Fig. 3). However, ANME-2c have also been observed in consortia with DSS bacteria.

The DSS group presented a higher diversity in the gene libraries, and at least three of the six previously described SEEP SRB-1 groups (Schreiber *et al.*, 2010) were detected. In EWM14 deep sediments, where no DSS/ANME aggregate was observed, DSS formed monospecific clusters, as previously observed (Omeregic *et al.*, 2008), and gene libraries indicated metabolically active members of the SEEP SRB-1b group, previously suggested as hydrocarbon degraders (Kniemeyer *et al.*, 2007; Schreiber *et al.*, 2010). The DSS 16S rDNA quantifications included the total SEEP SRB-1 (Fig. 2), thus the elevated DSS 16S rDNA concentrations in the deepest EWM14 sediment layers could correspond to the SEEP SRB-1b, independent of ANME, as observed by FISH. In contrast, in WMs, a majority of sequences were affiliated to SEEP SRB-1a, known to be involved in AOM (Schreiber *et al.*, 2010), and FISH observations highlighted DSS-related bacteria in consortia with both ANME-2a, ANME-2c and ANME-1. If sulphate-rich inputs explained a higher DSS abundance throughout WM12 sediments, metabolically active DSS was also detected and quantified in significant proportion (21%) in the deep sulphate-depleted sediments of WM14, which was previously observed in other marine sediments (Leloup *et al.*, 2007; 2009; Lloyd *et al.*, 2010). Even if we could not exclude that DSS bacteria could require lower sulphate concentrations, previous authors suggested that DSS

bacteria might switch to a fermentative process or could benefit from a cryptic sulphate formation (Leloup *et al.*, 2007; Lloyd *et al.*, 2010). Indeed, in marine sediments, sulphide could be re-oxidized to sulphate by abiotic reactions with Fe^{3+} (Yao and Millero, 1996). This sulphate formation would be masked by the DSS sulphate reduction activity at similar rates. Alternatively, DSS, observed within ANME-2c aggregates, could use by disproportionation the intracellular zero-valent sulphur stored in ANME-2c cells, which forms polysulphides with environmental sulphide, as previously demonstrated in ANME-2c/DSS enrichments (Milucka *et al.*, 2012). Such metabolism, observed by Milucka *et al.* at low sulphate concentrations (~3 mM), would allow the development of these ANME-2c/DSS consortia in sulphate-depleted sediments and thus explain the predominance of DSS and AOM aggregates throughout the WM14 sediment core. Additionally, in contrast to DBB, DSS could use a carbon source available throughout the sediments such as hydrocarbon-derived compounds, as supported by previous DSS enrichments (Dhillon *et al.*, 2003; Kniemeyer *et al.*, 2007), or more likely be lithoautotrophs and assimilate inorganic carbon as recently observed by NanoSIMS analysis of AOM communities (Kellermann *et al.*, 2012; Milucka *et al.*, 2012). Different sulphate requirements, carbon sources and/or environmental interactions for DBB and DSS would account for a distinct distribution of the sulphate-reducing populations and the bacterial partner involved in ANME-2c AOM consortium. The identity of the ANME-2c SRB partners may be dependent on SRB environmental requirements or fluid flow preferences in the sediment. Furthermore, the bacterial partner phylotype did not seem to affect the aggregate morphology (Fig. 4). This apparently unspecific and opportunistic association in AOM consortium for ANME-2c could provide a metabolic benefit for ANME-2c, allowing them to colonize a wide range of environmental niches in seep habitats, as compared with ANME-2a (Knittel and Boetius, 2009). This probably also explains the higher ANME-2c abundance estimated by Q-PCR in the Sonora Margin sediments (Fig. 3). Indeed, ANME-2a were observed in mixed and intermingled aggregates exclusively with DSS members, as previously observed (Knittel *et al.*, 2003; 2005; Schreiber *et al.*, 2010) (Fig. 4). This bacterial partner restriction could limit the distribution and abundance of ANME-2a in the Sonora Margin sediments. Likewise, ANME-1 were observed in tight associations only with DSS, as already reported (Orcutt *et al.*, 2005; Maignien *et al.*, 2012). ANME-1 aggregate formation, which we previously suggested to be dependent on a sulphate concentration threshold (Vigneron *et al.*, 2013), could also be limited by the specificity of their bacterial association. However, the absence of association between ANME-1 and DBB could also be due to

antagonist environmental requirements and therefore different distributions of ANME-1 and DBB. These specificities of partners in AOM consortia as well as the detection of only one SRB group per aggregate could indicate that recognition and control mechanisms exist during the setting up of the relationship between AOM partners. Processes remained unexplained but might potentially involve surface proteins and lipids detection, because different lipid compositions have recently been detected between ANME lineage cell membranes (Rossel *et al.*, 2011). Likewise, the electron, zero-valent sulphur (Milucka *et al.*, 2012), nitrogen (Dekas *et al.*, 2009) and/or potential nutrient transfers between the two microbial partners involved in syntrophic AOM remain enigmatic. Different mechanisms have been proposed such as cell-to-cell contacts (Meyerdierks *et al.*, 2010), use of extracellular proteins such as nanowires or interspecies electron shuttles (Knittel and Boetius, 2009; Stams and Plugge, 2009). SEM visualization of ANME-2c/Bacteria aggregates showed that AOM consortia appeared to be included in a complex organic matrix as previously described (Knittel *et al.*, 2005) (Fig. 5), probably produced by the consortia themselves. Indeed, the production of extracellular polymers by SRB was previously observed in marine sediments (Zinkevich *et al.*, 1996). As in microbial multi-species biofilms, this organic matrix could protect the microorganisms from environmental stress (oxygen), thus forming a propitious microniche for ANME and SRB, which favours cell-to-cell communications as well as electron or nutrient exchanges (Rickard *et al.*, 2003). This matrix was observed on both large and small aggregates (Fig. 5), suggesting a production in the earlier stage in the setting up of the association. This organic boundary could, by the confinement of the first AOM partners, explain the exclusivity of the partnership observed inside aggregates and conserve along the maturation of the aggregate (Nauhaus *et al.*, 2007). Enclosed ANME and SRB would syntrophically grow together inside the matrix, protected from environmental variations or competitive bacterial populations.

Conclusion

With its geochemically diverse habitats, the Sonora Margin cold seeps are an appropriate area to explore microbiological processes occurring in surface sediments percolated by methane and sulphide-rich fluids. While ANME populations were shown to dominate archaeal communities, bacteria involved in AOM did not seem to be dominant in Sonora Margin cold seep sediments. A wide diversity of active bacteria was observed. However, only two SRB groups, DSS (probably SEEP SRB-1a) and DBB, appear to be exclusively associated with ANME in the Sonora Margin cold seeps. This AOM-involved SRB

study highlighted different centimetre scale SRB distributions in cold seep sediments. These SRB appear to exhibit specific habitat preference and spatial configuration with archaeal partners in syntrophic AOM, suggesting that these SRB represent unique ecotypes. Different carbon and sulphate metabolisms (sulphate reduction, zero-valent sulphur disproportionation) coupled to AOM might occur, depending on SRB phylogeny and probably involving different electron transfer pathways or intermediate and partner recognition mechanisms. Comparative genome analysis of the different ANME partners and NanoSims analysis on enrichments of stable ANME-DBB aggregates might lead to a better understanding of biochemical processes involved in the different AOM consortia.

Experimental procedures

Sample description

The sediment push cores were sampled at Sonora Margin cold seep Vasconcelos site during the 'BIG' cruise in June 2010. Three different habitats were sampled in the Sonora Margin cold seeps (Fig. S1). Sediments of WM12 and WM14 were covered by white bacterial mats, while the water sediment interface of the edge of WM14 (EWM14) were colonized by grey polychaetes and gastropods (Vigneron *et al.*, 2013). An autonomous temperature sensor (T-Rov, NKE Electronics, Hennebont, France) indicated *in situ* temperatures of 3°C from the surface water to 50 cmbsf in each habitat before sampling. Immediately after recovery, sediment cores were transferred into a cold room, then aseptically subsampled in 2 cm thick layers and conditioned for molecular and FISH experiments. The sampling strategy and experimental procedures used in this study were detailed in a previous work based on an archaeal survey (Vigneron *et al.*, 2013). Detailed geochemical measurements and ANME concentrations are provided in Fig. 3.

Sediment RNA extractions, cDNA clone libraries and sequencing

16S rRNA amplification was used as a proxy for the detection of active microbial populations (Lloyd *et al.*, 2010). RNA was extracted using the Zhou protocol (Zhou *et al.*, 1996) with modifications (Lazar *et al.*, 2010) and purified using Nucleospin® RNA II kit (Macherey Nagel, Dren, Germany). Absence of residual DNA contamination was verified by PCR. Reverse transcription PCR of 16S rRNA was carried out by a two-step protocol with a preliminary reverse transcription step using Quanta qScript® kit (Quanta Bioscience, Gaithersburg, MD, USA). PCR reactions contained 10 ng of reverse transcribed RNA template, 1 X PCR Buffer, 2 nM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 mM of each primer (E338f 5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC-3' and U1407r 5'-GAC GGG CGG TGW GTR CAA-3') and 0.6 U *GoTaq* DNA polymerase (Promega BioSciences, San Luis Obispo, CA, USA). Amplifications were carried out using the GeneAmp PCR 9700 System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as

follows: denaturation step at 94°C for 1 min, annealing for 1 min 30 s at 54°C and extension step for 2 min at 72°C for 30 cycles. For gene library construction, the 16S rRNA was reverse transcribed, amplified in triplicate and pooled before gel purification. Purified amplification products were cloned into TOPO[®] XL PCR Cloning Kit and transformed into *Escherichia coli* TOP10 cells (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. 16S rRNA gene sequences were determined on an ABI3730xl – genetic analyser using M13 universal primers (GATC Biotech, Germany). Sequences were analysed using the NCBI BLASTn search program within GenBank (Altschul *et al.*, 1990). Sequences were aligned with closest representative sequences from GenBank using MAFFT 6.903 (Kato *et al.*, 2005) and checked manually for chimera. Phylogenetic trees were estimated with maximum likelihood methods, using MPI-parallelized RAxML 7.2.8. (Stamatakis, 2006) on the CIPRES Science Gateway (Miller *et al.*, 2011). GTRCAT approximation of models was used for ML bootstrapping (1,000). Simpson indexes were calculated using DOTUR as previously detailed (Guri *et al.*, 2012). Sequences from cDNA libraries affiliated to the *Deltaproteobacteria* were deposited in the EMBL database under accession numbers HE972157-HE972208 and other *Bacteria* under HF545525-HF545595.

Quantitative real-time PCR

Real-time PCR amplifications were performed in triplicate using Perfecta[®] SYBR[®] Green SuperMix ROX (Quanta Bioscience) according to the manufacturer's recommendations. Amplifications followed a two-step PCR (40 cycles) with 15 s denaturation (95°C) and 1 min annealing/elongation step at 60°C. Primer concentrations were optimized, as recommended by the manufacturer, to minimize the formation of secondary structure and to maximize the efficiency of the reaction. New primer sets, specific for SRB groups and candidate division JS1, were designed using the ARB package (Ludwig *et al.*, 2004) and web-based application Primaclade (Gadberry *et al.*, 2005) and are listed in Table S1. Primers were checked for specificity by using OLIGOCHECK software (School of Biosciences, Cardiff University, UK) and tested by PCR on various environmental clones from the Sonora Margin sediments. Triplicate standard curves were obtained with 10-fold serial dilutions of plasmids containing environmental 16S rRNA sequences relative to DSS, DBB, SEEP SRB-2 or JS1 and ranged from 10⁴ to 10⁸ copies/μL of 16S rDNA. The R² of standard curves obtained by real-time PCR were up to 0.997 and efficiency of the reaction up to 98%. The primer set specificity was confirmed by control sequencing of amplification products. Samples were diluted to a concentration for which no inhibitory effect was observed. Correlation factors and statistical tests on the microbial distribution were achieved using GRAPH PAD PRISM Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

FISH

Immediately after the core recovery, 2 g of sediment collected from each layer were fixed in phosphate-buffered saline (PBS) (1×)/formaldehyde (3% final) at 4°C for 4 h then

washed twice with PBS(1×) and stored in PBS(2×)/ethanol (1:1, vol/vol) buffer at –20°C. Twenty microlitres of a 100-fold dilution of the sample were immobilized on 0.22 μm GTP polycarbonate filters (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) for FISH observations. For filters observed by SEM after FISH, fixed sediments were sonicated (40-fold 1 s, 40% intensity, Vibra Cell, Bioblock Scientific, Illkirch, France) before immobilization on fine-tipped pen squared filters. Hybridization was carried out for 3 h at 46°C in formamide buffer with labelled probes (Table S2). After 20 min in washing buffer at 48°C, filters were fixed on slides and covered with an antifade/DAPI solution (SlowFade[®] Gold, Invitrogen). As cross-hybridization between DSS and SEEP SRB-2 probes was recently observed (Kleindienst *et al.*, 2012), detection of AOM-involved SRB was monitored combining the three SRB probes with 50% formamide and no co-localized signal was detected. In order to conclude on the aggregate morphologies and partnership specificities, two replicate filters (each harbouring over 100 aggregates) were fully explored for each sediment layer previously analysed by gene libraries. Observations and imaging were performed using an epifluorescence Axio Imager Z2 microscope equipped with the Apotome[®] system and the COLIBRI[®] technology (Zeiss, Jena, Germany). ANME/*Bacteria* aggregate location was noted in order to be observed by SEM.

SEM

Immediately after FISH observations, filters were completely dried at room temperature and then directly metalized with gold and palladium (60/40) using a high-resolution Sputter Coater (Quorum Technologies, Guelph, Canada). SEM observations and imaging were performed using a FEI Quanta 200 microscope (FEI, Hillsboro, Oregon, USA) and microanalyses were performed with EDX microelectrode (Oxford Instruments, Abingdon, UK).

Acknowledgements

We are indebted to the crews of the research vessel *L'Atalante* and the submersible *Nautilie* of the cruise 'BIG' and the scientific team for their contribution in sampling on board. This cruise and work was funded by IFREMER (France) and has benefited from a work permit in Mexican waters (DAPA/2/281009/3803, 28 October 2009).

References

- 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.
- Beal, E.J., House, C.H., and Orphan, V.J. (2009) Manganese- and iron-dependent marine methane oxidation. *Science* **325**: 184–187.
- Biddle, J.F., Cardman, Z., Mendlovitz, H., Albert, D.B., Lloyd, K.G., Boetius, A., and Teske, A. (2012) Anaerobic oxidation of methane at different temperature regimes in Guaymas Basin hydrothermal sediments. *ISME J* **6**: 1018–1031.
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C.J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., *et al.* (2000) A marine microbial

- consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**: 623–626.
- Bowles, M.W., Samarkin, V.A., Bowles, K.M., and Joye, S.B. (2011) Weak coupling between sulfate reduction and the anaerobic oxidation of methane in methane-rich seafloor sediments during ex situ incubation. *Geochim Cosmochim Acta* **75**: 500–519.
- Cambon-Bonavita, M.A., Nadalig, T., Roussel, E., Delage, E., Duperron, S., Caprais, J.C., et al. (2009) Diversity and distribution of methane-oxidizing microbial communities associated with different faunal assemblages in a giant pockmark of the Gabon continental margin. *Deep-Sea Res Part II-Top Stud Oceanogr* **56**: 2248–2258.
- Crepeau, V., Bonavita, M.A.C., Lesongeur, F., Randrianalivelo, H., Sarradin, P.M., Sarrazin, J., and Godfroy, A. (2011) Diversity and function in microbial mats from the lucky strike hydrothermal vent field. *FEMS Microbiol Ecol* **76**: 524–540.
- Dekas, A.E., Poretsky, R.S., and Orphan, V.J. (2009) Deep-sea archaea fix and share nitrogen in methane-consuming microbial consortia. *Science* **326**: 422–426.
- Dhillon, A., Teske, A., Dillon, J., Stahl, D.A., and Sogin, M.L. (2003) Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2765–2772.
- Ettwig, K.F., Butler, M.K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M.M.M., et al. (2010) Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* **464**: 543–551.
- Gadberry, M.D., Malcomber, S.T., Doust, A.N., and Kellogg, E.A. (2005) PrismaClade—a flexible tool to find conserved PCR primers across multiple species. *Bioinformatics* **21**: 1263–1264.
- Gr nke, S., Felden, J., Lichtschlag, A., Girth, A.C., De Beer, D., Wenzh Fer, F., and Boetius, A. (2011) Niche differentiation among mat-forming, sulfide-oxidizing bacteria at cold seeps of the Nile deep sea fan (Eastern Mediterranean Sea). *Geobiology* **9**: 330–348.
- Guri, M., Durand, L., Cueff-Gauchard, V., Zbinden, M., Crassous, P., Shillito, B., and Cambon-Bonavita, M.A. (2012) Acquisition of epibiotic bacteria along the life cycle of the hydrothermal shrimp *rimicaris exoculata*. *ISME J* **6**: 597–609.
- Harrison, B.K., Zhang, H., Berelson, W., and Orphan, V.J. (2009) Variations in archaeal and bacterial diversity associated with the sulfate-methane transition zone in continental margin sediments (Santa Barbara Basin, California). *Appl Environ Microbiol* **75**: 1487–1499.
- Head, I.M., and Swannell, R.P.J. (1999) Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Curr Opin Biotechnol* **10**: 234–239.
- Holler, T., Widdel, F., Knittel, K., Amann, R., Kellermann, M.Y., Hinrichs, K.U., et al. (2011) Thermophilic anaerobic oxidation of methane by marine microbial consortia. *ISME J* **5**: 1946–1956.
- Inagaki, F., Tsunogai, U., Suzuki, M., Kosaka, A., Machiyama, H., Takai, K., et al. (2004) Characterization of C1-metabolizing prokaryotic communities in methane seep habitats at the Kuroshima Knoll, southern Ryukyu Arc, by analyzing pmoA, mmoX, mxaF, mcrA, and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* **70**: 7445–7455.
- Jorgensen, B.B., and Boetius, A. (2007) Feast and famine—microbial life in the deep-sea bed. *Nat Rev Microbiol* **5**: 770–781.
- Katoh, K., Kuma, K., Toh, H., and Miyata, T. (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res* **33**: 511–518.
- Kellermann, M.Y., Wegener, G., Elvert, M., Yoshinaga, M.Y., Lin, Y.-S., Holler, T., et al. (2012) Autotrophy as a predominant mode of carbon fixation in anaerobic methane-oxidizing microbial communities. *PNAS* **109**: 19321–19326.
- Kleindienst, S., Ramette, A., Amann, R., and Knittel, K. (2012) Distribution and in situ abundance of sulfate-reducing bacteria in diverse marine hydrocarbon seep sediments. *Environ Microbiol* **14**: 2689–2710.
- Kniemeyer, O., Musat, F., Sievert, S.M., Knittel, K., Wilkes, H., Blumenberg, M., et al. (2007) Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. *Nature* **449**: 898–901.
- Knittel, K., and Boetius, A. (2009) Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annu Rev Microbiol* **63**: 311–334.
- Knittel, K., Boetius, A., Lemke, A., Eilers, H., Lochte, K., Pfannkuche, O., et al. (2003) Activity, distribution, and diversity of sulfate reducers and other bacteria in sediments above gas hydrate (Cascadia margin, Oregon). *Geomicrobiol J* **20**: 269–294.
- Knittel, K., Losekann, T., Boetius, A., Kort, R., and Amann, R. (2005) Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Appl Environ Microbiol* **71**: 467–479.
- Lazar, C.S., Dinasquet, J., Pignet, P., Prieur, D., and Toffin, L. (2010) Active archaeal communities at cold seep sediments populated by Siboglinidae tubeworms from the Storegga Slide. *Microb Ecol* **60**: 516–527.
- Leloup, J., Loy, A., Knab, N.J., Borowski, C., Wagner, M., and Jorgensen, B.B. (2007) Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, black sea. *Environ Microbiol* **9**: 131–142.
- Leloup, J., Fossing, H., Kohls, K., Holmkvist, L., Borowski, C., and Jorgensen, B.B. (2009) Sulfate-reducing bacteria in marine sediment (Aarhus Bay, Denmark): abundance and diversity related to geochemical zonation. *Environ Microbiol* **11**: 1278–1291.
- Lloyd, K.G., Albert, D.B., Biddle, J.F., Chanton, J.P., Pizarro, O., and Teske, A. (2010) Spatial structure and activity of sedimentary microbial communities underlying a *Beggiatoa* spp. mat in a Gulf of Mexico hydrocarbon seep. *PLoS ONE* **5**: e8738.
- Losekann, T., Knittel, K., Nadalig, T., Fuchs, B., Niemann, H., Boetius, A., and Amann, R. (2007) Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby mud volcano, Barents Sea. *Appl Environ Microbiol* **73**: 3348–3362.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, et al. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**: 1363–1371.

- McKay, L.J., MacGregor, B.J., Biddle, J.F., Albert, D.B., Mendlovitz, H.P., Hoer, D.R., *et al.* (2012) Spatial heterogeneity and underlying geochemistry of phylogenetically diverse orange and white Beggiatoa mats in Guaymas Basin hydrothermal sediments. *Deep Sea Res Part I: Oceanogr Res Pap* **67**: 21–31.
- Maignien, L., Parkes, R.J., Cragg, B., Niemann, H., Knittel, K., Coulon, S., *et al.* (2012) Anaerobic oxidation of methane in hypersaline cold seep sediments. *FEMS Microbiol Ecol* **83**: 214–231.
- Meyerdierks, A., Kube, M., Kostadinov, I., Teeling, H., Glockner, F.O., Reinhardt, R., and Amann, R. (2010) Metagenome and mRNA expression analyses of anaerobic methanotrophic archaea of the ANME-1 group. *Environ Microbiol* **12**: 422–439.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., and Schwartz, T. (2011) The CIPRES science gateway: a community resource for phylogenetic analyses. In *Proceedings of the 2011 TeraGrid Conference: Extreme Digital Discovery*. Salt Lake City, UT, USA: ACM, pp. 1–8.
- Milucka, J., Ferdelman, T.G., Polerecky, L., Franzke, D., Wegener, G., Schmid, M., *et al.* (2012) Zero-valent sulphur is a key intermediate in marine methane oxidation. *Nature* **491**: 541–546.
- Nauhaus, K., Albrecht, M., Elvert, M., Boetius, A., and Widdel, F. (2007) In vitro cell growth of marine archaeal-bacterial consortia during anaerobic oxidation of methane with sulfate. *Environ Microbiol* **9**: 187–196.
- Niemann, H., Losekann, T., de Beer, D., Elvert, M., Nadalig, T., Knittel, K., *et al.* (2006) Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. *Nature* **443**: 854–858.
- Omeregge, E.O., Mastalerz, V., de Lange, G., Straub, K.L., Kappler, A., Roy, H., *et al.* (2008) Biogeochemistry and community composition of iron- and sulfur-precipitating microbial mats at the Chefren mud volcano (Nile deep sea fan, Eastern Mediterranean). *Appl Environ Microbiol* **74**: 3198–3215.
- Orcutt, B., Boetius, A., Elvert, M., Samarkin, V., and Joye, S.B. (2005) Molecular biogeochemistry of sulfate reduction, methanogenesis and the anaerobic oxidation of methane at Gulf of Mexico cold seeps. *Geochim Cosmochim Acta* **69**: 4267–4281.
- Orcutt, B.N., Joye, S.B., Kleindienst, S., Knittel, K., Ramette, A., Reitz, A., *et al.* (2010) Impact of natural oil and higher hydrocarbons on microbial diversity, distribution, and activity in Gulf of Mexico cold-seep sediments. *Deep Sea Res Part II: Top Stud Oceanogr* **57**: 2008–2021.
- Orphan, V.J., House, C.H., Hinrichs, K.U., McKeegan, K.D., and DeLong, E.F. (2002) Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 7663–7668.
- Pace, N.R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**: 734–740.
- Pachiadaki, M.G., Lykousis, V., Stefanou, E.G., and Kormas, K.A. (2010) Prokaryotic community structure and diversity in the sediments of an active submarine mud volcano (Kazan mud volcano, East Mediterranean Sea). *FEMS Microbiol Ecol* **72**: 429–444.
- Pachiadaki, M.G., Kallionaki, A., Dahlmann, A., De Lange, G.J., and Kormas, K.A. (2011) Diversity and spatial distribution of prokaryotic communities along a sediment vertical profile of a deep-sea mud volcano. *Microb Ecol* **62**: 655–668.
- Paull, C.K., Ussler, W., Peltzer, E.T., Brewer, P.G., Keaten, R., Mitts, P.J., *et al.* (2007) Authigenic carbon entombed in methane-soaked sediments from the northeastern transform margin of the Guaymas Basin, Gulf of California. *Deep-Sea Res Part II-Top Stud Oceanogr* **54**: 1240–1267.
- Pereyra, L.P., Hiibel, S.R., Riquelme, M.V.P., Reardon, K.F., and Pruden, A. (2010) Detection and quantification of functional genes of cellulose-degrading, fermentative, and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. *Appl Environ Microbiol* **76**: 2192–2202.
- Pemthaler, A., Dekas, A.E., Brown, C.T., Goffredi, S.K., Embaye, T., and Orphan, V.J. (2008) Diverse syntrophic partnerships from deep-sea methane vents revealed by direct cell capture and metagenomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 7052–7057.
- 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.
- Raghoebarsing, A.A., Pol, A., van de Pas-Schoonen, K.T., Smolders, A.J.P., Ettwig, K.F., Rijpstra, W.I.C., *et al.* (2006) A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* **440**: 918–921.
- Rapp, M.S., and Giovannoni, S.J. (2003) The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol* **57**: 369–394.
- Rickard, A.H., Gilbert, P., High, N.J., Kolenbrander, P.E., and Handley, P.S. (2003) Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol* **11**: 94–100.
- Roalkvam, I., Jorgensen, S.L., Chen, Y.F., Stokke, R., Dahle, H., Hocking, W.P., *et al.* (2011) New insight into stratification of anaerobic methanotrophs in cold seep sediments. *FEMS Microbiol Ecol* **78**: 233–243.
- Rossel, P.E., Elvert, M., Ramette, A., Boetius, A., and Hinrichs, K.-U. (2011) Factors controlling the distribution of anaerobic methanotrophic communities in marine environments: evidence from intact polar membrane lipids. *Geochim Cosmochim Acta* **75**: 164–184.
- Salman, V., Bailey, J.V., and Teske, A. (2013) Phylogenetic and morphologic complexity of giant sulphur bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **104**: 169–186.
- Schreiber, L., Holler, T., Knittel, K., Meyerdierks, A., and Amann, R. (2010) Identification of the dominant sulfate-reducing bacterial partner of anaerobic methanotrophs of the ANME-2 clade. *Environ Microbiol* **12**: 2327–2340.
- Schubert, C.J., Vazquez, F., Losekann-Behrens, T., Knittel, K., Tonolla, M., and Boetius, A. (2011) Evidence for anaerobic oxidation of methane in sediments of a freshwater system (Lago di Cadagno). *FEMS Microbiol Ecol* **76**: 26–38.
- Simoneit, B.R.T., Lonsdale, P.F., Edmond, J.M., and Shanks, W.C. (1990) Deep-water hydrocarbon seeps in Guaymas Basin, Gulf of California. *Applied Geochemistry* **5**: 41–49.
- Sorokin, D.Y., Tourova, T.P., Panteleeva, A.N., and Muyzer, G. (2012) Desulfonatronobacter acidivorans gen. nov., sp. nov. and Desulfobulbus alkaliphilus sp. nov.,

- haloalkaliphilic heterotrophic sulfate-reducing bacteria from soda lakes. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**: 2107–2113.
- Stamatakis, A. (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**: 2688–2690.
- Stams, A.J.M., and Plugge, C.M. (2009) Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* **7**: 568–577.
- Stevens, H., St bner, M., Simon, M., and Brinkhoff, T. (2005) Phylogeny of proteobacteria and bacteroidetes from oxic habitats of a tidal flat ecosystem. *FEMS Microbiol Ecol* **54**: 351–365.
- Vigneron, A., Cruaud, P., Pignet, P., Caprais, J.-C., Cambon-Bonavita, M.-A., Godfroy, A., and Toffin, L. (2013) Archaeal and anaerobic methane oxidizer communities in the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin (Gulf of California). *ISME J.* **7**: 1595–1608.
- Webster, G., Parkes, R.J., Fry, J.C., and Weightman, A.J. (2004) Widespread occurrence of a novel division of bacteria identified by 16S rRNA gene sequences originally found in deep marine Sediments. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5708–5713.
- Webster, G., Yarram, L., Freese, E., Koster, J., Sass, H., Parkes, R.J., and Weightman, A.J. (2007) Distribution of candidate division JS1 and other bacteria in tidal sediments of the German Wadden Sea using targeted 16S rRNA gene PCR-DGGE. *FEMS Microbiol Ecol* **62**: 78–89.
- Yao, W., and Millero, F.J. (1996) Oxidation of hydrogen sulfide by hydrous Fe(III) oxides in seawater. *Mar Chem* **52**: 1–16.
- Zhou, J., Bruns, M.A., and Tiedje, J.M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* **62**: 316–322.
- Zinkevich, V., Bogdarina, I., Kang, H., Hill, M.A.W., Tapper, R., and Beech, I.B. (1996) Characterisation of exopolymers produced by different isolates of marine sulphate-reducing bacteria. *Int Biodeterior & Biodegradation* **37**: 163–172.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Fig. S1. Schematic view of sampling sites around markers BIG18 (N 27°35.5781; W 111°28.9848) with *Nautila* dive areas (PL), relative position of push cores (CT, diameter 5 cm, length 30 cm) and their geochemical measurements (CH₄ for methane concentrations, SO₄ for sulphate and H₂S for sulphide) and microbiological analysis (M). Scale is 1 m. Modified from Vigneron *et al.*, 2013.

Fig. S2. Maximum likelihood phylogenetic tree of the bacterial 16S cDNA sequences in the Guaymas Basin cold seep sediments, performed using RAxML 7.2.8 and GTRCAT model approximation with 1,000 replicates. Only bootstrap values above 70% are shown. Sequences amplified from sections 0 to 4 cmbsf are labelled 'Top', sequences from 4 to 6 cmbsf are 'Middle' and sequences from 8 cmbsf to the end of the core are tagged 'Bottom'. Only one representative sequence is shown. Number in brackets indicate the number of similar clones (above 97% similarity). WM12 = White Mat 12; WM14 = White Mat 14; EWM14 = Edge of White Mat 14.

Table S1. PCR primers used for real-time PCR of 16S rDNA genes.

Table S2. Oligonucleotide probes used for fluorescence *in situ* hybridization.

L'inventaire moléculaire des communautés bactériennes métaboliquement actives dans les sédiments de suintements froids de la marge de Sonora a présenté une importante diversité de microorganismes (32 phyla). Les partenaires des ANMEs dans l'oxydation anaérobie du méthane ont été recherchés parmi les bactéries détectées. Dans un premier temps, il est apparu qu'à l'inverse des ANMEs, qui représentaient la majorité des communautés archéennes, les populations bactériennes impliquées directement dans le processus d'AOM ne représentaient qu'une fraction de la communauté bactérienne (1/3 des séquences amplifiées). En effet, de nombreuses lignées bactériennes (*Epsilon*-, *Gamma-Proteobacteria*, *Firmicutes* ou encore diverses Candidates Divisions) ont été détectées. Ces groupes bactériens, impliqués pour la plupart dans la sulfo-oxydation (Teske et al., 1999; Yamamoto et al., 2010), la méthanotrophie aérobie (Conrad, 2009) ou la dégradation d'hydrocarbures (Phelps et al., 1998; Head and Swannell, 1999; Kniemeyer et al., 2007; Orcutt et al., 2010) pourraient néanmoins influencer les communautés microbiennes impliquées directement dans l'AOM. C'est par exemple probablement le cas du tapis bactérien de surface, composé en grande partie de bactéries filamenteuses du genre *Mariebeggia*. Ces bactéries, sulfo-oxydantes, semblent présenter un antagonisme avec les consortia ANME/SRB. Une compétition pour un même substrat carboné ou énergétique tel que l'acétate peut être envisagée mais aussi la libération de composés toxiques pour les consortia. De même, les bactéries impliquées dans la dégradation des hydrocarbures ou de la matière organique, doivent probablement influencer les populations associées à l'AOM en libérant par exemple des métabolites secondaires et des produits de dégradation. Dans un second temps, l'observation des consortia d'AOM a mis en évidence l'implication physique d'uniquement deux groupes bactériens : le sous-groupe SEEP SRB1a affilié au groupe *Desulfosarcina/Desulfococcus* (Schreiber et al., 2010) et un groupe affilié au genre *Desulfobulbus* (Niemann et al., 2006; Losekann et al., 2007). Ces deux groupes de *Delta-proteobacteria*, probablement sulfato-réducteurs ont, en dépit d'un rôle écologique similaire, présenté des répartitions différentes au sein des sédiments échantillonnés. Ces divergences de distribution, semblent indiquer des différences métaboliques entre ces deux partenaires bactériens impliqués dans l'AOM. En effet, la distribution des membres du genre *Desulfobulbus* dans les horizons sédimentaires les plus superficiels semblent indiquer l'utilisation de composés issus des

apports de surface. *A contrario*, la distribution des membres du groupe *Desulfosarcina/Desulfococcus*, dans les sédiments plus profonds, pourrait indiquer un métabolisme différent, basé sur l'utilisation de substrats provenant des fluides ou encore du soufre élémentaire (S^0) probablement disponible dans les horizons sédimentaires profonds. Par ailleurs, l'observation des agrégats d'AOM a démontré des restrictions d'association entre les partenaires bactériens et archéens, suggérant des mécanismes de reconnaissances cellulaires ou moléculaires lors de la mise en place de l'interaction syntrophique. Ce contrôle de l'identité du partenaire ainsi que les architectures particulières de ces consortia semblent indiquer l'existence de signaux de communication entre les cellules au sein des agrégats. Ces signaux, chimiques ou électriques, pourraient intervenir dans la spécificité de l'association, et, à l'instar des biofilms, dans l'organisation spatiale des cellules (Rickard et al., 2003) ainsi que dans la production de la matrice organique (Branda et al., 2005), observée par microscopie électronique à balayage. Cette matrice, enveloppant les cellules, pourrait conférer aux agrégats une résistance contre les variations environnementales, créant ainsi une micro-niche favorable au développement des ANME et SRB. Elle pourrait également servir à la connexion des cellules constituant les agrégats et ainsi permettre les transferts interspécifiques d'électrons (Torres et al., 2010). Enfin, elle pourrait faciliter des communications intercellulaires analogues au système de quorum sensing, en permettant l'accumulation de molécules messagères dans un environnement cloisonné.

Ces deux premières études ont ainsi décrit pour la première fois les communautés microbiennes des sédiments de surface associés aux émissions de fluides froids de la marge de Sonora. Afin de compléter ces études, les acteurs et processus microbiens des horizons sédimentaires plus profonds ont été étudiés.

Article 3 : "Unexpected diversity along the sulfate methane transition zone in Sonora Margin cold seeps, new perspectives on ecophysiology of marine sediment uncultured lineages"

Vignerot Adrien, Cruaud Perrine, Roussel Erwan, Pignet Patricia, Caprais Jean-Claude, Callac Nolwenn, Ciobanu Maria-Christina, Godfroy Anne, Cragg Barry, Parkes R. John, Van Nostrand Jov D., He Zhili, Zhou Jizhong et Toffin Laurent

En correction avant soumission à ISME Journal

Introduction à l'étude

Les sédiments de surface de la marge de Sonora ont révélé une communauté microbienne basée sur l'utilisation des sources de carbone et d'énergie issues à la fois des fluides froids et des apports de l'eau de mer. Les populations archéennes sont apparues principalement impliquées dans le cycle du méthane et du soufre, *via* le processus d'oxydation anaérobie du méthane couplé à la sulfato-réduction. Ces populations microbiennes ont présenté des niches écologiques spécifiques, réparties verticalement au sein des sédiments. La profondeur d'enfouissement des sédiments, de part les gradients géochimiques et la disponibilité décroissante en matière organique, semble donc être un paramètre important dans la distribution et l'activité métabolique des microorganismes. Un carottage sur une profondeur de 9 mètres a donc été réalisé, afin d'une part d'observer la stratification des populations microbiennes à plus grande échelle, et d'autre part d'accéder aux populations et aux activités microbiennes enfouies plus profondément dans les premiers mètres sous-jacents aux sorties de fluides froids et influençant certainement leur composition.



Phylogenetic and Functional Diversity of Microbial Communities Associated with Subsurface Sediments of the Sonora Margin, Guaymas Basin

Adrien Vigneron^{1,2,3*}, Perrine Cruaud^{1,2,3}, Erwan G. Roussel⁷, Patricia Pignet^{1,2,3}, Jean-Claude Caprais⁴, Nolwenn Callac^{1,2,3,5}, Maria-Cristina Ciobanu⁶, Anne Godfroy^{1,2,3}, Barry A. Cragg⁷, John R. Parkes⁷, Joy D. Van Nostrand⁸, Zhili He⁸, Jizhong Zhou^{8,9,10}, Laurent Toffin^{1,2,3}

1 Ifremer, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, ZI de la pointe du Diable, Plouzané, France, **2** Université de Bretagne Occidentale, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, ZI de la pointe du Diable, Plouzané, France, **3** CNRS, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, ZI de la pointe du Diable, Plouzané, France, **4** Ifremer, Laboratoire Etude des Environnements Profonds, UMR6197, ZI de la pointe du Diable, Plouzané, France, **5** Université de Brest, Domaines Océaniques IUEM, UMR6538, Place Nicolas Copernic, Plouzané, France, **6** Ifremer, Géosciences Marines, Laboratoire des Environnements Sédimentaires, ZI de la pointe du Diable, Plouzané, France, **7** School of Earth and Ocean Sciences, Cardiff University, Cardiff, United Kingdom, **8** Institute for Environmental Genomics and Department of Microbiology and Plant Biology, University of Oklahoma, Norman, Oklahoma, United States of America, **9** State Key Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control, School of Environment, Tsinghua University, Beijing, China, **10** Earth Science Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, California, United States of America

Abstract

Subsurface sediments of the Sonora Margin (Guaymas Basin), located in proximity of active cold seep sites were explored. The taxonomic and functional diversity of bacterial and archaeal communities were investigated from 1 to 10 meters below the seafloor. Microbial community structure and abundance and distribution of dominant populations were assessed using complementary molecular approaches (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, 16S rRNA libraries and quantitative PCR with an extensive primers set) and correlated to comprehensive geochemical data. Moreover the metabolic potentials and functional traits of the microbial community were also identified using the GeoChip functional gene microarray and metabolic rates. The active microbial community structure in the Sonora Margin sediments was related to deep subsurface ecosystems (Marine Benthic Groups B and D, Miscellaneous Crenarchaeotal Group, *Chloroflexi* and Candidate divisions) and remained relatively similar throughout the sediment section, despite defined biogeochemical gradients. However, relative abundances of bacterial and archaeal dominant lineages were significantly correlated with organic carbon quantity and origin. Consistently, metabolic pathways for the degradation and assimilation of this organic carbon as well as genetic potentials for the transformation of detrital organic matters, hydrocarbons and recalcitrant substrates were detected, suggesting that chemoorganotrophic microorganisms may dominate the microbial community of the Sonora Margin subsurface sediments.

Citation: Vigneron A, Cruaud P, Roussel EG, Pignet P, Caprais J-C, et al. (2014) Phylogenetic and Functional Diversity of Microbial Communities Associated with Subsurface Sediments of the Sonora Margin, Guaymas Basin. PLoS ONE 9(8): e104427. doi:10.1371/journal.pone.0104427

Editor: Jack Anthony Gilbert, Argonne National Laboratory, United States of America

Received: May 1, 2014; **Accepted:** July 8, 2014; **Published:** August 6, 2014

This is an open-access article, free of all copyright, and may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose. The work is made available under the Creative Commons CC0 public domain dedication.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. Nucleic acid sequences are available in the EMBL database under the following accession numbers: HF543837–HF543861 for archaeal, HF545450–HF545524 for bacterial 16S rRNA sequences and HF935025–HF935037 for *mcrA* gene sequences. The raw GeoChip dataset is available at <http://leg.ou.edu/4download/>.

Funding: The oceanographic cruise and this study was funded by IFREMER and a IFREMER PhD grant. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: avignero@gmail.com

Introduction

Deep marine subsurface sediments are one of the most extensive microbial habitats on Earth, covering more than two-thirds of the Earth's surface and reaching maximal thickness of more than 10 km at some locations [1]. Microbial populations are widespread in these sediments as deep as temperature permits [2] and cell numbers vary consistently ranging from 10^{10} to 10^3 cells per cm^3 of sediments according to their proximity from land, sedimentary rates and depth [3]. In general, microbial abundance in subsurface sediments (below 1 mbsf) decreases exponentially with depth, as a probable consequence of the decreasing organic carbon quality and availability [4]. Recent investigations based on

NanoSIMS monitoring [5] or intact ribosomal RNA [6] and membrane lipid detection [6,7] demonstrate that sedimentary microbial communities are active as they can incorporate carbon and nitrogen. However, overall metabolic rates are very slow, with biomass turnovers ranging from years to millennia [8]. Numerous of studies have focused on elucidating the microbial diversity of subsurface sediments [6,9–13]. Specific lineages of *Bacteria* (for e.g. *Chloroflexi*, Candidate division JS1) and *Archaea* (for e.g. Miscellaneous Crenarchaeotal Group (MCG), Marine Benthic Group D (MBGD), South African Goldmine Euryarchaeotal Group (SAGMEG) [14,15], distinct from the surface biospheres (above 1 mbsf), appear to occur consistently in marine subsurface

sediments. However identification of the metabolism of these microbial populations remains challenging. Isotopic signatures of membrane lipids suggested that heterotrophic strategies dominated in these ecosystems [6,7]. Metagenomic and metatranscriptomic analyses of subsurface sediments from the deep biosphere of the Peru Margin revealed metabolisms associated with lipids, carbohydrates and amino acids utilization. However detected genes and transcripts were mainly affiliated to *Firmicutes*, *Actinobacteria*, and *Alpha*- and *Gamma*proteobacteria rather than *Archaea*, *Chloroflexi* and candidate divisions [16,17]. Finally, recent single cell genomic approaches indicated the capacity of peptides degradation for members of MCG and MBGD archaeal lineages [18]. Despite these recent advances the metabolic pathways associated to the dominant microbial communities in subsurface sediments remain unclear.

The cold seeps of the Sonora Margin in the Guaymas Basin (Gulf of California), colonized by visible microbial mats and faunal assemblages, were previously characterized as highly active areas with abundant concentrations of methane and sulfur cycle microorganisms (Anaerobic methanotrophs, sulfate-reducing bacteria) in the shallow sediments (0–20 cmbsf) [19,20]. However, the subsurface microbial communities and processes that occur in the deeper sediments of the Sonora Margin have not yet been explored. The aim of this study was therefore to estimate the phylogenetic and functional biodiversity of the Sonora Margin sediments by comparing the geochemical composition, the microbial taxonomic diversity and abundance, and the GeoChip-based metagenome from subsurface sediments sampled in proximity with active cold seeps of the Sonora Margin. We analyzed the archaeal and bacterial diversity, abundance and distribution in correlation with geochemical gradients and elementary composition of the sediments and compared with the Sonora Margin surface cold seep sediments. Furthermore, we identified the metabolic processes and the functional potentials in term of carbon utilization and energy for both bacterial and archaeal communities and present insights into the microorganism adaptability and capacity to use various substrates in marine subsurface sediments.

Materials and Methods

Core sampling and abiotic variables

Sediment samples were collected from Sonora Margin cold seeps in the Guaymas Basin, during the Ifremer “BIG” cruise on the research vessel *L'Atalante* in June 2010. This cruise has benefited from a work permit in Mexican waters by the Mexican Secretariat of Foreign Relations (DAPA/2/281009/3803, October 28th, 2009). Gravity core BCK1 (N 27°35.804, W 111°28.697), 10 meters in length, was recovered from an observed gas depression in methane plume fields, 600 meters distant from visible active cold seeps (WM14 and EWM14 in Vasconcelos area [20]), at 1723 meters water depth. *In situ* temperatures, measured using thermal sensors (THP, Micrel) attached to the core, increased gradually from 3.5°C at the water-sediment interface to 5°C in the bottom of the core (9 mbsf). Immediately after retrieval, BCK1 core was sectioned in 1 meter long sections and transferred into the cold room. The plastic core liner was opened every 50 cm for sub-sampling. Samples for molecular analysis were collected aseptically using cut-off sterile 5 mL syringes, and frozen at –80°C. Sediment samples for activity rate estimations were taken using five cut-off sterile 5 mL syringes per section. These syringes were hermetically and anaerobically sealed with nitrogen in aluminum bags (Grüber-Folien, Germany) and stored at 4°C for processing back to laboratory. Methanogenic activity

measurements from Acetate, Di-methylamines and CO₂ substrates were carried out at Cardiff University, UK, as detailed in Methods S1.

Pore water was obtained by spinning down approximately 10 grams of crude sediment then was fixed as previously described [20]. Sulfate concentrations were determined by ion exchange chromatography as previously described [21]. Hydrogen sulfide and ammonium concentrations were measured by colorimetry [22]. Methane concentrations were quantified using the headspace technique (HSS Dani 86.50) and a gas chromatograph (Perichrom 2100) equipped with a flame-ionization detector [23]. Total organic carbon (TOC) of the sediments were measured by combustion in a LECO CS 125 carbon analyzer, as previously detailed [24]. Quantitative elemental chemical compositions of unfiltered pore waters were measured using Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrophotometry (ICP-AES, Ultima 2, Horiba, JobinYvon), as previously detailed [25]. Effect of eventual particle contaminations was limited by normalization of the elemental concentrations by conservative element (Na) concentrations. The stable-isotope composition of methane was measured by ISOLAB b.v. company (Necrijen, The Netherlands) in the first meter deep section (0.5 mbsf) and in the deepest sediment layer (8.5 mbsf) as previously described [20].

Nucleic acids extraction and amplifications

Total nucleic acids (DNA and RNA) were directly extracted in duplicate from 2.5 grams of sediments [26], then pooled and purified [27]. Total RNA was purified from crude nucleic acids using Nucleospin RNA II Kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) prior to RT-PCR. Aliquots of rRNA were reverse transcribed using Quanta qScript kit according to manufacturer's protocol (Quanta Bioscience, Gaithersburg, MD, USA). As control for DNA contamination, no amplification was obtained by PCR on RNA aliquots. All molecular experiments were carried out as previously monitored in surface cold seep sediments of the Sonora Margin [20]. PCR primers and appropriate annealing temperatures are listed in Table S1. Sequencing of 16S rRNA transcripts and their analysis including, taxonomic affiliations and phylogenetic trees were performed as detailed in Methods S1. Automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) of the archaeal and bacterial communities and real-time (q)PCR experiments targeting various sedimentary microbial lineages (*Archaea*, ANME-1, ANME-2a, ANME-2c, ANME-3, Methanosarcinales, Methanomicrobiales, Methanococcales, Methanobacteriales, Methanopyrales, MCG, MBGB, MBGD, *Bacteria*, *Chloroflexi*, Candidate division JS1, *Desulfosarcina/Desulfococcus*, *Desulfobulbus*, SEEP SRB2; Table S1) were carried out on purified DNA samples every 50 cm from 1 mbsf to 9 mbsf as presented in Methods S1. Statistical tests were carried out using the software PAST [28]. Nucleic acid sequences are available in the EMBL database under the following accession numbers: HF543837–HF543861 for archaeal, HF545450–HF545524 for bacterial 16S rRNA sequences and HF935025–HF935037 for *mcrA* gene sequences.

GeoChip analysis

The GeoChip 4.0 microarray, containing 83992 oligonucleotide probes and targeting 152414 gene variants in 401 categories for different microbial functional and biogeochemical processes was monitored as previously detailed [29]. Although the GeoChip was initially based on the genome of cultured microorganisms, the new generation of GeoChip has been extensively enriched with metagenome data from various environments and contains now an important number of relevant probes targeting genes from cultured and uncultured microorganisms involved in key biogeo-

chemical cycles. Total purified DNA samples were labeled then hybridized on GeoChip slides. Signal intensities were scanned and spots with signal-to-noise ratios lower than 2 were removed before analyses [29]. The phylogenetic design of the data acquisition enabled confident assignment of metabolic capabilities to bacterial and archaeal phyla [30,31], thus dataset were sorted according to the taxonomic affiliation of the genes (*Bacteria*, *Euryarchaeota* and *Crenarchaeota*). Output was analyzed using the GeoChip 4.0 data analysis pipeline [32] and tested using the statistical software PAST [28]. Relative signal intensity was normalized by the number of the probes for each indicated metabolic pathway. List of targeted genes for each category are provided in Table S2. Visualization of the bacterial and archaeal functional potential was achieved using spider dendrograms, where each arm of the plot corresponded to a metabolic pathway. The raw GeoChip dataset is available at <http://icg.ou.edu/4download/>.

Results

Geochemical description

The BCK1 core, from the Sonora Margin sediments, showed the typical geochemical signatures of continental margin sediments (Figure 1a), with a sulfate to methane transition zone (SMTZ) located around 5 mbsf. Sulfate pore water concentrations decreased from 25 mM at the sediment-water interface down to 2 mM at 5.5 mbsf. Hydrogen sulfide concentrations were only detected in the deeper sediment layers with a maximum of 32 mM at 5 mbsf decreasing to around 8 mM at 8 mbsf. Methane pore water concentrations increased with depth reaching 500 μM at the bottom of the sediment core (8.5 mbsf), and were positively correlated with the methanogenesis rates (Pearson correlation coefficient $r=0.72$, $P=0.001$; $<45 \text{ pmol/cm}^3/\text{d}$ at 8.5 mbsf) (Figure 1d). Isotopic signature of methane was -97.3% at the bottom of the core (9 mbsf) and -82% at 1 mbsf, confirming that most of methane produced was from biogenic origin and indicating that methane oxidation potentially occurred towards the sediment surface. Ammonium concentrations, likely resulting of organic matter degradation, increased with depth until reaching 2.5 mM at 5 mbsf (Figure 1b). Total organic carbon (TOC) content varied between 3.1 and 4.3% (w/w) throughout the sediment with peaks at 3.5, 5 and 7.5 mbsf (Figure 1c). Analysis of the element composition of the pore water highlighted both a manganese reduction zone in the first meter of sediment and specific horizons (3.5, 5–6, 7 and 8 mbsf) with significant enrichment of metallic elements (Fe, Al, Si, Mn, Ti) (Figure S1). These increases of metal concentrations in pore water suggest detrital terrigenous inputs in the sediment layers, as previously detected in the Guaymas Basin [33].

Microbial community structure and composition

Microbial community structure variations with depth were compared from the Sonora Margin cold seep surface sediments using ARISA. The archaeal and bacterial community structures of the BCK1 were significantly different from the surface sediments of both cold seep (WM14 and EWM14 samples [20]) and outside active seepage areas (REF samples [20]) as shown by clustering and ANOSIM ($p<0.0008$) on ARISA dataset (Figure 2) Dendrogram and Nonmetric Multidimensional Scaling (NMDS) analysis, based on Bray-Curtis similarity measure also indicated that BCK1 samples clustered according to sediment depths (1–4 mbsf, 4.5–6 mbsf and 6.5–9 mbsf). However this observation was not statistically supported by ANOSIM and seemed to rather reflect a difference in signal intensity more than in community composition.

Based on geochemical features, representative sediment depth horizons (1, 4, 5, 7 and 8 mbsf) were selected for the 16S rRNA survey. A total of 565 partial 16S rRNA sequences (303 for Archaea and 262 for Bacteria) were obtained and used as a proxy for active microbial communities [34–36]. Overall, statistical analysis of the microbial community structure of the samples indicated that the microbial community was nearly constant throughout the sediment core (SIMPER average similarities between paired samples above 74.05%).

Archaeal 16S rRNA libraries showed a very limited diversity throughout the sediment core ($1-H_{\text{Simpson}} = 0.615 \pm 0.08$; Figure 2, Figure S2, Figure S3), including three uncultivated phylotypes, mainly found in the deep biosphere: the Marine Benthic Groups B and D (MBGB, MBGD) and the Miscellaneous Crenarchaeotal Group (MCG), mainly represented by the MCG-8 and MCG-10 sub-groups [37]. Other groups such as South Africa Gold Mine Euryarchaeotal Group (SAGMEG), Marine Hydrothermal Vent Group (MHVG) and Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotal group (TMEG) were also detected in lower proportions in the deepest sediment layers.

In contrast, the bacterial 16S rRNA libraries indicated a larger diversity ($1-H_{\text{Simpson}} = 0.712 \pm 0.06$), dominated by *Chloroflexi* and diverse bacterial candidate divisions including JS1, OP11, OP1, OP8 and OP3 (Figure 2, Figure S2, Figure S4). The *Chloroflexi* lineage included different sub-groups and most of the amplified sequences were relatives to *Dehalococcoidetes* or subphylum IV groups. A few *Deltaproteobacteria*, usually related to sulfate-reducers and hydrocarbon degraders in cold seep sediments were detected in 4, 5 and 7 meters depth sediment horizons.

Microbial 16S rRNA gene abundance and distributions

Depth distributions and relative abundance of microorganisms were analyzed every 50 cm by real-time PCR (Figure 3). 16S rRNA gene abundance of *Bacteria* was around 10 fold higher than *Archaea* throughout the sediment core, and decreased with depth from 4×10^9 16S rRNA gene copies per gram of sediment in the top of the core to 2.8×10^8 copies at the bottom. Bacterial relative abundance showed elevated concentrations in particular at 5, 7 and 8 meters below the seafloor with 1.95×10^9 , 1.45×10^9 and 1.1×10^9 16S rRNA gene copies g^{-1} respectively. As sequences affiliated to *Chloroflexi* and candidate division JS1 dominated bacterial 16S rRNA gene libraries, the 16S rRNA genes of these groups were specifically quantified. *Chloroflexi* 16S rRNA gene abundance was estimated by subtracting JS1 16S rRNA gene copy numbers from quantifications with JS1 and *Chloroflexi* groups specific primers [38]. *Chloroflexi* 16S rRNA gene abundance appeared to mirror the bacterial distribution profile (Pearson correlation coefficient $r=0.914$, $P<0.0001$) and strongly dominated the bacterial community throughout the sediment core. In contrast, JS1 16S rRNA gene copy numbers increased with depth until reaching maximum values between 2.5 and 5 mbsf with 4.62×10^8 copies g^{-1} . No cold seep sulfate-reducing bacteria (*Desulfosarcina/Desulfococcus* and *Desulfobulbus* groups) were detected.

Total archaeal 16S rRNA gene copy numbers, represented 4–10% of the total number of 16S rRNA gene and decreased with depth, from 1.9×10^8 16S rRNA gene copies g^{-1} at 1 mbsf to 2.67×10^7 16S rRNA gene copies at the bottom of the sediment core. However, specific horizons (1 mbsf, 5 mbsf, 7 and 8 mbsf) showed peaks of elevated archaeal 16S rRNA gene concentrations with 4.8×10^8 , 1×10^8 , 1.1×10^8 and 6.8×10^7 16S rRNA gene copies respectively. Within the *Archaea*, uncultivated groups MBGD, MBGB and MCG were detected throughout the sediment core. Their distributions were correlated with the

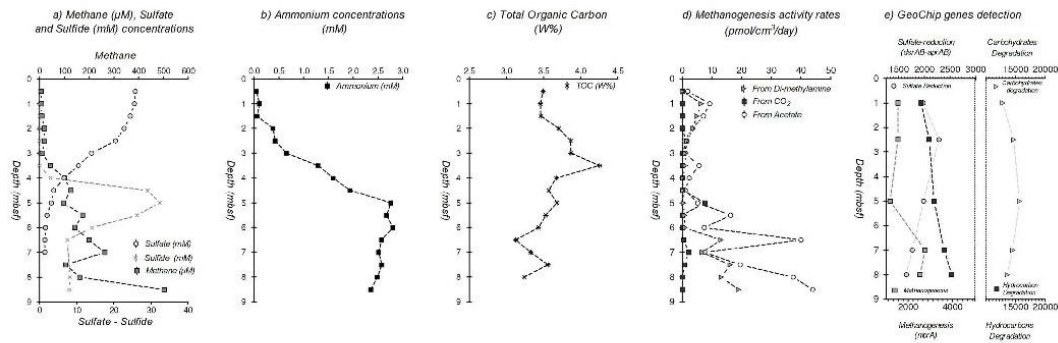


Figure 1. Geochemical depth profiles, putative methanogenesis activity rates and GeoChip genes detection of the sediment core BCK1. 1a) Dissolved methane (grey square, μM), sulfate (white circle, mM) and sulfide (grey cross, mM) concentrations in pore waters. 1b) Dissolved ammonium concentrations (mM) in pore waters. 1c) Total organic carbon (TOC) content in the sediments (% w/w). 1d) Methanogenesis activity rates from acetate (white circle), bicarbonate (black square) and di-methylamine (grey triangle) in the sediments ($\text{pmol}/\text{cm}^3/\text{day}$). 1e) Relative signal intensity of the GeoChip microarray for sulfate-reduction (circle), methanogenesis (grey square), carbohydrates degradation (triangle) and hydrocarbon degradation (black square) pathways, normalized by the number of the probes for each indicated metabolic pathway. doi:10.1371/journal.pone.0104427.g001

archaeal distribution (Pearson correlation coefficient $r = 0.98$, $P < 0.0001$) and no specific niche repartition was detected along the sulfate and methane concentration gradients. Assuming the same 16S rRNA copy number for each microbial lineage, MCG were fivefold less abundant than marine benthic groups except at 7 mbsf with 4.8×10^7 16S rRNA gene copies g^{-1} . Consistently with 16S rRNA library results, ANME lineages were below the detection limit ($< 10^4$ 16S rRNA gene copies g^{-1}) and methanogens were only represented by Methanosarcinales at 1 mbsf with 2.4×10^6 16S rRNA gene copies g^{-1} .

Functional gene diversity and GeoChip array

In order to investigate the ecophysiology of the microbial community associated to subsurface Sonora Margin sediments, an array targeting functional genes was used for sediments collected at selected depths (1, 2.5, 5, 7 and 8 mbsf). The microarray results indicated a small but significant variation between the metabolic potential of microbial communities from each sediment horizon (ANOVA: $F = 5.64$, $P = 0.002$). Similarity percentages (SIMPER) and clustering analyses using Bray-Curtis similarity measure showed that the microbial communities associated with the 2.5 and 5 mbsf sediment horizons and the two deeper sediment horizons (7 and 8 mbsf) shared the greatest number of functional genes (93.3% and 91.92% similarity respectively), and that divergence between these metabolic potentials increased with sediment depth. These analyses indicated that this divergence was mainly due to the highest presence, in deepest sediment layer communities, of genes involved in hydrocarbon degradation (13% of variation) and in the upper sediment layers the predominance of genes involved in cellulose degradation (6.79% of variation, Figure 4). Using the taxonomic nature of the GeoChip probes [31,32], putative metabolic functions were sorted according to specific taxonomic ranks: *Archaea* (3% of the total prokaryotic signal) or *Bacteria* (97%) super kingdoms and *Euryarchaeota* or *Crenarchaeota* phyla. *Crenarchaeota* phylum was recently revised to include only thermophilic lineages, excluding lineages such as MCG and MBGB [39]. However, GeoChip array was designed on the former phylogeny, thus the crenarchaeotal metabolic

pathways detected in this study are likely to include MCG and MBGB lineages.

Carbon metabolism

A large variety of bacterial genes for carbon utilization were identified (Figure 4). Genes coding for the RuBisCo, the propionyl-CoA/acetyl-CoA carboxylase (*ppc*), the ATP citrate lyase (*acLB*) and the carbon-monoxide dehydrogenase (CODH) were detected throughout the sediment core, indicating an autotrophic carbon fixation potential for both bacterial and archaeal lineages. Genes involved in heterotrophic metabolic pathways were also detected, indicating an important potential to transform a large variety of organic compounds. Bacterial genes associated with metabolic pathways for carbohydrates degradation (starch, cellulose, hemicellulose, chitin; lignin and pectin degradation), notably with extracellular enzyme genes, were detected in slightly higher proportion in the surface sediments. Hydrocarbon degradation pathway genes such as *chlA*, involved in ethylphenol and ethylbenzene catabolism, the *tut* operon, involved in toluene degradation and *alk* genes in the alkane degradation pathway [40] were also detected in increasing proportion with depth. The ability to degrade chlorinated, aromatic, polycyclic and xenobiotic compounds were also detected for bacteria, particularly with genes involved in the superpathway of aromatic compound degradation *via* 2-oxopent-4-enoate and in the metacleavage of aromatic compounds [41]. Finally, the bacterial potential to use methylated amines was also identified throughout the sediment core. Archaeal metabolic genes for carbon utilization involved in carbohydrates and complex organic matter degradation as well as autotrophic metabolisms associated with *Euryarchaeota* and *Crenarchaeota*-related lineages were also detected. Finally, *merA* euryarchaeotal genes, involved in both methane production and anaerobic oxidation [42] were detected in increasing proportion with depth consistently with methane concentrations (Pearson correlation coefficient $r = 0.832$, $P = 0.08$; Figure 1c).

Sulfate and Nitrogen metabolisms

The elevated ammonium concentrations measured in the sediments suggested that nitrogen cycle might be significant in

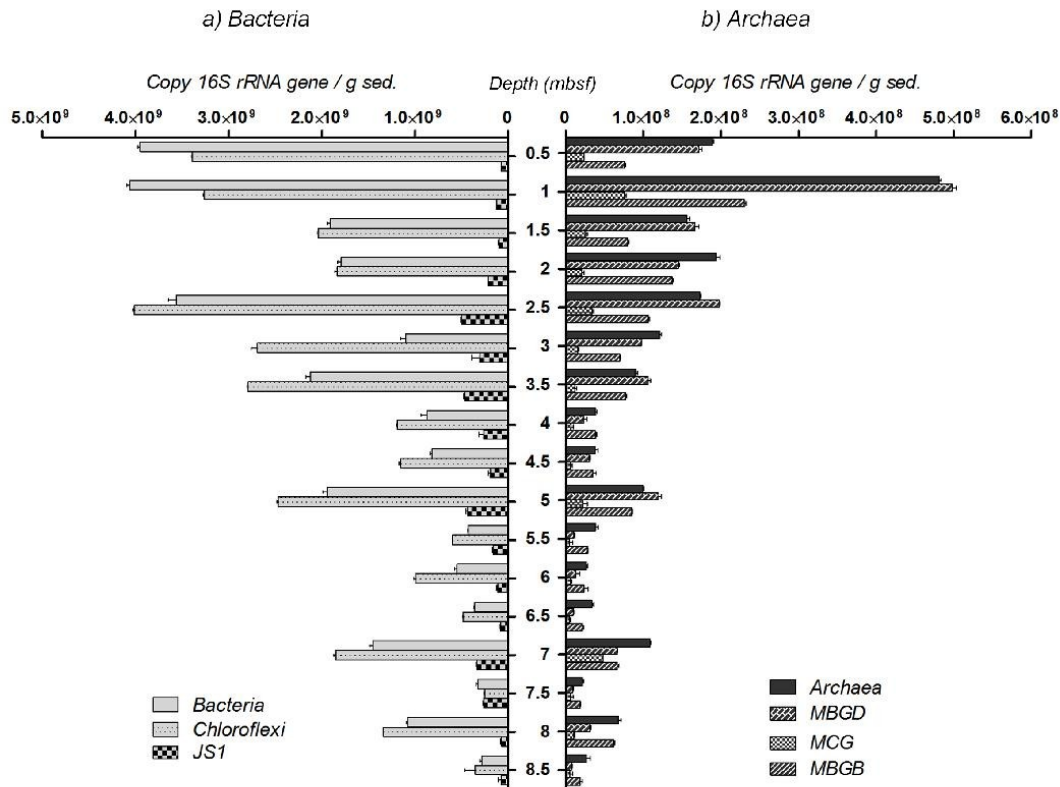


Figure 3. Q-PCR estimations. Q-PCR estimation of 16S rRNA gene copy numbers per gram of sediment for a) total *Bacteria* and bacterial groups of *Chloroflexi*, candidate division JS1 and b) total *Archaea* and archaeal groups of Marine Benthic Group B (MBGB), D (MBGD), Miscellaneous Crenarchaeotal Group (MCG), from BCK1 sediment core. Methanosarcinales were only detected at 1 mbsf with 2.4×10^6 16S rRNA gene copies g^{-1} but were not represented in the figure. ANaerobic MEthanotrophs (ANME), *Desulfosarcina/Desulfococcus* (DSS), *Desulfobulbus* (DBB) and other methanogens orders were not detected in analyzed samples. doi:10.1371/journal.pone.0104427.g003

phyla (JS1, OP8, etc.), and the major archaeal lineages detected were MCG, MBGB (also known as DSAG [43]) and MBGD. All these microbial populations have been frequently encountered in continental margin sediments and in the deep subsurface marine biosphere [9,10,13], but only in minor proportion in highly active ecosystems (hydrothermal vent, cold seeps) [20,44] and in low carbon environments (open ocean sediments) [45]. Interestingly, no significant variation of the microbial community structure, excepted for the candidate division JS1, was detected throughout the sediment core, despite the presence of marked geochemical gradients (sulfate, methane). These results suggest that dominant microbial lineages were probably not directly involved in these biogeochemical cycles, as previously proposed for archaeal lineages [6,37]. Overall, estimated cell abundance decreased with depth as commonly observed in marine sediments [3,4]. In the Sonora Margin, elevated amounts of organic matter, derived from both marine production and continental inputs, sedimented in the seafloor with an estimated rate of 2 mm/y [46]. The accumulation of these sedimentary particles led to an elevated sedimentary TOC content (3.5~4%). Distance to land, geochemical gradients and organic carbon quality and abundance can control the microbial

community structure and abundance in marine sediments [3,7,14], thus the high cellular abundance in the Sonora Margin sediments could be a consequence of the high concentrations of organic carbon. Elevated Q-PCR-based cell abundance estimations in the first meters of sediment could be due to higher concentrations of several electron acceptors (oxygen, nitrate, manganese and sulfate). Furthermore, significant correlations were found between TOC percentage and total *Bacteria*, *Chloroflexi*, candidate division JS1 and MBGD cell abundance estimations below 1.5 mbsf (Pearson correlation coefficients $r = 0.58, 0.66, 0.75$ and 0.66 respectively; $P < 0.04$), which are consistent with reports of correlation between TOC and subsurface microbial biomass [7,47]. Likewise, fluctuations below 3 mbsf of all microbial lineage cell abundances, appeared to be positively correlated with the local elementary composition of the sediments (Fe, Ti and Al, Pearson correlation coefficients $r > 0.67, P < 0.04$; Table S3). These results clearly indicate that in subsurface margin sediments microbial communities are influenced directly or indirectly by the geochemical composition of the sediments and suggest that the microbial abundance in margin ecosystems could be enhanced by the continental detrital inputs rather than by

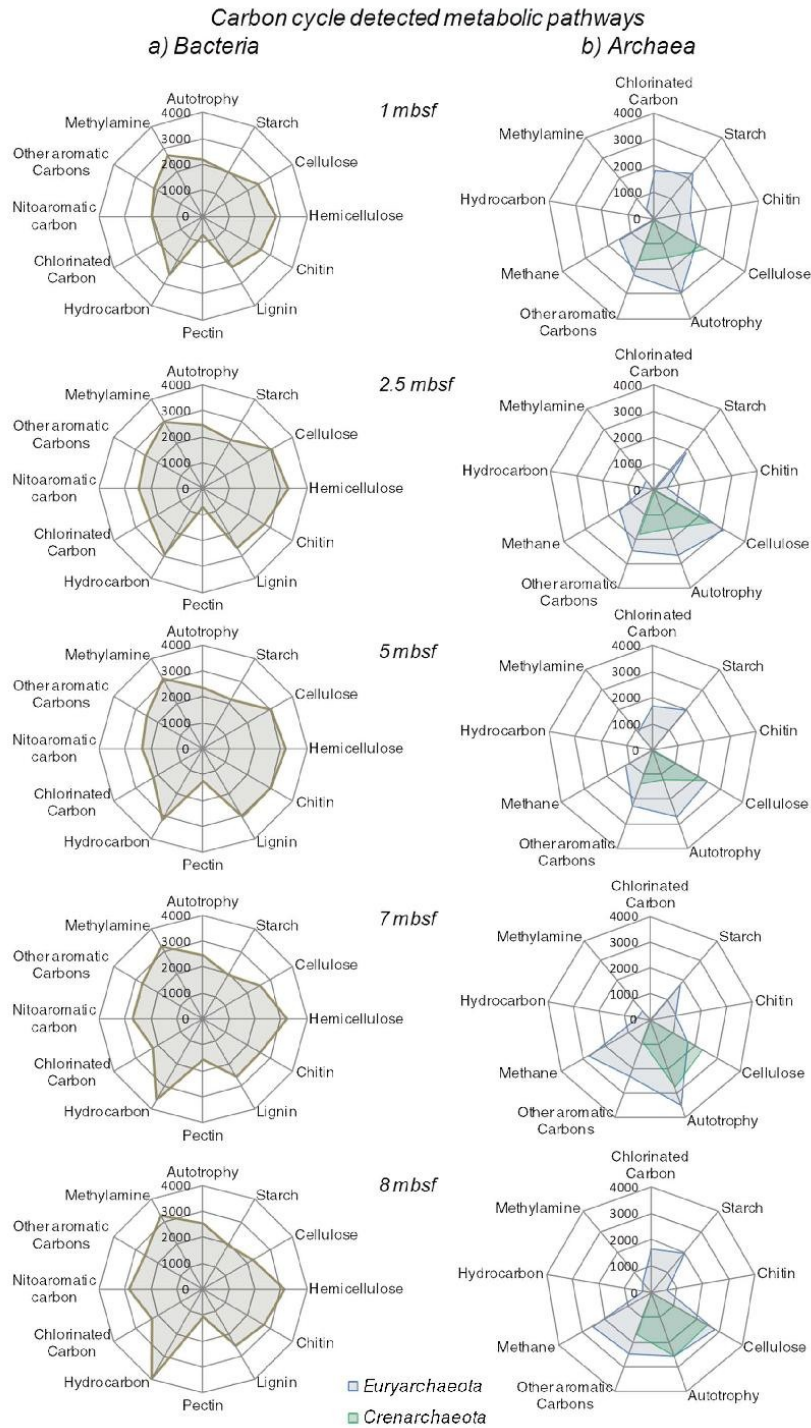


Figure 4. Carbon-cycling metabolic pathways detected by GeoChip. Carbon-cycling metabolic pathways identified for a) *Bacteria* and b) Archaeal *Euryarchaeota* (Blue) and *Crenarchaeota*-related (Green) lineages at different depths for BCK1 sediment core. Relative signal intensity was normalized by the number of the probes for each indicated metabolic pathway. List of targeted genes for each category are provided in Table S2. doi:10.1371/journal.pone.0104427.g004

oceanic production, as indicated the correlations with terrigenous-derived metallic elements [48,49]. This result is congruent with recent model calculations in subsurface sediments, indicating that buried organic carbon is sufficient to fuel microbial communities over turnover of millions of years [50].

Organic matter degradation

Based on single cell genomics, it was recently proposed that archaical MCG and MBGD lineages could degrade detrital organic matter [18]. Moreover, genes and transcripts, involved in anaerobic metabolism of amino acids, carbohydrates and lipids have been previously detected in the deep subsurface biosphere [16,17]. However, it remains unclear how the microbial community is organized to degrade the detrital inputs and which microbial processes are involved. Although the GeoChip cannot be considered to be a comprehensive array with respect to marine sediment environments, it does contain an important number of relevant probes targeting genes involved in key biogeochemical

cycles and represents an interesting approach to analyze the genomic potential in environments. The microbial metabolic potential analyzed using the GeoChip showed that the majority of the genes detected were related to various bacterial metabolic pathways for the transformation and the anaerobic degradation of simple and complex organic matter (Figure 1c). The high ammonium concentrations in these sediments could therefore be a consequence of the degradation of large amounts of organic matter by microbial communities associated to the Sonora Margin subsurface sediments. Genes associated with several metabolic pathways including extracellular and intracellular enzymes involved in the degradation and assimilation of decaying wood were detected, supporting the importance of subsurface microbial communities degrading organic matter such as plants and starch. For example, genes for transformation of lignin and complex organic aromatic substrates were also identified, notably involved in the superpathway of the aromatic compound cleavage, indicating that even the more recalcitrant wood particles could

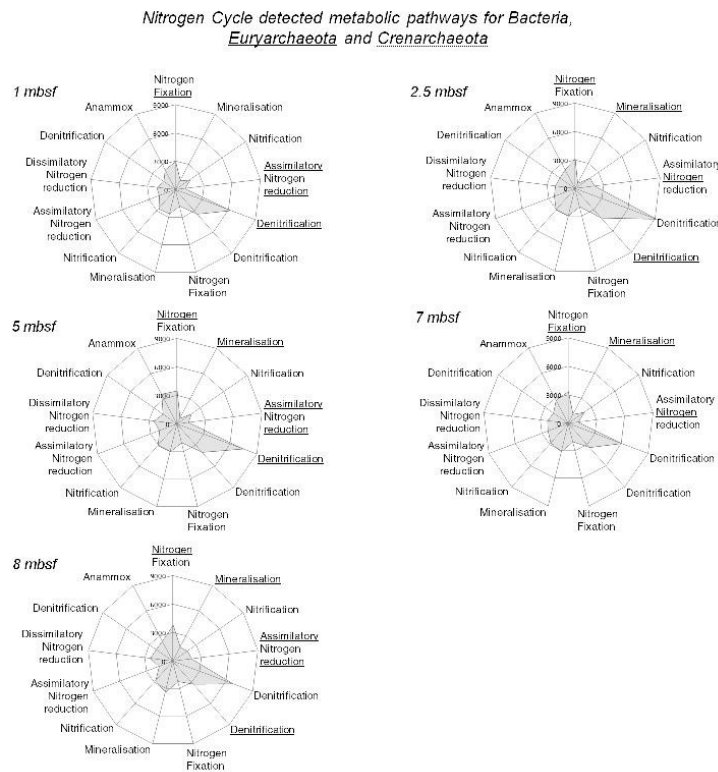


Figure 5. Nitrogen-cycling metabolic pathways identified at different depths for BCK1 sediment cores. Bacterial metabolic pathways are not underlined while *Euryarchaeota* and *Crenarchaeota*-related pathways are underlined with solid and dotted line respectively. Relative signal intensity was normalized by the number of the probes for each indicated metabolic pathway. List of targeted genes for each category are provided in Table S2. doi:10.1371/journal.pone.0104427.g005

potentially be degraded by the bacterial community in the Sonora Margin (Figure 4a). This wood-based degradation metabolism appeared to be predominant in the upper sediment layers while hydrocarbon catabolism predominated the deeper sediment horizons. The Guaymas Basin sediments are well known to harbor various C₁ to C₈ hydrocarbon compounds such as ethane, butane, pentane and other alkanes [51]. Thus the bacterial community may be able to degrade this upward migrating organic carbon source as well as sedimented particles.

Other genes implicated in metabolic pathways for carbon assimilation have also been identified, indicating that different strategies for carbon assimilation occur amongst the different bacterial lineages (Figure 4a). For example, potential for degradation of chlorinated compounds was present, which is congruent with previous detection of dehalogenase enzymes and dehalogenation activities in similar deep biosphere sediments dominated by *Chloroflexi* lineages [52]. Degradation of chlorinated compounds derived from decaying marine phytoplankton pigments [53], suggests that in addition to terrestrial input the Sonora Margin bacterial community, (e.g. *Chloroflexi* members) could catabolize marine production and phytoplankton [54]. This metabolic specialization, which is energetically more favorable than sulfate reduction, may also explain the overall abundance of *Chloroflexi* representatives in marine sediments [45]. In addition, part of the bacterial community could also decompose decaying macrofauna with metabolic pathways involved in chitin and methylamine degradation. Finally, genetic potential for autotrophic metabolism was identified in both *Bacteria* and *Archaea* domains, suggesting that carbon dioxide could be either assimilated by specific microbial groups or that some subsurface microorganisms might be facultative heterotrophs, as previously suggested [5].

In contrast to bacterial lineages, the detected metabolic potential of *Archaea* appeared to be less diverse, maybe due to the more limited number of genes targeted by the GeoChip. Even if we could not exclude that our representation of the archaeal metabolic potential may be biased by unknown or non-targeted archaeal functional genes were identified. Crenarchaeotal-related lineages, likely including MCG and MBGB phyla, appeared to have the metabolic potential for complex organic carbon degradation (cellulose and aromatic polymers; Figure 4b). This result is supported by single cell MCG genomes [18] and distribution [37] suggesting heterotrophic metabolisms, possibly linked to aromatic compounds degradation [55]. Likewise, euryarchaeotal lineages, dominated by MBGD (95% based on Q-PCR estimations), appeared to have mainly the potential to degrade wood detrital polymers like starch, cellulose and aromatic compounds (Figure 4b). Hence, MBGD members could be anaerobic and heterotrophic degraders of complex organic matter, as previously suggested [18]. Resulting peptides from enzymatic degradations could be further assimilated by MBGD cells *via* peptidases and oligopeptide transporters, recently detected in their genome [18].

Methane and Sulfate cycles

Interestingly, the low GeoChip signal intensity for the *mcrA* gene, a gene coding for an enzyme involved in production and anaerobic oxidation of methane [42] was correlated with methane concentrations and methanogenesis rates measured in the sediments (Figure 1). However, Q-PCR quantification and *mcrA* gene clone libraries (data not shown) only detected putative methane cycling *Archaea* related to *Methanococcoides* in sediments at 1 mbsf. Detection of these methanogens degrading noncompetitive substrates, such as methylated amines [56] is consistent

with the presence of methanogenesis from dimethylamine and the detection of euryarchaeotal genes involved in methylamine degradation (Figure 4b). In deeper sediments with low methanogenesis rates (10–100 fold lower than in cold seeps [57]), relative abundances of known methanogens were probably below the PCR and Q-PCR detection limits (<1000 16S rRNA gene copy per gram of sediment) or escape amplification due to primer deficiencies [13]. As suggested by the changing $\delta^{13}\text{-CH}_4$ signature, anaerobic methanotrophs could also be present in extremely low abundance or with altered key genes that would escape molecular detection [58]. These methanotrophs might be coupled directly or indirectly with sulfate-reducing *Deltaproteobacteria*, detected between 4 and 7 mbsf by 16S rRNA libraries and *dsrAB* *AprAB* GeoChip probes and thereby, lead to the formation of the SMTZ in these sediments (Figure 1).

Nitrogen cycle

Key bacterial metabolic genes involved in the nitrogen cycle were also detected with the microarray approach in the Sonora Margin sediments (Figure 5). In addition to nitrogen fixation, denitrification and anammox by bacterial communities, *Euryarchaeota* showed genetic potential for nitrogen fixation. Nitrogen assimilation is an important metabolic process for deep subsurface sediment microbial communities [5] and various members of the *Euryarchaeota* such as methanogenic lineages [59,60], ANME-2 [61] and ANME-1 [62] were previously found to anaerobically fix nitrogen. The detection of euryarchaeotal nitrogen fixation genes in our results suggested that members of MBGD, representing 95% of the *Euryarchaeota* could also be diazotrophic *Archaea*. Nitrification (ammonium oxidation) genes (*amoA*) were identified as a potential metabolism in crenarchaeotal-related lineages. Although ammonium, a potential electron donor, is abundant in the Sonora Margin sediments, probably due to organic matter microbial degradation, the presence of such oxygenase enzymes in this anoxic environment remains enigmatic [47,63]. It was therefore suggested that ammonium oxidation could be performed using an alternative electron acceptor [47] or that *amo* genes in anoxic environments could have an alternative function [64]. Consistently with the detection of *nar* transcripts in deep marine sediments [16], archaeal and bacterial denitrification genes were present throughout the sediment core, which could contribute to the elevated ammonium concentrations. Anaerobic ammonium oxidation was previously suggested for the nitrate origin in the deepest sediments as it could potentially be produced as a by-product of the process [16]. This would be supported by the detection of the *hzo* genes by the GeoChip probes, as well as the previously report of anammox process in the Sonora Margin sediments [65].

Conclusion

This study clearly indicated that Sonora Margin sub-surface sediment microbial communities, probably controlled by terrigenous inputs, are composed of deep biosphere-related microorganisms, distinct of the Sonora Margin surface cold seep communities. Consistently, genetic potentials for the catabolism of complex organic matters (decaying wood, macrofauna, phytoplankton and hydrocarbon) were identified, suggesting that various heterotrophic strategies occur amongst sedimentary microbial communities. Further specific measurements of rates of degradation these different substrates could confirm these results and lead to a better understanding of the biochemical processes driving subsurface microbial communities.

Supporting Information

Figure S1 Geochemical depth profiles of: total iron, aluminum, potassium, manganese, total sulfur, silica and titanium concentrations in the unfiltered pore waters of the BCK1 core. The blue shade represent important changes in elemental composition profiles.
(TIF)

Figure S2 Rarefaction curves for A) archaeal and B) Bacterial 16S rRNA gene libraries.
(TIF)

Figure S3 Maximum Likelihood phylogenetic tree of the archaeal 16S cDNA sequences amplified from sections 1, 4, 5, 7 and 8 mbsf (labeled S1, S4, S5, S7 and S8 respectively) of the BCK1 sediment core. Phylogenetic tree was performed using RAxML 7.2.8, and GTRCAT model approximation with 1000 replicates. Only bootstrap values up to 70% are shown. Only one representative sequence (>97% identical) per sediment horizon is shown. Number in brackets shown the number of clones analyzed from RNA clone libraries. MBG-D/B, Marine Benthic Group D/B; TMEG, Terrestrial Miscellaneous Euryarcheotal Group; MCG, Miscellaneous Crenarchaeotal Group; MHVG, Marine Hydrothermal Vent Group; SAGMEG, South Africa Gold Mine Euryarchaeotal Group.
(TIF)

Figure S4 Maximum Likelihood phylogenetic tree of the bacterial 16S cDNA sequences amplified from sections 1, 4, 5, 7 and 8 mbsf (labeled S1, S4, S5, S7 and S8 respectively) of the BCK1 sediment core. Phylogenetic tree was performed using RAxML 7.2.8, and GTRCAT model approximation with 1000 replicates. Only bootstrap values up to 70% are shown. Only one representative sequence (>97% identical) per sediment horizon is

shown. Number in brackets shown the number of clones analyzed from RNA clone libraries.
(TIF)

Table S1 Primer sets and annealing temperatures used for real-time PCR of 16S rRNA gene.
(DOC)

Table S2 Details of GeoChip-targeted genes, related proteins and processes corresponding to each identified metabolic pathways.
(DOC)

Table S3 Correlation statistical tests and associated P values for microbial lineages and elementary composition of the sediment pore-waters.
(DOC)

Methods S1 Detailed methods for methanogenesis activity measurements, gene library constructions and phylogenetic affiliations, Q-PCR and ARISA experiments.
(DOCX)

Acknowledgments

We would like to thank the crew of *L'Atalante* for their help on core preparation, François Harmegnies for temperature gradient recovery and Olivier Rouxel for geochemical interpretation.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AV LT JP JZ. Performed the experiments: AV PC EGR PP JCC NC MCC BAC JVN ZH. Analyzed the data: AV PC EGR BAC JVN ZH. Contributed reagents/materials/analysis tools: NC MCC. Contributed to the writing of the manuscript: AV PC EGR JP JZ LT AG.

References

- Divins DL (2003) Total Sediment Thickness of the World's Oceans & Marginal Seas. NOAA National Geophysical Data Center, Boulder CO.
- Roussel EG, Bonavita MA, Querellou J, Cragg BA, Webster G, et al. (2008) Extending the sub-sea-floor biosphere. *Science* 320: 1046.
- Kallmeyer J, Pockalny R, Adhikari RR, Smith DC, D'Hondt S (2012) Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Parkes RJ, Cragg BA, Wellsbury P (2000) Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: A review. *Hydrogeology Journal* 8: 11–29.
- Morono Y, Terada T, Nishizawa M, Ito M, Hillion F, et al. (2011) Carbon and nitrogen assimilation in deep subseafloor microbial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 18295–18300.
- Biddle JF, Lipp JS, Lever MA, Lloyd KG, Sorensen KB, et al. (2006) Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 3846–3851.
- Lipp JS, Morono Y, Inagaki F, Hinrichs KU (2008) Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments. *Nature* 454: 991–994.
- Jørgensen BB (2011) Deep subseafloor microbial cells on physiological standby. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 18193–18194.
- Inagaki F, Suzuki M, Takai K, Oida H, Sakamoto T, et al. (2003) Microbial communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the Sea of Okhotsk. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 7224–7235.
- Inagaki F, Nunoura T, Nakagawa S, Teske A, Lever M, et al. (2006) Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments, on the Pacific Ocean Margin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2815–2820.
- D'Hondt S, Jørgensen BB, Miller DJ, Batzke A, Blake R, et al. (2004) Distributions of Microbial Activities in Deep Subseafloor Sediments. *Science* 306: 2216–2221.
- Webster G, Parkes RJ, Fry JC, Weightman AJ (2004) Widespread occurrence of a novel division of bacteria identified by 16S rRNA gene sequences originally found in deep marine Sediments. *Appl Environ Microbiol* 70: 5708–5713.
- Newberry CJ, Webster G, Cragg BA, Parkes RJ, Weightman AJ, et al. (2004) Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough, Ocean Drilling Program Leg 190. *Environmental Microbiology* 6: 274–287.
- Orcutt BN, Syvan JB, Knab NJ, Edwards KJ (2011) Microbial ecology of the dark ocean above, at, and below the seafloor. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 361–422.
- Teske A, Sorensen KB (2008) Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? *Isme Journal* 2: 3–18.
- Orsi WD, Edgcomb VP, Christman GD, Biddle JF (2013) Gene expression in the deep biosphere. *Nature* 499: 205–208.
- Biddle JF, Fitz-Gibbon S, Schuster SC, Brenchley JE, House CH (2008) Metagenomic signatures of the Peru Margin subseafloor biosphere show a genetically distinct environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 10583–10588.
- Lloyd KG, Schreiber I, Petersen DG, Kjeldsen KU, Lever MA, et al. (2013) Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins. *Nature*.
- Vigneron A, Cruaud P, Pignet P, Caprais J-C, Gayet N, et al. (2014) Bacterial communities and syntrophic associations involved in anaerobic oxidation of methane process of the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin. *Environ Microbiol*: n/a–n/a.
- Vigneron A, Cruaud P, Pignet P, Caprais J-C, Cambon-Bonavita M-A, et al. (2013) Archaeal and anaerobic methane oxidizer communities in the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin (Gulf of California). *ISME J*.
- Lazar CS, L'Haridon S, Pignet P, Toffin L (2011) Archaeal populations in hypersaline sediments underlying orange microbial mats in the Napoli mud volcano. *Appl Environ Microbiol* 77: 3120–3131.
- Fonselius S, Dyrssen D, Yhlen B (2007) Determination of hydrogen sulphide. *Methods of Seawater Analysis: Wiley-VCH Verlag GmbH*. pp. 91–100.
- Sarradin P-M, Caprais J-C (1996) Analysis of dissolved gases by headspace sampling gas chromatography with column and detector switching. *Preliminary results. Analytical Communications* 33.
- Ciobanu MC, Rabineau M, Droz L, Révillon S, Ghiglione JF, et al. (2012) Paleoenvironmental imprint on subseafloor microbial communities in Western Mediterranean Sea Quaternary sediments. *Biogeosciences Discuss* 9: 253–310.
- Callac N, Rommevaux-Jestin C, Rouxel O, Lesongeur F, Liorzou C, et al. (2013) Microbial colonization of basaltic glasses in hydrothermal organic-rich sediments at Guaymas Basin. *Frontiers in Microbiology* 4.

26. Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* 62: 316–322.
27. Lazar CS, Dinasquet J, Pignet P, Prieur D, Toffin L (2010) Active archaeal communities at cold seep sediments populated by Siboglinidae tubeworms from the Storegga Slide. *Microb Ecol* 60: 516–527.
28. Hammer Ø, DA TH, PD R (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4.
29. Li ZM, He ZL, Parisi VA, Kang S, Deng Y, et al. (2012) GeoChip-Based Analysis of Microbial Functional Gene Diversity in a Landfill Leachate-Contaminated Aquifer. *Environmental Science & Technology* 46: 5824–5833.
30. Zhou J (2009) GeoChip: A high throughput genomics technology for characterizing microbial functional community structure. *Phytopathology* 99: S164–S164.
31. Chan Y, Van Nostrand JD, Zhou J, Pointing SB, Farrell RI (2013) Functional ecology of an Antarctic Dry Valley. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 8990–8995.
32. He ZL, Deng Y, Van Nostrand JD, Tu QC, Xu MY, et al. (2010) GeoChip 3.0 as a high-throughput tool for analyzing microbial community composition, structure and functional activity. *ISME Journal* 4: 1167–1179.
33. Cheshire H, Thurow J, Nederbragt AJ (2005) Late Quaternary climate change record from two long sediment cores from Guaymas Basin, Gulf of California. *Journal of Quaternary Science* 20: 457–469.
34. Kemp PF, Lee S, LaRoche J (1993) Estimating the Growth Rate of Slowly Growing Marine Bacteria from RNA Content. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 2594–2601.
35. Kerkhof L, Ward BB (1993) Comparison of Nucleic Acid Hybridization and Fluorometry for Measurement of the Relationship between RNA/DNA Ratio and Growth Rate in a Marine Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 1303–1309.
36. Danovaro R, Dell'Anno A, Pusceddu A, Fabiano M (1999) Nucleic acid concentrations (DNA, RNA) in the continental and deep-sea sediments of the eastern Mediterranean: relationships with seasonally varying organic inputs and bacterial dynamics. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 46: 1077–1094.
37. Kubo K, Lloyd KG, J FB, Amann R, Teske A, et al. (2012) Archaea of the Miscellaneous Crenarchaeotal Group are abundant, diverse and widespread in marine sediments. *ISME J*.
38. Blazejak A, Schippers A (2010) High abundance of JS-1 and Chloroflexi-related Bacteria in deeply buried marine sediments revealed by quantitative, real-time PCR. *FEMS Microbiol Ecol* 72: 198–207.
39. Guy L, Ettema TJG (2011) The archaeal TACK superphylum and the origin of eukaryotes. *Trends Microbiol* 19: 580–587.
40. Carmona M, Zamarró MT, Blázquez B, Durante-Rodríguez G, Juárez JF, et al. (2009) Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73: 71–133.
41. Arendorf JJ, Focht DD (1995) A meta cleavage pathway for 4-chlorobenzonate, an intermediate in the metabolism of 4-chlorobiphenyl by *Pseudomonas cepacia* P166. *Appl Environ Microbiol* 61: 443–447.
42. Knittel K, Boetius A (2009) Anaerobic Oxidation of Methane: Progress with an Unknown Process. *Annual Review of Microbiology* 63: 311–334.
43. Vetriani C, Tran HV, Kerkhof LJ (2003) Fingerprinting microbial assemblages from the oxic/anoxic chemocline of the Black Sea. *Appl Environ Microbiol* 69: 6481–6488.
44. Lloyd KG, Albert DB, Biddle JF, Chanton JP, Pizarro O, et al. (2010) Spatial structure and activity of sedimentary microbial communities underlying a *Beggiatoa* spp. mat in a Gulf of Mexico hydrocarbon seep. *PLoS One* 5: e8738.
45. Durbin AM, Teske A (2011) Microbial diversity and stratification of South Pacific abyssal marine sediments. *Environ Microbiol* 13: 3219–3234.
46. Simoneit BRT, Lonsdale PF, Edmond JM, Shanks WC (1990) Deep-Water Hydrocarbon Seeps in Guaymas Basin, Gulf of California. *Applied Geochemistry* 5: 41–49.
47. Jørgensen SI, Hannisdal B, Lauen A, Baumberger T, Flesland K, et al. (2012) Correlating microbial community profiles with geochemical data in highly stratified sediments from the Arctic Mid-Ocean Ridge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E2846–2855.
48. Govin A, Holzwarth U, Heslop D, Ford Keeling L, Zabel M, et al. (2012) Distribution of major elements in Atlantic surface sediments (36°N–49°S): Imprint of terrigenous input and continental weathering. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* 13: Q01013.
49. Nath BN, Rao VP, Becker KP (1989) Geochemical evidence of terrigenous influence in deep-sea sediments up to 8°S in the Central Indian Basin. *Marine Geology* 87: 301–313.
50. Lomstein BA, Langerhuus AT, D'Hondt S, Jørgensen BB, Spivack AJ (2012) Endospore abundance, microbial growth and necromass turnover in deep sub-seafloor sediment. *Nature* 484: 101–104.
51. Simoneit BRT, Mazurek MA, Brenner S, Crisp PT, Kaplan IR (1979) Organic geochemistry of recent sediments from Guaymas Basin, Gulf of California. *Deep Sea Research Part A Oceanographic Research Papers* 26: 879–891.
52. Futagami T, Morono Y, Terada T, Kaksanen AH, Inagaki F (2009) Dehalogenation Activities and Distribution of Reductive Dehalogenase Homologous Genes in Marine Subsurface Sediments. *Appl Environ Microbiol* 75: 6905–6909.
53. Roy R (2010) Short-term variability in halocarbons in relation to phytoplankton pigments in coastal waters of the central eastern Arabian Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 88: 311–321.
54. Löffler FE, Yan J, Ritalahti KM, Adrian L, Edwards EA, et al. (2012) Dehalococcoides mccartyi gen. nov., sp. nov., obligate organohalide-respiring anaerobic bacteria, relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, Dehalococcoidetes classis nov., within the phylum Chloroflexi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
55. Meng J, Xu J, Qin D, He Y, Xiao X, et al. (2013) Genetic and functional properties of uncultivated MCG archaea assessed by metagenome and gene expression analyses. *ISME J*.
56. Sowers KR, Ferry JG (1983) Isolation and Characterization of a Methylophilic Marine Methanogen, *Methanococcoides methylotens* gen. nov., sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 45: 684–690.
57. Parkes RJ, Cragg BA, Banning N, Brock F, Webster G, et al. (2007) Biogeochemistry and biodiversity of methane cycling in subsurface marine sediments (Skagerrak, Denmark). *Environ Microbiol* 9: 1146–1161.
58. Parkes RJ, Webster G, Cragg BA, Weightman AJ, Newberry CJ, et al. (2005) Deep sub-seafloor prokaryotes stimulated at interfaces over geological time. *Nature* 436: 390–394.
59. Leigh JA (2000) Nitrogen fixation in methanogens: the archaeal perspective. *Curr Issues Mol Biol* 2: 125–131.
60. Raymond J, Siefert JL, Staples CR, Blankenship RE (2004) The natural history of nitrogen fixation. *Molecular Biology and Evolution* 21: 541–554.
61. Dekas AE, Poretsky RS, Orphan VJ (2009) Deep-sea archaea fix and share nitrogen in methane-consuming microbial consortia. *Science* 326: 422–426.
62. Meyerdierks A, Kube M, Kostadinov I, Teeling H, Glockner FO, et al. (2010) Metagenome and mRNA expression analyses of anaerobic methanotrophic archaea of the ANME-1 group. *Environ Microbiol* 12: 422–439.
63. Roussel EG, Sauvadet A-L, Chaduteau C, Fouquet Y, Charlou J-L, et al. (2009) Archaeal communities associated with shallow to deep sub-seafloor sediments of the New Caledonia Basin. *Environ Microbiol* 11: 2446–2462.
64. Mussmann M, Brito I, Pitcher A, Sinnighe Damste JS, Hatzenpichler R, et al. (2011) Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express *amoA* but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 16771–16776.
65. Russ L, Kartal B, Op Den Camp HJM, Sollai M, Le Bruchee J, et al. (2013) Presence and diversity of anammox bacteria in cold hydrocarbon-rich seeps and hydrothermal vent sediments of the Guaymas Basin. *Frontiers in Microbiology* 4.

L'analyse des horizons sédimentaires profonds de la marge de Sonora a démontré la présence de communautés microbiennes différentes de celles détectées dans les premiers centimètres des sédiments associés aux tapis microbiens et aux assemblages faunistiques. En effet, les populations microbiennes détectées métaboliquement actives, semblent s'apparenter aux lignées microbiennes de sédiments de sub-surface (Parkes et al., 2000; Biddle et al., 2006; Inagaki et al., 2006), dont les écophysologies restent méconnues. Malgré la présence d'une zone de transition méthane/sulfate clairement identifiée 5 mètres sous le plancher océanique, les populations de méthanotrophes anaérobies, décrites précédemment, n'ont pas été observées. De même, les populations de méthanogènes des sédiments profonds n'ont pu être identifiées en dépit de la détection de taux d'activités de méthanogénèse significatifs. Ces résultats semblent donc indiquer l'existence de communautés microbiennes inconnues, ou identifiées mais dont les métabolismes sont non définis, capables de produire et d'oxyder le méthane en anaérobiose dans les sédiments marins profonds. Ces communautés méthanogènes et méthanotrophes pourraient échapper aux moyens de détection utilisés dans cette étude par l'utilisation d'une voie métabolique codée par des gènes à la séquence extrêmement dégénérée (Teske, 2006) ou totalement différente, telle que l'oxydation anaérobie du méthane couplée à la dénitrification, récemment décrite chez les bactéries du groupe NC10 (Ettwig et al., 2010). Un tel métabolisme couplant le cycle du méthane et le cycle de l'azote serait vraisemblable dans les sédiments profonds de la marge de Sonora, riches en composés azotés issus de la dégradation de la matière organique. En effet, le cycle de l'azote, dont de nombreux gènes (archéens et bactériens) ont été mis en évidence *via* l'utilisation de la technique de puce fonctionnelle semble être un cycle majeur dans les sédiments profonds de la marge de Sonora. Par ailleurs, cette technique a également permis d'émettre plusieurs hypothèses quant aux métabolismes et aux fonctions environnementales des microorganismes incultivés détectés. Ainsi la communauté bactérienne, fortement dominée par les bactéries vertes non sulfureuses (*Chloroflexi*) et divers groupes de candidates divisions, pourrait se développer grâce à la dégradation de molécules organiques complexes et réfractaires ainsi que par l'utilisation de substrats chlorés enfouis dans les sédiments, comme le suggère la détection, en importantes intensités, de gènes bactériens codant des enzymes impliquées dans les voies métaboliques de dégradation de la matière organique, des composés aromatiques et organochlorés (Bjornsson et al., 2002; Kragelund

et al., 2007; Yamada and Sekiguchi, 2009). De même, la communauté archéenne, largement dominée par les MBGB, MBGD et en moindre proportion MCG semble se développer *via* la dégradation de la matière organique réfractaire (Borrel et al., 2012; Kubo et al., 2012). Ces résultats apportent ainsi des premiers indices sur les métabolismes pouvant être mis en œuvre par les communautés microbiennes qui constituent la biosphère profonde.

V. DISCUSSION GENERALE

Ce travail de thèse avait pour but d'explorer pour la première fois les sédiments soumis à des migrations de fluides froids de la marge de Sonora afin d'identifier les communautés microbiennes présentes, ainsi que leurs rôles dans ces écosystèmes. De plus, il s'agissait également d'étudier et d'approfondir les mécanismes de production du méthane et de régulation de ses émissions au niveau des marges continentales. La diversité, l'abondance, la distribution et l'écophysioogie des communautés microbiennes métaboliquement actives dans les sédiments associés aux zones de suintements froids ont donc été étudiées et ont confirmé le caractère complexe des écosystèmes de marges continentales.

I. Diversité phylogénique et fonctionnelle des communautés microbiennes de la marge de Sonora

L'analyse microbiologique détaillée des sédiments de la marge de Sonora a mis en évidence la présence et l'activité métabolique de communautés bactériennes et archéennes diverses. Couplés aux mesures des gradients géochimiques sédimentaires, ces résultats ont permis d'émettre de nombreuses hypothèses quant à la distribution, au rôle et à l'organisation des différentes communautés microbiennes observées.

1) Les communautés bactériennes

Les quantifications de biomasse microbienne présente dans les sédiments associés à la zone de migration de fluides froids de la marge de Sonora ont démontré la prédominance des populations bactériennes sur les communautés archées (article 1). Cependant, différentes populations ont été détectées selon la profondeur d'enfouissement des échantillons. En effet, les échantillons de surface semblent principalement être colonisés par les bactéries phylogénétiquement affiliées aux *Proteobacteria* (article 2). Ces populations bactériennes, fréquemment observées dans les environnements riches en matière organique (sols, boues de stations d'épurations, composts ...) (Wagner et al., 1993), interviennent dans des processus microbiens extrêmement variés telles que la sulfoxydation, la sulfato-réduction, la dégradation de la matière organique sédimentée ou des hydrocarbures. Ainsi les *Epsilon-proteobacteria* (*Sulfurovum*) et les *Gamma-proteobacteria* (*Mariebeggiatoa*) ont été détectées en surface des sédiments associés aux sorties de

fluides froids. Ces populations bactériennes se développent au niveau de la zone de transition oxygène/anoxique du sédiment grâce à l'oxydation de sulfures contenus dans les fluides. Ces populations assurent ainsi un rôle de biofiltre limitant la libération des sulfures dans l'hydrosphère (Teske et al., 1999). Dans les horizons sédimentaires anoxiques sous-jacents (20 premiers centimètres), les communautés bactériennes semblent être dominées par les *Delta-proteobacteria*, impliquées dans la sulfato-réduction couplée à l'oxydation anaérobie du méthane ou d'autres hydrocarbures, ainsi que par d'autres familles de *Gamma-proteobacteria*, probablement également investies dans la dégradation des hydrocarbures (Head and Swannell, 1999). *A contrario*, très peu de *Proteobacteria* ont été détectées dans les horizons sédimentaires profonds (1-9 mbsf), qui apparaissent être colonisés par des bactéries phylogénétiquement affiliées aux *Chloroflexi* ou à divers groupes de Candidate Divisions (Article 3). Ces différences dans la structure des communautés microbiennes entre les horizons de surface et les couches de sédiments plus profondes peuvent être interprétées comme une dépendance des groupes microbiens à des intensités de fluides, une lithologie sédimentaire ou à des concentrations en substrats organiques particulières (Inagaki et al., 2003; Niemann et al., 2006; Durbin and Teske, 2011). La fonction écologique de ces bactéries reste méconnue. La détection, lors de ce travail de thèse, par puce fonctionnelle de nombreux gènes bactériens impliqués dans des processus de dégradation de la matière organique complexe, des composés aromatiques ou organochlorés suggérerait une voie métabolique basée sur l'utilisation de ces éléments. De tels composés, issus de la dégradation du phytoplancton (Roy, 2010) sont probablement abondants dans les sédiments marins de la marge de Sonora, alimentés par une importante neige marine. La prépondérance de ces populations bactériennes dans les sédiments profonds pourrait ainsi être expliquée par le rendement énergétique plus favorable de l'utilisation de ces composés par rapport à celui de la sulfato-réduction (Fetzner, 1998; Durbin and Teske, 2011). Ces résultats sont en accord avec la détection d'activités de déhalogénéation et des gènes de fonction associés, effectuée dans les sédiments de sub-surface de la marge du Pérou ou de la Mer du Japon présentant une diversité microbienne comparable à celle observée dans les sédiments profonds de la marge de Sonora (Futagami et al., 2009). La respiration de composés chlorés semble donc représenter une importante voie énergétique dans les sédiments marins. De même, le cycle de l'azote apparaît également comme un cycle biogéochimique important dans les sédiments profonds de la marge de Sonora. En effet, l'ensemble des gènes codant les

voies enzymatiques intervenant dans ce cycle a été détecté en forte intensité. Les composés azotés (ammonium, nitrates ou nitrites), probablement dérivés de la dégradation de la matière organique, se retrouvent en quantités importantes dans le sédiment (concentration en NH_4 atteignant 2500 $\mu\text{mol/L}$ sous 4.5 m de sédiments; Julie Le Bruchec EEP/LEP communication personnelle) et peuvent ainsi servir au métabolisme énergétique de populations microbiennes. Une fraction de la communauté bactérienne détectée doit donc vraisemblablement être impliquée dans des processus de dénitrification.

2) Les communautés archées

A l'instar de la communauté bactérienne, différentes populations d'archées ont été détectées selon la profondeur d'enfouissement des échantillons étudiés. En effet, les communautés d'archées métaboliquement actives des horizons sédimentaires superficiels associés aux sorties de fluides froids sont très majoritairement dominées par les archées méthanotrophes anaérobies (ANME-1, ANME-2 et ANME-3), impliquées dans le cycle du méthane mais dont le métabolisme précis est discuté dans ce travail (Article 1 ; cf paragraphe suivant). Ces populations d'ANME constituent un biofiltre essentiel pour la régulation des émissions de méthane (Knittel and Boetius, 2009). Cependant ces populations n'ont pas été détectées dans les sédiments profonds pourtant riches en sulfate et méthane et semblent donc être restreintes à des environnements de surface ou présentant des intensités de fluides importantes. D'autres archées, phylogénétiquement affiliées au DHVE-8 ont également été détectées, sans toutefois que leur activité métabolique (amplification de l'ARNr 16S) ait pu être confirmée. Ces archées pourraient être associées à la dégradation des hydrocarbures comme le suggère leur présence dans d'autres environnements marins riches en hydrocarbures (Lloyd et al., 2010b). Les communautés d'archées des sédiments profonds sont apparues composées principalement de membres appartenant aux groupes MBGB, MBGD et MCG, dont les métabolismes sont jusqu'à présent méconnus mais classiquement détectés dans les sédiments marins profonds de sub-surface (Parkes et al., 2000; Biddle et al., 2006; Inagaki et al., 2006) (Article 3). L'analyse de la diversité fonctionnelle, réalisée à l'aide de puce ADN (Geochip) a permis de formuler certaines hypothèses quant aux fonctions de ces groupes microbiens identifiés et leurs implications possibles dans les grands cycles biogéochimiques. En effet, la présence de gènes codant des enzymes de dégradation de la matière organique, phylogénétiquement affiliés à ces groupes archéens, indiquerait leur implication dans la

dégradation des particules organiques enfouies, tels que les vestiges du phytoplancton. De plus, les MBGD semblent également être capables de fixer le diazote alors que les MBGB et MCG posséderaient le gène *amoA*, codant l'enzyme impliquée dans son oxydation aérobie. Ces observations confirment ainsi l'importance écologique du cycle de l'azote dans les sédiments marins. Enfin, il est également intéressant de souligner la détection d'autres populations archéennes (MBGE et MBGA) dans les sédiments superficiels non influencés par les sorties de fluides de la marge de Sonora (Article 1). Ces populations, dont l'activité métabolique n'a pas pu être démontrée dans les sédiments, pourraient avoir un métabolisme extrêmement lent, ou provenir de la colonne d'eau comme les membres des MG-I, MG-II détectés en proportion importante (DeLong, 2006; Durbin and Teske, 2011).

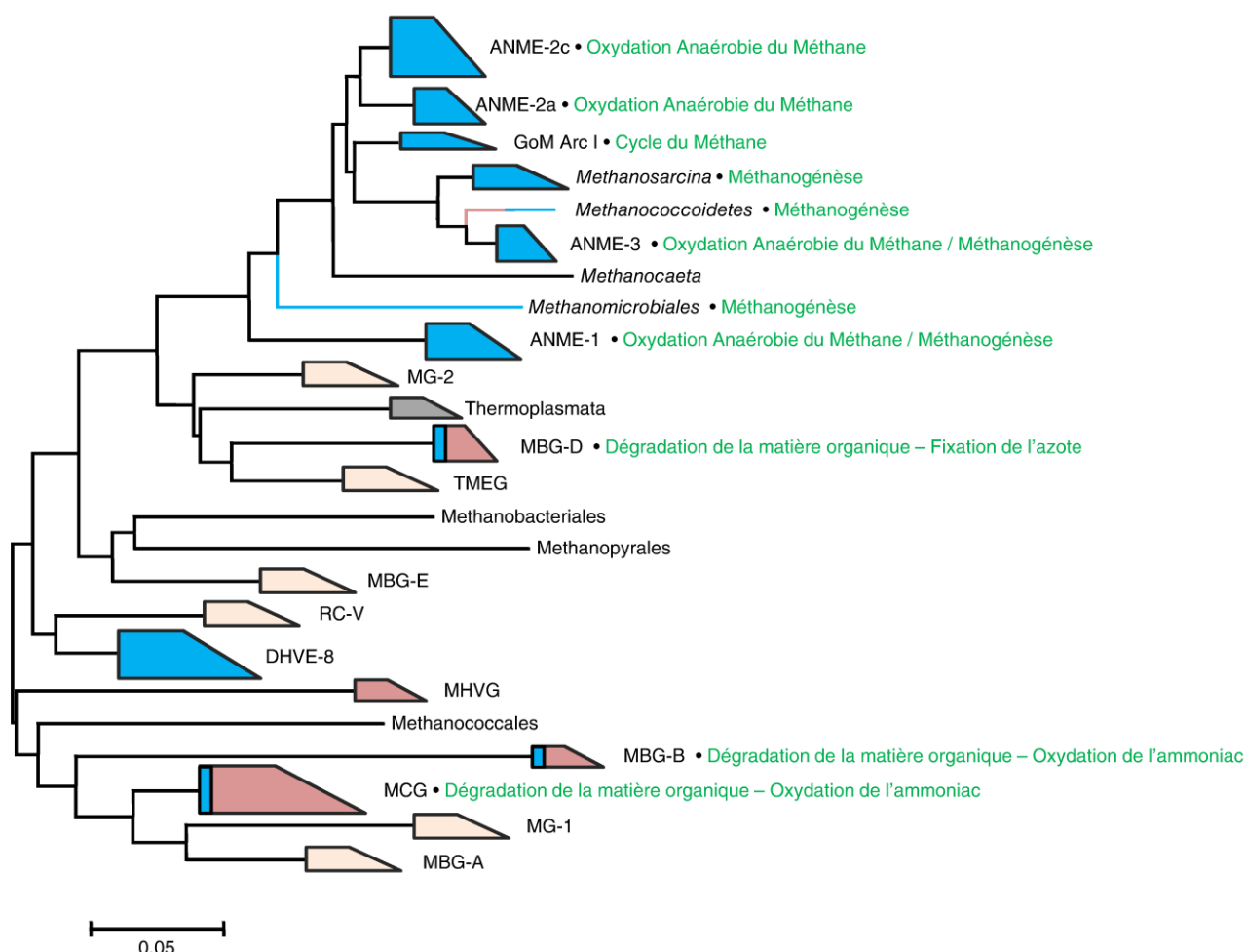


Figure 32 : Arbre phylogénétique, basé sur l'analyse de l'ARNr 16S, des communautés archées détectées dans les sédiments de la marge de Sonora. En bleu sont indiqués les groupes archéens détectés dans les sédiments de surface associés aux émissions de fluides froids, en rouge les groupes archéens détectés dans les sédiments profonds et en

rose les groupes archéens détectés dans les sédiments de surface non influencés par des sorties de fluides. Le métabolisme hypothétique des membres de ces groupes, supposé d'après l'étude de leur distribution, leur morphologie ou la détection de gènes de fonctions est indiqué en vert.

II. Le cycle du méthane, processus majeur dans les sédiments de la marge de Sonora

L'analyse de la diversité microbienne des sédiments de la marge de Sonora a confirmé l'importance du cycle du méthane dans les écosystèmes sédimentaires associés aux sorties de fluides froids. En effet, plusieurs populations archéennes et bactériennes, impliquées dans ce cycle biogéochimique essentiel à l'équilibre des écosystèmes, ont été identifiées et représentent une biomasse conséquente dans les sédiments de surface de la marge de Sonora.

1) Les acteurs microbiens et leurs métabolismes

a) Les méthanogènes

Différentes espèces de méthanogènes ont été détectées dans les sédiments de la marge de Sonora. Ces méthanogènes, principalement affiliées à la famille des *Methanococoides* au sein de l'ordre des *Methanosarcinales*, mais également à l'ordre des *Methanomicrobiales*, ont été quantifiées en faible abondance cellulaire (Article 1) et ont nécessité des étapes d'enrichissement en milieu spécifique pour parvenir à leur identification (Article complémentaire). La présence de ces populations de méthanogènes dans les sédiments de surfaces totalement prédominés par les populations d'ANME, semble être rendu possible grâce à l'utilisation de sources d'énergie différentes. En effet, les méthanogènes détectées utiliseraient soit des substrats dits non compétitifs, tels que les composés méthylés (Oremland and Polcin, 1982; Parkes et al., 2000), soit des substrats présents en abondance dans les sédiments tels que l'acétate (environ 40 μM dans l'ensemble des échantillons) ou le CO_2 libéré par les populations d'ANME et bénéficieraient ainsi d'une niche écologique particulière permettant leur développement dans les écosystèmes de marges continentales (Lazar, 2009).

b) Les ANME-1

Les trois lignées d'archées anaérobies méthanotrophes identifiées (ANME-1, ANME-2, ANME-3) ont été détectées dans les sédiments de surface de la marge de Sonora (Article 1). Cette cohabitation semble être possible grâce à des propriétés métaboliques et/ou à des associations interspécifiques différentes, créant ainsi des niches écologiques spécifiques. En effet, les ANME-1 ont été observées dans les horizons les plus profonds des échantillons de surface sans toutefois avoir été détectées dans les horizons sédimentaires dépassant le mètre de profondeur. La distribution des ANME-1 semble donc confirmer l'existence d'une niche écologique de surface strictement anaérobie et riche en composés réduits tels que les sulfures (Lloyd et al., 2011; Biddle et al., 2012). Les ANME-1 seraient mieux adaptées que les autres groupes méthanotrophes aux horizons les plus profonds des sédiments de surface, probablement appauvris en matière organique biodisponible. Cette indépendance vis-à-vis des apports de surface pourrait s'expliquer par la mise en œuvre d'un processus d'AOM, dissocié de partenaires bactériens sulfato-réducteurs qui sont eux-mêmes dépendant des apports de surface (sulfate). Les ANME-1, probablement moins compétitives que les ANME-2 dans les sédiments amendés en matière organique biodisponible et en sulfate, bénéficieraient ainsi d'une niche écologique exclusive dans les sédiments pauvres, non colonisables pour les ANMEs dont le métabolisme dépend strictement d'une association syntrophique. Le métabolisme énergétique des ANME-1 reste néanmoins complexe, la possibilité d'un passage d'un métabolisme de méthanotrophie à un processus de méthanogénèse n'est pas à exclure (Lloyd et al., 2011). De même, les ANME-1 sont également capables de former une association syntrophique avec des bactéries sulfato-réductrices affiliées au groupe *Desulfosarcina/Desulfococcus* (DSS) (Michaelis et al., 2002; Orphan et al., 2002). Néanmoins, cette association semble dépendre de la présence d'une concentration seuil élevée en sulfate, comme c'est le cas dans certains sédiments de surface particuliers, tels que l'habitat WM12 dans le cas de la marge de Sonora ou encore dans les édifices carbonatés de la Mer Noire (Michaelis et al., 2002; Treude et al., 2005), sujets à des arrivées de fluides advectifs riches en sulfate. Le caractère syntrophique des ANME-1, discuté dans de nombreuses études (Knittel et al., 2005; Lloyd et al., 2006; Lloyd et al., 2011; Yanagawa et al., 2011; Kleindienst et al., 2012) pourrait donc être dépendant de la concentration en sulfate dans l'environnement. Ainsi, dans le cas où le sulfate est limitant, les ANME-1 utiliseraient une voie métabolique non syntrophique (AOM ou

méthanogénèse), indépendante des partenaires bactériens sulfato-réducteurs. Inversement, quand les concentrations en sulfate sont non limitantes, les ANME-1 pourraient s'associer aux SRB et coexister avec les agrégats d'ANME-2. Seules les bactéries affiliées aux DSS ont été détectées en partenariat avec les ANME-1. Ces bactéries présentent une distribution dans les sédiments compatible avec celle des ANME-1, permettant ainsi une interaction, et semblent nécessiter de plus faibles concentrations en sulfate et être moins dépendantes des apports de surface (matière organique fraîche, sulfate) que les bactéries sulfato-réductrices appartenant au genre *Desulfobulbus*.

c) Les ANME-2

Les ANME-2a et ANME-2c représentent les populations archéennes dominantes dans les sédiments de surface de la marge de Sonora. Les ANME-2a présentent une distribution similaire à celle des ANME-2c, mais en concentrations nettement inférieures. Cette distribution similaire pourrait être due à l'utilisation de voies métaboliques semblables pour ces deux groupes d'ANME phylogénétiquement très proches. Les ANME-2, impliquées dans l'oxydation anaérobie du méthane (Knittel et al., 2005; Orcutt and Meile, 2008; Schreiber et al., 2010), ont présenté un métabolisme syntrophe obligatoire. Leur distribution semble donc dépendante de la présence de partenaires bactériens sulfato-réducteurs. La présence et l'activité métabolique des agrégats d'ANME-2/SRB ont été observées en surface des sédiments colonisés par des communautés de gastéropodes et de vers tubicoles. Cette activité au niveau de la zone de transition oxic/anoxique des sédiments suggérerait une certaine tolérance des ANME-2 vis-à-vis de faibles concentrations en oxygène. Les bactéries sulfato-réductrices pourraient également protéger les ANME-2 de la présence d'oxygène dissous par leurs mécanismes enzymatiques de détoxification (Dolla et al., 2006) ou encore par la production de la matrice organique extracellulaire enveloppant les agrégats (Article 2). *A contrario*, les agrégats d'ANME-2 n'ont pas été retrouvés, ou seulement en très faible quantité, dans les sédiments de surface colonisés par les tapis microbiens. Cela suggère un antagonisme entre le tapis microbien et les ANME-2 ou, plus vraisemblablement avec leurs partenaires bactériens, ce qui entraînerait un décalage de leur niche écologique plus en profondeur dans les sédiments. Les ANME-2a et ANME-2c s'associant tous deux avec les bactéries sulfato-réductrices DSS, une compétition entre les deux groupes pourrait exister pour le recrutement de leurs partenaires bactériens. La différence d'abondance entre les ANME-2a

et les ANME-2c pourrait ainsi être expliquée par le recrutement de partenaires bactériens supplémentaires (DBB) pour les ANME-2c. Cette possibilité de recruter une plus grande diversité phylogénétique de partenaires bactériens leur permettrait ainsi d'étendre leur niche écologique et de bénéficier de conditions de croissance avantageuses. Les ANME-2a, qui semblent restreindre leurs partenariats bactériens aux DSS en agrégats mélangés (*ie.* non concentriques), sont ainsi désavantagées par rapport aux ANME-2c et se retrouvent donc en minorité dans les sédiments. Cependant, le mode d'association en mélange des ANME-2a, théoriquement plus efficace pour les échanges métaboliques, pourrait d'une certaine manière compenser la spécificité des partenaires bactériens et permettre une cohabitation des deux sous-groupes d'ANME-2 dans les mêmes horizons sédimentaires.

d) Les ANME-3

Les ANME-3, détectées sans partenaire bactérien, en minorité et métaboliquement actives dans les sédiments sous-jacents les premiers centimètres de sédiment de la marge de Sonora sont encore très peu étudiées. Aucun indice dans notre étude (Article 1) n'a permis de valider l'implication des ANME-3 dans l'oxydation anaérobie du méthane, qui avait auparavant été supposée après l'observation de leur association avec des bactéries sulfato-réductrices DBB dans les sédiments du volcan de boue Haakon Mosby, sur la marge continentale norvégienne (Losekann et al., 2007). La localisation particulière (4-8 cmbsf) des ANME-3 dans les sédiments laisserait plutôt suggérer une implication dans d'autres processus métaboliques tels que l'utilisation de composés secondaires libérés par les communautés microbiennes de surface ou des premiers horizons sédimentaires. La très forte proximité phylogénétique des ANME-3 avec les méthanogènes méthylotrophes de la famille *Methanococcoidetes* pourrait laisser supposer un métabolisme de méthanogénèse proche de celui des *Methanococcoïdes*, basé sur l'utilisation de substrats non compétitifs tels que des composés méthylés, issus d'une première dégradation de la matière organique sédimentée (Sowers and Ferry, 1983). Cependant, un métabolisme d'oxydation du méthane indépendant de bactéries sulfato-réductrices, ou un shift métabolique à l'instar de celui supposé pour les ANME-1 restent toutefois possibles et permettraient ainsi la coexistence de ces différentes lignées d'ANME.

e) *De nouveaux acteurs archéens ?*

De nouveaux groupes archéens émergent suite à l'étude de zones d'émissions de fluides froids jusqu'à présent inexplorées. Ce fut le cas pour les archées membres du groupe Gom Arc I, détectées dans le Golfe du Mexique (Mills et al., 2004), le Golfe de Cadix (Maignien et al., 2011) et également dans les sédiments de la marge de Sonora. L'appartenance phylogénétique de ces archées au groupe des *Methanosarcinales*, suggèrerait un rôle dans le cycle du méthane (méthanogénèse ou méthanotrophie anaérobie), ce qui reste toutefois à confirmer. C'est également le cas pour le groupe d'"ANME-2Sonora", proposé au cours de ce travail (Article 1) après la détection de séquences génétiques inédites. Ce groupe, phylogénétiquement affilié aux ANME-2 mais distinct des ANME-2c et ANME-2a, pourrait constituer une nouvelle lignée de méthanotrophes anaérobies. Les séquences apparentées à cet embranchement ont été détectées dans les sédiments riches en sulfates, suggérant que les membres des ANME-2Sonora nécessiteraient de fortes concentrations en sulfate pour se développer. La présence de sulfate en concentrations non limitantes pourrait favoriser le développement de populations d'ANMEs minoritaires, au métabolisme plus lent, et ainsi permettre leur détection par les outils moléculaires.

f) *Les partenaires bactériens de l'AOM*

A l'heure actuelle, quatre groupes de bactéries sulfato-réductrices ont été décrits en association syntrophique avec des ANMEs : les membres des groupes SEEP SRB1a de la famille des *Desulfosarcina/Desulfococcus* (Knittel et al., 2005), SEEP SRB2 (Kleindienst et al., 2012), et deux groupes de *Desulfobulbus* (Losekann et al., 2007). Sur les trois groupes (SEEP SRB1a, SEEP SRB2 et DBB) dont l'activité métabolique a été détectée dans les sédiments de la marge de Sonora, seulement deux (DSS et DBB) ont été observés en partenariat physique avec les ANMEs (Article 2). L'implication de membres d'autres groupes bactériens tels que les *Alpha-Proteobacteria* ou les *Beta-Proteobacteria* (Pernthaler et al., 2008) ou encore les Candidates Divisions JS1 (Harrison et al., 2009) n'a pas pu être démontrée. Il semble donc que, dans les sédiments de la marge de Sonora, l'oxydation anaérobie du méthane ne soit couplée qu'avec la sulfato-réduction. Cette hypothèse se confirme dans les sédiments de l'habitat WM12 où les flux de fluides enrichis en sulfate favoriseraient le développement des communautés bactériennes sulfato-réductrices dans les sédiments, ce qui entraînerait une abondance cellulaire élevée des

communautés archéennes ANME associées. Les bactéries, affiliées au groupe *Desulfosarcina/Desulfococcus* et probablement plus précisément au sous-groupe SEEP SRB1a (Schreiber et al., 2010), ont été observées en association avec les ANME-2a, ANME-2c et enfin ANME-1 dans les sédiments profonds riches en sulfate. Les bactéries DSS ont été quantifiées en concentrations importantes dans les échantillons de sédiments superficiels à l'exception des horizons en contact avec les tapis microbiens. Cette distribution suggère d'une part, une compétition avec les bactéries du tapis microbiens, probablement pour des ressources de surface tel que l'acétate ou une sensibilité à des composés antimicrobiens produits par les bactéries contenues dans le tapis bactérien. D'autre part cela indique également que les bactéries du groupe DSS pourraient nécessiter de plus faibles concentration en sulfate, ou qu'elles puissent utiliser le soufre élémentaire probablement disponible dans les sédiments (Jørgensen and Bak, 1991). Il faut toutefois souligner que la quantification des DSS, réalisée lors de ce travail, prend en compte les populations de SRB associées aux ANMEs (SEEP SRB1a) mais également les sous-groupes de DSS libres dans l'environnement dont le métabolisme est probablement indépendant de l'AOM (Dhillon et al., 2003; Kleindienst et al., 2012). Ainsi la population de DSS, observée dans les sédiments les plus profonds de l'habitat colonisé par la macrofaune, correspond à un sous-groupe de DSS (SEEP SRB1b) dont les membres ne sont pas impliqués dans l'AOM mais probablement dans la dégradation d'hydrocarbures (Schreiber et al., 2010; Kleindienst et al., 2012).

Les bactéries affiliées au genre *Desulfobulbus* (DBB) ont été observées exclusivement en association avec les ANME-2c. La distribution des DBB, au niveau des sédiments de la marge de Sonora, présente un profil différent des DSS. En l'absence de tapis microbien, les DBB, et donc les consortia d'AOM ANME2c/DBB, colonisent les sédiments de surface. En revanche, la présence de tapis microbien déplacerait significativement ces populations plus en profondeur. Cela confirmerait l'existence d'un antagonisme entre les bactéries composant le tapis de surface et les bactéries associées aux ANMEs. Cet antagonisme pourrait être dû à une compétition pour un même substrat tel que l'acétate, potentielle source de carbone pour les SRB et *Beggiatoa* (Burton et al., 1966; Sørensen et al., 1981) ou par la production de composés toxiques dans l'environnement. Cette distribution spécifique des membres des DBB, différente de celle des membres des DSS, permet ainsi aux ANME-2c de dominer les populations archées dans les sédiments riches en sulfate.

g) Les acteurs inconnus des horizons sédimentaires profonds

En complément des sédiments de surface, échantillonnés au niveau de la zone de sortie de fluides, des couches sédimentaires plus profondes ont été prélevées, afin d'accéder à la diversité fonctionnelle et phylogénique microbienne présente dans les horizons sédimentaires sous-jacent aux zones d'émissions de fluides froids (Article 3). Les profils géochimiques ont permis d'identifier clairement une zone de transition méthane / sulfate enfouie dans les sédiments (4-5 mbsf). Cependant, aucune communauté microbienne connue pour être impliquée dans le cycle du méthane n'a été détectée. Seule une petite fraction d'organismes méthanogènes a été retrouvée dans les horizons supérieurs du prélèvement malgré des mesures d'activités de méthanogénèse acétoclastique et méthylotrophique dans les couches sédimentaires les plus profondes. Les résultats obtenus lors de cette étude ont donc souligné la présence de communautés microbiennes méthanogènes en profondeur et méthanotrophes au niveau de la zone de transition méthane sulfate, inconnues ou indétectables par les techniques mises en œuvre dans les sédiments profonds de la marge de Sonora. Certaines populations archéennes, telles que les SAGMEG, détectées métaboliquement actives uniquement dans ces horizons sédimentaires (Article 3) et fréquemment observées dans les environnements profonds riches en méthane (sédiments riches en hydrates de méthane de la Mer d'Okhotsk par exemple (Inagaki et al., 2003)) pourraient être impliquées dans la production de méthane. La méthanogénèse et l'oxydation anaérobie du méthane ont longtemps été considérées comme des processus réalisés exclusivement par des populations archéennes. Cependant la découverte récente de bactéries capables de l'oxydation anaérobie du méthane couplée à la dénitrification (Ettwig et al., 2010) ouvre de nouveau ce débat. En effet, il pourrait être envisageable que les membres de certains groupes bactériens incultivés, comme il en a été détecté dans les sédiments profonds de la marge de Sonora, puisse être impliqués dans la production ou l'oxydation anaérobie du méthane et que ces processus ne soient pas limités aux populations archées dans ce type d'écosystème.

2) L'agrégat, organe complexe de l'AOM

Parmi l'ensemble des communautés microbiennes impliquées dans le cycle du méthane, les ANME-2 sont apparues comme largement majoritaires dans les sédiments

riches en sulfate et en méthane de la marge de Sonora. Ces ANMEs ont été détectées exclusivement en consortia avec des bactéries sulfato-réductrices (Article 2). Ces agrégats ANME/SRB présentent des morphologies complexes et variées et très peu de connaissances sont disponibles concernant le fonctionnement précis de ces structures complexes. Si l'organisation en mélange des ANME-2a/DSS semble être fixe dans les environnements de suintements froids (Knittel et al., 2005; Schreiber et al., 2010), les consortia ANME-2c présentent des architectures variables (Article 2). Cependant, la distinction entre une architecture d'agrégats complexe, composée de multiples "noyaux" d'ANMEs et l'agglutination de petits agrégats dans une même matrice reste difficile. L'organisation spatiale des agrégats, théoriquement importante pour les échanges interspécifiques intervenant dans le processus d'AOM, pourrait être dépendante de l'affiliation phylogénétique des groupes bactériens ou archéens considérés. L'observation d'agrégats d'ANME-2c sphériques, avec une organisation concentrique des populations microbiennes, à la fois avec des partenaires bactériens affiliés aux DSS et DBB suggérerait toutefois que la distinction taxinomique se situe à un niveau inférieur à celui du groupe ANME-2c. En effet, le groupe des ANME-2c, comme celui des DSS, présente une diversité intra-spécifique importante. La morphologie des agrégats d'AOM pourrait alors être une combinaison entre les différentes lignées d'ANME-2c et de partenaires bactériens. Cette hypothèse reste toutefois à démontrer expérimentalement notamment par la construction de sondes spécifiques des différents embranchements phylogénétiques internes aux groupes ANME-2c et DSS. Au même titre que la morphologie des agrégats, le contrôle des partenaires bactériens ainsi que le transfert des électrons, de protons ou de substrats carbonés abordés lors de ce travail, restent des points obscurs dans le processus d'AOM syntrophique (Stams and Plugge, 2009). L'exclusivité de partenaire observée au sein d'un agrégat donné, le maintien de cette fidélité d'association et l'architecture des consortia, suggèreraient la présence de mécanismes de reconnaissance et de communication cellulaire entre les acteurs de l'AOM. Ces mécanismes de communication sont probablement différents selon les espèces d'ANMEs. En effet, l'architecture en mélange des agrégats d'ANME-2a indiquerait une communication de type cellule-cellule, impliquant probablement des protéines extracellulaires et membranaires (Bassler and Losick, 2006). En revanche, la structure des agrégats d'ANME-2c, typiquement un ou plusieurs "noyaux" d'ANMEs entourés des partenaires bactériens, suggèrerait un mécanisme différent, probablement basé sur l'émission de signaux. Ces signaux, chimiques ou peptidiques,

maintiendraient une certaine distance, visible par microscopie, entre les cellules d'ANME-2c et leurs partenaires. Cette communication interspécifique, à la manière du quorum sensing dans les biofilms microbiens, pourrait réguler des processus microbiens tels que la fixation du diazote, énergétiquement coûteuse, son transfert des ANMEs aux SRB (Dekas et al., 2009), ou encore l'induction de la production de la matrice extracellulaire observée par microscopie électronique. Cette matrice organique, entourant les agrégats, pourrait être impliquée dans les transferts d'électrons extracellulaires en connectant les cellules, ou dans la résistance aux stress environnementaux tels que la présence d'oxygène ou de flux de fluides importants, en formant des micro niches favorables. Elle pourrait également intervenir dans la régulation des associations ANME/SRB. En effet, à l'instar des biofilms bactériens, cette matrice pourrait être produite après l'association initiale des partenaires microbiens, et empêcherait alors, de part le cloisonnement de l'agrégat, l'arrivée de partenaires bactériens phylogénétiquement différents au sein du consortium. Cette barrière physique pourrait ainsi expliquer le caractère exclusif de l'association. L'ensemble de ces observations, reporté sur le schéma ci-dessous, ouvre de nouvelles voies de recherche pour accéder au fonctionnement de ces consortia, considérés parfois comme les ancêtres des cellules eucaryotes (Moreira and López-García, 1998).

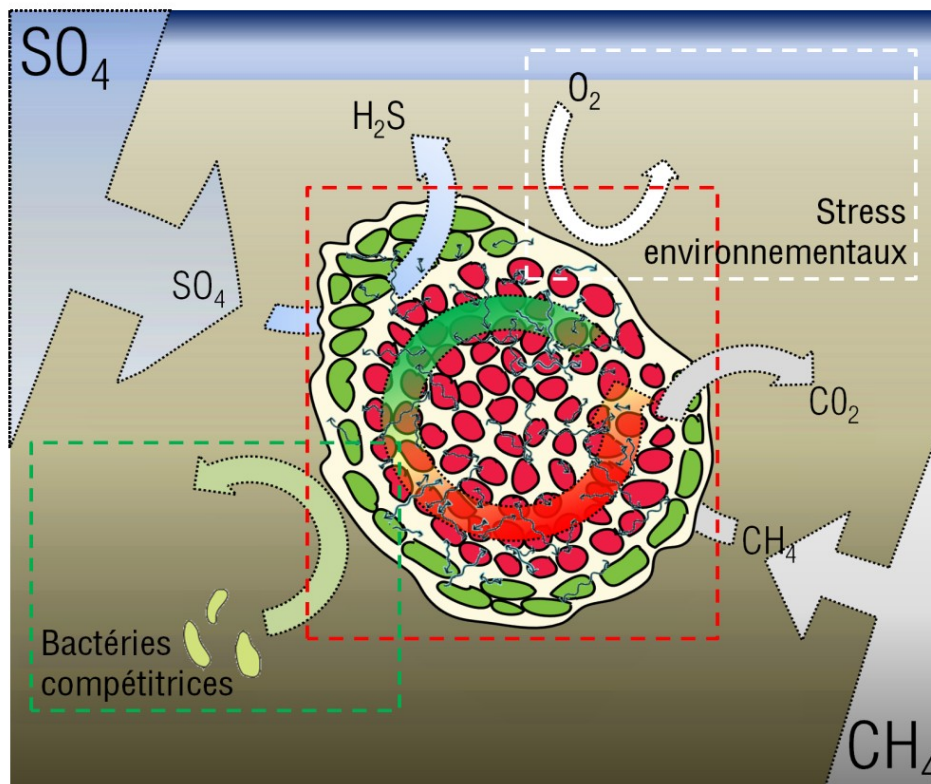


Figure 33 : Schéma hypothétique des interactions probables au sein des consortia d'AOM et des rôles possibles de la matrice extracellulaire. En encadré rouge, le processus d'AOM par les ANME (rouge) et les bactéries sulfato-réductrices (vert). La croissance des cellules s'effectue à l'intérieur de la matrice organique, celle-ci favorisant la communication et les échanges interspécifiques (flèches noires) et protégeant les cellules des stress environnementaux tels que la présence d'oxygène (encadré blanc). La matrice extracellulaire pourrait également avoir un rôle dans l'exclusivité du partenaire lors de l'interaction (encadré vert) en cloisonnant le consortium.

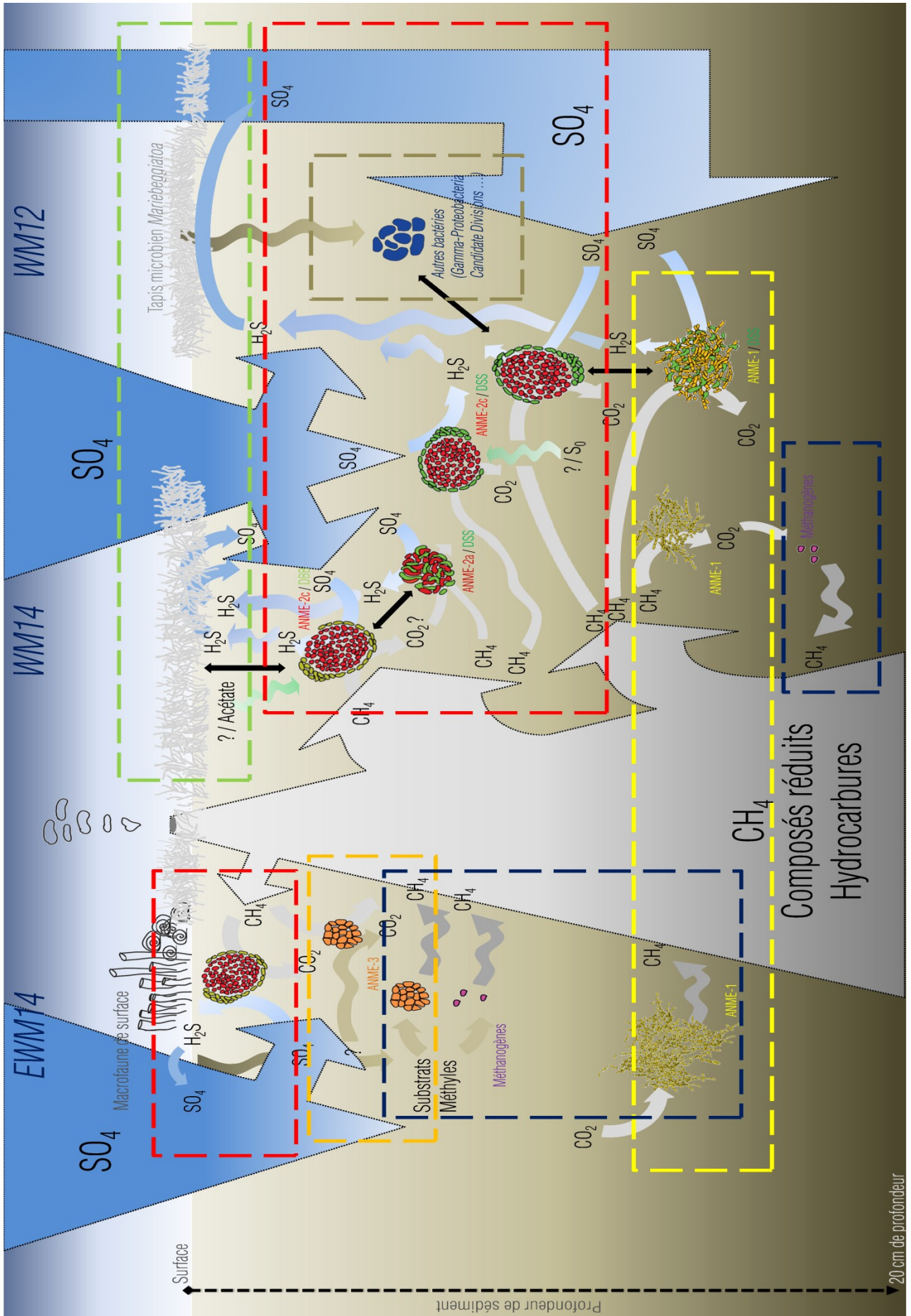
3) Facteurs environnementaux influençant le cycle du méthane dans les sédiments de surface de la marge de Sonora

Différents paramètres environnementaux semblent influencer la distribution et l'écophysiologie des microorganismes impliqués dans le cycle du méthane. Il apparaît tout d'abord que certains paramètres physico-chimiques divergents entre les sédiments de surface et les sédiments profonds, tels que la lithologie du sédiment, les intensités de fluides ou la biodisponibilité et la qualité de la matière organique soient des facteurs essentiels permettant le développement de communautés microbiennes différentes entre ces deux écosystèmes. Au niveau des sédiments de surface associés aux migrations de fluides froids, les principaux facteurs identifiés au cours de ce travail de thèse ont été dans

un premier temps la concentration en sulfate et les interactions avec les communautés microbiennes ou animales environnantes. En effet, le métabolisme des ANME-1 ainsi que la distribution verticale et la densité cellulaire des ANME-2 semblent être en grande partie dépendantes de la teneur en sulfate dans les sédiments. Cette dépendance provient certainement de leur association syntrophique avec les bactéries sulfato-réductrices. La distribution des populations d'ANME-2 dans les sédiments serait donc contrôlée par la présence dans les sédiments de ces bactéries et de leurs substrats énergétiques mais également par la présence et/ou l'activité d'autres microorganismes. En effet, les bactéries constituant le tapis microbiens ont présenté un antagonisme avec les consortia d'AOM, contraignant les ANMEs et SRB à des horizons sédimentaires plus profonds. De même, d'autres bactéries, telles que les *Gamma-proteobacteria*, doivent influencer les communautés du cycle du méthane par la libération de métabolites secondaires ou de produits de dégradations. D'autres paramètres environnementaux, tels que la teneur en oxygène dissous, généralement considéré comme facteur important dans la distribution des communautés d'ANME (Yanagawa et al., 2011), ou encore la qualité et la quantité de matière organique biodisponible dans les sédiments, doivent également jouer un rôle important dans la composition de l'écosystème. La prise en compte de l'ensemble de ces paramètres et des résultats obtenus dans ce travail de thèse permet de proposer le modèle théorique ci-dessous de distribution des communautés méthanogènes, des ANMEs et de leurs partenaires bactériens respectifs ainsi que de leurs métabolismes présumés dans les sédiments de surface associés aux zones d'émissions de fluides froids de la marge de Sonora.

Figure 34 : Schéma hypothétique, récapitulatif des processus microbiens associés à l'AOM identifiés à partir des échantillons de sédiments de surface associés aux migrations de fluides froids de la marge de Sonora. En encadrés bleu sont proposés les processus de méthanogénèse possibles ; en rouge, orange et jaune, la localisation des groupes d'ANMEs détectés (ANME-1 en jaune, ANME-2 en rouge et ANME-3 en orange) ; en vert le processus de sulfo-oxydation au niveau des tapis bactériens de surface et en marron celui de la diagénèse précoce. Les doubles flèches noires indiquent la présence probable d'une interaction ou d'une compétition entre les microorganismes. Les flèches grises représentent les migrations de fluide enrichi en méthane. Les flèches bleues correspondent aux diffusions de sulfate et les marrons aux flux présumés de matière organique.





VI. BILAN ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse d'écologie microbienne des écosystèmes de suintements froids des marges continentales apporte donc de nouvelles connaissances ainsi que de nouveaux outils moléculaires pour l'exploration et la compréhension des cycles biogéochimiques et des communautés microbiennes des sédiments marins.

D'un point de vue méthodologique, une gamme d'amorces de Q-PCR a été créée, ciblant les communautés microbiennes impliquées dans le cycle du méthane (méthanogènes, ANMEs et bactéries sulfato-réductrices) ainsi que d'autres communautés microbiennes des écosystèmes marins (JS1, MBGB, MBGD). Ces amorces permettent la quantification de ces populations ainsi que l'observation de leur distribution dans les sédiments, reflet de leur niche écologique et indicateur de leur métabolisme. Par ailleurs, l'utilisation de la technique de puce ADN fonctionnelle est également apparue comme une approche intéressante pour l'étude des communautés microbiennes incultivées, en permettant la détection de la présence de gènes codant des fonctions insoupçonnées dans ce type d'écosystème.

L'exploration des sédiments de surface de la marge de Sonora a permis d'approfondir notre connaissance de la diversité microbienne présente dans les écosystèmes sédimentaires associés aux sorties de fluides froids des marges continentales. Les résultats obtenus ont confirmé d'une part la relativement faible abondance des communautés méthanogènes malgré leur rôle écologique significatif. D'autre part, l'observation de la diversité microbienne a élargi la liste des protagonistes supposés pour l'oxydation anaérobie du méthane avec la découverte du nouveau groupe d'"ANME-2Sonora" et la confirmation de l'émergence du groupe des GoM Arc I. Cependant, cette étude remet aussi en cause les observations publiées dans des études antérieures, notamment concernant le rôle métabolique des lignées d'ANME-1 et/ou d'ANME-3 dans l'oxydation anaérobie du méthane. Ce travail de thèse a également permis d'observer avec précision l'abondance et la distribution des acteurs métaboliques clés du cycle du méthane en fonction de la profondeur d'enfouissement, révélant des différences de niches écologiques et donc de métabolismes pour des microorganismes à la fonction écologique supposée similaire. De même, des différences de fidélité des partenaires et d'organisation spatiale dans les consortia d'AOM ont été observées selon les groupes d'ANME et de SRB considérés. Cela suggérerait l'existence de systèmes de communication cellulaires interspécifiques et de

processus d'AOM probablement légèrement différents entre les groupes d'ANME. Ces différences pourraient permettre la cohabitation des groupes d'ANMEs dans les sédiments, probablement essentielle pour assurer un équilibre et un rôle de biofiltre efficace du méthane dans un écosystème aux conditions environnementales dynamiques.

Le modèle proposé dans ce travail de thèse (Figure 34) doit être confronté à d'autres échantillons d'environnements similaires de suintements froids. Les interactions entre ANMEs et bactéries, le transfert de composés, d'électrons et de signaux d'échanges ou encore la mise en place de l'interaction restent fortement méconnus et nécessiteraient de nouvelles études, notamment avec le suivi de substrats isotopiques au sein des agrégats (SIP) couplé avec l'imagerie haute résolution (NanoSims), la recherche de gènes impliqués dans les transferts extracellulaires ou encore la création de sondes FISH spécifiques des sous groupes d'ANME-2c ou de Gom Arc I et ANME-2Sonora.

Par ailleurs, le métabolisme des ANME-1 et ANME-3 nécessite d'être approfondi. Si ces organismes semblent pouvoir se développer indépendamment de bactéries sous certaines conditions environnementales, un effort de mise en culture de ces organismes pourrait aboutir à leur isolement. Une approche de métagénomique ou métatranscriptomique comparative entre les ANME-1 ou -3 avec leurs partenaires respectifs et les ANME-1 ou -3 sans partenaire pourrait également aider à la compréhension de leur métabolisme respectif.

La surprenante diversité fonctionnelle et taxinomique microbienne au sein des sédiments profonds apporte également de nouveaux éléments. En effet, cette étude fournit des indices sur les métabolismes possibles de nombreuses lignées microbiennes incultivées à la fonction écologique jusqu'à présent inconnue. Cela engendre également de nouvelles interrogations: i) Quelles sont les communautés méthanogènes profondes dont l'activité a été détectée ? ii) Quels sont les microorganismes impliqués dans la consommation du méthane dans ces écosystèmes ? iii) Quelles sont les sources d'énergie et de carbone des microorganismes détectés? De même, des gènes codant des enzymes impliquées dans des processus tels que l'oxydation de l'ammonium ou la réduction du sulfate par les archées ont été détectés mais aucune population connue pour réaliser ces fonctions dans ces environnements n'a été identifiée. Quelles populations microbiennes assurent ces fonctions? La recherche des gènes spécifiques codant les enzymes impliquées dans ces fonctions puis la visualisation des communautés microbiennes impliquées par la technique

de MAR-FISH (FISH sur ARNm) pourraient apporter de premiers éléments de réponse. L'isolement de ces communautés par micromanipulation ou cytométrie (FACS-FISH) pourrait enfin aboutir à leur identification et à l'analyse de leur métabolisme.

La similarité des communautés microbiennes observées avec celles des sédiments marins profonds étend ces questions à l'échelle des sédiments marins globaux qui semblent ainsi héberger des communautés microbiennes très diverses, aux métabolismes fondamentaux pour le fonctionnement des cycles biogéochimiques, et encore inexplorés.

This microbiological ecology thesis of cold seep ecosystems from continental margins provides new knowledge and molecular tools for the exploration and understanding of marine sediment biogeochemical cycles and microbial communities.

From a methodological point of view, a whole primer set for Q-PCR, targeting the microbial communities involved in the methane cycle (methanogens, ANME, SRB), as well as other uncultured marine lineages (JS1, MBGB, MBGD) was designed and optimized for the quantification of these populations and the observation of their vertical distributions through the sediments, reflecting their ecological niches and providing clues on their metabolisms. The Geochip functional microarray, by highlighting the presence of unsuspected functional genes in marine sediments, has also emerged as an attractive alternative approach for the study of uncultivated microbial communities.

The exploration of the shallow sediments of the Sonora Margin broadened our knowledge on the diversity of microbial communities. First, the methanogenic communities were confirmed as a minority in the microbial population despite their important ecological role. Secondly, the list of microorganisms expected to be involved in anaerobic oxidation of methane was extended with the discovery of the new ANME2-Sonora group and the confirmation of the emerging group of GoM Arc I in cold seep environments. However, this study also questions the previous observations, particularly regarding the metabolic role of ANME-1 and ANME-3 in anaerobic oxidation of methane. This thesis also allows the precise observation of the abundance and the vertical distribution of the different species involved in methane cycle, revealing differences in ecological niches and therefore in metabolism for microorganisms with similar ecological function. Moreover, differences in specificity of associations were observed between bacterial and archaeal AOM actors. These differences in the distribution and in the aggregation behavior, suggesting interspecific cell communications and a probably slightly different AOM process would allow the cohabitation of the ANMEs and be essential for the balance of the ecosystem and the role of efficient methane biofilter.

For purpose, the model proposed in this work must be confronted to other cold seep environment samples. Interactions between *Bacteria* and ANMEs, transfers of compounds, electrons or signal exchanges between both partners, or the setting up of the syntrophic relationship remain highly unknown and require further study. Experiments with radiotracers

substrates (SIP) coupled with high resolution imaging (NanoSims) or the study of genes involved in communications or extracellular transfers would be interesting to follow the metabolic transfers inside the aggregates. Likewise, design of specific probes for ANME-2c subgroups, Gom Arc I or ANME2Sonora would be required.

Elsewhere, the metabolism of ANME-1 and ANME-3 remains misunderstood, as these organisms were able to grow independently of bacteria according to environmental conditions, a cultivation work could lead to the isolation of these populations. Likewise, a comparative metagenomic or metatranscriptomic approach between ANME-1/-3 with partners and ANME-1/-3 without partners could also lead to interesting perspectives on their respective metabolisms.

The surprising taxonomic and functional microbial diversity in deepest sediments of the Sonora Margin also provides new evidences. Indeed, this study provides clues on the metabolism of various microbial uncultured lineages with ecological functions heretofore unknown. However, this also generates other questions : i) Which are the methanogenic populations in the deepest sediment horizons? ii) Which microorganisms are involved in anaerobic oxidation of methane? iii) What are the exact energy and carbon sources for the detected microorganisms? Likewise, other global questions remain. Genes encoding enzymes involved in environmental processes such as bacterial ammonium oxidation or archaeal sulfate reduction were detected but no population known to be involved in such processes was identified. Which microbial populations perform these functions? The amplification and sequencing of genes encoding the enzymatic complexes involved in these functions, then the visualization of the corresponding microbial populations by using the MAR-FISH technique (FISH on mRNA) could provide the first clues. The isolation of these communities by using micromanipulation or cytometry (FACS-FISH) could finally lead to their identification and the analysis of their metabolism.

The similarity of microbial communities observed both in the Sonora Margin deepest sediments and in the deep marine sediments extends these issues at the level of the whole marine sediments that therefore appear to contain an important metabolic potential still unexplored.

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aakra, A., Utaker, J.B., and Nes, I.F. (2001a) Comparative phylogeny of the ammonia monooxygenase subunit A and 16S rRNA genes of ammonia-oxidizing bacteria. *Fems Microbiology Letters* **205**: 237-242.
- Aakra, A., Utaker, J.B., Pommerening-Roser, A., Koops, H.P., and Nes, I.F. (2001b) Detailed phylogeny of ammonia-oxidizing bacteria determined by rDNA sequences and DNA homology values. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 2021-2030.
- Ahmadian, A., Ehn, M., and Hober, S. (2006) Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta* **363**: 83-94.
- Alain, K., and Querellou, J. (2009) Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles* **13**: 583-594.
- Alonso-Sáez, L., Waller, A.S., Mende, D.R., Bakker, K., Farnelid, H., Yager, P.L. et al. (2012) Role for urea in nitrification by polar marine Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 17989-17994.
- Bannert, A., Kleinedam, K., Wissing, L., Mueller-Niggemann, C., Vogelsang, V., Welzl, G. et al. (2011) Changes in Diversity and Functional Gene Abundances of Microbial Communities Involved in Nitrogen Fixation, Nitrification, and Denitrification in a Tidal Wetland versus Paddy Soils Cultivated for Different Time Periods. *Appl Environ Microbiol* **77**: 6109-6116.
- Baross, J.A., and Hoffman, S.E. (1985) Submarine Hydrothermal Vents and Associated Gradient Environments as Sites for the Origin and Evolution of Life. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **15**: 327-345.
- Barton, L.L., and Fauque, G.D. (2009) Chapter 2 Biochemistry, Physiology and Biotechnology of Sulfate-Reducing Bacteria. In *Advances in Applied Microbiology*. Allen I. Laskin, S.S., and Geoffrey, M.G. (eds): Academic Press, pp. 41-98.
- Bassler, B.L., and Losick, R. (2006) Bacterially Speaking. *Cell* **125**: 237-246.
- Beal, E.J., House, C.H., and Orphan, V.J. (2009) Manganese- and iron-dependent marine methane oxidation. *Science* **325**: 184-187.
- Biddle, J.F., Cardman, Z., Mendlovitz, H., Albert, D.B., Lloyd, K.G., Boetius, A., and Teske, A. (2012) Anaerobic oxidation of methane at different temperature regimes in Guaymas Basin hydrothermal sediments. *Isme Journal* **6**: 1018-1031.
- Biddle, J.F., Lipp, J.S., Lever, M.A., Lloyd, K.G., Sorensen, K.B., Anderson, R. et al. (2006) Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 3846-3851.
- Bjornsson, L., Hugenholtz, P., Tyson, G.W., and Blackall, L.L. (2002) Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology-Sgm* **148**: 2309-2318.
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C.J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A. et al. (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**: 623-626.
- Borrel, G., Lehours, A.-C., Crouzet, O., Jézéquel, D., Rockne, K., Kulczak, A. et al. (2012) Stratification of Archaea in the Deep Sediments of a Freshwater Meromictic Lake: Vertical Shift from Methanogenic to Uncultured Archaeal Lineages. *PLoS ONE* **7**: e43346.
- Branda, S.S., Vik, Å., Friedman, L., and Kolter, R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* **13**: 20-26.
- Brochier-Armanet, C., Gribaldo, S., and Forterre, P. (2012) Spotlight on the Thaumarchaeota. *ISME J* **6**: 227-230.
- Burton, S.D., Morita, R.Y., and Miller, W. (1966) Utilization of Acetate by Beggiatoa. *Journal of Bacteriology* **91**: 1192-1200.
- Byrne, N., Strous, M., Crepeau, V., Kartal, B., Birrien, J.L., Schmid, M. et al. (2009) Presence and activity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria at deep-sea hydrothermal vents. *ISME J* **3**: 117-123.
- Cambon-Bonavita, M.A., Nadalig, T., Roussel, E., Delage, E., Duperron, S., Caprais, J.C. et al. (2009) Diversity and distribution of methane-oxidizing microbial communities associated with different faunal assemblages in a giant pockmark of the Gabon continental margin. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography* **56**: 2248-2258.

- Chin, K.J., Lueders, T., Friedrich, M.W., Klose, M., and Conrad, R. (2004) Archaeal community structure and pathway of methane formation on rice roots. *Microb Ecol* **47**: 59-67.
- Conrad, R. (2009) The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environmental Microbiology Reports* **1**: 285-292.
- Crepeau, V. (2010) Diversite et fonctions dans les tapis microbiens du site hydrothermal de Lucky Strike. *Thèse de doctorat en microbiologie Université de Bretagne Occidentale*.
- Crepeau, V., Bonavita, M.A.C., Lesongeur, F., Randrianalivelo, H., Sarradin, P.M., Sarrazin, J., and Godfroy, A. (2011) Diversity and function in microbial mats from the Lucky Strike hydrothermal vent field. *FEMS Microbiol Ecol* **76**: 524-540.
- D'Hondt, S., Rutherford, S., and Spivack, A.J. (2002) Metabolic activity of subsurface life in deep-sea sediments. *Science* **295**: 2067-2070.
- Dang, H., Luan, X.W., Chen, R., Zhang, X., Guo, L., and Klotz, M.G. (2010) Diversity, abundance and distribution of amoA-encoding archaea in deep-sea methane seep sediments of the Okhotsk Sea. *FEMS Microbiol Ecol* **72**: 370-385.
- Dekas, A.E., Poretsky, R.S., and Orphan, V.J. (2009) Deep-sea archaea fix and share nitrogen in methane-consuming microbial consortia. *Science* **326**: 422-426.
- DeLong, E.E., and Pace, N.R. (2001) Environmental diversity of Bacteria and Archaea. *Systematic Biology* **50**: 470-478.
- DeLong, E.F. (2000) Resolving a methane mystery. *Nature* **407**: 577, 579.
- DeLong, E.F. (2006) Archaeal mysteries of the deep revealed. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6417-6418.
- DeLong, E.F., Taylor, L.T., Marsh, T.L., and Preston, C.M. (1999) Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* **65**: 5554-5563.
- Desbruyères (2010) Le trésors des Abysses. *Carnet de Science Quae Edition*.
- Dhillon, A., Teske, A., Dillon, J., Stahl, D.A., and Sogin, M.L. (2003) Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2765-2772.
- Dhillon, A., Lever, M., Lloyd, K.G., Albert, D.B., Sogin, M.L., and Teske, A. (2005) Methanogen diversity evidenced by molecular characterization of methyl coenzyme M reductase A (mcrA) genes in hydrothermal sediments of the Guaymas Basin. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4592-4601.
- Dimitrov, L.I. (2003) Mud volcanoes - a significant source of atmospheric methane. *Geo-Marine Letters* **23**: 155-161.
- Dojka, M.A., Harris, J.K., and Pace, N.R. (2000) Expanding the Known Diversity and Environmental Distribution of an Uncultured Phylogenetic Division of Bacteria. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1617-1621.
- Dolla, A., Fournier, M., and Dermoun, Z. (2006) Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *J Biotechnol* **126**: 87-100.
- Dunne, J.P., Sarmiento, J.L., and Gnanadesikan, A. (2007) A synthesis of global particle export from the surface ocean and cycling through the ocean interior and on the seafloor. *Global Biogeochem Cycles* **21**: GB4006.
- Duperron, S., Nadalig, T., Caprais, J.C., Sibuet, M., Fiala-Medioni, A., Amann, R., and Dubilier, N. (2005) Dual symbiosis in a Bathymodiolus sp. mussel from a methane seep on the Gabon continental margin (Southeast Atlantic): 16S rRNA phylogeny and distribution of the symbionts in gills. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1694-1700.
- Durbin, A.M., and Teske, A. (2011) Microbial diversity and stratification of South Pacific abyssal marine sediments. *Environ Microbiol* **13**: 3219-3234.
- Edmond, J.M., Vondamm, K.L., McDuff, R.E., and Measures, C.I. (1982) Chemistry of Hot Springs on the East Pacific Rise and Their Effluent Dispersal. *Nature* **297**: 187-191.
- Emerson, D., Rentz, J.A., Lilburn, T.G., Davis, R.E., Aldrich, H., Chan, C., and Moyer, C.L. (2007) A Novel Lineage of Proteobacteria Involved in Formation of Marine Fe-Oxidizing Microbial Mat Communities. *PLoS ONE* **2**: e667.
- Engelen, B., and Cypionka, H. (2009) The subsurface of tidal-flat sediments as a model for the deep biosphere. *Ocean Dynamics* **59**: 385-391.
- Ettwig, K.F., van Alen, T., van de Pas-Schoonen, K.T., Jetten, M.S.M., and Strous, M. (2009) Enrichment and Molecular Detection of Denitrifying Methanotrophic Bacteria of the NC10 Phylum. *Appl Environ Microbiol* **75**: 3656-3662.

- Ettwig, K.F., Butler, M.K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M.M.M. et al. (2010) Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* **464**: 543-+.
- Fan, L.-F., Tang, S.-L., Chen, C.-P., and Hsieh, H.-L. (2012) Diversity and Composition of Sulfate- and Sulfite-Reducing Prokaryotes as Affected by Marine-Freshwater Gradient and Sulfate Availability. *Microbial Ecology* **63**: 224-237.
- Fauque, G.D., and Barton, L.L. (2012) Chapter 1 - Hemoproteins in Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. In *Advances in Microbial Physiology*. Robert, K.P. (ed): Academic Press, pp. 1-90.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence-Limits on Phylogenies - an Approach Using the Bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Ferry, J.G., and Lessner, D.J. (2008) Methanogenesis in Marine Sediments. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1125**: 147-157.
- Fetzner, S. (1998) Bacterial dehalogenation. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**: 633-657.
- Finster, K. (2008) Microbiological disproportionation of inorganic sulfur compounds. *Journal of Sulfur Chemistry* **29**: 281-292.
- Fonselius, S., Dyrssen, D., and Yhlen, B. (2007) Determination of hydrogen sulphide. In *Methods of Seawater Analysis*: Wiley-VCH Verlag GmbH, pp. 91-100.
- Freitas, S., Hatosy, S., Fuhrman, J.A., Huse, S.M., Welch, D.B.M., Sogin, M.L., and Martiny, A.C. (2012) Global distribution and diversity of marine Verrucomicrobia. *Isme Journal* **6**: 1499-1505.
- Froelich, P.N., Klinkhammer, G.P., Bender, M.L., Luedtke, N.A., Heath, G.R., Cullen, D. et al. (1979) Early Oxidation of Organic-Matter in Pelagic Sediments of the Eastern Equatorial Atlantic - Suboxic Diagenesis. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **43**: 1075-1090.
- Fuerst, J.A. (2005) INTRACELLULAR COMPARTMENTATION IN PLANCTOMYCETES. *Annual Review of Microbiology* **59**: 299-328.
- Futagami, T., Morono, Y., Terada, T., Kaksonen, A.H., and Inagaki, F. (2009) Dehalogenation Activities and Distribution of Reductive Dehalogenase Homologous Genes in Marine Subsurface Sediments. *Appl Environ Microbiol* **75**: 6905-6909.
- Galand, P.E., Lovejoy, C., and Vincent, W.F. (2006) Remarkably diverse and contrasting archaeal communities in a large arctic river and the coastal Arctic Ocean. *Aquatic Microbial Ecology* **44**: 115-126.
- Glissman, K., Chin, K.J., Casper, P., and Conrad, R. (2004) Methanogenic pathway and archaeal community structure in the sediment of eutrophic Lake Dagow: effect of temperature. *Microb Ecol* **48**: 389-399.
- Goffredi, S.K., and Orphan, V.J. (2010) Bacterial community shifts in taxa and diversity in response to localized organic loading in the deep sea. *Environ Microbiol* **12**: 344-363.
- Goffredi, S.K., Wilpiseski, R., Lee, R., and Orphan, V.J. (2008) Temporal evolution of methane cycling and phylogenetic diversity of archaea in sediments from a deep-sea whale-fall in Monterey Canyon, California. *ISME J* **2**: 204-220.
- Grosskopf, R., Janssen, P.H., and Liesack, W. (1998) Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl Environ Microbiol* **64**: 960-969.
- Grunke, S., Lichtschlag, A., de Beer, D., Kuypers, M., Losekann-Behrens, T., Ramette, A., and Boetius, A. (2010) Novel observations of Thiobacterium, a sulfur-storing Gammaproteobacterium producing gelatinous mats. *ISME J* **4**: 1031-1043.
- Grünke, S., Felden, J., Lichtschlag, A., Girnth, A.C., De Beer, D., Wenzhöfer, F., and Boetius, A. (2011) Niche differentiation among mat-forming, sulfide-oxidizing bacteria at cold seeps of the Nile Deep Sea Fan (Eastern Mediterranean Sea). *Geobiology* **9**: 330-348.
- Guri, M., Durand, L., Cuffe-Gauchard, V., Zbinden, M., Crassous, P., Shillito, B., and Cambon-Bonavita, M.A. (2012) Acquisition of epibiotic bacteria along the life cycle of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *Isme Journal* **6**: 597-609.
- Harris, J.K., Kelley, S.T., and Pace, N.R. (2004) New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP11. *Appl Environ Microbiol* **70**: 845-849.
- Harrison, B.K., Zhang, H., Berelson, W., and Orphan, V.J. (2009) Variations in archaeal and bacterial diversity associated with the sulfate-methane transition zone in continental margin sediments (Santa Barbara Basin, California). *Appl Environ Microbiol* **75**: 1487-1499.
- Head, I.M., and Swannell, R.P.J. (1999) Bioremediation of petroleum hydrocarbon

- contaminants in marine habitats. *Current Opinion in Biotechnology* **10**: 234-239.
- Herbert, R.A. (1999) Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* **23**: 563-590.
- Inagaki, F., Suzuki, M., Takai, K., Oida, H., Sakamoto, T., Aoki, K. et al. (2003) Microbial communities associated with geological horizons in coastal seafloor sediments from the Sea of Okhotsk. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 7224-7235.
- Inagaki, F., Nunoura, T., Nakagawa, S., Teske, A., Lever, M., Lauer, A. et al. (2006) Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments, on the Pacific Ocean Margin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2815-2820.
- Ingalls, A.E., Shah, S.R., Hansman, R.L., Aluwihare, L.I., Santos, G.M., Druffel, E.R.M., and Pearson, A. (2006) Quantifying archaeal community autotrophy in the mesopelagic ocean using natural radiocarbon. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 6442-6447.
- Jetten, M.S., Sliemers, O., Kuypers, M., Dalsgaard, T., van Niftrik, L., Cirpus, I. et al. (2003) Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater planctomycete-like bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **63**: 107-114.
- Jørgensen, B.B., and Boetius, A. (2007) Feast and famine--microbial life in the deep-sea bed. *Nat Rev Microbiol* **5**: 770-781.
- Jørgensen, B.B., and Bak, F. (1991) Pathways and Microbiology of Thiosulfate Transformations and Sulfate Reduction in a Marine Sediment (Kattegat, Denmark). *Appl Environ Microbiol* **57**: 847-856.
- Kallmeyer, J., Pockalny, R., Adhikari, R.R., Smith, D.C., and D'Hondt, S. (2012) Global distribution of microbial abundance and biomass in seafloor sediment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Kato, S.Y., A (2010) Microbial Ecosystem in marine hydrothermal system in the early and present Earth. *Viva Origino* **38**.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., and Miyata, T. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* **30**: 3059-3066.
- Kimura, M. (1980) A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions through Comparative Studies of Nucleotide-Sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111-120.
- Kirchman, D.L. (2002) The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiol Ecol* **39**: 91-100.
- Klein, M., Friedrich, M., Roger, A.J., Hugenholtz, P., Fishbain, S., Abicht, H. et al. (2001) Multiple lateral transfers of dissimilatory sulfite reductase genes between major lineages of sulfate-reducing prokaryotes. *Journal of Bacteriology* **183**: 6028-6035.
- Kleindienst, S., Ramette, A., Amann, R., and Knittel, K. (2012) Distribution and in situ abundance of sulfate-reducing bacteria in diverse marine hydrocarbon seep sediments. *Environ Microbiol*: no-no.
- Kniemeyer, O., Musat, F., Sievert, S.M., Knittel, K., Wilkes, H., Blumenberg, M. et al. (2007) Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. *Nature* **449**: 898-U810.
- Knittel, K., and Boetius, A. (2009) Anaerobic Oxidation of Methane: Progress with an Unknown Process. *Annual Review of Microbiology* **63**: 311-334.
- Knittel, K., Losekann, T., Boetius, A., Kort, R., and Amann, R. (2005) Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Appl Environ Microbiol* **71**: 467-479.
- Knittel, K., Boetius, A., Lemke, A., Eilers, H., Lochte, K., Pfannkuche, O. et al. (2003) Activity, distribution, and diversity of sulfate reducers and other bacteria in sediments above gas hydrate (Cascadia margin, Oregon). *Geomicrobiology Journal* **20**: 269-294.
- Knowles, R. (1982) Denitrification. *Microbiological Reviews* **46**: 43-70.
- Konneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., and Stahl, D.A. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**: 543-546.
- Kragelund, C., Levantesi, C., Borger, A., Thelen, K., Eikelboom, D., Tandoi, V. et al. (2007) Identity, abundance and ecophysiology of filamentous Chloroflexi species present in activated sludge treatment plants. *FEMS Microbiol Ecol* **59**: 671-682.
- Kubo, K., Lloyd, K.G., J, F.B., Amann, R., Teske, A., and Knittel, K. (2012) Archaea of the Miscellaneous Crenarchaeotal Group are abundant, diverse and widespread in marine sediments. *ISME J*.

- Kuypers, M.M., Sliemers, A.O., Lavik, G., Schmid, M., Jorgensen, B.B., Kuenen, J.G. et al. (2003) Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* **422**: 608-611.
- Lampitt, R.S., Bett, B.J., Kiriakoulakis, K., Popova, E.E., Ragueneau, O., Vangriesheim, A., and Wolff, G.A. (2001) Material supply to the abyssal seafloor in the Northeast Atlantic. *Progress in Oceanography* **50**: 27-63.
- Lazar, C.S. (2009) Diversité et activité des communautés microbiennes dans des sédiments marins associés aux émissions de fluides froids. *Thèse de doctorat en microbiologie Université de Bretagne Occidentale*.
- Lazar, C.S., L'Haridon, S., Pignet, P., and Toffin, L. (2011) Archaeal populations in hypersaline sediments underlying orange microbial mats in the Napoli mud volcano. *Appl Environ Microbiol* **77**: 3120-3131.
- Lazar, C.S., Dinasquet, J., Pignet, P., Prieur, D., and Toffin, L. (2010) Active archaeal communities at cold seep sediments populated by Siboglinidae tubeworms from the Storegga Slide. *Microb Ecol* **60**: 516-527.
- Lazar, C.S., John Parkes, R., Cragg, B.A., L'Haridon, S., and Toffin, L. (2012) Methanogenic activity and diversity in the centre of the Amsterdam Mud Volcano, Eastern Mediterranean Sea. *FEMS Microbiol Ecol*.
- Lees, H., and Simpson, J.R. (1957) The biochemistry of the nitrifying organisms. V. Nitrite oxidation by *Nitrobacter*. *Biochem J* **65**: 297-305.
- Leigh, J.A. (2000) Nitrogen fixation in methanogens: the archaeal perspective. *Curr Issues Mol Biol* **2**: 125-131.
- Leloup, J., Loy, A., Knab, N.J., Borowski, C., Wagner, M., and Jorgensen, B.B. (2007) Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea. *Environ Microbiol* **9**: 131-142.
- Leloup, J., Fossing, H., Kohls, K., Holmkvist, L., Borowski, C., and Jorgensen, B.B. (2009) Sulfate-reducing bacteria in marine sediment (Aarhus Bay, Denmark): abundance and diversity related to geochemical zonation. *Environmental Microbiology* **11**: 1278-1291.
- Levin, L.A. (2005) Ecology of cold seep sediments: Interactions of fauna with flow, chemistry and microbes. *Oceanography and Marine Biology - an Annual Review, Vol 43* **43**: 1-46.
- Liu, Y.C., and Whitman, W.B. (2008) Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Incredible Anaerobes: From Physiology to Genomics to Fuels* **1125**: 171-189.
- Lloyd, K.G., Lapham, L., and Teske, A. (2006) An anaerobic methane-oxidizing community of ANME-1b archaea in hypersaline Gulf of Mexico sediments. *Appl Environ Microbiol* **72**: 7218-7230.
- Lloyd, K.G., MacGregor, B.J., and Teske, A. (2010a) Quantitative PCR methods for RNA and DNA in marine sediments: maximizing yield while overcoming inhibition. *FEMS Microbiol Ecol* **72**: 143-151.
- Lloyd, K.G., Alperin, M.J., and Teske, A. (2011) Environmental evidence for net methane production and oxidation in putative ANaerobic MEthanotrophic (ANME) archaea. *Environ Microbiol* **13**: 2548-2564.
- Lloyd, K.G., Albert, D.B., Biddle, J.F., Chanton, J.P., Pizarro, O., and Teske, A. (2010b) Spatial structure and activity of sedimentary microbial communities underlying a *Beggiatoa* spp. mat in a Gulf of Mexico hydrocarbon seep. *PLoS One* **5**: e8738.
- Löffler, F.E., Yan, J., Ritalahti, K.M., Adrian, L., Edwards, E.A., Konstantinidis, K.T. et al. (2012) *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligate organohalide-respiring anaerobic bacteria, relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidetes* classis nov., within the phylum Chloroflexi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Losekann, T., Knittel, K., Nadalig, T., Fuchs, B., Niemann, H., Boetius, A., and Amann, R. (2007) Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea. *Appl Environ Microbiol* **73**: 3348-3362.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., Clark, D. (2008) *Brock Biology of microorganisms* 12th edn. *Pearson Education*.
- Maignien, L., Parkes, R.J., Cragg, B., Niemann, H., Knittel, K., Coulon, S. et al. (2012) Anaerobic oxidation of methane in hypersaline cold seep sediments. *FEMS Microbiol Ecol*: n/a-n/a.
- Maignien, L., Depreiter, D., Foubert, A., Reveillaud, J., De Mol, L., Boeckx, P. et al. (2011) Anaerobic oxidation of methane in a cold-water coral carbonate mound from the Gulf of Cadiz.

International Journal of Earth Sciences **100**: 1413-1422.

Martin-Cuadrado, A.B., Rodriguez-Valera, F., Moreira, D., Alba, J.C., Ivars-Martinez, E., Henn, M.R. et al. (2008) Hindsight in the relative abundance, metabolic potential and genome dynamics of uncultivated marine archaea from comparative metagenomic analyses of bathypelagic plankton of different oceanic regions. *ISME J* **2**: 865-886.

Martinez-Garcia, M., Brazel, D.M., Swan, B.K., Arnosti, C., Chain, P.S.G., Reitenga, K.G. et al. (2012) Capturing Single Cell Genomes of Active Polysaccharide Degradors: An Unexpected Contribution of *Verrucomicrobia*. *PLoS ONE* **7**: e35314.

Massana, R., Murray, A.E., Preston, C.M., and DeLong, E.F. (1997) Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Appl Environ Microbiol* **63**: 50-56.

McDonald, I.R., and Murrell, J.C. (1997) The particulate methane monooxygenase gene *pmoA* and its use as a functional gene probe for methanotrophs. *Fems Microbiology Letters* **156**: 205-210.

McKay, L.J., MacGregor, B.J., Biddle, J.F., Albert, D.B., Mendlovitz, H.P., Hoer, D.R. et al. (2012) Spatial heterogeneity and underlying geochemistry of phylogenetically diverse orange and white Beggiatoa mats in Guaymas Basin hydrothermal sediments. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **67**: 21-31.

Mehta, M.P., Butterfield, D.A., and Baross, J.A. (2003) Phylogenetic diversity of nitrogenase (*nifH*) genes in deep-sea and hydrothermal vent environments of the Juan de Fuca ridge. *Appl Environ Microbiol* **69**: 960-970.

Meyer, B., and Kuever, J. (2007a) Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes - origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. *Microbiology-Sgm* **153**: 2026-2044.

Meyer, B., and Kuever, J. (2007b) Molecular analysis of the diversity of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes in the environment, using *aprA* as functional marker gene. *Appl Environ Microbiol* **73**: 7664-7679.

Meyer, B., Imhoff, J.F., and Kuever, J. (2007) Molecular analysis of the distribution and

phylogeny of the *soxB* gene among sulfur-oxidizing bacteria - evolution of the Sox sulfur oxidation enzyme system. *Environ Microbiol* **9**: 2957-2977.

Meyerdierks, A., Kube, M., Kostadinov, I., Teeling, H., Glockner, F.O., Reinhardt, R., and Amann, R. (2010) Metagenome and mRNA expression analyses of anaerobic methanotrophic archaea of the ANME-1 group. *Environ Microbiol* **12**: 422-439.

Meyerdierks, A., Kube, M., Lombardot, T., Knittel, K., Bauer, M., Glockner, F.O. et al. (2005) Insights into the genomes of archaea mediating the anaerobic oxidation of methane. *Environ Microbiol* **7**: 1937-1951.

Michaelis, W., Seifert, R., Nauhaus, K., Treude, T., Thiel, V., Blumenberg, M. et al. (2002) Microbial Reefs in the Black Sea Fueled by Anaerobic Oxidation of Methane. *Science* **297**: 1013-1015.

Mills, H.J., Martinez, R.J., Story, S., and Sobczyk, P.A. (2004) Identification of members of the metabolically active microbial populations associated with *Beggiatoa* species mat communities from Gulf of Mexico cold-seep sediments. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5447-5458.

Milucka, J. (2011) Dissimilatory sulfur metabolism coupled to anaerobic oxidation of methane. *Ph D manuscript The International Max Planck Research School of Marine Microbiology (MarMic)*.

Moeseneder, M.M., Smith Jr, K.L., Ruhl, H.A., Jones, D.O.B., Witte, U., and Prosser, J.I. (2012) Temporal and depth-related differences in prokaryotic communities in abyssal sediments associated with particulate organic carbon flux. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*.

Moreira, D., and López-García, P. (1998) Symbiosis Between Methanogenic Archaea and δ -Proteobacteria as the Origin of Eukaryotes: The Syntrophic Hypothesis. *Journal of Molecular Evolution* **47**: 517-530.

Morita, M., Malvankar, N.S., Franks, A.E., Summers, Z.M., Giloteaux, L., Rotaru, A.E. et al. (2011) Potential for Direct Interspecies Electron Transfer in Methanogenic Wastewater Digester Aggregates. *mBio* **2**.

Musslewhite, C.L., McInerney, M.J., Dong, H.L., Onstott, T.C., Green-Blum, M., Swift, D. et al. (2003) The factors controlling microbial distribution and activity in the shallow subsurface. *Geomicrobiology Journal* **20**: 245-261.

- Nercessian, O., Reysenbach, A.L., Prieur, D., and Jeanthon, C. (2003) Archaeal diversity associated with in situ samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise (13 degrees N). *Environ Microbiol* **5**: 492-502.
- Niemann, H., Losekann, T., de Beer, D., Elvert, M., Nadalig, T., Knittel, K. et al. (2006) Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. *Nature* **443**: 854-858.
- Olsen, G.J., and Woese, C.R. (1993) Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *The FASEB Journal* **7**: 113-123.
- Omeregic, E.O., Mastalerz, V., de Lange, G., Straub, K.L., Kappler, A., Roy, H. et al. (2008) Biogeochemistry and community composition of iron- and sulfur-precipitating microbial mats at the Chefren mud volcano (Nile Deep Sea Fan, Eastern Mediterranean). *Appl Environ Microbiol* **74**: 3198-3215.
- Ondreas, H., Olu, K., Fouquet, Y., Charlou, J.L., Gay, A., Dennielou, B. et al. (2005) ROV study of a giant pockmark on the Gabon continental margin. *Geo-Marine Letters* **25**: 281-292.
- Orcutt, B., and Meile, C. (2008) Constraints on mechanisms and rates of anaerobic oxidation of methane by microbial consortia: process-based modeling of ANME-2 archaea and sulfate reducing bacteria interactions. *Biogeosciences* **5**: 1587-1599.
- Orcutt, B., Boetius, A., Elvert, M., Samarkin, V., and Joye, S.B. (2005) Molecular biogeochemistry of sulfate reduction, methanogenesis and the anaerobic oxidation of methane at Gulf of Mexico cold seeps (vol 69, pg 4267, 2005). *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **69**: 5633-5633.
- Orcutt, B.N., Joye, S.B., Kleindienst, S., Knittel, K., Ramette, A., Reitz, A. et al. (2010) Impact of natural oil and higher hydrocarbons on microbial diversity, distribution, and activity in Gulf of Mexico cold-seep sediments. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **57**: 2008-2021.
- Oremland, R.S., and Polcin, S. (1982) Methanogenesis and Sulfate Reduction - Competitive and Noncompetitive Substrates in Estuarine Sediments. *Appl Environ Microbiol* **44**: 1270-1276.
- Orphan, V.J., House, C.H., Hinrichs, K.U., McKeegan, K.D., and DeLong, E.F. (2002) Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 7663-7668.
- Orphan, V.J., Hinrichs, K.U., Ussler, W., Paull, C.K., Taylor, L.T., Sylva, S.P. et al. (2001) Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1922-1934.
- Pachiadaki, M.G., Lykousis, V., Stefanou, E.G., and Kormas, K.A. (2010) Prokaryotic community structure and diversity in the sediments of an active submarine mud volcano (Kazan mud volcano, East Mediterranean Sea). *FEMS Microbiol Ecol* **72**: 429-444.
- Pachiadaki, M.G., Kallionaki, A., Dahlmann, A., De Lange, G.J., and Kormas, K.A. (2011) Diversity and spatial distribution of prokaryotic communities along a sediment vertical profile of a deep-sea mud volcano. *Microb Ecol* **62**: 655-668.
- Parkes, R.J., Cragg, B.A., and Wellsbury, P. (2000) Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: A review. *Hydrogeology Journal* **8**: 11-28.
- Parkes, R.J., Cragg, B.A., and Wellsbury, P. (2002) Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: A review (vol 8, pg 11, 2000). *Hydrogeology Journal* **10**: 346-346.
- Parkes, R.J., Webster, G., Cragg, B.A., Weightman, A.J., Newberry, C.J., Ferdelman, T.G. et al. (2005) Deep sub-seafloor prokaryotes stimulated at interfaces over geological time. *Nature* **436**: 390-394.
- Paul, K., Nonoh, J.O., Mikulski, L., and Brune, A. (2012) 'Methanoplasmatales': Thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments are the seventh order of methanogens. *Appl Environ Microbiol*.
- Paull, C.K., Ussler, W., Peltzer, E.T., Brewer, P.G., Keaten, R., Mitts, P.J. et al. (2007) Authigenic carbon entombed in methane-soaked sediments from the northeastern transform margin of the Guaymas Basin, Gulf of California. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography* **54**: 1240-1267.
- Perner, M., Kuever, J., Seifert, R., Pape, T., Koschinsky, A., Schmidt, K. et al. (2007) The influence of ultramafic rocks on microbial communities at the Logatchev hydrothermal field, located 15 degrees N on the Mid-Atlantic Ridge. *FEMS Microbiol Ecol* **61**: 97-109.

- Pernthaler, A., Dekas, A.E., Brown, C.T., Goffredi, S.K., Embaye, T., and Orphan, V.J. (2008) Diverse syntrophic partnerships from deep-sea methane vents revealed by direct cell capture and metagenomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 7052-7057.
- 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.
- Pol, A., Heijmans, K., Harhangi, H.R., Tedesco, D., Jetten, M.S.M., and den Camp, H.J.M.O. (2007) Methanotrophy below pH1 by a new Verrucomicrobia species. *Nature* **450**: 874-U817.
- Raghoebarsing, A.A., Pol, A., van de Pas-Schoonen, K.T., Smolders, A.J.P., Ettwig, K.F., Rijpstra, W.I.C. et al. (2006) A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* **440**: 918-921.
- Rappé, M.S., and Giovannoni, S.J. (2003) THE UNCULTURED MICROBIAL MAJORITY. *Annual Review of Microbiology* **57**: 369-394.
- Raymond, J., Siefert, J.L., Staples, C.R., and Blankenship, R.E. (2004) The natural history of nitrogen fixation. *Molecular Biology and Evolution* **21**: 541-554.
- Reed, A.J., Lutz, R.A., and Vetriani, C. (2006) Vertical distribution and diversity of bacteria and archaea in sulfide and methane-rich cold seep sediments located at the base of the Florida Escarpment. *Extremophiles* **10**: 199-211.
- Rickard, A.H., Gilbert, P., High, N.J., Kolenbrander, P.E., and Handley, P.S. (2003) Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol* **11**: 94-100.
- Roalkvam, I., Jorgensen, S.L., Chen, Y.F., Stokke, R., Dahle, H., Hocking, W.P. et al. (2011) New insight into stratification of anaerobic methanotrophs in cold seep sediments. *FEMS Microbiol Ecol* **78**: 233-243.
- Rochelle, P.A., Cragg, B.A., Fry, J.C., Parkes, R.J., and Weightman, A.J. (1994) Effect of Sample Handling on Estimation of Bacterial Diversity in Marine-Sediments by 16s Ribosomal-Rna Gene Sequence-Analysis. *FEMS Microbiol Ecol* **15**: 215-225.
- Rospert, S., Breitung, J., Ma, K., Schworer, B., Zirngibl, C., Thauer, R.K. et al. (1991) Methyl-Coenzyme-M Reductase and Other Enzymes Involved in Methanogenesis from Co₂ and H₂ in the Extreme Thermophile Methanopyrus-Kandleri. *Archives of Microbiology* **156**: 49-55.
- Roussel, E.G., Bonavita, M.A., Querellou, J., Cragg, B.A., Webster, G., Prieur, D., and Parkes, R.J. (2008) Extending the sub-sea-floor biosphere. *Science* **320**: 1046.
- Roy, R. (2010) Short-term variability in halocarbons in relation to phytoplankton pigments in coastal waters of the central eastern Arabian Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **88**: 311-321.
- Sakai, S., Imachi, H., Sekiguchi, Y., Tseng, I.-C., Ohashi, A., Harada, H., and Kamagata, Y. (2009) Cultivation of Methanogens under Low-Hydrogen Conditions by Using the Coculture Method. *Appl Environ Microbiol* **75**: 4892-4896.
- Sangwan, P., Kovac, S., Davis, K.E.R., Sait, M., and Janssen, P.H. (2005) Detection and Cultivation of Soil Verrucomicrobia. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8402-8410.
- Schaefer, R.G., Galushkin, Y.I., Kolloff, A., and Littke, R. (1999) Reaction kinetics of gas generation in selected source rocks of the West Siberian Basin: implications for the mass balance of early-thermogenic methane. *Chemical Geology* **156**: 41-65.
- Scheller, S., Goenrich, M., Boecher, R., Thauer, R.K., and Jaun, B. (2010) The key nickel enzyme of methanogenesis catalyses the anaerobic oxidation of methane. *Nature* **465**: 606-U697.
- Schink, B. (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**: 262-280.
- Schink, B. (2006) Syntrophic Associations in Methanogenic Degradation
- Molecular Basis of Symbiosis. In: Overmann, J. (ed): Springer Berlin Heidelberg, pp. 1-19.
- Schmid, M., Twachtmann, U., Klein, M., Strous, M., Juretschko, S., Jetten, M. et al. (2000) Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Syst Appl Microbiol* **23**: 93-106.
- Schonheit, P., and Schafer, T. (1995) Metabolism of Hyperthermophiles. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **11**: 26-57.
- Schreiber, L., Holler, T., Knittel, K., Meyerdierks, A., and Amann, R. (2010) Identification of the dominant sulfate-reducing bacterial partner of

- anaerobic methanotrophs of the ANME-2 clade. *Environ Microbiol* **12**: 2327-2340.
- Schut, G.J., Boyd, E.S., Peters, J.W., and Adams, M.W.W. (2012) The modular respiratory complexes involved in hydrogen and sulfur metabolism by heterotrophic hyperthermophilic archaea and their evolutionary implications. *FEMS Microbiology Reviews*: n/a-n/a.
- Simoneit, B.R., Leif, R.N., and Ishiwatari, R. (1996) Phenols in hydrothermal petroleum and sediment bitumen from Guaymas Basin, Gulf of California. *Org Geochem* **24**: 377-388.
- Simoneit, B.R.T., Lonsdale, P.F., Edmond, J.M., and Shanks, W.C. (1990) Deep-Water Hydrocarbon Seeps in Guaymas Basin, Gulf of California. *Applied Geochemistry* **5**: 41-49.
- Smith, C.R., and Baco, A.R. (2003) Ecology of whale falls at the deep-sea floor. *Oceanography and Marine Biology, Vol 41* **41**: 311-354.
- Sørensen, J., Christensen, D., and Jørgensen, B.B. (1981) Volatile Fatty Acids and Hydrogen as Substrates for Sulfate-Reducing Bacteria in Anaerobic Marine Sediment. *Appl Environ Microbiol* **42**: 5-11.
- Sorensen, K.B., and Teske, A. (2006) Stratified communities of active archaea in deep marine subsurface sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 4596-4603.
- Sowers, K.R., and Ferry, J.G. (1983) Isolation and Characterization of a Methylophilic Marine Methanogen, *Methanococcoides methylutens* gen. nov., sp. nov. *Appl Environ Microbiol* **45**: 684-690.
- Spang, A., Hatzenpichler, R., Brochier-Armanet, C., Rattei, T., Tischler, P., Spieck, E. et al. (2010) Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota. *Trends Microbiol* **18**: 331-340.
- Stackebrandt, E., Murray, R.G.E., and Trüper, H.G. (1988) Proteobacteria classis nov., a Name for the Phylogenetic Taxon That Includes the "Purple Bacteria and Their Relatives". *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**: 321-325.
- Stams, A.J.M., and Plugge, C.M. (2009) Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology* **7**: 568-577.
- Stevens, H., Brinkhoff, T., and Simon, M. (2005a) Composition of free-living, aggregate-associated and sediment surface-associated bacterial communities in the German Wadden Sea. *Aquatic Microbial Ecology* **38**: 15-30.
- Stevens, H., Stübner, M., Simon, M., and Brinkhoff, T. (2005b) Phylogeny of Proteobacteria and Bacteroidetes from oxic habitats of a tidal flat ecosystem. *FEMS Microbiol Ecol* **54**: 351-365.
- Stokke, R., Roalkvam, I., Lanzen, A., Haflidason, H., and Steen, I.H. (2012) Integrated metagenomic and metaproteomic analyses of an ANME-1-dominated community in marine cold seep sediments. *Environ Microbiol*.
- Strous, M., Pelletier, E., Mangenot, S., Rattei, T., Lehner, A., Taylor, M.W. et al. (2006) Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature* **440**: 790-794.
- Suzuki, Y., Inagaki, F., Takai, K., Nealson, K.H., and Horikoshi, K. (2004) Microbial Diversity in Inactive Chimney Structures from Deep-Sea Hydrothermal Systems. *Microbial Ecology* **47**: 186-196.
- Takai, K., and Horikoshi, K. (1999) Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics* **152**: 1285-1297.
- Takai, K., Komatsu, T., Inagaki, F., and Horikoshi, K. (2001a) Distribution of Archaea in a Black Smoker Chimney Structure. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3618-3629.
- Takai, K., Moser, D.P., DeFlaun, M., Onstott, T.C., and Fredrickson, J.K. (2001b) Archaeal diversity in waters from deep South African gold mines. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5750-5760.
- Takai, K., K.a.N., K. (2010) Compositional, physiological and metabolic variability in microbial communities associated with geochemically diverse, deep-sea hydrothermal vent fluids. *Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective*: 251-283.
- Teske, A. (2006) Microbial community composition in deep marine subsurface sediments of ODP Leg 201: sequencing surveys and cultivations. *Jørgensen, BB, D'Hondt, SL, and Miller, DJ (Eds), Proc ODP, Sci Results* **201**.
- Teske, A., and Sorensen, K.B. (2008) Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? *Isme Journal* **2**: 3-18.
- Teske, A., Sogin, M.L., Nielsen, L.P., and Jannasch, H.W. (1999) Phylogenetic Relationships of a Large Marine Beggiatoa. *Syst Appl Microbiol* **22**: 39-44.
- Teske, A., Hinrichs, K.U., Edgcomb, V., Gomez, A.D., Kysela, D., Sylva, S.P. et al. (2002) Microbial diversity of hydrothermal sediments in the

- Guaymas Basin: Evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1994-2007.
- Thauer, R.K. (2011) Anaerobic oxidation of methane with sulfate: on the reversibility of the reactions that are catalyzed by enzymes also involved in methanogenesis from CO₂. *Curr Opin Microbiol* **14**: 292-299.
- Thioulouse, J., and Dray, S. (2007) Interactive multivariate data analysis in R with the ade4 and ade4TkGUI packages. *Journal of Statistical Software* **22**: 1-14.
- Torres, C.I., Marcus, A.K., Lee, H.-S., Parameswaran, P., Krajmalnik-Brown, R., and Rittmann, B.E. (2010) A kinetic perspective on extracellular electron transfer by anode-respiring bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **34**: 3-17.
- Tourova, T.P., Kolganova, T.V., Kuznetsov, B.B., and Pimenov, N.V. (2002) Phylogenetic Diversity of the Archaeal Component in Microbial Mats on Coral-like Structures Associated with Methane Seeps in the Black Sea. *Microbiology* **71**: 196-201.
- Treude, T., Knittel, K., Blumenberg, M., Seifert, R., and Boetius, A. (2005) Subsurface microbial methanotrophic mats in the Black Sea. *Appl Environ Microbiol* **71**: 6375-6378.
- Trotsenko, Y.A., and Murrell, J.C. (2008) Metabolic aspects of aerobic obligate methanotrophy. *Advances in Applied Microbiology, Vol 63* **63**: 183-229.
- Turner, J.T. (2002) Zooplankton fecal pellets, marine snow and sinking phytoplankton blooms. *Aquatic Microbial Ecology* **27**: 57-102.
- Valentine, D.L. (2002) Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 271-282.
- Vetriani, C., Tran, H.V., and Kerkhof, L.J. (2003) Fingerprinting microbial assemblages from the oxic/anoxic chemocline of the Black Sea. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6481-6488.
- Wagner, M., and Horn, M. (2006) The Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlamydiae and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance. *Current Opinion in Biotechnology* **17**: 241-249.
- Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H., and Schleifer, K.H. (1993) Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl Environ Microbiol* **59**: 1520-1525.
- Wang, P.W., Y.; Zhang, C. (2010) Archaeal diversity in surface sediments of the South China Sea. *AGU Fall Meeting Abstracts*.
- Wawrik, B., Boling, W.B., Van Nostrand, J.D., Xie, J.P., Zhou, J.Z., and Bronk, D.A. (2012) Assimilatory nitrate utilization by bacteria on the West Florida Shelf as determined by stable isotope probing and functional microarray analysis. *FEMS Microbiol Ecol* **79**: 400-411.
- Webster, G., Parkes, R.J., Fry, J.C., and Weightman, A.J. (2004) Widespread occurrence of a novel division of bacteria identified by 16S rRNA gene sequences originally found in deep marine Sediments. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5708-5713.
- Webster, G., Yarram, L., Freese, E., Koster, J., Sass, H., Parkes, R.J., and Weightman, A.J. (2007) Distribution of candidate division JS1 and other Bacteria in tidal sediments of the German Wadden Sea using targeted 16S rRNA gene PCR-DGGE. *FEMS Microbiol Ecol* **62**: 78-89.
- Webster, G., Blazejak, A., Cragg, B.A., Schippers, A., Sass, H., Rinna, J. et al. (2009) Subsurface microbiology and biogeochemistry of a deep, cold-water carbonate mound from the Porcupine Seabight (IODP Expedition 307). *Environ Microbiol* **11**: 239-257.
- Weiss, D.S., and Thauer, R.K. (1993) Methanogenesis and the Unity of Biochemistry. *Cell* **72**: 819-822.
- Woyke, T., Teeling, H., Ivanova, N.N., Huntemann, M., Richter, M., Gloeckner, F.O. et al. (2006) Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. *Nature* **443**: 950-955.
- Wu, X.L., Chin, K.J., and Conrad, R. (2002) Effect of temperature stress on structure and function of the methanogenic archaeal community in a rice field soil. *FEMS Microbiol Ecol* **39**: 211-218.
- Yamada, T., and Sekiguchi, Y. (2009) Cultivation of Uncultured Chloroflexi Subphyla: Significance and Ecophysiology of Formerly Uncultured Chloroflexi 'Subphylum I' with Natural and Biotechnological Relevance. *Microbes and Environments* **24**: 205-216.
- Yamamoto, M., Nakagawa, S., Shimamura, S., Takai, K., and Horikoshi, K. (2010) Molecular characterization of inorganic sulfur-compound metabolism in the deep-sea epsilonproteobacterium *Sulfurovum* sp. NBC37-1. *Environ Microbiol* **12**: 1144-1153.

Yanagawa, K., Sunamura, M., Lever, M.A., Morono, Y., Hiruta, A., Ishizaki, O. et al. (2011) Niche Separation of Methanotrophic Archaea (ANME-1 and -2) in Methane-Seep Sediments of the Eastern Japan Sea Offshore Joetsu. *Geomicrobiology Journal* **28**: 118-129.

Yoshinaga, I., Amano, T., Yamagishi, T., Okada, K., Ueda, S., Sako, Y., and Suwa, Y. (2011) Distribution and diversity of anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria in the sediment of a eutrophic freshwater lake, Lake Kitaura, Japan. *Microbes and Environments* **26**: 189-197.

Zehr, J.P., and Kudela, R.M. (2011) Nitrogen cycle of the open ocean: from genes to ecosystems. *Ann Rev Mar Sci* **3**: 197-225.

Zellner, G., Stackebrandt, E., Kneifel, H., Messner, P., Sleytr, U.B., de Macario, E.C. et al. (1989) Isolation and Characterization of a Thermophilic, Sulfate Reducing Archaeobacterium, *Archaeoglobus fulgidus* Strain Z. *Syst Appl Microbiol* **11**: 151-160.

Zengler, K., Toledo, G., Rappe, M., Elkins, J., Mathur, E.J., Short, J.M., and Keller, M. (2002) Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15681-15686.

Zhou, J., Bruns, M.A., and Tiedje, J.M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* **62**: 316-322.

VIII. POSTERS

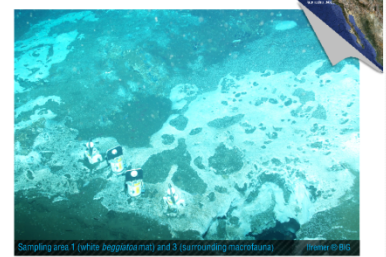
Distribution of metabolically active Archaea in the Guaymas basin cold seep sediments: Evidence for Anaerobic Methanotrophic communities.

A. Vigneron, P. Cruaud, P. Pignet, J.C. Caprais, M.A. Cambon-Bonavita, A. Godfroy and L. Toffin

Laboratoire de microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, IFREMER, France
adrien.vigneron@ifremer.fr

Background:

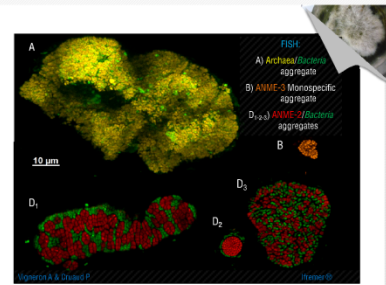
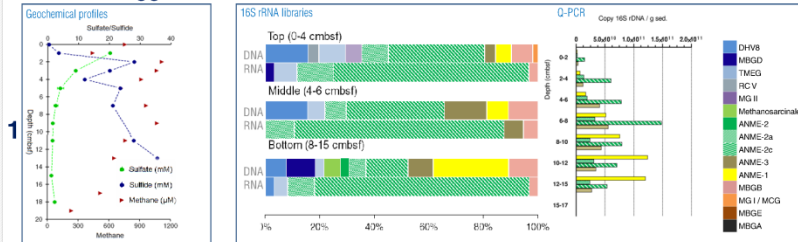
Unexplored area of the **Guaymas Basin cold seeps** (Gulf of Mexico): The **Sonora margin**, a mosaic of **white *Beggiatoa* spp. mats** surrounding by **grey macrofauna** (deposit feeders and grazers polychaetes & gastropods) fuelled by cold seeps and high sedimentary rates (2mm/y).



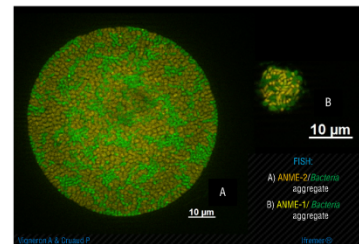
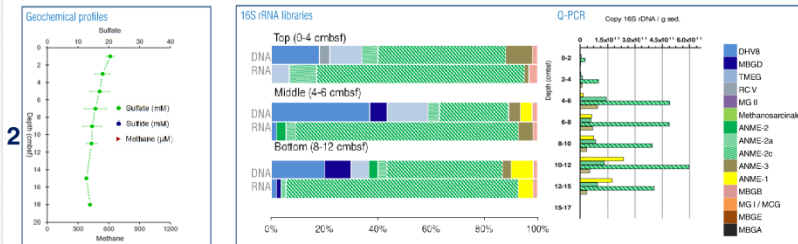
Objectives:

- Explore the **Archaeal diversity** (16S rRNA and rDNA genes libraries) in sediments underlying **2 white *Beggiatoa* spp. Mats** (habitat 1 & 2) and a surrounding macrofauna (habitat 3)
- Determine the **spatial distributions** and **quantify the dominant Archaea** (16S Q-PCR and FISH)
- Describe the archaeal process (**methanogenesis / anaerobic methanotrophy AOM**)

White *Beggiatoa* mat habitats:

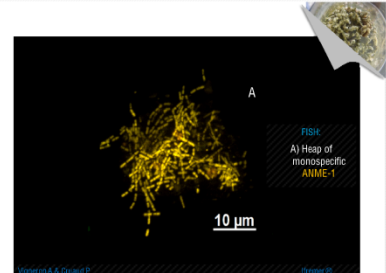
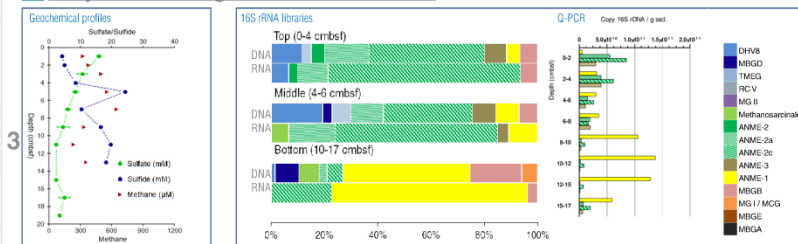


- No clear Sulfate to Methane Transition Zone (SMTZ) but rapid sulfate depletion.
- Archaeal communities** dominated by **anaerobic methanotrophs (ANME-1, -2a, -2c and -3)** with **specific distributions** and various **syntrophic behaviors**: ANME-2 in morphologically **various aggregates with bacteria** in sulfate-rich sediments, **monospecific aggregates of ANME-3** only in intermediate layer and **single ANME-1** in increasing proportion with depth.



- Advective **sulfate-rich** fluid flow.
- Increase of ANME-2 community concentrations** and **ANME-2/Bacteria aggregates abundance** throughout the sediments.
- Presence of **ANME-1/Bacteria aggregates** in the deepest sediments.

Grey surrounding macrofauna habitat:



- Presence of deposit feeders in the surface might alter the archaeal community structure, maybe due to rapid macrofaunal organic matter consumption.
- Few ANME-2 / bacteria aggregates are restricted to the firsts organic-rich sediments layers
- Monospecific** heaps of active **ANME-1** increase with depth.

Conclusions and hypothesis ...

- Anaerobic methanotrophs (ANME-1, ANME-2a, ANME-2c, ANME-3) are the dominant archaeal populations in the Sonora Margin cold seeps.
- Niche specific distribution for ANMEs.
 - Different needs or environmental specificities (sulfate, methane, sulfide concentrations, syntrophic bacterial requirements ...)**
- Different aggregation behaviors.
 - Non-syntrophic AOM for ANME-3 and ANME-1 ? Or alternative metabolisms ? Methanogenesis ?**
- Surface assemblages might alter the archaeal diversity / distribution / function ?
 - Role of surface colonizers (*Beggiatoa* / macrofauna) ?**

REMERCIEMENTS:

Le rideau se ferme sur trois ans de travail, l'heure est maintenant aux remerciements, aux effusions d'émotions et de sentiments

...

Je tiens tout d'abord à remercier Anne Godfroy, directrice du laboratoire pour m'avoir permis de réaliser ce travail au laboratoire de microbiologie des environnements extrêmes et de m'avoir fait visiter les abysses. Je suis également reconnaissant à Laurent Toffin pour m'avoir choisi, pour s'être battu afin obtenir le financement tant attendu de ma thèse et pour sa confiance accordée tout au long de ce travail et Marie-Anne Cambon-Bonavita pour tous ses précieux conseils et corrections.

Je remercie également tous les membres de mon jury de thèse, les rapporteurs Pierre Galand et Karen Lloyd ainsi que les examinateurs Timothy Vogel, Mohamed Jebbar, Christian Jeanthon et Georges Barbier pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

...

Un gros merci à toutes les personnes qui ont apporté une pierre (petite ou grande) à la construction de ce travail. L'ancienne école (Benjamin, Cassandre, Stéphane, Marie, Bénédicte, Valentin, Mathieu sans oublier Erwan) pour avoir guidé mes premiers et derniers pas, mes contemporains (Pierre François, Jonas, Pauline,) et la nouvelle (et bientôt ancienne) génération Marine (c'est quand même une drôle de couleur de cheveux) Céline (récipient !) et Perrine (pour tout ces kilomètres, miles, mètres de dénivelé parcouru ensemble) pour m'avoir accompagné vers mon envol.

...

Merci à toutes les personnes qui téléchargeront, agrafferont, liront, empileront, partageront et recycleront ce travail !

...

Merci à ma famille et à tout mes amis

Les lyonnais que j'ai l'immense chance de fréquenter: Guigui (cours Forest cours) et toute la famille Maury, Macdo (T'es pas un peu aérène toi ?, TIENS !!), Poulette, Chicken, Captain Nono, Giberton, Arnold (jeboté kuratz), François (Badu+?love+Flylo), la team du labo ampère, Jerem (what's up nigga?), Cath (j crois que ton corps veut te dire quelque chose la !), Seb, Alban, les expatriées, Margaux et Maude.

Les handballeurs finistériens: Romain (Double stricte là ! non?), Balou (t'as raison mon petit, faut pas se laisser aller), Catin (avec des petits oignons ... mais oui), Theulière, Pérotte (arf arf la ..) pour ne citer que les plus gratinés. Raphael et Noel (ca en fait des Twingo au final ..) pour m'avoir rafistolé pendant plus d'un an.

Les parisiens Manu, Marie, Francesco et toute l'équipe de GoodMusicOnly pour tous ces échanges musicaux de haut vol.

Tous les artistes qui ont contribué à la bande son de ma vie pendant ces trois ans.

Donuts Are Forever

Merci, j'espère sincèrement pouvoir tous vous remercier encore une fois dans les prochains manuscrits !!

Résumé

Au niveau des marges continentales, et plus particulièrement dans des zones dites d'émissions de fluides froids, des communautés microbiennes et animales complexes se développent localement à la surface des sédiments. Ces communautés utilisent pour leur croissance des composés chimiques réduits (H₂S, Méthane, CO₂ ...), contenus dans un fluide à basse température, percolant à travers les sédiments et issus de phénomènes géologiques et de divers processus microbiens.

Afin d'étudier la diversité des communautés microbiennes associées à ces écosystèmes ainsi que leur rôle dans l'environnement, et d'appréhender les paramètres environnementaux influençant la distribution et l'écophysiologie de ces communautés, des sédiments de surface (0-20 cm) mais également plus profonds (<9 mbsf) ont été prélevés au niveau de la Marge de Sonora. Les communautés microbiennes présentes ont été étudiées par diverses approches de biologie moléculaire, de mise en culture et de microscopie.

Ce travail de recherche a permis: i) de déterminer la structure et la diversité des communautés microbiennes métaboliquement actives dans ces sédiments, ii) de mettre en évidence des écophysiologies différentes entre les acteurs du cycle du méthane (méthanogènes, ANMEs, SRB), prépondérant dans cet écosystème et iii) de découvrir la présence de nouvelles lignées et fonctions microbiennes dans les sédiments de zones d'émissions de fluides froids des marges continentales.

Mots Clés

Marge de Sonora, Bassin de Guaymas, Diversité moléculaire, Communautés microbiennes, *Archaea*, *Bacteria*, méthanogène, ANME, SRB, méthane, sédiments, fluides froids

Summary

At continental margins, and more particularly in cold seep areas, microbial and animal communities were locally detected at the surface of the sediments. These communities grow using reduced chemical compounds (H₂S, Methane, CO₂ ...) contained in the percolated cold fluids and produced by both geological and microbial processes.

In order to study microbial community diversity in these ecosystems and their role in the environment as well as to understand the environmental factors influencing the distribution and ecophysiology of these communities, surface (0-20 cmbsf) but also deeper (<9 mbsf) sediments were collected at the Sonora Margin. Microbial communities have been studied using various molecular, cultural and microscopy approaches.

This research allowed : i) to determine the structure and diversity of metabolically active microbial communities in sediments, ii) to highlight different ecophysiological for methane cycle involved microorganisms (methanogens, ANME, SRB) and iii) to discover the presence of new microbial lineages and functions in the cold seep sediments of the continental margins.

Key Words

Sonora Margin, Guaymas Basin, Molecular diversity, Microbial communities, Archaea, Bacteria, Methanogen, ANME, SRB, Methane, Sediments, Cold seeps.