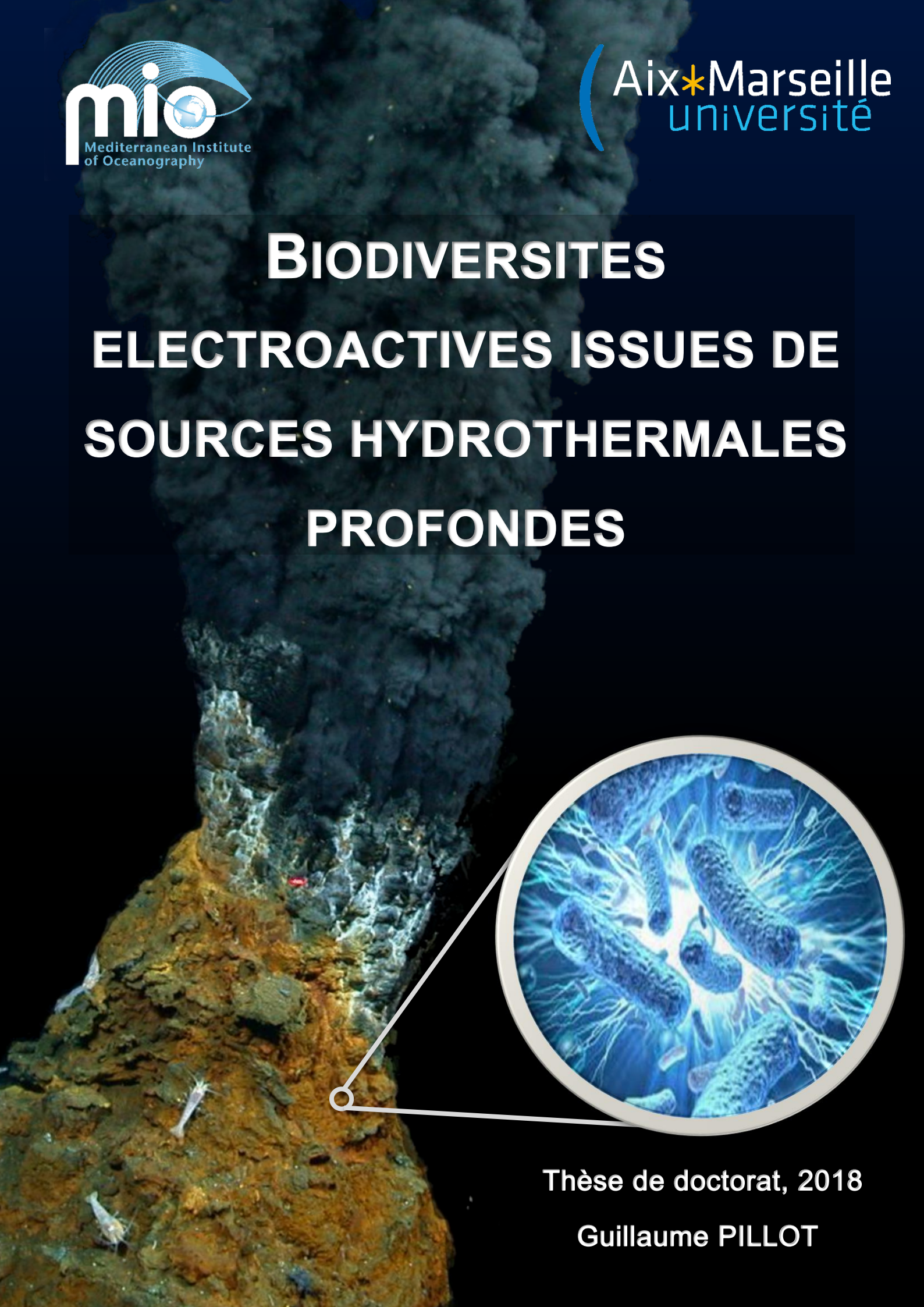
Mediterranean Institute of Oceanography

Aix*Marseille université

BIODIVERSITES ELECTROACTIVES ISSUES DE SOURCES HYDROTHERMALES PROFONDES



Thèse de doctorat, 2018

Guillaume PILLOT

Thèse de Doctorat de l'Université d'Aix-Marseille

Ecole Doctorale des Sciences de l'Environnement

Mediterranean Institute of Oceanography

Biodiversités électroactives issues de sources hydrothermales profondes

Par

Guillaume PILLOT

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université d'Aix-Marseille

Spécialité Océanographie

Soutenue le 14 décembre 2018 devant un jury composé de :

Pr. Valérie Michotey	**MIO, AMU – Marseille**	**Présidente**
Dr. Alain Bergel	**LGC – Toulouse**	**Rapporteur**
Dr. Marie-Anne Cambon Bonavita	**LM2E, IFREMER – Brest**	**Rapporteur**
Dr. Anne Godfroy	**LM2E, IFREMER – Brest**	**Examinateur**
Dr. Richard Auria	**MIO, IRD – Marseille**	**Directeur**
Dr. Pierre-Pol Liebgott	**MIO, IRD – Marseille**	**Co-directeur**

C’est de l’interdisciplinarité que naît l’innovation

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury, Marie-Anne Cambon Bonavita, Anne Godfroy, Valérie Michotey et Alain Bergel d'avoir accepté de juger mon travail de thèse à travers ce manuscrit et ma soutenance de thèse. Je remercie également Carole Baffert, Laurie Casalot, Patricia Bonin et Céline Rommevaux en tant que membres de mon comité de pilotage de thèse, qui m'ont permis de mener à bien ces trois années de travail sans trop m'éparpiller.

Je remercie Richard Sempéré de m'avoir accueilli au sein du M.I.O. pendant ces trois années et de m'avoir aidé à obtenir ma bourse de thèse grâce à ses conseils. Je tiens également à remercier Patricia Bonin et Alain Dolla en tant que responsable de l'équipe MEB et l'Ecole Doctorale 251 « Sciences de l'environnement » pour m'avoir permis d'obtenir un financement pour effectuer cette thèse.

Je tiens à remercier Richard Auria et Pierre-Pol Liebgott dans leur rôle de directeur de thèse. Merci Richard, sans qui je n'aurais pu être doctorant, pour ton rôle administratif et tes signatures si précieuses. Merci Pierre-Pol de m'avoir emmené dans cette grande aventure ensemble. Merci d'avoir remarqué ces quelques mots dans mon CV qui m'ont permis de faire ce projet passionnant avec toi. Merci en tant qu'encadrant de thèse à plein temps, pour ton enthousiasme parfois débordant pour la recherche, pour avoir été ce cheval fou qui m'a fait prendre des initiatives dans mon travail et m'a transmis sa passion. Merci pour ces longues discussions sur l'interprétation des résultats, pour ton investissement dans ma thèse, dans la correction des articles et de mon manuscrit. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir souvent considéré comme ton égal dans la recherche. J'ai pu grandir et m'épanouir à ton contact. Vraiment merci !

Je remercie également Yannick Combet-Blanc et Sylvain Davidson pour leur rôle important dans cette thèse. Yannick, merci pour ces longues discussions sur la microbiologie et les métabolismes microbiens. Merci pour ton esprit critique, ton écoute et tes conseils. Merci beaucoup Sylvain pour ton aide tout au long de cette thèse pour maîtriser les plateformes de fermentation, ces bijoux de technologie, mais aussi pour concevoir les manips et pour avoir partagé ton expérience sur ces petites bêtes hyperthermophiles.

Il me faut aussi remercier Anne Godfroy, qui nous a fournis les échantillons de cheminées indispensables à ce travail de thèse, Véronique Cornet-Barthaux, pour m'avoir initié à la microscopie confocale, Christos Panagiotopoulos, Jean Lorquin et Laetitia Shintu, pour leur aide pour identifier nos molécules mystères. Merci à Carole Baffert pour m'avoir fait découvrir l'électrochimie.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes deux amies (d'infortune ?), Eleonore et Lisa, pilier de soutien durant toute cette thèse. Que de moments passés ensemble, à se soutenir contre vents et marées. Eleonore, nous avons commencé ensemble et nous terminerons ensemble. Merci pour ces pauses café, pour m'avoir fait découvrir le plaisir de la

grimpe, pour m'avoir initié aux sciences occultes de la bio-informatique et pour ton soutien indéfectible. Je te souhaite un avenir radieux, tu le mérites. Lisa, oh Lisa ! Tant de choses à dire, mais qui peuvent se résumer comme cela : Merci d'être toi ! Pour ces « Oui à la vie » mais aussi ces longues discussions à philosopher sur la vie, le bonheur ou l'amour. Tu resteras pour toujours ma Drama Queen ! Bon courage pour cette dernière année.

Un grand merci également à mes deux stagiaires pendant cette thèse, Emilie et Chloé, qui ont contribué grandement à ce travail, tant par les manips que par leur bonne humeur. J'espère avoir été un aussi bon encadrant que vous avez été mes « étudiants ».

J'ai aussi beaucoup de personnes à remercier dans l'équipe MEB, en particulier Marie et Léa S., les deux soleils du labo. Merci pour votre bonne humeur, vos rires et vos encouragements. Merci à Laurie et Gwenola, pour vos conseils si précieux en Bio. Mol., pour avoir géré les comptes, et pour m'avoir aidé à trouver tout le matériel dont j'ai pu avoir besoin (Oui, je sais, j'ai coûté cher… ☺). Merci à Patricia et Valérie pour votre participation dans cette fin de thèse et pour ces discussions sur le cycle de l'azote. Merci également à toute la team pacifique : Corinne, Sophie, Cécile, Philippe, Léa C. et Marc G. pour ces repas partagés, cette bonne humeur. Merci à Isabelle Guedin et Dominique Estivale d'avoir été patiente et si efficace, de m'avoir aidé à affronter les méandres de l'administration.

Merci Pipo, qui n'a pas seulement été un directeur de thèse, mais aussi un ami. Merci pour ces parties endiablées de jeu de rôle, pour avoir partagé ce petit bureau à deux pendant deux ans. Merci à toi, à Sylvain, Jean-Roch, Pierre, Eleonore et Lisa pour ces soirées arrosées au O'Bradys ou au Black Stones, à parler dans l'ordre : d'art, de séries, de religion, de politique et bien d'autres sujets... Merci aussi à Jean-Roch, pour tous ces repas ensemble à midi à Polytech, pour avoir été l'avocat du diable à toutes ces soirées pour relancer les débats, pour tes conseils éclairés. Merci à toute la table de jeu de rôle pendant ces 3 années, Pipo, JR, Matthieu, Dimitri, Oulfat, Jérémie, Guillaume G. …

Je remercie également ces professeurs qui m'ont mené sur ce chemin et ont su me donner l'envie de faire de la recherche. Je remercie Mr. Courtois et Mme Boitel, pour leurs enseignements de microbiologie et biotechnologie en DUT qui m'ont marqué et donné l'envie d'étudier et d'exploiter ces êtres microscopiques. Merci à Hervé Prévost, en tant qu'enseignant de microbiologie à Oniris et maître de stage ingénieur pour m'avoir encouragé à continuer en recherche.

Finalement je remercie mes proches qui m'ont soutenu durant ces trois ans. Merci à Killian, qui a dû me supporter pendant cette fin de thèse. Ce fut rude, mais c'est enfin passé. Merci à ma famille, François, Daria, Annick et Denis. Et particulièrement à mon frère et à ma mère pour le temps que vous avez passé à corriger article et manuscrit. A ma grand-mère, Françoise, à qui je dédie cette thèse et qui je l'espère aurait été fière de moi.

ABREVIATIONS

Français		English	
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	**DNA**	DeoxyriboNucleic Acid
AFM	Microscopie par force atomique	**AFM**	Atomic force microscopy
ARN	Acide RiboNucléique	**RNA**	RiboNucleic Acid
ARNr	ARN ribosomique	**rRNA**	Ribosomal RNA
BEA	Biofilm Electro-Actif	**EAB**	Electro-Active Biofilm
		BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CA	Chronoampérométrie	**CA**	Chronoamperometry
CLM	Cellule d'electroLyse Microbienne	**MLC**	Microbial electroLysis Cell
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse	**GC**	Gas chromatography
CSM	Cellule d'Electrosynthèse Microbienne	**MSC**	Microbial ElectroSynthesis Cell
CV	Cyclovoltammérie	**CV**	Cyclic voltammetry
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole		
EFM	Microscopie par force électrostatique	**EFM**	Electrostatic force microscopy
FISH	Hybridation In Situ en Fluorescence	**FISH**	Fluorescent In Situ Hybridization
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance	**HPLC**	High-Performance Liquid Chromatography
IFREMER	Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer		
LCHF	Champ hydrothermal de Lost City	**LCHF**	Lost City Hydrothermal Field
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la Spectrométrie de Masse.	**LC-MS**	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
LM2E	Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes		
LPSN	Liste des noms procaryotes avec nomenclature	**LPSN**	List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature
LUCA	Dernier ancetre commun universel	**LUCA**	Last Universal Common anecstor
MAR	Dorsale Medio-Atlantique	**MAR**	Mid-Atlantic Ridge
MIO	Institut Méditerranéen d'Océanologie	**MIO**	Mediterranean Institute of Oceanography
OTU	Unité Taxonomique Opérationnelle	**OTU**	Operational taxonomic unit
PCM	Pile à Combustible Microbienne	**MFC**	Microbial Fuel Cell
PCR	Polymerase chain reaction	**PCR**	Polymerase chain reaction
POR	Potentiel d'Oxydo-Réduction	**ORP**	Oxydo-Reduction Potential
qPCR	PCR quantitative	**qPCR**	Quantitative PCR
RMN	Spectroscopie en Résonance Magnétique Nucléaire	**NMR**	Nuclear magnetic resonance spectroscopy
SEM	Système Electrochimique Microbien	**MES**	Microbial Electrochemical System
TED	Transfert d'électron direct	**DET**	Direct electron transfer
TEE	Transfert d'Electrons Extracellulaire	**EET**	External Electron Transfer
		ROV	Remote Operated Vehicle

LEXIQUE

Abiotique : qualifie tous ce qui est indépendant de la biologie ou d'un organisme vivant.

Aérobie : qualifie un métabolisme basé sur la respiration de l'O_2 comme accepteur d'électron ou un environnement riche en O_2.

Anaérobie : qualifie un métabolisme basé sur la respiration d'un composé autre que l'O_2 comme accepteur d'électron ou un environnement sans O_2.

Biocénose : Ensemble des êtres vivants coexistant dans un espace écologique donné, plus leurs organisations et interactions.

Caldeira : Vaste dépression circulaire ou elliptique, généralement d'ordre kilométrique, souvent à fond plat, située au cœur de certains grands édifices volcaniques et résultant d'une éruption qui vide la chambre magmatique sous-jacente.

Classification taxonomique : Domaine – Règne – Phylum – Classe – Ordre – Famille – Genre – Espèce – Souche.

Consortium (Consortia) : groupe de différentes espèces microbiennes vivant en symbiose.

Endémisme : Présence d'une espèce animale ou végétale dans une aire de répartition limitée et qui en est caractéristique.

Enthalpie : Mesure thermodynamique de la variation de la quantité de chaleur contenue dans un système physique ou chimique.

Exoélectrogène : qualifie la capacité à transférer des électrons de la cellule vers un support conducteur extracellulaire, produisant un courant électrique.

Hadéen : Premier éon de l'histoire de la Terre. Il commence avec la formation de la Terre il y a environ 4,6 milliards d'années (Ga) pour se terminer à 4 Ga, et dure donc 600 millions d'années (Ma).

Héminique : qualifie une enzyme contenant de l'hème comme cofacteur dans le rôle d'accepteur d'électron afin de catalyser diverses réactions d'oxydoréduction.

Metabarcoding 16S : Méthode d'identification taxonomique d'une communauté microbienne basée sur le séquençage de région variable du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S.

Metagenomique : Méthode de séquençage et reconstruction du génome complet d'une communauté microbienne basée sur le séquençage de l'ADN. Cette méthode donne une image des potentialités métaboliques d'une communauté microbienne.

Métatranscriptomique : Méthode de séquençage des gènes transcrits complet d'une communauté microbienne basée sur le séquençage de l'ARN. Cette méthode donne une vue globale des voies métaboliques exprimées et actives dans une condition particulière.

Microaérophile : qualifie un microorganisme ne pouvant croître qu'en présence d'une faible concentration en O_2 , devenant toxique à plus forte concentration.

Oxydation : Perte d'électrons d'une molécule

Réduction : Gain d'électrons d'une molécule

Serpentinisation : réaction exothermique d'hydratation de roches ultramafiques transformant l'olivine en serpentine, brucite et magnétite et libérant des quantités importantes de dihydrogène.

Symbiose : Association biologique, durable et réciproquement profitable, entre deux organismes vivants.

Type trophique : définit la manière dont un organisme vivant constitue sa propre matière organique (anabolisme) et produit l'énergie dont il a besoin (catabolisme). Ces deux mécanismes sont intimement liés et forment le métabolisme d'un organisme

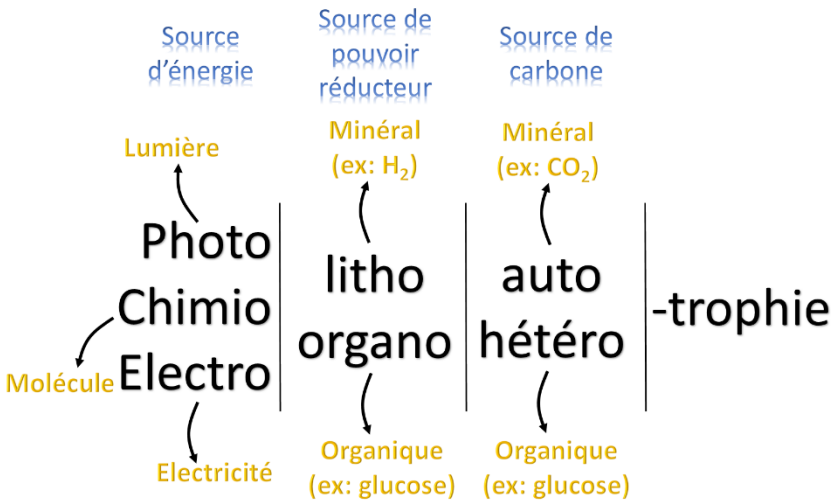


TABLE DES MATIERES

Remerciements **1**
Abréviations **3**
Lexique **5**
Table des matières **7**
Introduction **14**
Chapitre I - Les sources hydrothermales profondes **16**
1. L'histoire des sources hydrothermales 18
2. Géochimie des sources hydrothermales profondes 19
2.1. Formation des différents types de source hydrothermale profonde 19
2.1.1. Les fumeurs acides 19
2.1.2. Les fumeurs alcalins 21
2.1.3. Mixité des processus hydrothermaux et variabilité des sites 23
2.2. Localisation des sources hydrothermales profondes 26
2.2.1. Le site Lost City : exemple de fumeur alcalin 26
2.2.2. Le site Rainbow : exemple de site mixte 27
2.2.3. Le site Lucky Strike : exemple de fumeur acide 27
3. Biotope des sources hydrothermales profondes 28
3.1. La macrofaune des sources hydrothermales profondes 29
3.2. La microflore des sources hydrothermales profondes 30
3.2.1. Métabolismes des sources hydrothermales profondes 31
3.2.2. Biodiversité du compartiment hyperthermophile (>80°C) 39
3.2.3. Biodiversité du compartiment thermophile (45-80°C) 43
3.2.4. Biodiversité du compartiment méso- et psychro-phile (<45°C) 48
3.2.5. Evolution temporelle des communautés : de la colonisation primaire à la chaine trophique 48
4. L'origine de la vie et les sources hydrothermales profondes 52
4.1. Condition pour l'émergence de la vie durant l'Hadéen 52
4.1.1. La surface de la Terre primitive 52
4.1.2. Les océans primitifs 53
4.1.3. Les sources hydrothermales profondes, un lieu propice à l'émergence de la vie 54
4.2. Formation des éléments indispensables à la vie 55
4.2.1. Réduction du carbone et polymérisation : production des premières briques de la vie sur Terre 55
4.2.1. Les proto-membranes : Vésicules lipidiques 56
4.2.2. Proto-métabolisme énergétique 57
4.2.3. Sources de micro et macroéléments. 58
4.3. Les hypothèses d'origine de la vie en contexte hydrothermal 58
4.3.1. L'origine de la vie dans les sources hydrothermales alcalines 59
4.3.2. L'origine de la vie dans un monde Fer-Soufre 59
4.4. LUCA et l'origine de la vie 60
5. Un courant électrique au sein des sources hydrothermales profondes 60
5.1. Origine géochimique de ce courant électrique 60

5.2. Implication de ce courant électrique dans les hypothèses d'origine de la vie 61
5.3. Implication de ce courant électrique dans les écosystèmes hydrothermaux modernes 61
Chapitre II - L'électromicrobiologie – l'étude des micro-organismes électroactifs .64
1. Le concept d'électroactivité 66
1.1. Histoire de l'électroactivité microbienne 66
1.2. Définition d'électroactivité et électromicrobiologie 67
2. Les microorganismes électroactifs 67
2.1. Les microorganismes électroactifs isolés 67
2.1. Les microorganismes électroactifs modèles 69
3. Les mécanismes de transfert d'électrons extra-cellulaire 69
3.1. Transfert d'électrons via un médiateur 71
3.1.1. Transfert indirect d'électrons par l'oxydation d'un produit issu du métabolisme bactérien 71
3.1.2. Transfert indirect d'électrons par des médiateurs physiologiques 71
3.1.3. Transfert indirect d'électrons par des médiateurs artificiels 71
3.2. Transfert d'électrons via des connections à distance 73
3.2.1. Transfert via les nanofilaments composés de pili conducteurs 73
3.2.2. Transfert via les nano-podes composés d'extension de la membrane externe 76
3.3. Transfert d'électrons par contact direct 77
3.3.1. Mécanisme de transfert d'électrons extracellulaire de Geobacter sulfurreducens 77
3.3.2. Mécanisme de transfert d'électrons extracellulaire de Shewanella oneidensis 78
3.4. Mécanismes de transfert d'électrons à la cathode 79
3.5. Mutualisme électronique 80
4. Les Systèmes Electrochimiques Microbiens (SEM) 82
4.1. Concept du Système Electrochimique Microbien 82
4.2. Notion de thermodynamique 84
4.3. Les applications des Systèmes Electrochimiques Microbiens 85
4.3.1. Les Piles à Combustible Microbiennes (MFC) 85
4.3.2. Les Piles à Electrosynthèses Microbiennes (MSC) et l'électrofermentation .87
4.3.3. Les Piles à Electrolyse Microbiennes (MLC) 88
4.3.4. Les Piles à Assainissement Microbien (MRC) 89
4.3.5. Les Piles à Désalinisation Microbienne (MDC) 89
4.3.6. Combinaison des applications et expansion du paysage des MXC 90
4.4. Les techniques électrochimiques d'étude des biofilms électroactifs 90
4.4.1. Performances idéales 90
4.4.2. Evaluation des performances réelles d'un SEM 91
1.1.2. Techniques électrochimiques 95
5. Potentialité des microorganismes extremophiles électroactifs 97
5.1. Définition des microorganismes extremophiles 97
5.2. Les microorganismes acidophiles et alcalophiles électroactifs 98
5.3. Les microorganismes halophiles électroactifs 98
5.4. Les microorganismes thermophiles électroactifs 99
5.5. Les microorganismes hyperthermophiles électroactifs 100
Chapitre III - Objectif de thèse et développement méthodologique 102
1. Objectif de thèse 104

2. Design d'un système electrochimique microbien hyperthermophile 104
3. Mise au point d'outils d'observation microscopique de biofilms electroactifs 107
3.1. Microscopie confocale à balayage laser couplée à des sondes FISH 107
4. Design d'amorces qPCR spécifiques à des groupes phylogénétiques specifiques ..108
4.1. Design des amorces 108
4.2. Validation des amorces qPCR 110
5.5.1. Réalisation des gammes étalons qPCR 110
5.5.2. Quantification par qPCR 110
5.5.3. Dénombrement par microscopie par epifluorescence 111
5.5.4. Comparaison des méthodes 111
Chapitre IV - Etincelle de vie dans les profondeurs: 114
1. Prologue au Chapitre IV.....116
2. Article 1: Electrosynthesis and electrofermentation of pyruvate driving biodiversity's increase in hyperthermophilic nitrate-reducing electrotrophic community from deep hydrothermal vent enriched in bioelectrochemical System. 118
2.1. Introduction.....119
2.2. Material and methods 120
2.2.1. Sample collection and preparation.....120
2.2.2. Electrotrophic enrichment in a microbial electrochemical system.....120
2.2.3. Nitrate/Nitrite quantification.....121
2.2.4. Identification and quantification of organic compounds production.....121
2.2.5. Biodiversity analysis 122
2.2.6. Microscopy observation with fluorescent in-situ hybridization 122
2.2.7. Quantitative PCR of phylogenetic orders 124
2.3. Results 124
2.3.1. Current and Nitrate consumption. 124
2.3.2. Electrosynthesis of organic compounds. 125
2.3.3. Enrichment over time of dominant phylogenetic orders. 126
2.3.4. Statistical analysis of correlation between variables. 127
2.3.5. Microscopic observation of electrotrophic biofilm. 128
2.3.6. Biodiversity on electrode and liquid media over experiments. 130
2.4. Discussion 131
2.4.1. Electrotrophic hyperthermophilic nitrate reduction 131
2.4.2. Electrosynthesis of pyruvate 133
2.4.3. Electrofermentation of pyruvate 134
2.4.4. Trophic chain from electro-autotrophic nitrate reduction to heterotrophy....135
2.4.5. Development of microbial biodiversity from deep hydrothermal vents 135
2.5. Acknowledgments.....137
3. Conclusion sur l'électrotrophie hyperthermophile et implication dans l'origine de la vie 138
3.1. Courant électrique et colonisation primaire 138
3.2. Un modèle hypothétique d'émergence de la vie par électrochimie dans les fumeurs acides 140
3.2.1. Fixation du CO_2 par électrochimie et autotrophie primitive 140
3.2.2. Un courant électrique comme source d'énergie pour la proto-cellule. 141
3.2.3. Un gradient de proton électrochimique à l'origine de la force proton motrice. 143

3.2.4. La mise en place d'un métabolisme autotrophique primitif 144
3.2.5. Des sources hydrothermales alcalines aux sources hydrothermales électrifiées 145
Chapitre V - Production d'électricité en milieu extreme 148
1. Prologue au Chapitre V.....150
2. Article 2: Specific enrichment of hyperthermophilic electroactive Archaea from deep-sea hydrothermal vent on electrically conductive support. 151
2.1. Abstract 151
2.2. Introduction.....152
2.3. Material and methods 153
2.3.1. Sample collection and preparation.....153
2.3.2. Enrichment on iron oxide in flask 154
2.3.3. Semi-Automated Bioelectrochemical Systems.....154
2.3.4. Operating conditions in BES 155
2.3.5. Taxonomic and phylogenetic classification 155
2.3.6. Quantitative PCR of archaeal and bacterial 16S rRNA gene copies 156
2.4. Results and discussion 156
2.4.1. Microbial diversity of hydrothermal chimney from Rainbow site of Atlantic Ocean 156
2.4.2. Enrichment of anode-respiring community in BES from crushed chimney .157
2.4.3. Enrichment of hyperthermophilic microorganisms on crystalline Fe (III) oxide 162
2.4.4. Solid electron acceptor determine the microbial ecology of electroactive enrichment.....163
2.5. Conclusion.....165
3. Article 3 : Production of current by syntrophy between exoelectrogenic and fermentative hyperthermophilic microorganisms in heterotrophic biofilm from a deep-sea hydrothermal chimney. 166
3.1. Abstract 166
3.2. Introduction.....167
3.3. Material and methods 168
3.3.1. Sample collection and preparation.....168
3.3.2. Exoelectrogenic enrichment in a bioelectrochemical system.....169
3.3.3. Biodiversity analysis 171
3.3.4. Quantitative PCR of archaeal and bacterial 16S rRNA gene copies 172
3.3.5. Microscopy observation with fluorescent in-situ hybridization 172
3.4. Results 173
3.4.1. Exoelectrogenic community enrichments and current density production. .173
3.4.2. Evolution in microbial diversity during the first three weeks of enrichment .176
3.4.3. Microscopic observation of exoelectrogenic biofilm.....178
3.4.4. Current density production with a single substrate.....180
3.5. Discussion 180
3.5.1. Hyperthermophilic exoelectrogenic enrichments in MFC 180
3.5.2. Microbial composition of the biofilm community 181
3.5.3. Trophic relation between fermentative and exoelectrogenic microorganisms.. 183
3.6. Acknowledgments.....184

4. Conclusion sur les communautés exoélectrogènes hyperthermophiles des sources hydrothermales profondes 186
Conclusion et perspectives 188
Table des illustrations.....192
Références bibliographiques 198

INTRODUCTION

Ce travail de recherche à été réalisé dans le cadre de la préparation d'un doctorat de l'Ecole Doctorale 251 dans le domaine de l'Océanographie. L'ensemble des travaux réalisés dans ce projet a été effectué au sein de l'équipe 3 de Microbiologie Environnementale et Biotechnologie (MEB) de l'Institut Méditerranéen d'Océanologie (MIO) de Marseille sous l'encadrement de Pierre-Pol Liebgott, chargé de recherche de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et la supervision de Richard Auria, Directeur de Recherche IRD.

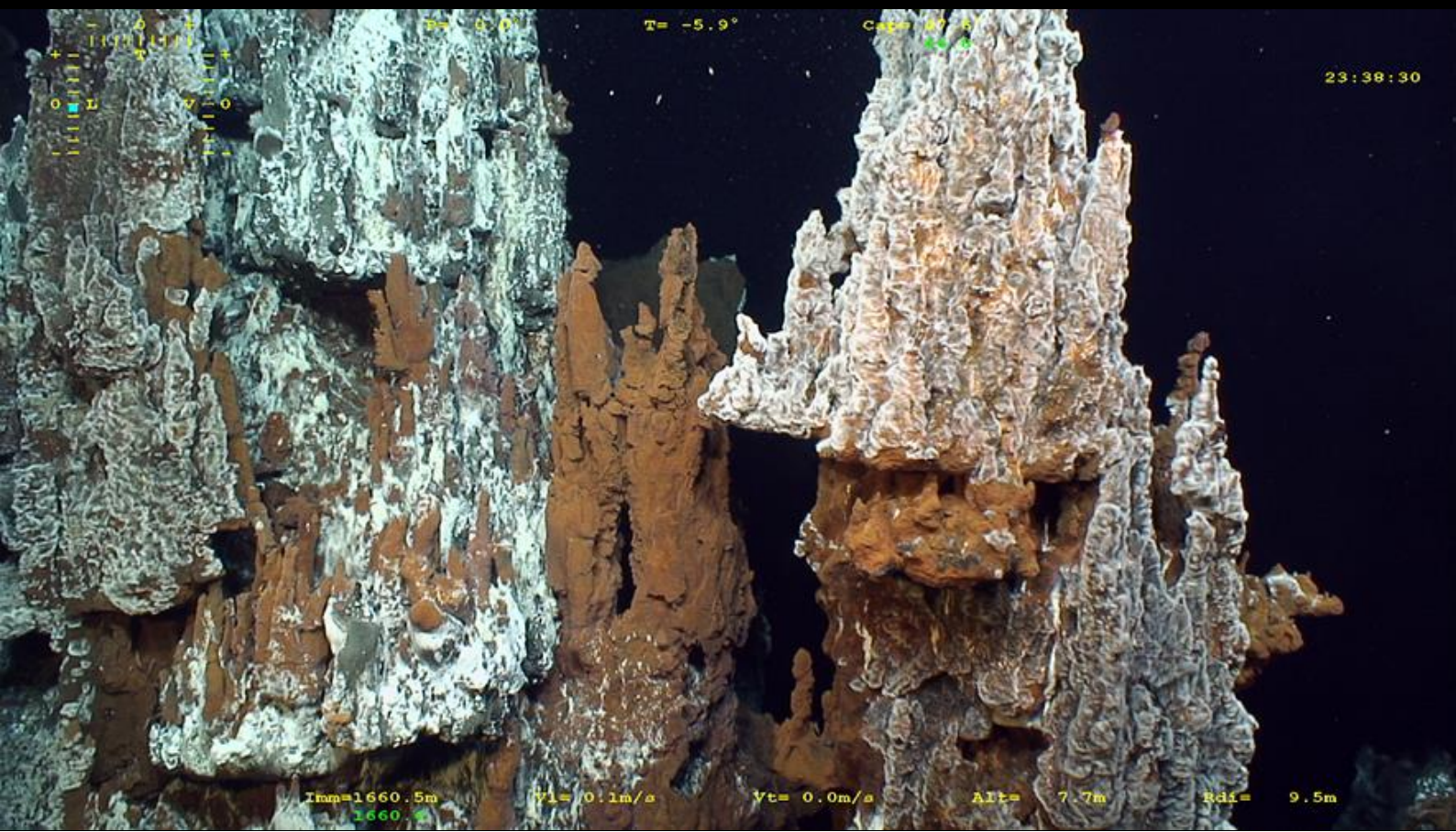
L'objectif de ce projet de recherche était d'étudier le rôle de l'électroactivité dans l'apparition de vie dans les sources hydrothermales, que ce soit lors de la colonisation primaire des cheminées hydrothermales actuelles ou dans les hypothèses d'origine de la vie en contexte hydrothermal sous-marin. Pour cela, nous avons dû démontrer la présence de microorganismes électroactifs hyperthermophiles au sein des sources hydrothermales modernes et étudier leur rôle dans les chaînes trophiques pour le développement d'une biocénose complexe. Grâce à ces résultats et par extrapolation, nous avons pu construire une hypothèse innovante sur l'origine de la vie au niveau de sources hydrothermales profondes présentes sur Terre à l'époque de l'Hadéen.

Afin de vous exposer ces résultats scientifiques obtenus pendant ces 3 années de doctorat, ce manuscrit s'articule autour de 5 chapitres. Les deux premiers posent le contexte scientifique de cette étude avec d'une part, une présentation des écosystèmes hydrothermaux profonds et la théorie d'origine de la vie en contexte hydrothermal et d'autre part, une présentation de l'état de l'art des avancées scientifiques en électromicrobiologie et les applications potentielles en biotechnologie des microorganismes électroactifs. Le troisième chapitre présente l'objectif et la stratégie d'étude utilisée dans ce projet de recherche ainsi que les développements méthodologiques préalablement nécessaires à ces expériences. Finalement les trois derniers chapitres présentent les résultats obtenus suivant deux aspects : Le premier de ces aspects regroupe les résultats obtenus sur les communautés électrotrophes hyperthermophiles et leur rôle potentiel dans la colonisation primaire et l'établissement d'une nouvelle hypothèse de mécanisme ayant potentiellement permis l'émergence de la vie. Le dernier chapitre présente les résultats sur les communautés exoélectrogènes hyperthermophiles dans les sources hydrothermales profondes et leurs interactions trophiques.

Bonne lecture à vous ...

CHAPITRE I - LES SOURCES HYDROTHERMALES PROFONDES

Des oasis de vie perdues au fond des océans



1. L'HISTOIRE DES SOURCES HYDROTHERMALES

C'est le 17 février 1977, lors d'une campagne océanographique sur la dorsale du Pacifique, au large des Galápagos, que fûrent découverte pour la première fois les sources hydrothermales profondes (Corliss and Ballard, 1977). Lors de la descente du submersible américain Alvin à 2000 m de profondeur, un submersible de 16 tonnes équipé pour la recherche dans les abysses, les scientifiques découvrent un paysage bouleversant, composé de longues cheminées d'où s'échappe un panache noir de fluide hydrothermal. Autour de ces édifices géologiques est apparu une biocénose composée d'une macrofaune et d'une microflore abondante et luxuriante. Cet oasis de vie, isolé des rayons solaires, a suscité le vif intérêt des scientifiques pour comprendre le fonctionnement de ces édifices géologiques et comment des organismes vivants ont pu se développer dans ces conditions. C'est grâce au développement au fil des années des moyens d'analyse des fonds marins, tels que les sous-marins permettant la descente de scientifiques (comme le Nautile de l'IFREMER, Figure I-1), les sous-marins télécommandés depuis la surface (comme le ROV Victor 6000, Figure I-1), ou les appareils d'analyse autonome (comme le Glyder SeaExplorer800, Figure I-1) que les scientifiques ont pu étudier ces environnements extrêmes et difficiles d'accès. Ils ont ainsi pu déterminer : (i) les causes géologiques de ces processus hydrothermaux ; (ii) étudier la biodiversité microbienne et animale ; (iii) les interactions trophiques et le rôle dans les cycles biogéochimiques de ces organismes vivants aux capacités d'adaptation extrêmes. De plus, outre l'intérêt géologique et écologique que suscite l'étude de ces environnements extrêmes modernes, ils sont également au centre de débats exobiologistes sur des hypothèses d'origine de la vie en contexte hydrothermal lors de l'Hadéen, il y a environ 4 milliards d'années.

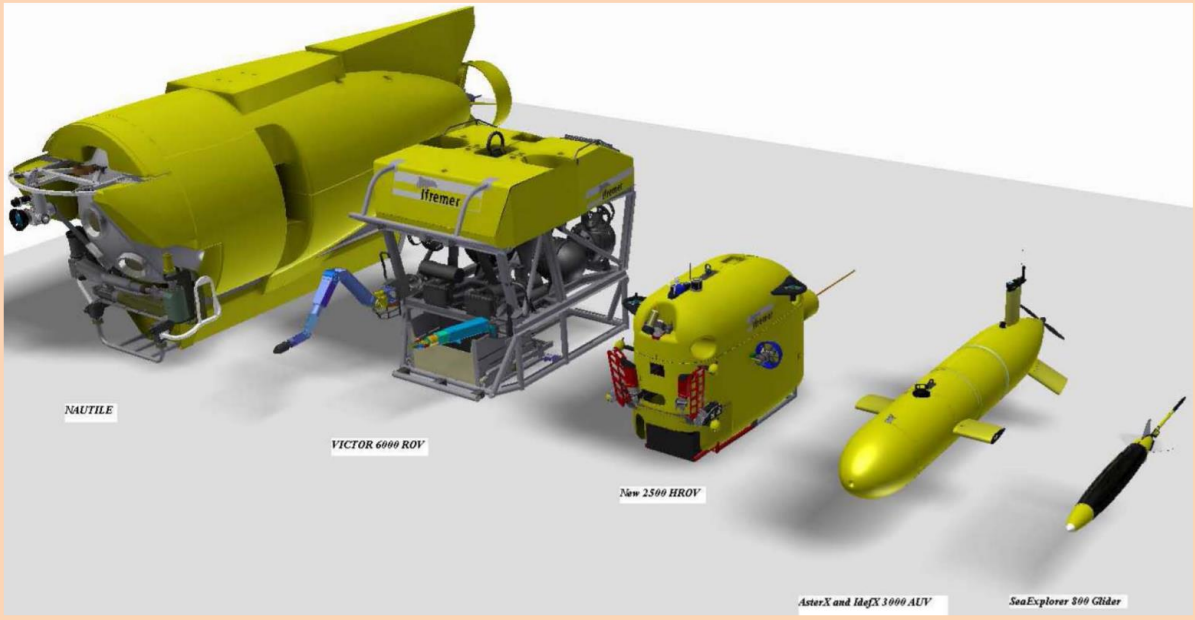


Figure I-1 : Système manuel, autonome ou hybride d'observation et d'analyse sous-marine de l'IFREMER. D'après Rigaud and Nicolas-Meunier (2015)

2. GEOCHIMIE DES SOURCES HYDROTHERMALES PROFONDES

2.1. Formation des différents types de source hydrothermale profonde

Lors de l'étude des sources hydrothermales, les scientifiques ont découvert que les phénomènes d'extension et d'accrétion des plaques tectoniques étaient à l'origine de la remontée de magma (≈1200°C) et de roches du manteau supérieur (péridotites etc.) à quelques kilomètres de profondeur du plancher océanique. Ces processus tectoniques et le refroidissement du magma forment des anfractuosités au niveau de la croûte océanique (épaisse de 5 à 15 km) permettant l'infiltration d'eau de mer. La résurgence de ces poches magmatiques et des roches du manteau supérieur est à l'origine de deux processus distincts de formation des systèmes hydrothermaux, ayant des conséquences sur la composition du fluide et la structure minérale des cheminées hydrothermales. Ces deux processus sont notamment différenciés par le pH du fluide hydrothermal, donnant ainsi une classification théorique avec deux types de fumeurs : les fumeurs acides, et les fumeurs alcalins.

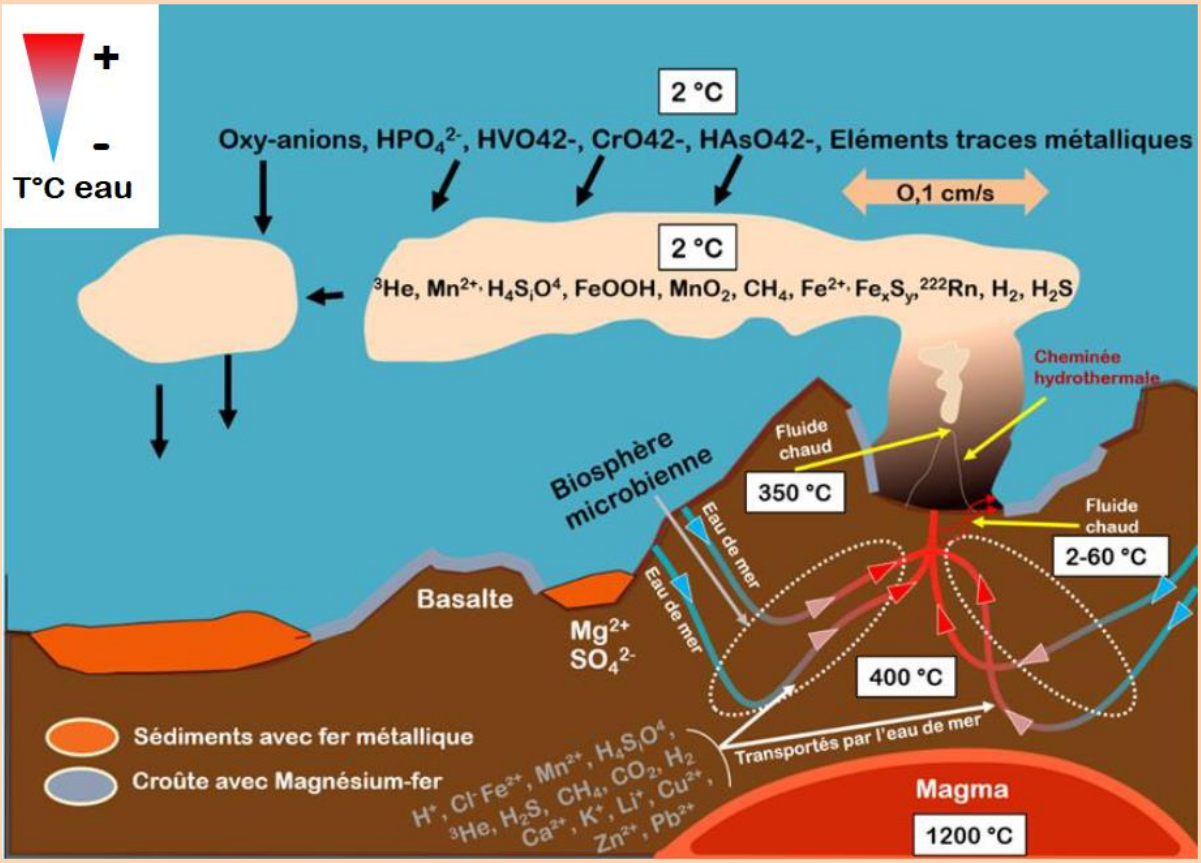


Figure I-2 : Schéma de formation des sources hydrothermales acides en contexte basaltique ou mixte (Modifié par E. Pasero d'après Gary Massoth/PMEL).

2.1.1. *Les fumeurs acides*

Les fumeurs acides sont issus de l'infiltration d'eau de mer dans les fissures d'un plancher océanique composé majoritairement de roches basaltiques et sous l'influence d'une chambre magmatique souterraine. Le transfert thermique provoqué par le magma en fusion et les hautes pressions, réchauffe cette eau de mer à l'origine froide (2°C) jusqu'à 400°C. Cette

augmentation de température et de pression augmente son pouvoir de solubilisation et la repousse vers la surface, percolant dans la lithosphère et lessivant les roches crustales pour former un fluide acide (jusqu'à pH≈2-3) enrichi en éléments métalliques (Fe^{2+}, Mn^{2+}, Si^{+}, Zn^{2+}) et gazeux (H_2, H_2S, CH_4, CO, CO_2) très réduits. En effet, les sulfates réagissent avec le fer contenu dans la roche pour produire du sulfure d'hydrogène (H_2S) ou des oxydes de fer (FeOH), tandis que le magnésium réagit avec les hydroxydes et la silice. Ainsi, par ces réactions d'oxydoréduction, le fluide s'appauvrit en oxygène dissous et en sels minéraux (Mg^{2+}, NO_3^-, SO_4^{2-}, et PO_4^{3-}), diminuant sa salinité (de 0,1 à 2 fois celle de l'eau de mer). Ce fluide hydrothermal, repoussé vers la surface, ressort du plancher océanique à des endroits localisés pour entrer en contact avec l'eau de mer froide (≈2°C) oxydée et au pH plus élevé (pH≈8.2). Cette différence de conditions physico-chimiques provoque une précipitation des minéraux qui s'accumulent pour former des cheminées hydrothermales, qui s'élèvent en structures concentriques jusqu'à 100 m de hauteur. Au cours du temps, la structure de la cheminée va s'enrichir en différents éléments suivant plusieurs étapes (Fouquet et al., 1988).

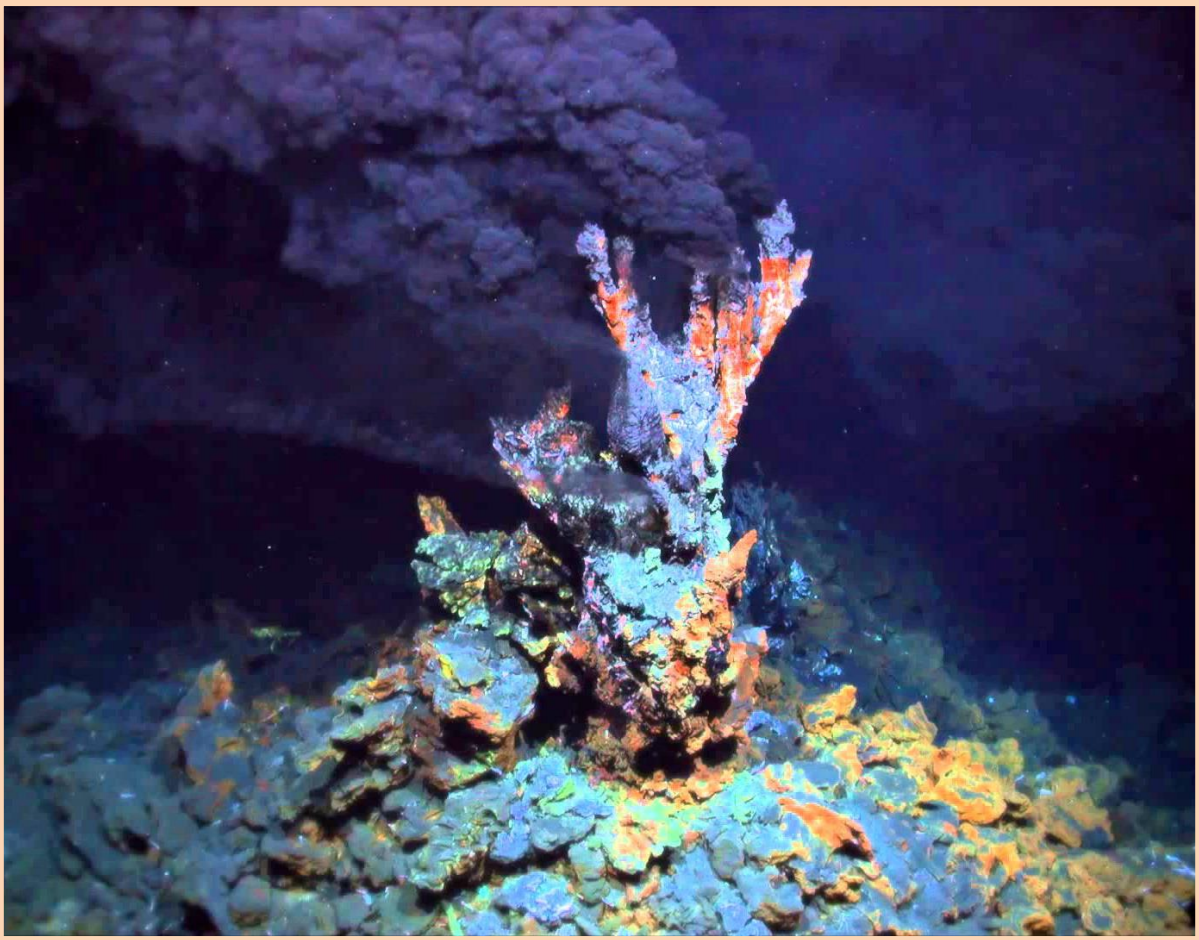


Figure I-3 : Cheminée hydrothermale acide riche en métaux et sulfure lui donnant ces couleurs caractéristiques (Crédit photo : jighinfo-terra.blogspot.com)

Lors des premières émissions de fluide chaud à la surface du plancher océanique, des dépôts poreux de barytine ($BaSO_4$) et d'anhydrite ($CaSO_4$) se forment à partir des ions sulfates présents dans l'eau de mer. L'édifice en formation va alors croître verticalement en s'enrichissant de dépôts métalliques sulfureux (fer, cuivre et zinc). Ces dépôts secondaires

vont alors colmater la matrice poreuse initiale et former une délimitation physique entre l'eau de mer et le fluide hydrothermal.

Ce colmatage progressif des pores de l'édifice géologique naissant va provoquer une augmentation interne de la température permettant, dans une deuxième phase, la formation de sulfures polymétalliques (pyrite, marcassite, pyrrhotite, chalcopyrite, isocubanite). Ces minéraux sont produits par réaction entre le sulfure d'hydrogène et les ions métalliques (Fer, cuivre, manganèse) du fluide hydrothermal et forment le conduit central de la cheminée, stabilisant la structure. Ils lui donnent également ces nuances de couleurs caractéristiques des roches métalliques.

Finalement, la cheminée va continuer de croitre à la fois vers l'intérieur et vers l'extérieur et parfois par des expansions latérales. En effet, le chemin emprunté par le fluide hydrothermal peut varier au cours du temps, empruntant et créant une multitude de cavités et de canaux. Ce processus peut durer de quelques années à plusieurs décennies suivant l'activité tectonique du site, formant des fumeurs de taille variant entre 70 à 100 m de hauteur avec un diamètre à la base de 25 à 100 m. Avec le temps et les mouvements tectoniques, l'influence magmatique du site peut diminuer et les conduits se colmater, rendant certaines cheminées inactives. Elles finissent souvent par s'écrouler pour donner naissance à d'autres édifices sur le site hydrothermal. Ainsi l'étude d'une cheminée au cours des années par les scientifiques peut s'avérer compliquée.

2.1.2. Les fumeurs alcalins

Les sources hydrothermales alcalines sont quant à elles issues de l'infiltration d'eau de mer dans un plancher océanique majoritairement composé de roches ultramafiques, sans influence de chambre magmatique. Les roches ultramafiques ou roches ultrabasiques sont des roches magmatiques et méta-magmatiques très pauvres en silice (moins de 45 % en masse) leur conférant leur caractère basique, et contenant plus de 90 % de minéraux riches en fer et magnésium. Ces roches, notamment la péridotite, proviennent de résurgences du manteau supérieur à travers des failles tectoniques. L'hydratation de ces roches ultramafiques provoque une réaction exothermique de Serpentinisation, libérant de l'hydrogène et transformant les péridotites en serpentine, brucite et magnétite (Équation 1). Cette réaction est responsable de l'augmentation de la température locale jusqu'à 120 °C au maximum.

Équation 1 : Réaction de serpentinisation

$$\text{Péridotite} + H_2O \rightarrow \text{Serpentine} + \text{Brucite} + \text{Magnetite} + H_2$$

Sous l'effet de la pression et de la température, l'hydrogène produit et le CO/CO_2, provenant du manteau supérieur ou des carbonates marins, vont réagir par des procédés de type Fischer-Tropsch pour produire du méthane (CH_4) et de petits acides gras à courte chaine comme l'acétate. L'augmentation de la température et le relargage de molécules réduites produisent un fluide hydrothermal chaud (jusqu'à 90 °C), réduit et alcalin (pH entre 9 et 11). Ce fluide remonte à la surface et le CO_2 présent précipite au contact de l'eau de mer plus acide, pour former des carbonates de calcium. L'accumulation de ces carbonates forme des cheminées hydrothermales blanchâtres pouvant atteindre 30 à 60 m de haut (Martin and Russell, 2007). Le premier site hydrothermale alcalin profond connu, appelé Lost City Hydrothermal Field (LCHF), fut découvert en 2000 lors d'une expédition de la National Science

Foundation sur la dorsale médio-atlantique. Depuis, d'autres sources hydrothermales alcalines de profondeur ont été observées, tel que sur la dorsale centrale Indienne ou près de la Fosse des Mariannes (Schrenk et al., 2013). On retrouve également différents sites marins de surface, tel que le champ hydrothermal de Strýtan en Islande (Stanulla et al., 2017) ou le site hydrothermal de Prony en Nouvelle Calédonie (Monnin et al., 2014).



Figure I-4 : Cheminée alcaline de Lost City composée principalement de carbonate de calcium lui donnant cette couleur blanche (Crédit photo : University of Washington)

2.1.3. *Mixité des processus hydrothermaux et variabilité des sites*

Lors de la découverte des premiers sites hydrothermaux profonds, les scientifiques considéraient que la composition des fluides était relativement constante et stable. Cependant, l'étude d'un plus grand nombre de sites a permis de constater que la composition du fluide pouvait être très variable (Table I-1). Plusieurs phénomènes vont établir cette variabilité. Tout d'abord, la plupart des sites hydrothermaux actuels résultent de la combinaison des deux processus hydrothermaux vus précédemment, à des proportions plus ou moins importantes, conduisant à une diversité importante de la composition des fluides et des cheminées hydrothermales. On appelle ces sites des sites mixtes.



Figure I-5 : Fumeur blanc ou diffuseur (Crédit photo : oceanexplorer.noaa.gov)

D'autre part, avant sa sortie à la surface du plancher océanique, le fluide hydrothermal peut se retrouver mélangé avec de l'eau de mer avec des compositions ou des débits différents. Ainsi, une deuxième division est faite entre les fumeurs « noirs » (acide ou basique) où le fluide émis est pur et les fumeurs « blancs » ou diffuseurs (Figure I-5), où le fluide est dilué par l'eau de mer. Le fluide hydrothermal des fumeurs blancs est caractérisé par une température abaissée et de faibles débits. Les minéraux dominants dans la matrice des fumeurs blancs sont des sulfures de zinc et de fer (sphalérite, wurtzite) avec pas ou peu d'anhydrite, et peu de cuivre (Fouquet, 1997; Fouquet et al., 1988). Ces fumeurs blancs se manifestent sous forme d'émissions diffuses, fréquemment translucides ou peu chargées en particules. En effet, ils ne comportent généralement pas de conduit central comme les fumeurs noirs plus localisés. Dans l'environnement, tous les types d'intermédiaires entre fumeurs blancs et fumeurs noirs existent.

Finalement, une dernière morphologie de cheminée a été observée. L'accumulation du fluide hydrothermal sous une saillie rocheuse forme par précipitations successives un plafond

minéral poreux constitué de microcavités d'où le fluide s'échappe lentement. On appelle ces formations géologiques des « flanges » (Figure I-6).

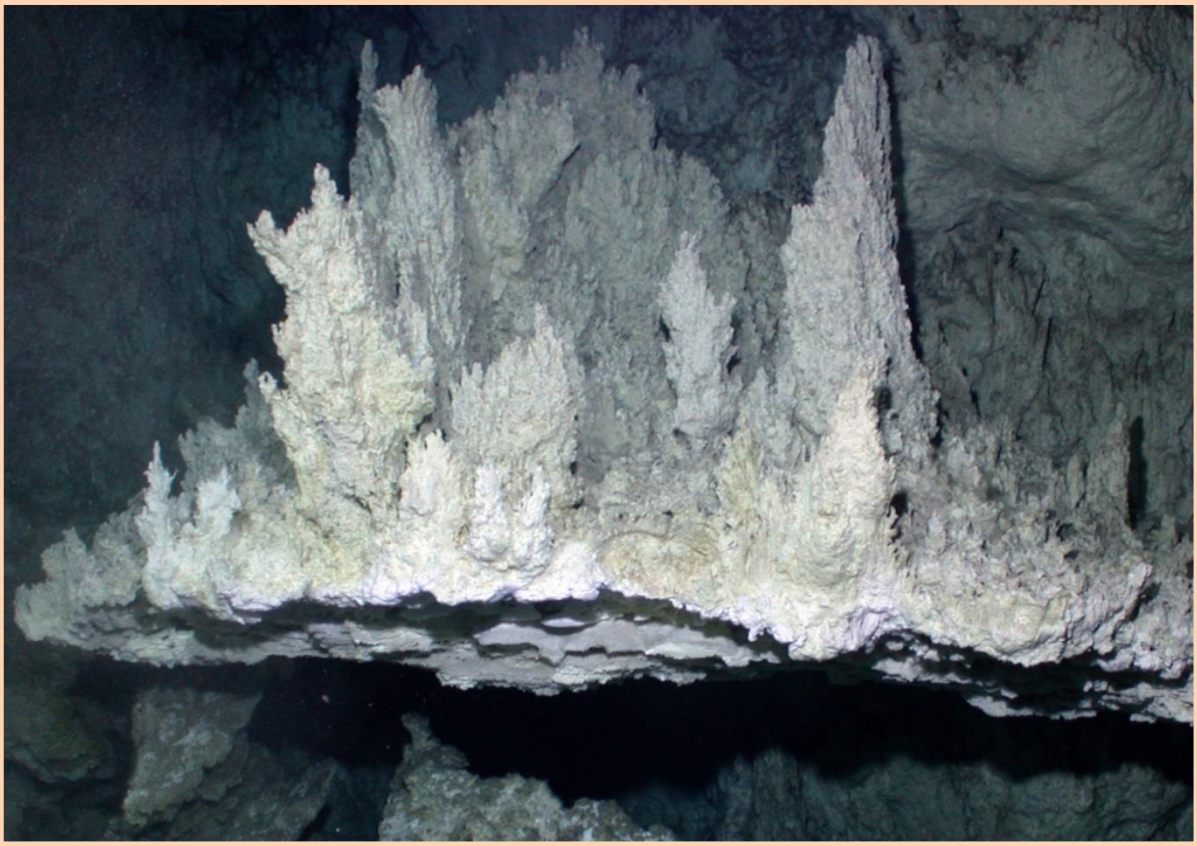


Figure I-6 : "Flange" formé par l'accumulation de fluide hydrothermal sous une saillie rocheuse (Crédit photo : University of Washington)

Table I-1 : Caractéristiques physico-chimiques moyennes de fluide hydrothermal de différents types de sources hydrothermales profondes. Exemple de fumeur alcalin (Lost City), fumeur acide (Lucky Strike et Menez Gwen) et de site mixte (Rainbow) de la dorsale médio-atlantique. (Cerqueira et al., 2017; Charlou et al., 2000; Desbruyères et al., 2001; Flores et al., 2011a; Tivey, 2007)

	Dorsale médio-océanique	Bassin arrière-arc	Sediment-Hosted	Fumeurs alcalins	Site mixte	Fumeurs acides		Eau de mer
				Lost City	Rainbow	Lucky Strike	Menez Gwen	
Conditions physiques								
T°C	≤ 405	278-334	100-315	≤ 91	360-365	300-333	265-284	2
pH (25°C)	2.8-4.5	< 1-5.0	5.1-5.9	9-11	2.8	3.7	4.2	8.1
Composition en gaz dissous (mM)								
H_2	0.0005-38	0.035-0.5	-	< 1- 15	13	0.21	0.04	-
H_2S	0-19.5	1.3-13.1	1.10-5.98	< 0.064	1-2.9	1.4-3.3	1.5-2	-
CO_2	3.56-39.9	14.4-200	-	-	≤ 16	8.9-28	17-20	2.36
CH_4	0.007-2.58	0.005-0.06	-	1-2	0.13-2.2	0.5-0.97	1.35-2.63	-
Composition minérale								
Na (mM)	10.6-983	210-590	315-560	479-485	553	347-446	312-319	464
Cl (mM)	30.5-1245	255-790	412-668	547-554	750	417-533	357-381	545
Ca (mM)	4.02-109	6.5-89	160-257	< 30	67	31.3-38.2	29.7-33.1	10.2
K (mM)	-59.87	10.5-79	13.5-49.2	10.5	20	21.1-26.7	22.1-23.8	10.1
Mg (mM)	0	0	0	<1	0	0	0	53
Ba (µM)	1.64-18.6	5.9-100	> 12	-	> 67	9.4-52.2	20.0-42.8	0.14
NH_3 (mM)	< 0.65	-	5.6-15.6	-	-	-	-	-
Fe (µM)	7-18700	13-2500	0-180	-	8100-24000	31-863	24.1-28.2	0.0045
Mn (µM)	59-3300	12-7100	10-236	-	2250	84-446	59-71	-
Cu (µM)	0-150	0.003-34	< 0.02-1.1	-	140	1.1-26	0.16-0.41	-
Zn (µM)	0-780	7.6-3000	0.1-40	-	160	5.1-57.8	2.4-5.1	-
Pb (µM)	0.183-0.163	0.036-3.9	< 0.02-0.652	-	0.148	0.020	-	0.00034
Co (µM)	0.02-1.43	-	< 0.005	-	13	-	-	-
Cd (µM)	0.091	-	< 0.01-0.046	-	0.13	-	-	-
Ni (µM)	-	-	-	-	3	-	-	-
SO_4 (mM)	0	0	0	1.4-4.4	0	-	-	28
NO_3 (µM)	-	-	-	-	15.4	11.8-17.1	-	18.2-20.03

2.2. Localisation des sources hydrothermales profondes

Comme évoqué précédemment, les processus hydrothermaux résultent d'une résurgence de roches du manteau supérieur ou de la présence de poches magmatiques souterraines. Ces conditions sont majoritairement retrouvées dans des zones de forte activité tectonique et à des profondeurs variant entre 700 et 4 000 mètres, au niveau des dorsales médio-océaniques de l'Atlantique, du Pacifique oriental (EPR : East Pacific Rise), et de l'Océan Indien, ou des bassins arrière-arcs du Pacifique occidental (Bassin de Lau, Bassin Nord-Fidjien, Bassin de Manus). La Figure I-7 présente une liste non-exhaustive des sites hydrothermaux étudiés jusqu'en 2011. Sur les 60 000 km de dorsales océaniques que compte le globe terrestre, seules quelques centaines de kilomètres ont été explorées à ce jour. Actuellement, plus de 700 édifices hydrothermaux ont été référencés sur la base InterRidge Vents Database (http://vents-data.interridge.org), représentant plus de 500 champs hydrothermaux (Dick et al., 2013).

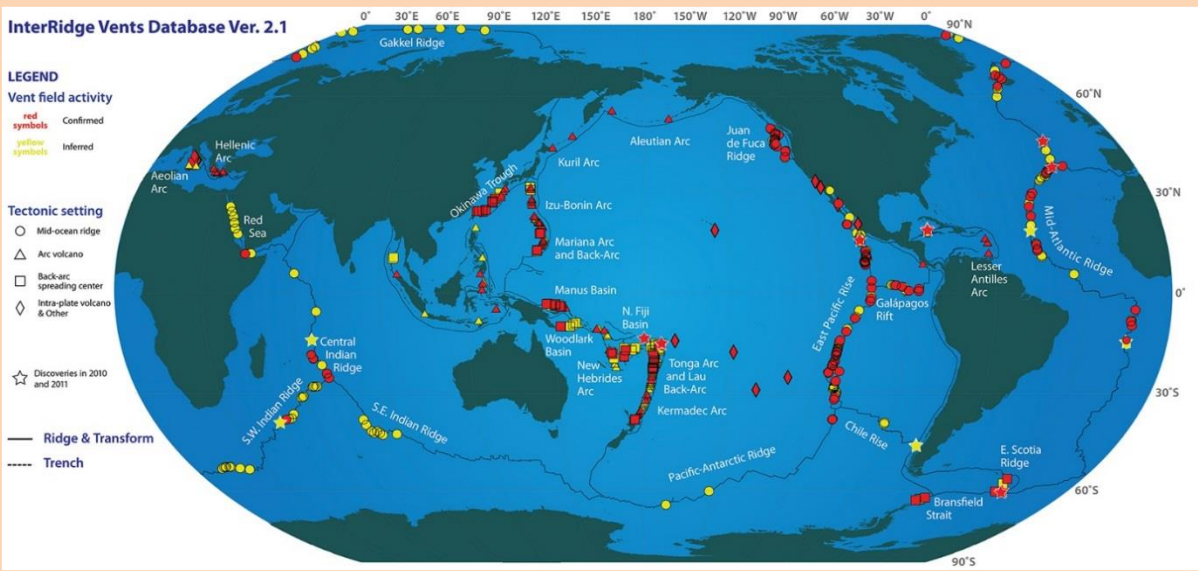


Figure I-7 : Localisation des sources hydrothermales profondes sur le globe terrestre (D'après InterRidge Vents Database - 2011).

Parmi tous ces sites, trois sites retiendront notre attention dans le cadre de ce travail de thèse. Le premier, le site de Lost City, utilisé comme « modèle » pour l'établissement des théories d'origine de la vie en contexte hydrothermal alcalin. Les deux suivants, utilisés comme objet d'étude pour les expériences menées lors de ce projet de recherche, sont le site Rainbow et le site Lucky Strike.

2.2.1. Le site Lost City : exemple de fumeur alcalin

Le site hydrothermal Lost City a été découvert en 2000 par des équipes américaines sur le massif Atlantis à 750-900 m de profondeur à 15 km de l'axe de la dorsale médio-atlantique. Hors d'un contexte magmatique, ce sont les réactions de Serpentinisation de roches ultramafiques riches en magnésium, exportées par la dislocation du massif, qui vont produire le fluide hydrothermal alcalin (pH entre 9 et 11) à des températures plus basses (40 à 91°C) que les sites d'origine magmatique. Le fluide est caractérisé par de fortes

concentrations en H_2 et CH_4, par la présence d'acides gras à chaîne courte et les faibles concentrations en sulfure et métaux. La principale source de carbone du fluide sont les ions carbonate ($CO3^{2-}$) qui précipitent au contact de l'eau de mer plus acide pour former les cheminées de 60 à 100m de hauteur (Kelley et al., 2005).

2.2.2. *Le site Rainbow : exemple de site mixte*

Le champ hydrothermal de Rainbow fut découvert en 1997 à 2350m de profondeur, sur le segment nord de la dorsale médio-atlantique (36°13,80' N, 33° 54′ 20″ O), lors de la campagne de plongée FLORES menée conjointement par 5 pays européens (France, Royaume-Uni, Belgique, Portugal, Irlande), dans le cadre du projet AMORES. Le panache de Rainbow a été détecté grâce à des anomalies géochimiques dans la colonne d'eau (Fouquet, 1997). Le site est localisé sur le flanc Ouest d'une ride non-volcanique sur une zone d'affleurement de roches ultramafiques. Des roches basaltiques sont également présentes à moins d'un kilomètre du site actif. Le site se compose de 30 groupes de petites cheminées actives dispersées sur une aire de 15 000 m^2.

Les fluides émis par ces fumeurs noirs y sont particulièrement acides (~pH 2.8) et chauds 365°C (Table I-1). Ils sont également très riches en hydrogène et méthane produits par les réactions de serpentinisation avec l'affleurement de roches ultramafiques. Cependant, contrairement au site de Lost City, le pH du fluide est très acide indiquant très probablement un contexte magmatique souterrain encore inconnu. Celui-ci permettrait la montée en température du fluide à des valeurs si élevées conduisant à la solubilisation d'éléments de roches ultramafiques ou basaltiques ce qui entrainerait la libération d'ions H^+ en grande quantité dans le fluide. On retrouve ainsi de faibles quantités d'H_2S, Si, Al, Li et une haute teneur en chlorures (> 750 mM) permettant une forte stabilisation des métaux (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ag, Cd, Cs, Pb, Y) par formation de complexes aqueux de chlorures. En contact avec l'eau de mer froide, ces complexes précipitent pour former des cheminées très riches en chalcopyrite et sphalérite.

2.2.3. *Le site Lucky Strike : exemple de fumeur acide*

Le site de Lucky Strike a été découvert en 1993 lors de la campagne FAZAR à une profondeur de 1700m au sud-ouest des Açores (37° 18′ N, 32° 16′ O), sur le sommet d'un volcan de la dorsale médio-atlantique. Une chambre magmatique axiale est reportée à 3.4 km sous le plancher océanique en lien direct avec les sites actifs. Il est constitué de 21 cheminées actives sur une zone de 150 000 m² entourant la caldeira d'un ancien lac de lave d'un volcan d'environ 450 m d'altitude pour 13 et 7 kilomètres de dimensions à sa base. Le champ hydrothermal Lucky Strike est l'un des champs hydrothermaux les plus étendus connus actuellement dans l'océan atlantique (Langmuir et al., 1997).

Les fluides des cheminées de Lucky Strike sont caractérisés par une température entre 300 et 333°C, la présence en quantité importante de méthane (jusqu'à 0,85 mmol/kg) et par la faible quantité en sulfures (< 3 mmol/kg). La chlorinité du fluide est voisine de celle de l'eau de mer (500-520 mmol/kg).

Un nouveau site actif, appelé Capelinhos, fut découvert en 2013 par le ROV Victor6000 à 1.5 km à l'est du site principal de Lucky Strike durant la campagne océanographique MoMARsat 2013. Il est composé de deux fumeurs noirs principaux mesurant plus de 10 m de haut ainsi qu'une dizaine de cheminées périphériques, en plus de flanges et de diffuseurs. Les cheminées sont très riches en sulfures et oxydes de fer, lui donnant une couleur orange-rouge très caractéristique (Henri et al., 2015). Le fluide hydrothermal à 328°C, est caractérisé par une très forte concentration en fer et par une très faible chlorinité (270 mM), indiquant très peu de mélange avec l'eau de mer avant sa sortie de la croûte océanique (Leleu et al., 2015).

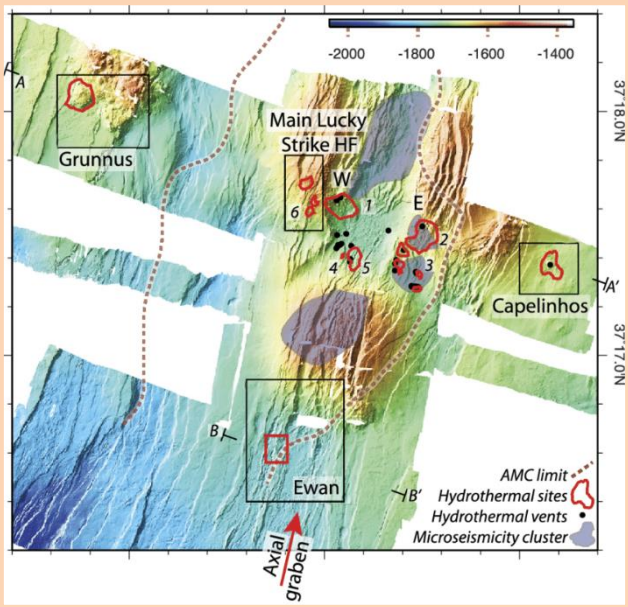


Figure I-8 : Micro-bathymétrie du Site Lucky Strike montrant les quatre champs hydrothermaux. (Crédit : IFREMER)

3. BIOTOPE DES SOURCES HYDROTHERMALES PROFONDES

Lors des mélanges turbulents de fluide hydrothermal et d'eau de mer, de forts gradients thermiques et chimiques se forment et constituent une très grande diversité de conditions pour le développement d'organismes vivants. Ces organismes sont très diversifiés et capables de s'adapter à ces conditions extrêmes et changeantes. L'observation de ces communautés vivantes a permis d'identifier et d'étudier des macroorganismes, constituant la macrofaune, et le développement de tapis microbiens sur les surfaces minérales des cheminées hydrothermales, constituant la microflore de ces écosystèmes. Toutes ces espèces vivantes sont interconnectées sous la forme d'une chaine trophique complexe dont certains aspects restent encore obscurs ou spéculatifs.

L'intérêt des scientifiques pour les organismes vivants de ces environnements est de plus en plus important au fil des années comme le montre la Figure I-9. En effet, l'étude de ces organismes a permis d'améliorer la compréhension des mécanismes des cycles de la matière des océans et de développer de potentielles applications de ces organismes extrêmophiles en biotechnologie ou dans le domaine médical.

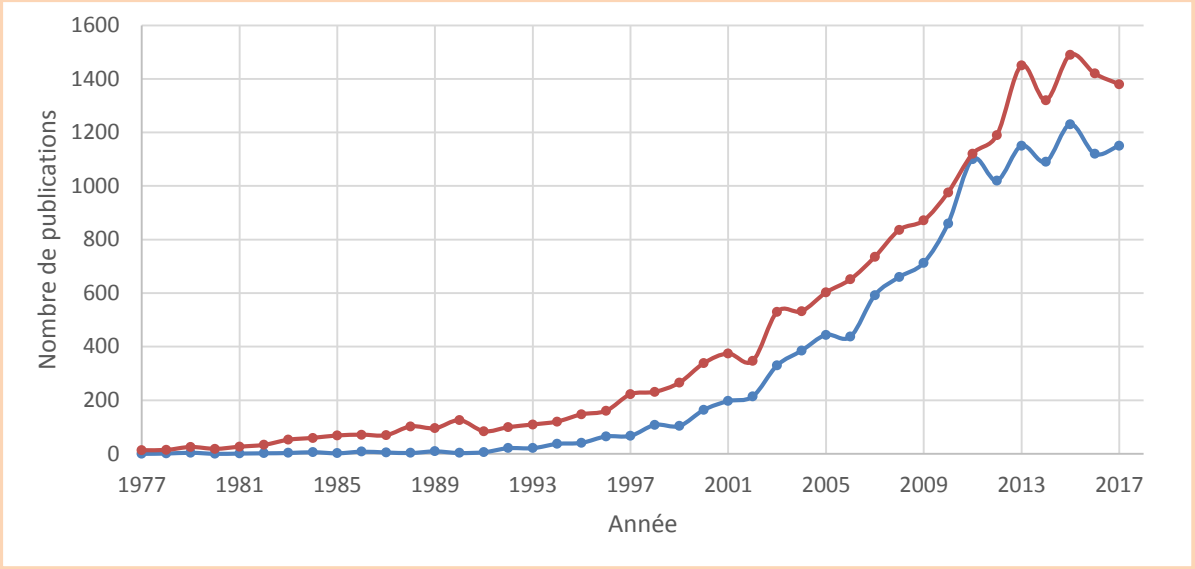


Figure I-9 : Evolution du nombre de publications par année sur la biodiversité (« biodiversity hydrothermal vents », bleu) et sur les nouvelles espèces isolées (« nov. sp. hydrothermal vents », rouge) des sources hydrothermales depuis la découverte des sources hydrothermales profondes en 1977 (d'après Google Scholar Juillet 2018)

3.1. La macrofaune des sources hydrothermales profondes

Suivant le type de site hydrothermal, la population de macroorganismes habitant les alentours des cheminées est différente. La macrofaune des sites alcalins est pauvre, avec seulement de petits invertébrés, tel que des escargots, bivalves, polychètes, amphipodes et ostracodes. Les animaux plus grands sont absents de la surface des cheminées de carbonate (Kelley et al., 2005). A l'inverse, la macrofaune retrouvée dans les environnements des fumeurs acides ou mixtes est composée de bivalves, poissons, crustacés et poulpes se développant à proximité des cheminées dans des gradients de température allant de 4 à 50°C. Au pôle chaud (20-50°C), le plus proche du fluide, on observe des crabes de la famille des *Bythograeidae* (par exemple du genre *Cyanagraea*), ainsi que des annélides polychètes des genres *Alvinella* (ver de Pompéi) et *Paralvinella*. Plus loin, le pôle tiède (10-20°C) est occupé par des vers tubicoles (*Riftia pachyptila*, *Lamellibrachia barhami*), des crabes, de petits poissons (anguille des sources, *Aphyonides*…). Au pôle froid vivent des animaux plus grands, comme des poulpes (*Benthoctopus*, *Graneldone*), des poissons abyssaux benthiques (grenadiers, donzelles, chabot blob) ainsi que des communautés de bivalves (*Bathymodiolus*, *Calyptogena*).

Toutes ces espèces sont caractérisées par une densité de biomasse importante sur de petites surfaces (jusqu'à 50 kg/m²). Cette macrofaune est surtout située autour des cheminées hydrothermales. Elle est caractérisée par une biodiversité spécifique et endémique à ces écosystèmes. Pour coloniser de nouveaux espaces dans cet écosystème très instable, la macrofaune a développé des stratégies de propagation, soit par mobilité, soit par des propagules (ex : larves) portées par les courants.

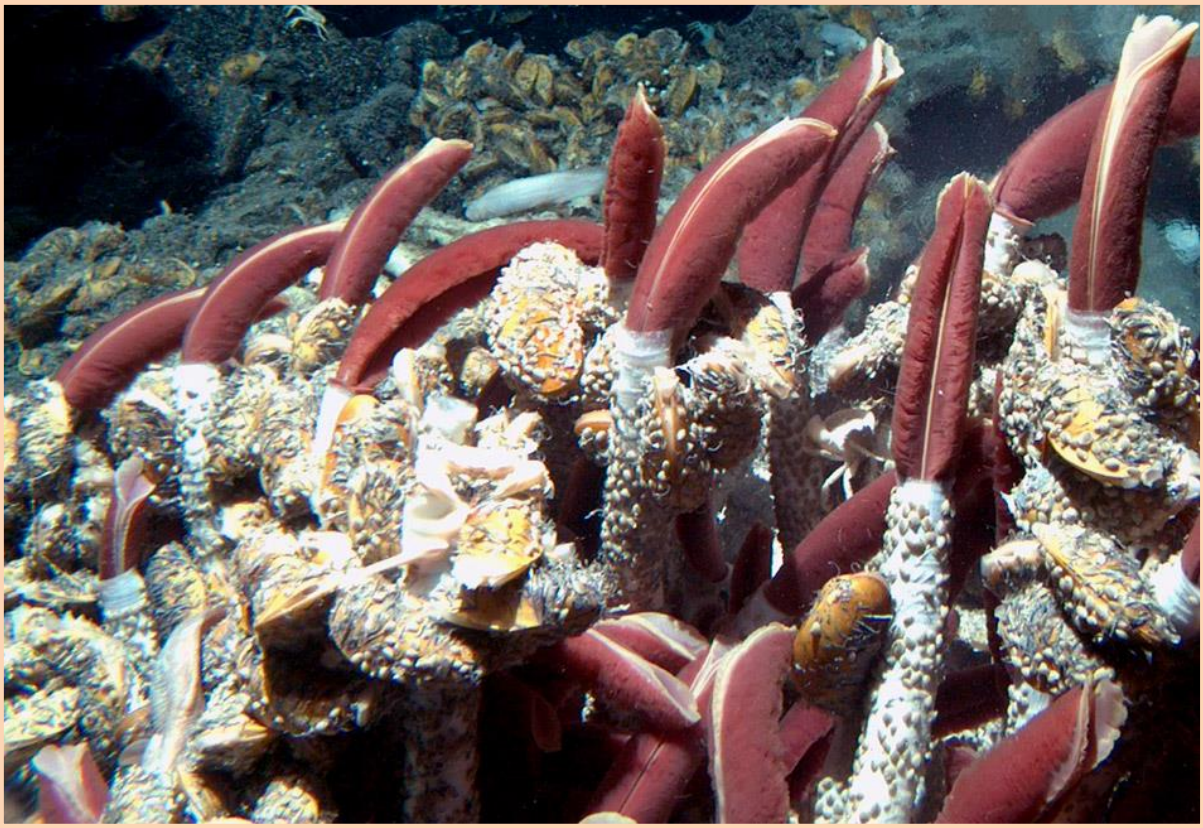


Figure I-10 : Macrofaune se développant sur la surface des cheminées hydrothermales acides composée de vers tubicoles, de crabes, de crevettes et de bivalves (Crédit photo : Woods Hole Oceanographic Institution)

Cette macrofaune, spécifique des sources hydrothermales profondes, se développe au sein d'une chaine trophique dépendante de microorganismes. En effet, les macroorganismes ont besoin de matière organique pour se développer. Dans les sources hydrothermales profondes, la photosynthèse n'est pas possible par manque de rayonnement solaire. Ainsi, seuls les microorganismes capables de « Chimiolithoautotrophie », c'est-à-dire la production de matière organique à partir du CO_2 dissous présent dans le fluide ou l'eau de mer, sont capables de se développer. Cette relation entre micro- et macroorganismes peut se faire : (i) par « broutage » des tapis microbiens se développant sur les surfaces minérales ; (ii) par des symbioses au niveau des systèmes digestifs. De plus, les communautés microbiennes en lien direct avec la macrofaune peuvent également servir à protéger la macrofaune en détoxifiant le milieu de certains éléments nocifs pour eux.

3.2. La microflore des sources hydrothermales profondes

Les environnements marins profonds (sédiments marins, sites hydrothermaux, croûte océanique), sont considérés comme de gigantesques réservoirs de biomasse microbienne. En effet, des scientifiques ont estimé la quantité de biomasse totale dans les environnements profonds à plus de 5.10^{17} g de carbone, soit cent fois plus que dans l'ensemble des océans, pour un volume habitable équivalent (Heberling et al., 2010). Ainsi, par leur nombre et leurs capacités métaboliques, les procaryotes de ces environnements doivent jouer un rôle important dans les cycles biogéochimiques et dans le fonctionnement des écosystèmes marins profonds. Cependant, les techniques et connaissances actuelles sur la culture de ces

microorganismes n'a permis d'étudier et de caractériser qu'une infime partie (0.05 à 10% suivant l'écosystème considéré) de la biodiversité totale de ces environnements (Amann et al., 1995). Les dernières avancées en biologie moléculaire et bioinformatique ont permis de développer des outils « omiques » donnant de plus en plus accès à l'identification taxonomique et fonctionnelle des microorganismes incultivés de ces environnements.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la microflore des sources hydrothermales est à la base de la chaine trophique permettant le développement d'une biocénose diversifiée et luxuriante dans ces conditions extrêmes. Pour aborder la composition des communautés microbiennes des systèmes hydrothermaux profonds, il est tout d'abord nécessaire de s'intéresser à la diversité des métabolismes et des conditions de croissance de ces microorganismes. En effet, ces microorganismes peuvent être catégorisés suivant leurs températures de croissance, leurs métabolismes, leur affiliation taxonomique ou leur caractère aéro/anaérobie en fonction de leur positionnement dans les gradients physico-chimique du mélange fluide/eau de mer.



Figure I-11 : Tapis microbiens à la surface d'une cheminée hydrothermale (Crédit photo : Woods Hole Oceanographic Institution)

3.2.1. Métabolismes des sources hydrothermales profondes

3.2.1.1. Types métaboliques énergétiques et principe thermodynamique

La vie et ses métabolismes énergétiques associés peuvent être définis comme une succession de chaîne d'oxydoréduction entre une molécule réduite (ou réducteur), donneuse d'électrons et une molécule plus oxydée (ou oxydant) acceptrice d'électrons. Ce flux électronique permet alors la création d'une force proton-motrice entre deux espaces délimités

par une membrane semi-perméable. Ce métabolisme est communément appelé respiration. La nature du donneur d'électrons et de l'accepteur va définir l'énergie libérée lors des cascades d'oxydo-réduction et donc la production d'ATP ou équivalents. Chez les microorganismes, de nombreux accepteurs et donneurs d'électrons peuvent être utilisés (Table I-2), de nature organique ou inorganique. Certains êtres vivants peuvent également réaliser une phosphorylation de leur substrat (donneur d'électrons), qui peut servir, après transformation, d'accepteur d'électrons final endogène. On appelle ce métabolisme la fermentation. La fermentation n'est possible que sur des substrats organiques fermentescibles (sucres, acides aminés, acides gras).

Les microorganismes peuvent être classés selon trois types de métabolismes énergétiques différents en fonction de la source d'énergie utilisée :

- La phototrophie : Les microorganismes phototrophes utilisent l'énergie lumineuse comme source d'énergie grâce à des pigments photosensibles (chlorophylle ou bactériochlorophylle). Ce type métabolique est absent des sources hydrothermales profondes plongées dans l'obscurité.
- La chimioorganotrophie : Les microorganismes chimioorganotrophes utilisent des molécules organiques comme source d'énergie, telles que des carbohydrates, des acides aminés, des acides gras etc. C'est le type de métabolisme le plus commun au sein des procaryotes. Il se produit souvent en condition aérobie, par respiration sur oxygène comme accepteur d'électrons mais peut également se dérouler en anaérobie par respiration sur d'autres accepteurs d'électrons (NO^{3-}, NO^{2-}, Mn^{4+}, Fe^{3+}, SO_4^{2-} ou S^0) ou par fermentation.
- La chimiolithotrophie : Les micro-organismes chimiolithotrophes utilisent des composés inorganiques réduits comme source d'énergie, tel que l'H_2, H_2S, S^0, Fe^{2+}, Mn^{2+}, NO^{2-}, CH_4.

Ainsi, l'énergie utilisable par les microorganismes peut être réduite à la réaction entre deux couples d'oxydoréduction (Ox/Red). En couplant la demi-équation (Équation 2) de chaque couple, on obtient une réaction d'oxydo-réduction (Équation 3). Chaque demi-réaction possède un potentiel standard, noté E'_0 et exprimé en Volt (V), qui correspond au niveau énergétique des couples d'oxydo-réduction par rapport à une référence, le couple H^+/H_2 (E'_0=0V) dans des conditions standards. Ce potentiel peut être calculé suivant les conditions expérimentales via l'équation de Nernst

Équation 2 : Demi-réaction d'oxydoréduction entre l'oxydant (Ox) et le Réducteur (Red).

$$Ox + ne^- \leftrightarrow Red$$

Équation 3 : Réaction d'oxydoréduction entre le donneur (Red_1) et l'accepteur d'électron (Ox_2), donnant une molécule réduite (Ox_1) et une molécule oxydée (Red_2) :

$$Red_1 + Ox_2 \leftrightarrow Ox_1 + Red_2$$

Équation 4 : Equation de Nernst

$$E = E'_0 - \left(\frac{RT}{nF}\right) \log \frac{[red]}{[ox]}$$

E : Tension d'équilibre
E'_0 : Potentiel standard à pH 7
R : Constante des gaz parfaits (8,306 $J.mol^{-1}.K^{-1}$)
T : Température absolue (K)
n : nombre d'électrons
F : constante de Faraday (96 485 $C.mol^{-1}$)

(Équation 4). Une liste des potentiels standards de demi-réaction communément retrouvés dans les microorganismes se trouveTable I-2.

Table I-2 : Demi-réaction d'oxydoréduction du métabolisme microbien, le nombre d'électrons issus de la réaction (n) et le potentiel standard de la réaction E'₀

Oxydant		Réducteur	n	E'₀ (V)
½ O_2 + $2H^+$	↔	H_2O	2	0.82
Fe^{3+}	↔	Fe^{2+} à pH2	1	0.76
Nitrate + $5H^+$	↔	N2 + 5/2 H_2O	5	0.74
Nitrate + $2H^+$	↔	Nitrite + H_2O	2	0.42
Cytochrome a (+3)	↔	Cytochrome a (+2)	1	0.29
Cytochrome c (+3)	↔	Cytochrome c (+2)	1	0.25
Fe^{3+}	↔	Fe^{2+} à pH7	1	0.2
Cytochrome b (+3)	↔	Cytochrome b (+2)	1	0.035
Fumarate + $2H^+$	↔	Succinate	2	0.031
$2H^+$ + $2e^-$	↔	H_2 (aux conditions standards, pH0)	2	0
α-cétoglutarate + NH_4^+ + $2H^+$	↔	Glutamate + H_2O	2	-0.14
Oxaloacetate + $2H^+$	↔	Malate	2	-0.17
Pyruvate + $2H^+$	↔	Lactate	2	-0.19
Acetaldehyde + $2H^+$	↔	Ethanol	2	-0.2
FAD + $2H^+$	↔	$FADH_2$	2	-0.22
SO_4^{2-} + $10H^+$	↔	H_2S + $4H_2O$	8	-0.22
CO_2	↔	Acétate	8	-0.28
S^0 + $2H^+$	↔	H_2S	2	-0.28
FMN + $2H^+$	↔	FMNH2	2	-0.3
NAD^+ + H^+	↔	NADH	2	-0.32
$NADP^+$ + H^+	↔	NADPH	2	-0.32
Pyruvate + CO_2 + H^+	↔	Malate	2	-0.33
Acetoacetate + H^+	↔	β-Hydroxybutyrate	2	-0.35
CO_2	↔	méthanol	6	-0.38
$2H^+$	↔	H_2 (à pH7)	2	-0.42
Ferredoxine (oxydée)	↔	Ferredoxine (réduite)	1	-0.43
CO_2	↔	Glucose	24	-0.43
O_2	↔	O_2-	1	-0.45
Acétate + $3H^+$	↔	Acetaldehyde + H_2O	2	-0.6
Succinate + CO_2 + $2H^+$	↔	α-cétoglutarate + H_2O	2	-0.67
Acétate + CO_2 + $2H^+$	↔	Pyruvate + H_2O	2	-0.7

Dans le cadre de la respiration, c'est la différence (ΔE) de potentiel standard E'_0 entre le donneur et l'accepteur d'électrons (

Table I-2) qui va définir l'énergie disponible à la cellule pour la production d'équivalent énergétique tel que l'ATP. Cette différence d'énergie est appelée Enthalpie libre ou énergie libre de Gibbs, noté ΔG (Équation 5). Elle définit la spontanéité d'une réaction d'oxydo-réduction (si ΔG < 0). Cependant, même si la réaction est spontanée, certaines réactions ont besoin d'un apport d'énergie pour passer de l'état initial à l'état final, on parle alors d'énergie d'activation. Cette énergie d'activation peut être fournie par une augmentation de la température par exemple. Des catalyseurs, comme les systèmes enzymatiques, ont pour but de réduire l'énergie d'activation nécessaire pour réaliser cette réaction d'oxydo-réduction. Il est à noter que cette enthalpie libre est indépendante des cinétiques de réaction et donc ne reflète pas une vitesse de réaction, laquelle sera dépendante des conditions et des systèmes enzymatiques mis en jeu.

Équation 5 : Equation de calcul de l'Enthalpie libre ΔG d'une réaction d'oxydoréduction

$$\Delta G = \Delta G^{0\prime} + RT \ln \frac{[Ox_1][Red_2]}{[Red_1][Ox_2]} = -nF\Delta E$$

$\Delta G^{0\prime}$: Variation enthalpie libre standard à pH 7 et 25°C et 1 atm ($J.mol^{-1}$)
R : Constante des gaz parfaits (8,306 $J.mol^{-1}.K^{-1}$)
T : Température absolue (K)
n : nombre d'électrons
F : constante de Faraday (96 485 $C.mol^{-1}$)
ΔE : différence de potentiel de l'oxydant et du réducteur

Ainsi dans les sources hydrothermales, une grande diversité métabolique a été observée allant de la fermentation à la respiration. Cette dernière est basée sur les éléments réduits du fluide hydrothermal comme donneur d'électrons (H_2, H_2S, S^0, Fe^{2+}, Mn^{2+}, CH_4, CO_2) et les éléments oxydés de l'eau de mer comme accepteur d'électrons (O_2, SO_4^{2-}, NO^{3-}, NO^{2-}) ainsi que sur les intermédiaires métaboliques (NO^{2-}, Mn^{4+}, Fe^{3+}, Fe^0, $S_2O_3^{2-}$ ou S^0). L'ensemble de ces métabolismes et leur enthalpie libre standard $\Delta G^{0\prime}$ sont présentés Table I-3.

3.2.1.2. Métabolisme du carbone et nutriments

Outre l'aspect énergétique, les microorganismes ont besoin d'une source de carbone, d'azote, de Phosphore, de Soufre et de macro- et micronutriments pour la production des différents constituants cellulaires via leur anabolisme. Les micro- (Zn^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}...) et macronutriments (Na^+, K^+, Cl^-, Ca^{2+}, Mg^{2+}, $H_2PO_4^-$/ HPO_4^{2-}/PO_4^{3-}, Fe^{2+}/Fe^{3+}) étant relativement abondants dans l'eau de mer, ils ne sont généralement pas limitants dans les écosystèmes marins. Concernant la source de carbone, on distingue deux mécanismes d'assimilation :

- L'hétérotrophie : Ce mécanisme consiste à l'utilisation de carbone organique comme source de carbone. On trouve parmi ces sources organiques des carbohydrates, des acides aminés, des acides gras, des alcools etc.
- L'autotrophie : Ce mécanisme consiste à la fixation de carbone inorganique, tel que le CO, CO_2 et les ions carbonates HCO_3^-. Actuellement 6 voies de fixation du carbone ont été décrites chez les procaryotes (Figure I-12). On trouve :

- Le cycle de Calvin-Benson-Bassham (CBB)
- La voie réductive de l'acétyl-coenzyme A ou voie de Wood-Ljungdahl (WL)
- La voie réductive de l'acide citrique, cycle Arnon-Buchanan ou cycle de Krebs inverse (rTCA)
- Le bicycle du 3-Hydroxypropionate (3-HP)
- Le cycle du 3-Hydroxypropionate-4-hydroxybutyrate (3-HP/4-HB)
- Le cycle du Dicarboxylate-4-Hydroxybutyrate (DC/4-HB)

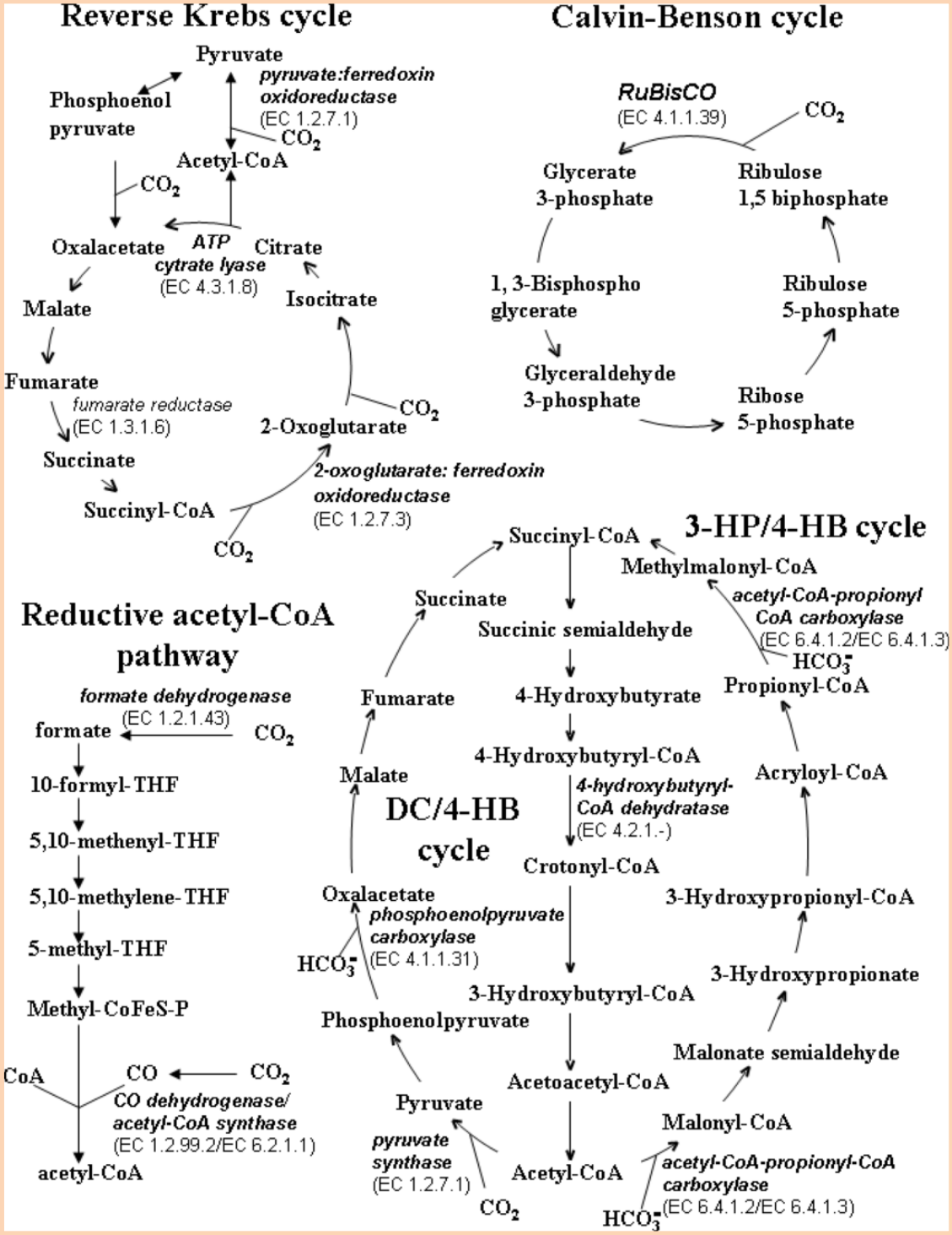


Figure I-12 : Les six voies de fixation autotrophique du carbone chez les procaryotes (Minic and Thongbam, 2011)

Table I-3 : Diversité des métabolismes en fonction des donneurs et accepteurs d'électrons et l'énergie libre standard de Gibbs associée (D'après Amend and Shock (2001) et Takai and Nakamura (2011)).

Type énergétique	Source de carbone	Donneur d'électrons	Accepteur d'électrons	Produit final	ΔG°' (kJ/mol)	Processus métabolique	Code	Représentant archée (A) ou bactérie (B)
Chimiolithotrophie	Autotrophie (CO_2)	H_2	O_2	H_2O	-263	Oxydation de l'hydrogène	H_2/O_2	B
		H_2	NO_3^-	NO_2^-	-176	Nitrate réduction	H_2/N	A et B
				N_2	-636	Dénitrification		A et B
				NH_4^+	-698	Ammonification	H_2/NH	A et B
		H_2	S^0	H_2S	-45	Sulfo-réduction	H_2/S^0	A et B
		H_2	SO_4^{2-}	H_2S	-303	Sulfato-réduction	H_2/SO	A et B
		H_2	$S_2O_3^{2-}$	H_2S	-315	Thiosulfato-réduction		A et B
		H_2	Fe^{3+}	Fe^{2+}	-166	Réduction du fer autotrophique	H_2/Fe	A et B
		H_2	CO_2	CH_4	-194	Méthanogénèse hydrogénotrophe	H_2/CO	A
		Acétate	CO_2	CH_4	-31	Méthanogénèse acétotrophe	Ac/CO	A
		H_2S	O_2	SO_4^{2-}	-750	Oxydation des composés soufrés	HS/O_2	B
		S^0	O_2	HSO_3^-	-307		S^0/O_2	B
		$S_4O_6^{2-}$	O_2	SO_4^{2-}	-2567		SO/O_2	B
		$S_2O_3^{2-}$	O_2	SO_4^{2-}	-762			B
		Fe^0	O_2	Fe^{3+}	-	Oxydation du fer	Fe/O_2	B
		Fe^{2+}	O_2	Fe^{3+}	-97			B
		Mn^{2+}	O_2	Mn^{4+}	-	Oxydation du manganèse	Mn/O_2	B
		CH_4	O_2	CO_2	-859	Méthanotrophie	CH/O_2	B
		CO	O_2	CO_2	-274	Méthylotrophie	CO/O_2	A et B
		NO_2^-	O_2	NO_3^-	-87	Nitrification	N/O_2	Pas détecté
		NH_4^+	O_2	NO_2^-	-268		NH/O_2	A

		H_2S	NO_3^-	$SO_4^{2-} + N_2$	-3571	Dénitrification par sulfo-oxydation	HS/N	B
		S^0	NO_3^-	$SO_4^{2-} + N_2$	-2527		S^0/N	B
		$S_2O_3^{2-}$	NO_3^-	$SO_4^{2-} + N_2$	-3634		SO/N	B
		CH_4	SO_4^{2-}	$CO_2 + H_2S$	?	Oxydation anaérobie du méthane	CH/SO	A avec B
		NH_4^+	NO_2^-		-397	Oxydation anaérobie de l'ammoniac	NH/N	B
	Hétérotrophie ($[CH_2O]_n$)	S^0, SO_3^- ,$S_2O_3^{2-}$	O_2		-	Mixotrophie	S^0/O_2 SO/O_2	
		H_2	S^0, SO_4^{2-}, $S_2O_3^{2-}$		-			B
Chimioorganotrophie	Hétérotrophie ($[CH_2O]_n$)	$[CH_2O]_n$	O_2	CO_2	-849 à -3139	Hétérotrophie aérobie	MO/O_2	A et B
		$[CH_2O]_n$	NO_3^-	NO_2^-/ N_2/ NH_4^+	-	Dénitrification hétérotrophique	MO/N	
		$[CH_2O]_n$	Fe^{3+}	Fe^{2+}	-	Réduction du fer hétérotrophique	MO/Fe	
		$[CH_2O]_n$	S^0, SO_4^{2-}, $S_2O_3^{2-}$	H_2S	- /-47.7 / -	Réduction hétérotrophique de composés soufrés	MO/S	A et B
		$[CH_2O]_n$		$CO_2/H_2/$ $[CH_2O]_n$	-	Fermentation	F	A et B

3.2.1.3. Distribution spatiale et physico-chimique des métabolismes

Les systèmes hydrothermaux peuvent être vus comme une multitude de strates concentriques de conditions physico-chimiques différentes permettant le développement de microorganismes adaptés à ces conditions. Suivant la disponibilité de chacun des donneurs et accepteurs d'électrons tout au long des gradients, l'énergie disponible dans différents systèmes hydrothermaux a pu être déterminée (Figure I-13) (Reveillaud et al., 2016).

D'après cette étude, l'énergie la plus abondante des fumeurs alcalins, en contexte ultramafique tel que Lost City, proviendrait majoritairement de la sulfato-réduction, et en moindre mesure de l'oxydation aérobie et anaérobie du méthane ou de l'oxydation aérobie d'hydrogène.

L'énergie des sites mixtes, comme ceux de Von Damm, Piccard, Rainbow ou Logatchev proviendrait majoritairement de la sulfato-réduction, de la métanogénèse et des oxydations aérobies de sulfure, méthane, hydrogène et fer à partir de 40°C.

Une biomasse représentant plus de 10^{10} cellules/kg est théoriquement attendue dans ces écosystèmes.

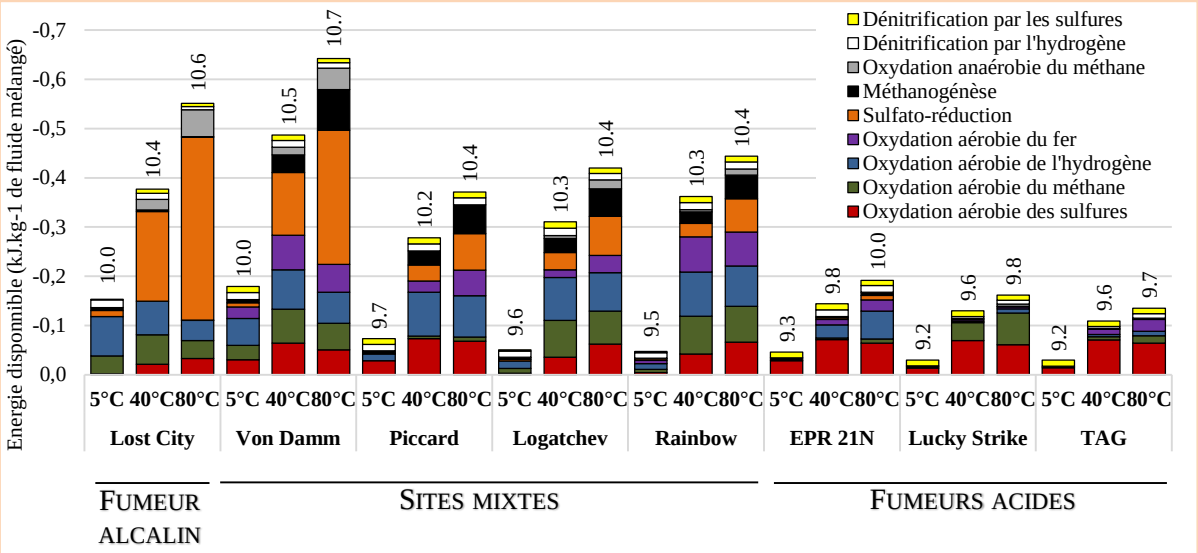


Figure I-13 : Energies cataboliques (en kJ.kg^{-1}de fluide mélangé) disponibles à partir des réactions d'oxydo-réduction clées de huit systèmes hydrothermaux à 3 différentes températures (modifié d'après Reveillaud et al., 2016). La valeur en haut de chaque histogramme indique le nombre de cellules maximales potentiellement produit (exprimé en log$_{10}$ par kg de fluide hydrothermal). Le calcul suppose que l'oxydation aérobie des sulfures, du méthane et du fer nécessite 152 kJ/g de poids sec de biomasse et 38kJ/g pour les autres et que le poids sec moyen d'une cellule est de 3.10^{-13} g/Cellule (d'après McCollom, 2007).

Pour les fumeurs acides, dans un contexte uniquement basaltique, l'énergie disponible apparait plus faible et principalement dominée par l'oxydation aérobie des sulfures, du méthane et de l'hydrogène au-dessus de 40°C avec une biomasse théorique plus faible (<10^{10} Cellules/kg de fluide). Il est à noter que ces estimations de biomasse ne reflètent pas

forcément la réalité et que ces métabolismes ne sont pas nécessairement exploités suivant la biodiversité de ces sites. De plus, une compétition pour des substrats limitants (comme l'hydrogène) peut être observé, diminuant l'énergie totale réellement disponible dans certains cas.

Les espèces qui survivent ne sont pas les espèces les plus fortes, ni les plus intelligentes, mais celles qui s'adaptent le mieux aux changements.

Charles Darwin

Un des critères les plus importants dans l'énergie disponible pour le développement microbien au sein des sources hydrothermales concerne la température. En effet, comme évoqué précédemment, l'augmentation de la température diminue l'énergie d'activation nécessaire pour initier les réactions d'oxydoréduction et augmente l'énergie libre de Gibbs libérée lors des différents métabolismes.

Ainsi nous pouvons séparer les communautés microbiennes des sources hydrothermales en trois catégories. La première regroupe les microorganismes dits hyperthermophiles (Figure I-14) vivant au plus près du cœur des cheminées hydrothermales, en condition d'anoxie ou de microaérophilie imposée par l'influence du fluide hydrothermal et pouvant se développer à des températures supérieures à 80°C. La deuxième constitue la biodiversité thermophile pouvant se développer dans le gradient de fluide/eau de mer à des températures allant de 45 à 80°C. Le troisième groupe, mésophile et psychrophile, se développe à la périphérie des cheminées, à des températures plus basses (<45°C) et majoritairement en aérobie dû à l'influence de l'eau de mer.

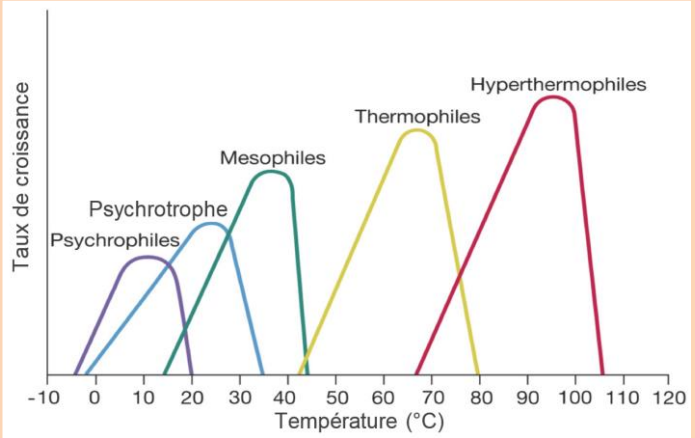


Figure I-14 : Classification des microorganismes en fonction de leur température de croissance

3.2.2. Biodiversité du compartiment hyperthermophile (>80°C)

Ce compartiment hyperthermophile n'est principalement retrouvé que dans les fumeurs acides, où le fluide initialement à 400°C permet l'obtention de niches écologiques à plus de 80°C par mélange avec l'eau de mer froide. Dans les fumeurs alcalins, la température du fluide à sa sortie n'excède pas 90°C et son rapide mélange avec l'eau de mer ne permet pas d'obtenir des niches hyperthermophiles stables. En effet, on retrouve très peu d'hyperthermophiles dans les analyses de biodiversité du site de Lost City, avec seulement quelques séquences de Thermococcales retrouvées (Brazelton et al., 2006).

Dans les sites mixtes ou fumeurs acides, la plupart des microorganismes du compartiment hyperthermophile sont anaérobies ou microaérophiles. Leur croissance est principalement basée sur l'autotrophie en se servant de molécules réduites présentes au sein du fluide hydrothermal, tel que l'hydrogène (H_2), le méthane (CH_4) ou le sulfure d'hydrogène (H_2S) comme source d'énergie, et le CO_2 comme source de carbone. Certains de ces microorganismes sont également hétérotrophes en se servant de la matière organique produite par les autotrophes comme source d'énergie et de carbone. La majorité des microorganismes hyperthermophiles des sources hydrothermales appartiennent au règne des *Archaea*. Parmi les *Euryarchaeota*, on trouve l'ordre hétérotrophe des *Thermococcales*, des *Archaeoglobales* hydrogénotrophes autotrophes et des *Methanococcales* et *Methanopyrales* méthanogènes autotrophes. Parmi les *Crenarchaeota*, on trouve principalement les *Desulfurococcales*, comprenant des autotrophes et des fermentaires. Finalement, on trouve également les *Nanoarchaeota* encore peu connu à l'heure actuelle et symbionte obligatoire de *Desulfurococcales*. Les bactéries hyperthermophiles sont réparties entre les *Thermotogales* hétérotrophes fermentaires et les *Aquificales* autotrophes. La Table I-4 présente une liste de genres hyperthermophiles retrouvés fréquemment dans les sources hydrothermales acides, ainsi que leurs caractéristiques de croissance et leurs métabolismes associés.

Table I-4 : Diversité hyperthermophile des sources hydrothermales profondes (Bertoldo and Antranikian, 2006; Bhandari and Gupta, 2014; Brileya and Reysenbach, 2014; Byrne, 2008; Gupta, 2014; Huber and Kreuter, 2014; Itoh and Iino, 2013; Oren, 2014a, 2014b, 2014c)

Famille	Genre	Nombre d'espèces	Gamme de Temp. (°C)	Temp. Optimale (°C)	pH optimum	Source C	Métabolisme
ARCHAEA							
Euryarchaeota							
Classe des *Archaeoglobi*							
Ordre des *Archaeoglobales*							
Archaeoglobaceae	*Archaeoglobus*	5	60-95	70-83	6.0-7.0	AF (WL)	H_2-MO/SO
	Ferroglobus	1	65-95	85	7	AF (WL)	H_2-MO/Fe-N-SO
	Geoglobus	2	50-90	81-88	6.8-7.0	AF (WL)	H_2-MO/Fe
Classe des *Thermococci*							
Ordre des *Thermococcales*							
Thermococcaceae	*Thermococcus*	27	40-103	75-93	5.8-9.0	H	F, MO/S^0
	Palaeococcus	2	45-88	80-83	6.0-6.5	H	F
	Pyrococcus	5	70-108	95-103	6.0-8.0	H	F
Classe des *Methanococci*							
Ordre des *Methanococcales*							
Methanococcaceae	*Methanothermococcus*	2	17-75	60-65	5.1-7.0	A (WL)	H_2/CO
Methanocaldococcaceae	*Methanocaldococcus*	6	48-92	80-85	6.0-6.5	A (WL)	H_2/CO
	Methanotorris	2	45-91	75-88	5.7-6.7	A (WL)	H_2/CO
Classe des *Methanopyri*							
Ordre des *Methanopyrales*							
Methanopyraceae	*Methanopyrus*	1	84-122	98-105	6.3-6.6	A	H_2/CO
Crenarchaeota							
Classe des *Thermoprotei*							
Ordre des *Desulfurococcales*							
Desulfurococcaceae	*Desulfurococcus*	5	63-97	80-92	6.0-6.5	H	MO/S, F
	Aeropyrum	2	70-100	85-95	7.0-8.0	H	MO/S^0-O_2
	Ignicoccus	3	70-98	90	5.5-6.0	A (DC/4-HB)	H_2/S^0
	Staphylothermus	2	70-98	95-98	6.0-6.5	H	F
	Stetteria	1	70-102	95	6	AF (DC/4-HB)	H_2/S, MO/S

	Sulphobococcus	1	70-95	85	7.5	H	F
	Thermodiscus	1	75-98	90	5.0-7.0	H	MO/S, F
	Thermosphaera	1	65-90	85	6.5	H	F
Pyrodictiaceae	*Pyrodictium*	3	80-110	97-105	5.5	AF (DC/4-HB)	H_2/S, F
	Hyperthermus	1	75-108	95-107	7	H	F
	Pyrolobus	1	90-113	106	5.5	A (DC/4-HB)	H_2/SO-N-O_2
Nanoarchaeota							
Classe des Nanoarchaeia							
Ordre des Nanoarchaeales							
Nanoarchaeaceae	*Nanoarchaeum*	1	75-98	90	5.5-6.0	S (Ignicoccus)	H_2/S^0
BACTERIA							
Thermotogae							
Classe des *Thermotogae*							
Ordre des *Thermotogales*							
Thermotogaceae	*Thermotoga*	9	47-90	65-80	7.0-7.5	H	F, MO/S
	Fervidobacterium	6	41-90	65-80	6.5-7.8	H	F, MO/S
Aquificae							
Classe des *Aquificae*							
Ordre des *Aquificales*							
Aquificaceae	*Aquifex*	2	67-95	85	6.8	A (r-TCA)	H_2-S/N-O_2
	Hydrogenivirga	2	55-85	70-75	6.5-7.5	A (r-TCA)	H_2-S/N-O_2
	Hydrogenobaculum	1	-	65	3.0-4.0	A (r-TCA)	H_2-S^0/N-O_2
	Hydrogenobacter	3	60-85	70-78	7	AF (r-TCA)	H_2-S/O_2
	Thermocrinis	3	44-89	75-85	5.9-7.0	AF (r-TCA)	H_2-S-MO/O_2
Desulfobacteraceae	*Desulfurobacterium*	3	40-85	70-75	6.0-6.2	A (r-TCA)	H_2/S
	Balnearium	1	45-80	70-75	5.4	A (r-TCA)	H_2/S
	Thermovibrio	3	50-88	75-80	5.5-6.2	AF (r-TCA)	H_2/S-N
	Thermosulfidibacter	1	55-78	70	5.5-6.0	A (r-TCA)	H_2/S^0
Hydrogenothermaceae	*Hydrogenothermus*	1	45-80	65	7	A (r-TCA)	H_2/O_2
	Persephonella	3	50-80	70-73	6.0-7.2	A (r-TCA)	H_2-S/N-O_2
	Sulfurihydrogenibium	5	40-80	60-75	6.0-7.5	AF (r-TCA)	H_2-S-Fe/O_2-Fe
	Venenivibrio	1	45-75	70	5.4	A (r-TCA)	H_2-S/O_2

Source de Carbone : A : Autotrophie, AF : Autotrophie Facultative, H : Hétérotrophie, S : Synthrophie obligatoire, abréviation voir 3.2.1.2; Métabolisme : voir Table I-3 ; Liste non-exhaustive

3.2.3. *Biodiversité du compartiment thermophile (45-80°C)*

Les communautés microbiennes thermophiles des fumeurs acides sont composées de microorganismes autotrophes, tels que les *Aquificales*, certaines *ε-Proteobacteria* (*Caminibacter*, *Hydrogenimonas*, *Nautilia*) (Campbell et al., 2006), *Thermodesulfobacteriales* (*Thermodesobacterium*, *Thermodesulfatator*), et des hétérotrophes, tel que les *Firmicutes* (Itoh and Iino, 2013), *Thermales*, *Thermotogales*, *Deferribacterales* (Alauzet and Jumas-Bilak, 2014), *α-γ-* et *δ-Proteobacteria*

Leur métabolisme est principalement basé sur la fermentation ou la respiration de matière organique produite par les autotrophes. Les accepteurs d'électrons majoritairement retrouvés sont le nitrate, l'oxygène ou certains composés soufrés ou métalliques. Certains peuvent utiliser de manière facultative l'hydrogène comme donneur d'électrons, provenant du mélange du fluide hydrothermal ou résultant de la fermentation de la matière organique.

Dans les fumeurs alcalins, la biodiversité thermophile est dominée par des *Archaea* de l'ordre des *Methanosarcinales* encore incultivées. On retrouve également des Firmicutes thermophiles, tel que *Hydrogenimonas* (Russell, 2011).

Table I-5 : Biodiversité thermophile des sources hydrothermales profondes (en cours) (Albuquerque and Costa, 2014)

Famille	Genre	Nombre d'espèces	Gamme de Temp. (°C)	Temp. Optimale (°C)	pH optimum	Source Carbone	Métabolisme
ARCHAEA							
Euryarchaeota							
Classe des *Methanomicrobia*							
Ordre des *Methanosarcinales*							
	LCMS	0	?	?	?	?	?
Classe des *Methanococci*							
Ordre des *Methanococcales*							
Methanococcaceae	*Methanothermococcus*	2	17-75	60-65	5.1-7.0	A (WL)	H2/CO
Classe des Thermoplasmata							
Ordre des Thermoplasmatales							
Ferroplasmaceae	*Acidiplasma*	1	15-65	45	0-4	H	Fe/O2, MO/Fe
	Ferroplasma	1	15-45	-	1.3-2.2	A	Fe/O2
Picrophilaceae	*Picrophilus*	1	47-65	60	0.0-3.5	H	MO/O2
Thermoplasmataceae	*Thermoplasma*	2	33-67	60	0.5-4	H	MO/O2-S
Inclassifié							
DHVE2	*Aciduliprofundum*	1	55-77	70	3.3-5.8	H	MO/Fe-S
BACTERIA							
Thermotogae							
Classe des *Thermotogae*							
Ordre des *Thermotogales*							
Thermotogaceae	*Defluviitoga*	1	37-65	55	6.9	H	F, MO/S
	Geotoga	2	30-60	45-50	6.5	H	F, MO/S
	Kosmotoga	2	20-80	60-65	6.8-7.1	H	F, MO/S
	Marinitoga	5	25-70	55-65	5.5-7.0	H	F, MO/S
	Oceanotoga	1	25-70	55-58	7.3-7.8	H	F, MO/S
	Petrotoga	6	25-65	55-60	6.0-7.5	H	F, MO/S
	Thermococcoides	1	45-75	65	7	H	F, MO/S
	Thermosipho	7	35-80	65-75	6.0-7.6	H	F, MO/S

Proteobacteria							
Classe des α-Proteobacteria							
Ordre des Rhodobacterales							
Rhodobacteraceae	*Piezobacter*	4	30-55	50	5.8-7.6	AF	MO-H2-SO/O2-N
Classe des δ-Proteobacteria							
Ordre des Desulfovibrionales							
Desulfohalobiaceae	*Desulfonauticus*	2	40-62	45-58	6.2-8.6	H	H2/S, CO/S
	Desulfothermus	1	50-69	60-65	6.5-6.8	H	MO/SO
Ordre des *Desulfuromonales*							
Geobacteraceae	*Geothermobacter*	1	35-65	55	5.0-8.0	H	MO/S0-Fe
Classe des γ-*Proteobacteria*							
Ordre des *Chromatiales*							
Thioalkalispiraceae	*Thioprofundum*	2	29-50	39-50	6-8	AF	SO/O2-N
Classe des ε-Proteobacteria							
Ordre des Nautiliales							
Nautiliaceae	*Caminibacter*	3	45-70	55-60	4.5-7.5	A (rTCA)	H2-MO/S0-N
	Nautilia	3	30-55	45-53	6.0-9.0	AF (rTCA)	H2-MO/S
	Lebetimonas	2	35-63	50-55	5.5-7.1	A (rTCA)	H2/S-N
Ordre incertain							
Hydrogenimonaceae	*Hydrogenimonas*	1	35-65	55	4.9-7.2	A (rTCA)	H2/O2-S-NH
Nitratiruptoraceae	*Nitratiruptor*	1	40-57	55	5.4-6.9	A (rTCA)	H2/O2-S-N
Firmicutes							
Classe des *Clostridia*							
Ordre des *Clostridiales*							
Clostridiaceae	*Clostridium*	14 (177)	22-70	49-65	6.0-10.3	H	F
	Caloramator	7	37-80	50-68	6.0-8.2	H	F, MO/Fe-S
	Caloranaerobacter	2	45-70	60-65	4.5-8.5	H	F, MO/Fe-S
	Caminicella	1	45-65	55-60	7.5-8.0	H	F
	Fervidicella	1	37-55	50	5-9	H	F
	Tepidibacter	2 (3)	33-60	45-50	6.0-6.8	H	F
	Tepidimicrobium	2	25-67	40-60	7.5-8.5	H	F, MO/Fe-S
	Thermobrachium	1	43-75	66	5.4-9.5	H	F
	Thermohalobacter	1	45-70	65	5.2-8.8	H	F
Peptococcaceae	*Desulfotomaculum*	15 (27)	20-85	50-66	-	AF	H2-MO/SO

	Thermincola	2	37-70	55-60	7.0-8.0	AF	H2-MO/Fe
Incertae sedis	*Sulfobacillus*	3 (5)	17-60	45-60	1.7-2.0	H	MO-Fe-SO/S
	Thermaerobacter	5	50-80	70-75	5.0-8.5	H	MO/O2
	Anoxybacter	1	44-72	60-62	5.0-9.0	H	F
Ordre des *Thermoanaerobacterales*							
Thermoanaerobacteraceae	*Thermoanaerobacter*	14	30-85	55-75	5.8-8.5	H	F
	Caldanaerobacter	2	40-85	65-75	4.8-8.0	H	F
	Carboxydothermus	4	48-78	65-72	5.5-7.2	A	CO
Thermodesulfobiaceae	*Thermodesulfobium*	1	37-65	50-55	5.5-6.0	A	H2/SO-N
Incertae sedis	*Thermoanaerobacterium*	7	35-72	55-70	5.2-7.8		F
Classe des *Bacilli*							
Ordre des *Bacillales*							
Bacillaceae	*Bacillus*	11 (190)	<80	50-70	4.2-8.0	H	*MO/O2*
	Aeribacillus	1	50-70	60	-		MO/O2
	Anoxybacillus	16	30-75	50-66	6.0-9.7		F, MO/O2
	Geobacillus	18	35-75	55-70	6.2-8.0		MO/O2-N
	Vulcanibacillus	1	37-60	55	6.0-8.5	H	F
Thermoactinomycetaceae	*Thermoactinomyces*	2	-	50-55	-	H	F
	Laceyella	4	28-70	48-55	-	H	F
Deferribacteres							
Classe des *Deferribacteres*							
Ordre des *Deferribacterales*							
Deferribacteraceae	*Deferribacter*	4	25-75	60-65	5.0-8.0	AF	H2-MO/S0-N-Fe-Mn
	Calditerrivibrio	1	30-65	55	5.5-8.0	H	MO/N
	Flexistipes	1	30-53	45-50	6-8	H	F
Ordre incertain							
	Caldithrix	1	40-70	60	5.8-7.8	H	F, H2-MO/N
Thermus-Deinococcus							
Classe des *Deinococci*							
Ordre des *Thermales*							
Thermaceae	*Thermus*	11	37-80	65-73	5.0-10.5	H	MO/O2
	Marinithermus	1	50-73	67.5	6.2-7.7	H	MO/O2
	Oceanithermus	2	30-68	60	5.5-8.4	H	MO/O2-N-S
	Vulcanithermus	1	37-80	70	5.5-8.4	H	MO/O2-N

Thermodesulfobacteria							
Classe des *Thermodesulfobacteria*							
Ordre des *Thermodesulfobacteriales*							
Thermodesulfobacteriaceae	*Caldimicrobium*	2	40-82	75	5.9-9.5	A	H2-MO/SO
	Geothermobacterium	1	65-100	85-90	≈7	A	H2/Fe
	Thermodesulfatator	2	55-75	65-70	5.5-8.0	AF	H2/SO
	Thermodesulfobacterium	2	42-85	65-70	6.0-8.0	A	F, H2-MO/SO
Bacteroidetes							
Classe des *Bacteroidetes*							
Ordre des *Bacteroidetales*							
Rhodothermaceae	*Rhodothermus*	2	50-85	65-80	7	H	F
Spirochaetes							
Classe des *Spirochaetia*							
Ordre des *Spirochaetales*							
-	*Exilispira*	1	37-60	50	6.0-7.5	H	F

Source de Carbone : A : Autotrophie, AF : Autotrophie Facultative, H : Hétérotrophie, S : Synthrophie obligatoire, abréviation voir 3.2.1.2; Métabolisme : voir Table I-3 ; Liste non-exhaustive

3.2.4. Biodiversité du compartiment méso- et psychro-phile (<45°C)

Dans ce compartiment la plupart des microorganismes se développent en ecto- ou endo-symbiose avec la faune abyssale colonisant les environs des cheminées, sous forme de tapis microbiens sur les roches environnantes, comme *Beggiatoa* et *Thiothrix*, ou dans les sédiments marins environnants. On retrouve dans ces zones principalement des bactéries mésophiles appartenant à la plupart des phyla connus, allant des Firmicutes, *Bacteriodetes*, α-, β-, γ-, δ-, ζ-Proteobacteria, *Nitrospirae*, *Chlorobi*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes,* Sphingobacteria, au *Verrucomicrobia.* (Emerson et al., 2007; Makita et al., 2017). Le métabolisme de ces microorganismes est principalement aérobie ou fermentaire mais certains peuvent également respirer sur des composés soufrés ou des métaux.

3.2.5. Evolution temporelle des communautés : de la colonisation primaire à la chaine trophique

3.2.5.1. Evolution de la biodiversité des fumeurs acides

- *Colonisation*

Lors de la formation des cheminées hydrothermales, la première éruption de fluide, porté jusqu'à 400°C, stérilise le milieu environnant. Durant les premiers stades, la structure minérale de la cheminée est poreuse et dominée par des anhydrites ($CaSO_4$), sulfures métalliques (Fe-Zn-CuS_2) et barytines ($BaSO_4$). Des études ont été réalisées afin d'identifier les premiers colonisateurs de ces environnements suivant différentes approches. L'étude des populations présentes dans le fluide hydrothermal suite à une éruption a montré le développement en quelques jours de *Methanococcales*, de *Thermococcales*, d'*ε-Proteobacteria* et *d'Aquificae* sur les particules provenant de la croûte océanique sous-jacente aux cheminées (Huber et al., 2002, 2003), ainsi que la présence d'autres Euryarchées (*Archaeoglobales*, *Methanopyrales* …), Crenarchées (*Desulfurococcales*, Marine group I) et Korarchées (Takai et al., 2004). Il a donc été suggéré une colonisation primaire de subsurface par des hyperthermophiles autotrophes hydrogénotrophes. Des colonisateurs *in-situ* ont également été placés à plusieurs reprises près de cheminées hydrothermales pour tenter d'observer la colonisation primaire de ces environnements. Les colonisateurs les plus proches du fluide (température de 40 à 100°C) ont montré la dominance parmi les archées des ordres *Thermococcales* (71%) et *Archaeoglobales* (22%) et de bactéries appartenant aux ε-*Proteobacteria* (40%) et aux *Aquificae* (43%) (Corre et al., 2001; Nercessian et al., 2003). Ces observations ont été renforcées par une étude *in vitro* pour étudier la capacité de membres des *Thermococcales* (*Pyrococcus furiosus*) et *Methanococcales* (*Methanocaldococcus villosus*) à coloniser des surfaces. Cette étude a montré que ces espèces pouvaient scanner la surface des cheminées par un mouvement lent en zigzag pour trouver des conditions idéales de température et se fixer en quelques secondes via leurs flagelles pour former des biofilms (Wirth et al., 2018). D'autres colonisateurs placés plus à l'écart, sur des colonies d'*Alvinellidae* (5 à 40°C), ont montré une colonisation rapide par des ε-*Proteobacteria* (genre *Arcobacter*) bactéries chimioautotrophes capables d'oxyder le H_2S (Alain et al., 2004; López-García et al., 2003; Taylor et al., 1999).

- *Cheminées matures*

Sur des cheminées acides matures, différentes analyses de barcoding 16S et quelques études métagénomique ont été réalisées. Ces études ont montré l'augmentation de la biomasse de l'intérieur de la cheminée (<10^5 cellules.g^{-1}) vers l'extérieur (>10^{8-10} cellules.g^{-1}), attachées à la surface des minéraux. (Chevaldonné and Godfroy, 1997; Schrenk et al., 2003). De plus, les proportions d'archées ont tendance à diminuer passant de 14-50% à 3-17% (Harmsen et al., 1997; Takai and Horikoshi, 1999; Takai et al., 2001) en faveur des bactéries. En 1998, des études sur le site actif du Pacifique à Loihi Seamount ont montré la dominance de ε-*Proteobacteria* (60.5%) et de γ-*Proteobacteria* (27.1%) (Moyer et al., 1994, 1995, 1998). En 2012, une étude de barcoding 16S sur le site Loki's Castle de la dorsale Médio-Arctique a révélé la présence d'ε-proteobacteria (36.1%), de *Thermococcus* (28.4%), *d'Aquificae* (26.1%), de *Methanococci* (2.8%), et *d'Archaeoglobi* (1.8%) (Jaeschke et al., 2012). Dans l''étude d'une banque de clone obtenue d'une cheminée de la dorsale de Juan de Fuca, 50% des clones archéens étaient affiliés aux *Desulfurococcales*, 20 % à des *Thermococcales* et 20% au cluster des « Deep-sea Hydrothermal Vent *Euryarchaeota* » (DHVE) (Schrenk et al., 2003). Dans toutes ces études, on observe une dominance bactérienne d'ε-*Proteobacteria*, présentant une diversité phylogénétique considérable, majoritairement incultivée, indiquant probablement une fonction importante dans l'écosystème hydrothermal océanique.

Les sédiments et zones froides de cheminées matures, quant à eux, présentent une grande diversité de séquences bactériennes, dominée principalement par des γ-Proteobacteria (10-98%) et ε- Proteobacteria (10-95%) et en moindre mesure à des *Acidobacteria*, α- et δ-*Proteobacteria*. Les séquences archéennes obtenues sont affiliées majoritairement aux *Crenarchaeota* du « Marine Group I » et à des *Thermoplasmata* (Anderson et al., 2015; López-García et al., 2003).

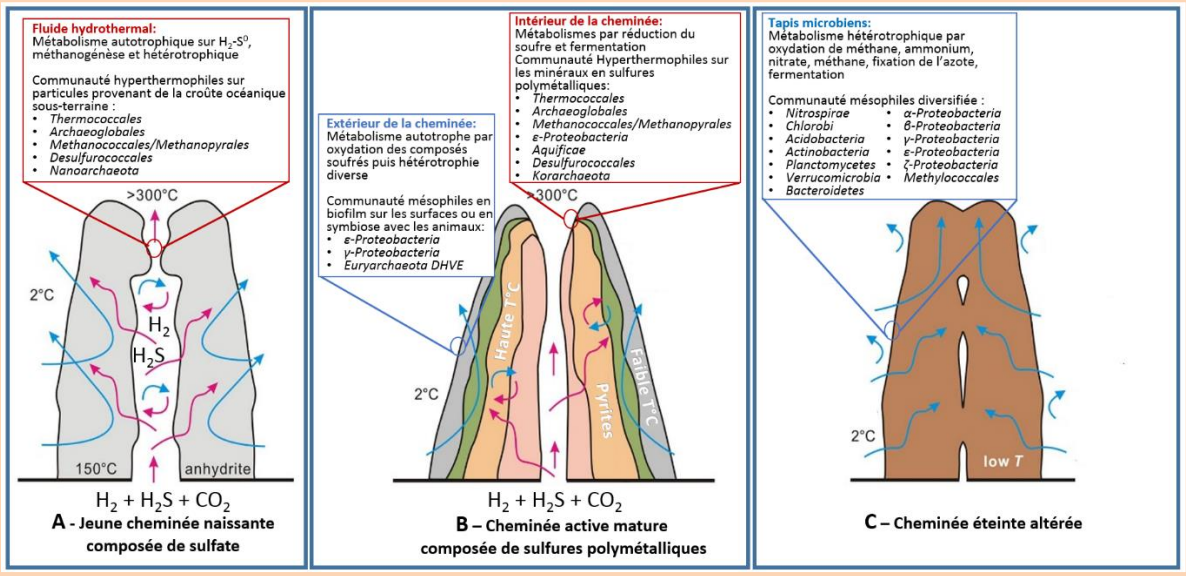


Figure I-15 : Distribution des microorganismes et des métabolismes tout au long de la vie d'un fumeur acide (modifié d'après Li et al., 2017)

- *Cheminées éteintes*

Lorsque le fluide hydrothermal est bloqué ou dévié, la cheminée hydrothermale s'éteint et les communautés microbiennes présentes à sa surface et aux environs s'adaptent. Sur certaines sites, la proportion d'*ε-Proteobacteria* à tendance a augmenter, représentant parfois jusqu'à 98% de la biodiversité, le reste étant principalement composé de *γ-Proteobacteria* (Longnecker and Reysenbach, 2001). Sur d'autres, ce sont les *α-Proteobacteria* (dominée par le genre *Thalassospira*) qui dominent les cheminées éteintes (jusqu'à 69%), suivi des *γ-Proteobacteria* (24%), puis des *Sphingobacteria*, *β-Proteobacteria* et *Flavobacteria* (Zhang et al., 2016). Une autre étude a montré la présence de *Nitrospirae*, *Chlorobi*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes* et bactéries appartenant aux sous-divisions α, β, γ, δ et ε des *Proteobacteria*. Les Archées, principalement des *Crenarchaeota* et *Euryarchaeota* incultivés, diminuent fortement pour représenter moins de 1% de la population totale tandis que la biomasse reste constante avec $1{,}7.10^{7}$ à $3{,}0.10^{8}$ cellules.mL^{-1}(Suzuki et al., 2004). Sur certains sites, on retrouve la dominance archéenne de *Thaumarchaeota* (99%) (Zhang et al., 2016). Des études plus récentes révèlent une modification claire de la biodiversité, initialement dominée par des ε-*Proteobacteria* et des *Aquificae*, diminuant en faveur d'α-, β-, γ-, δ-*Proteobacteria* et *Bacteroidetes* lorsque la cheminée s'éteint (Li et al., 2014, 2017; Sylvan et al., 2012). En l'absence de fluide hydrothermal, la biodiversité change donc radicalement pour s'adapter aux nouvelles conditions de substrat et de température.

3.2.5.2. Evolution de la biodiversité des fumeurs alcalins

Les fumeurs alcalins sont des systèmes hydrothermaux pouvant atteindre plusieurs dizaines de milliers d'années de vie. En effet, en absence de contexte magmatique et de ses fluctuations, les réactions de serpentinisation restent constantes et localisées. Dans les jeunes fumeurs alcalins, on retrouve principalement des *Thiomicrospira* (*γ-Proteobacteria*) (≈40%) et des Firmicutes (≈10%) en plus grande quantité que dans les plus anciennes cheminées, quant à elles plus riches en α-, δ-*Proteobacteria* et en *Bacteroidetes*. Au niveau des archées, les cheminées les plus récentes montrent la présence en majorité d'un seul phylotype de *Methanosarcinales* incultivées appelées « Lost City MethanoSarcinales » (LCMS) et de *Crenarchaeota* du Marine Group I (Schrenk et al., 2004). Ces dernières disparaissent très rapidement au profit des LCMS. Finalement dans les cheminées les plus anciennes, on retrouve un shift complet des populations d'archées avec la dominance (≈94%) d'archées appartenant au groupe des ANME-1, réalisant l'oxydation anaérobie du méthane (Brazelton et al., 2010). Le reste de la biodiversité bactérienne est composée de *Planctomycetes*, *Methylobacter*, *Nitrospira*, *Actinobacteria*, et *ε–proteobacteria* (Brazelton et al., 2006).

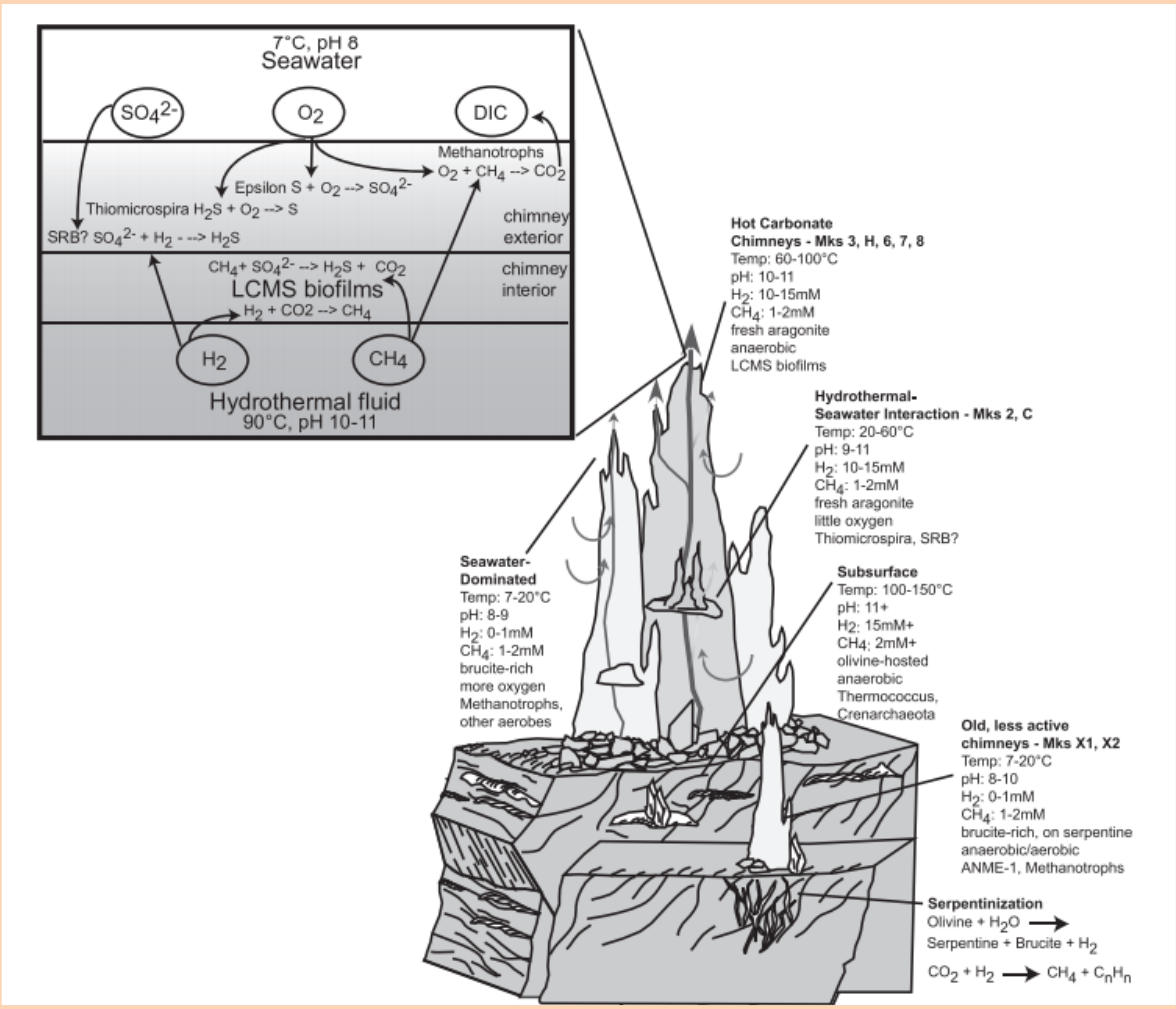


Figure I-16 : Distribution des microorganismes et des métabolismes dans les fumeurs alcalins (Brazelton et al., 2006)

4. L'ORIGINE DE LA VIE ET LES SOURCES HYDROTHERMALES PROFONDES

Qu'elle commence ailleurs dans l'Univers ou sur Terre, de nombreuses hypothèses ont été établies sur l'origine de la vie au cours de l'histoire. En commençant par la création divine, puis la génération spontanée, les scientifiques en sont arrivés à l'hypothèse de la transformation prébiotique de la matière inorganique en matière organique qui se serait auto-organisée au court du temps pour former les organismes vivants complexes modernes. Dans cette dernière théorie, différentes approches ont été utilisées pour tenter de définir les conditions de l'émergence de la vie. Tandis que les géochimistes tentent de comprendre le passage de l'inorganique à l'organique (Bonfio et al., 2017; Fahrenbach et al., 2017), les biologistes tentent de retracer l'évolution des espèces modernes jusqu'au « Last Common Universal Ancestor » (LUCA), le dernier ancêtre commun universel (Gaucher et al., 2010; Weiss et al., 2016).

La découverte récente de fossiles de bactéries dans des précipités de source hydrothermale datés entre 3.77 et 4.28 milliards d'années (Ga), les plus anciens retrouvés à l'heure actuelle, ont permis de donner un contexte historique probable à l'émergence de la vie (Dodd et al., 2017). Ainsi, les premiers organismes vivants seraient apparus durant l'Hadéen, il y a plus de 3.8 milliards d'années, période pendant laquelle il y a eu la formation des océans (4.40-4.26 Ga) et la stabilisation de la Terre primitive. Ainsi, afin d'étudier les mécanismes potentiels d'émergence de la vie sur Terre, il est nécessaire de s'intéresser aux conditions de la Terre primitive pour définir l'environnement le plus propice aux développements des premiers élements biologiques et des proto-cellules.

4.1. Condition pour l'émergence de la vie durant l'Hadéen

4.1.1. La surface de la Terre primitive

D'après l'analyse isotopique de roches datant de cette période, la température de surface de la Terre primitive devait atteindre en moyenne les 55-85°C (Knauth and Lowe, 2003), avec probablement de grandes variations saisonnières, allant du froid polaire aux températures extrêmes volcaniques. Ces températures élevées auraient pu favoriser l'initiation de réaction d'oxydoréduction du proto-métabolisme en diminuant l'énergie d'activation nécessaire (Deamer and Weber, 2010). D'autre part, l'atmosphère de la Terre avait une pression 10 à 20 fois supérieure à celle actuelle (Teerikorpi, 2009) et était relativement peu oxydée et dominée par du CO_2, puis du N_2 (~2 bars), de l'H_2O, du SO_2 et du CH_4. En effet on estime l'enrichissement en O_2 de l'atmosphère à ~2.45 Ga, peu après la fin de l'Hadéen, par l'apparition de la photosynthèse dans les océans (Sleep, 2010). L'absence d'ozone dans l'atmosphère laissait passer les rayonnements solaires, bombardant la surface de la Terre par des rayonnements UV (Sleep, 2010). Ces rayonnements UV de haute intensité sont notamment responsables de photodissociation, et donc de la destruction des molécules organiques, rendant l'hypothèse de l'origine de la vie à la surface de la Terre peu probable. De plus, la vie comme nous la connaissons actuellement nécessite la présence d'eau pour se développer. Ainsi, il est plus probable que la vie soit apparue au fond des océans, à l'abri de la lumière.

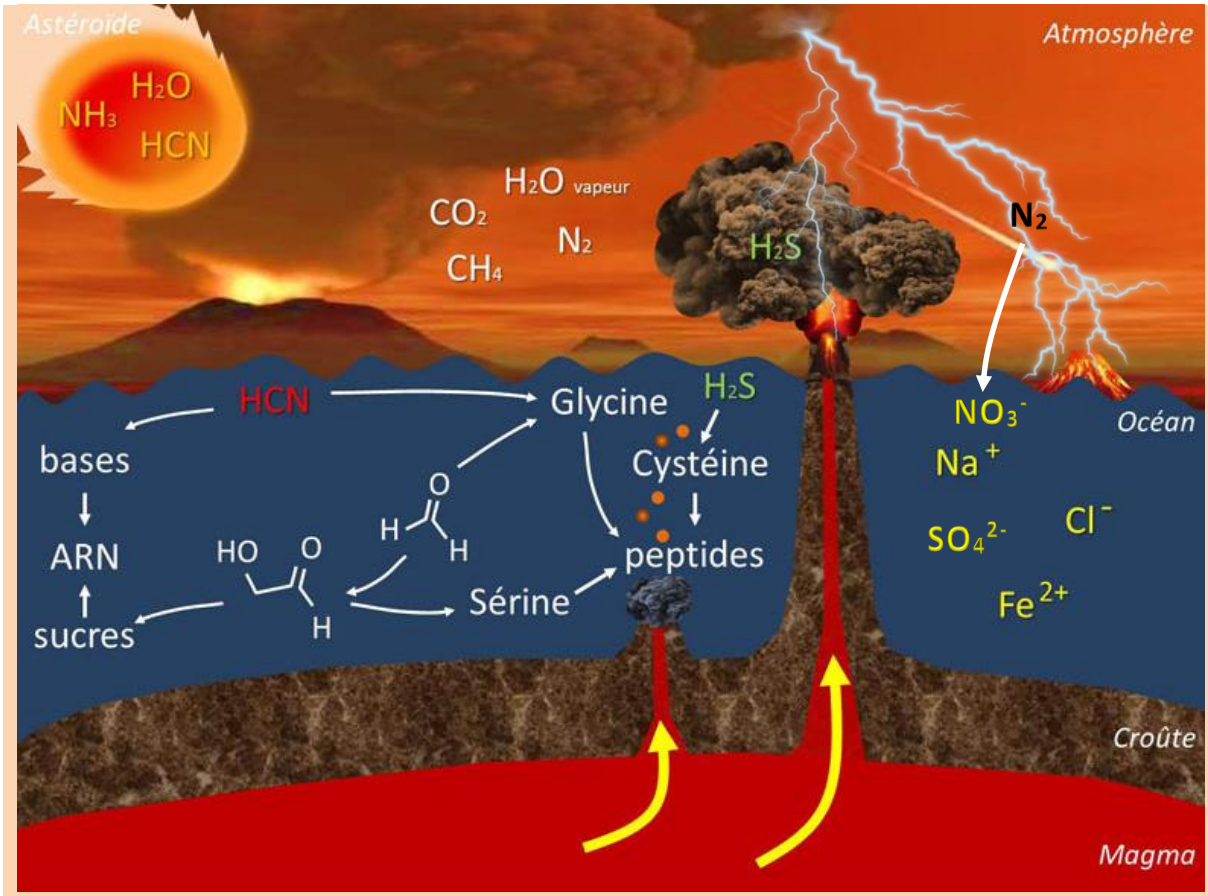


Figure I-17 : Condition de la Terre primitive lors de l'émergence de la vie et ses synthèses prébiotiques supposées (Modifié d'après http://www.encyclopedie-environnement.org)

4.1.2. Les océans primitifs

4.1.2.1. Température des océans

A cette époque, une importante quantité de CO_2 atmosphérique (initialement à plus de 210 bars de pression à 4.4-4.3 Ga) est dissous dans les océans et séquestrée dans le manteau (laissant 5 à 25 bars en surface). Les océans deviennent alors plus stables et assez froid (30-100°C) facilitant l'apparition de la vie, avec quelques épisodes de réchauffement lors des bombardements de météorites (jusqu'à 300°C) (Pinti, 2005).

4.1.2.2. pH des océans

Les océans primitifs en équilibre avec l'atmosphère, étaient probablement riches en gaz dissous, notamment en CO_2 de par les fortes concentrations atmosphériques. Certains chercheurs estiment le pH des océans acides (pH 4.8- 6.5), de par ces fortes concentrations en CO_2 dissous (Pinti, 2005) tandis que d'autres estiment que les océans de l'Hadéen seraient plus probablement à pH proche de la neutralité, comme les océans modernes, dû à l'effet tampon des basaltes de la croûte océanique (Sleep, 2010). Finalement d'autres modèles plus anciens, ont également estimé un océan alcalin (pH 9-10.5) saturé en carbonate de sodium, mais ce résultat fut contesté d'un point de vue thermodynamique (Kempe and Degens, 1985). A l'heure actuelle, les hypothèses penchent plutôt en faveur d'un océan proche de la neutralité et de nombreuses discussions sont en cours sur leur véracité.

4.1.2.3. Composition chimique des océans

Outre les fortes concentrations en gaz dissous, des scientifiques supposent la présence de sulfate (SO_4^{2-}) dans les océans primitifs par la réaction entre le SO_2 d'origine volcanique et l'H_2O à des températures inférieures à 400°C, donnant de l'H_2S et du H_2SO_4 (Holland, 2002). Des études récentes ont également quantifié l'apport en oxydes d'azote, tel que les nitrates et nitrite, dans les océans de l'Hadéen. En effet, le N_2 et CO_2 atmosphérique en forte concentration aurait réagi lorsqu'ils auraient été touchés par la foudre, produisant des oxydes nitriques (NO). Des réactions photochimiques auraient ensuite transformé ces oxydes nitriques en acides, tel que des HNO, HNO_2, HNO_3, et HO_2NO_2, qui auraient ruisselé dans les océans pour se dissocier et former des nitrates et nitrites. Ces productions sont estimées à $6{,}5.10^8$ molécules.cm^{-2}.s^{-1} au maximum, produisant des concentrations de l'ordre du millimolaire après des dizaines de millions voire des dizaines de milliers d'années (Wong et al., 2017).

La salinité des océans à cette époque est plus difficile à prévoir, mais probablement 1,5 à 2 fois supérieure aux océans modernes, dû au manque de mer fermée pouvant accumuler les sels par évaporation pour former des halites (NaCl solide) réduisant la concentration des sels dans l'océan. La Table I-6 montre la composition supposée en ions de l'océan primitif et des océans modernes.

Table I-6 : Composition en ions des océans primitifs et actuels en mM (De Ronde et al., 1997)

Cl^-	Br^-	I^-	SO_4^{2-}	Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Sr^{2+}
Océans primitifs								
920	2.25	0.037	2.3	789	18.9	50.9	232	4.52
Océans modernes								
556	0.86	0.0005	28.7	477	10.1	54.2	10.5	0.09

4.1.3. Les sources hydrothermales profondes, un lieu propice à l'émergence de la vie

Les sources hydrothermales profondes semblent particulièrement favorables à l'émergence de la vie. En effet, ce milieu, privé d'oxygène et de lumière, avec de forts gradients de température et de pH, chargé en métaux et soufre, semble le lieu idéal pour l'émergence de la vie sur Terre. C'est dans ce contexte qu'ont vu le jour de nombreux modèles de mécanismes pour l'origine de la vie. Parmis eux, on retrouve le monde à ARN, qui consiste à l'apparition de l'information génétique et sa réplication avant le premier métabolisme (Crisp and Carell, 2018; Gesteland and Atkins, 1993). L'ARN aurait alors servi de catalyseur et se serait autorépliqué. Ce modèle a été longtemps critiqué mais certaines études récentes continuent de développer ce concept pourtant fortement controversé. A l'inverse, un autre modèle, plus couramment accepté à l'heure actuelle, place l'apparition du métabolisme avant l'information génétique, par des systèmes de flux d'énergie et de matières auto-réplicatifs.

Ce modèle suppose la production des élements de bases de la vie par diverses réactions abiotiques spécifiques des sources hydrothermales profondes (Deamer and Weber, 2010; Wächtershäuser, 1998). Ces molécules, sous forme de « soupe primordiale » ou condensés dans une matrice, auraient réagi entre elles pour donner des molécules organiques

de plus en plus complexes (Deamer and Weber, 2010). La nature de ces molécules, les mécanismes de production et le contexte physico-chimique favorable à ces réactions ont donné lieu à différentes théories spécifiques à différents environnements hydrothermaux. Cependant, dans chacune de ces hypothèses, on retrouve la présence d'élements indispensables, inférée par rapport aux métabolismes des organismes modernes. Ces éléments de bases peuvent être décrits comme suit :

- la production abiotique de molécules par réduction du carbone inorganique et leur polymérisation en molécules plus complexes.
- la compartimentation par des proto-membranes composées de micelles de molécules amphiphiles d'origine abiotique, permettant d'obtenir des différences de conditions entre l'intérieur et l'extérieur et le maintien de conditions physico-chimiques internes favorables
- la mise en place d'un proto-métabolisme énergétique basé sur les donneurs et accepteurs d'électrons disponible dans l'environnement.
- l'assimilation de micro et macro-élements présents dans l'environnement.

Les molécules impliquées dans ces réactions se seraient ensuite complexifiées pour donner des systèmes enzymatiques archaïques qui se seraient dupliqués par des associations ARN-enzyme, permettant le maintien d'une fonction lors de la division des proto-cellules. Par la suite, le système aurait évolué par le passage à des associations protéine-enzyme grâce à l'apparition des ribozymes. Ainsi, suite à ces hypothèses de nombreuses questions sont apparues : Dans quelles conditions peuvent apparaître ces molécules prébiotiques ? Quel fût le premier métabolisme ? Comment ces systèmes enzymatiques ont-ils pu perdurer ? En connaissant les conditions de l'hadéen, il est possible d'essayer de répondre à ces questions.

4.2. Formation des éléments indispensables à la vie

4.2.1. Réduction du carbone et polymérisation : production des premières briques de la vie sur Terre

En 1988, Wachtershauser propose l'hypothèse de réduction du CO_2 du fluide hydrothermal en utilisant le sulfure d'hydrogène (H_2S) sur des sulfures de fer (FeS) comme agent réducteur, formant de la pyrite FeS_2 (Wächtershäuser, 1998). Cette hypothèse a ensuite été étayée par de nombreux travaux, démontrant notamment la réduction d'acétylène et de mercaptans par l'H_2S sur du FeS (Blöchl et al., 1992). Cependant, la réduction du CO_2 n'a pas été achevée. Une synthèse alternative a été décrite par la suite, par la réaction de monoxyde de carbone avec des méthyl mercaptan dans une solution de sulfure de fer et de nickel pour donner un dérivé de l'acide acétique (Huber and Wächtershäuser, 1997). De même la synthèse de peptide est réalisable dans les mêmes conditions à partir d'acides aminés (Huber and Wächtershäuser, 1998).

D'autre part, des études ont montré que des réactions de Koch et de type Fischer-Tropsch pouvaient également se dérouler au sein des sources hydrothermales entre l'hydrogène et le monoxyde et dioxyde de carbone du fluide hydrothermal. Ces réactions forment une diversité importante d'hydrocarbures à courte chaîne tel que du CH_4, du C_2H_6 et

du C_3H_8, mais aussi des n-C_4H_{10} et des n-C_5H_{12} (Cody et al., 2004; Ji et al., 2008), pouvant même s'assembler pour former des molécules à plus de 35 carbones (McCollom and Seewald, 2003). Il est également possible de produire des acides aminés à partir de formiate d'ammonium (NH_4HCO_2) (Aubrey et al., 2009). Ainsi de nombreuses molécules organiques peuvent être produites dans les systèmes hydrothermaux, constituant les premières briques des systèmes vivants.

Suite à la production de ces molécules, comment ont pu se former les polymères nécessaires à l'apparition de la vie ? La plupart des biopolymères sont synthétisés quand l'équivalent d'une molécule d'eau est enlevée pour former les ponts ester des acides nucléiques, les ponts glycosides des polysaccharides et les ponts peptidiques des protéines. Dans les organismes modernes, la suppression de l'eau est effectuée en amont de la formation des liaisons. Ce processus implique le transfert d'électrons, qui est couplé à l'oxydation d'un substrat ou la génération d'un gradient de protons qui est converti en énergie par la synthèse de liaisons pyrophosphates dans l'ATP (Deamer and Weber, 2010). Ces mécanismes sont complexes et un système plus simplifié doit être envisagé pour les proto-cellules. De plus, thermodynamiquement l'élimination de cette molécule d'eau est défavorable dans l'eau elle-même, nécessitant des conditions particulières.

D'après la théorie de l'argile (Ponnamperuma et al., 1982), ces molécules organiques complexes auraient pu se condenser dans des argiles ou des minéraux comme la pyrite, constituant des cheminées des sources hydrothermales profondes acides modernes. L'agglutination de ces molécules sur une surface (espace à 2 dimensions) augmenterait leur réactivité entre elles, en vue de leur polymérisation, plutôt que libre dans l'eau (espace à 3 dimensions). De plus, les pyrites, de composition FeS_2 sont également des catalyseurs de réactions chimiques (Schoonen et al., 2004; Taran, 2017)

4.2.1. Les proto-membranes : Vésicules lipidiques

Les membranes des organismes modernes sont constituées de phospholipides issus de voies métaboliques très évoluées, se plaçant en double feuillet par leurs propriétés amphiphiles et formant des micelles de manière spontanée. Elles délimitent l'intérieur de la cellule et son environnement externe, permettant de contrôler la composition interne de la cellule par échanges de molécules et d'ions avec l'extérieur. Enchâssés dans cette bicouche lipidique, on trouve de nombreux sucres et protéines régulant ces échanges de matière.

Les proto-membranes étaient probablement basées sur le même principe. Cependant, il est peu probable que des phospholipides se soient formés par voie chimique. Ainsi, il est plus probable que des molécules amphiphiles plus simples aient été synthétisées de manière abiotique et se soient rassemblées de manière spontanée en micelles. Des études ont montré qu'il était possible de synthétiser des lipides dans les conditions des sources hydrothermales par des réactions chimiques semblables au procédé Fischer-Tropsch à des températures entre 100 et 400°C (Baross and Hoffman, 1985; Rushdi and Simoneit, 2001). Mais pour que ces lipides puissent se rassembler pour former ces micelles, il est nécessaire que leur concentration soit suffisamment élevée, et donc qu'ils ne soient pas dilués dans l'eau environnante. Une étude a montré que les microcapillaires de la structure de la cheminée

hydrothermale jouaient le rôle de colonne de diffusion, concentrant ces lipides pour former les micelles (Budin et al., 2009). Ces études ont également montré que ces vésicules sont capables de croître et de se diviser à partir de l'insertion additionnelle de nouveaux lipides. Ce phénomène constituerait le premier élément de la division cellulaire (Baross and Hoffman, 1985; Rushdi and Simoneit, 2001). De plus, la diversité des molécules lipidiques de cette proto-membrane permettrait des réactions d'autocatalyse mutuelle, favorisant la transmission aux cellules filles de conformations particulières de ces membranes et constituant une première forme d'hérédité (Segré et al., 2001).

4.2.2. Proto-métabolisme énergétique

Dans les organismes vivants modernes, la bifurcation des électrons des chaînes d'oxydoréduction entre donneur et accepteur d'électrons conduit à un gradient de protons inter-membranaire créant une force proton-motrice. Cette force est ensuite convertie en énergie chimique anhydre (ATP), via l'ATP Synthase. Ce phénomène énergétique est appelé la Chimiosmose. En 1985, Arthur Koch fût le premier à s'interroger sur l'existence de ce phénomène dans les proto-membranes. Il a alors exposé trois postulats qui permettraient l'existence de ce phénomène dans les proto-membranes :

- Les membranes doivent maintenir un gradient de proton, et le gradient doit être suffisant pour conduire à la synthèse d'ATP
- Les protons doivent être pompés à travers la membrane par des transporteurs d'électrons utilisant la lumière ou le transfert d'électrons comme source d'énergie
- Les membranes doivent contenir une ATP synthase qui pourrait servir également comme pompe à proton.

L'existence de ces conditions dans les proto-membranes reste pour le moment spéculative. En effet, l'ATP synthase est une enzyme complexe et donc le fruit d'une évolution spécifique. Toutefois, sa structure est similaire chez les bactéries et les archées et donc probablement une fonction héritée de LUCA. De plus, certaines études soutiennent que les proto-membranes composées uniquement de molécules amphiphiles seraient trop perméables à la traversée des protons, et donc ne pourrait maintenir un gradient de proton suffisant pour l'apparition de phénomène de chimiosmose (Mansy, 2010). Cependant, des proto-membranes ayant intégré des polymères divers en seraient capables (Deamer and Weber, 2010). Le débat reste ouvert…

Toutefois pour réaliser un cycle de gradients de protons nécessaires à la synthèse d'énergie, il était nécessaire d'avoir des donneurs d'électrons et des accepteurs d'électrons à l'époque de l'Hadéen, pour réaliser les réactions d'oxydo-réductions. Outre les rayonnements solaires, source abondante d'énergie mais fortement toxique à cette époque (dissociation des molécules organiques), il existait d'autres sources d'énergie potentiellement impliquées dans l'émergence de la vie, notamment produites par les phénomènes hydrothermaux. En effet, les sources d'énergies les plus abondantes à cette époque étaient l'H_2, l'H_2S et le CH_4 produit par l'hydrothermalisme et les réactions associées. Ces composés sont d'ailleurs toujours utilisés par les microorganismes modernes des sources hydrothermales profondes, comme nous avons pu le voir précédemment. En revanche, les mécanismes de dissociation de ces

molécules à l'heure actuelle sont catalysés par des métalloprotéines complexes et les mécanismes présents à l'époque de l'Hadéen restent encore inconnus. Peut-être existait-il une autre source d'énergie directement utilisable ? Nous essaierons de proposer un mécanisme dans ce sens là dans la partie résultat.

Maintenant en ce qui concerne les accepteurs d'électrons, il est communément accepté que l'atmosphère primitive était composée de peu ou pas d'oxygène, l'accepteur d'électrons majoritaire des organismes modernes. Ainsi, des études se sont intéressées à définir une liste d'accepteurs d'électrons potentiels. Parmi ces accepteurs les plus importants dans l'océan primitif étaient : (i) le Nitrate, formé par synthèse photochimique à partir du N_2 atmosphérique ; (ii) le Sulfate, formé par réaction entre l'H_2S d'origine volcanique, l'H_2O et les ions métalliques présents dans l'océan (Fe^{2+}) (Holland, 2002; Russell et al., 2014; Wong et al., 2017).

4.2.3. Sources de micro et macroéléments.

L'azote est un élément essentiel à la synthèse de protéines et des acides nucléiques. De la même manière que la fixation du carbone, l'H_2S est capable de réduire l'azote moléculaire (N_2) en ammoniac (NH_3) (Dörr et al., 2003). Ainsi, les sources hydrothermales sont de bonnes sources de NH_3. De plus, comme vu précédemment, les océans étaient également potentiellement constitués de nitrate et de nitrite de l'ordre du millimolaire, apporté par l'atmosphère.

Le phosphore est impliqué dans la synthèse des acides nucléiques par les liaisons phosphodiester entre les différents nucléotides, mais aussi dans la formation d'ATP et de protéines. La source de phosphore la plus courante est le phosphate. Des études ont montré la présence de phosphore réduit dans les océans de l'Hadéen-Archéen provoqué par le bombardement de météorites, relarguant des formes réactives de phosphore, telles que des phosphites facilement intégrables dans des synthèses prébiotiques (Pasek et al., 2013)

Le soufre entre dans la composition des acides aminés. Les composés soufrés sont très abondants au niveau des sources hydrothermales acides modernes et probablement durant l'Hadéen. Il est retrouvé sous forme de sulfure d'hydrogène très réactif et de sulfure de métaux. Des quantités significatives de sulfate étaient également présentes dans l'océan par la réaction de l'H_2S volcanique avec les molécules d'eau. Ces concentrations restent cependant dix fois moindres que les concentrations actuelles (Farquhar et al., 2000).

Les autres nutriments, qu'ils appartiennent aux micro- ou macro- nutriments étaient probablement apportés par l'eau de mer. En effet, comme exposé précédemment, les océans primitifs contenaient de nombreux éléments dissous (Table I-6) ainsi que des ions métalliques en abondance.

4.3. Les hypothèses d'origine de la vie en contexte hydrothermal

A partir de ces élements, deux théories d'origine de la vie en contexte hydrothermal ont été soulevées. La première, développée principalement par Michael J. Russel, s'oriente

vers les fumeurs alcalins tandis que la deuxième, regroupée sous le terme de « monde fer-soufre », est orientée vers les fumeurs acides riches en sulfure (Wächtershäuser, 1998).

4.3.1. *L'origine de la vie dans les sources hydrothermales alcalines*

Les théories impliquant les sources hydrothermales alcalines ont débuté en 1989, avant la découverte du site de Lost City, et supposaient que l'océan primitif était neutre ou légèrement acide par les fortes proportions de CO_2 dissous, servant de réservoir d'ions Fe^{2+}. Il était également supposé que la croûte océanique était ultramafique par la présence de komatiites, produisant un fluide hydrothermal alcalin par les réactions de serpentinisation. L'hydrogène produit par ces réactions aurait servi de source d'énergie pour la réduction via un cluster Fe-Ni du CO_2 dissous en CO couplé à la bifurcation des électrons conduisant au métabolisme énergétique basé sur la différence de potentiel entre un donneur d'électron à très bas potentiel et un accepteur à très haut potentiel (Ducluzeau et al., 2009; Russell and Hall, 1997). Par la suite, Russell et al. (2014) ont supposé que le méthane aurait également servi de source d'énergie et de carbone couplé à la réduction de nitrate/nitrite. Cette voie serait une variante ancienne potentielle de la voie de l'acétyl-coenzyme A (ou voie de Wood- Ljungdahl), utilisée actuellement par grand nombre de microorganismes anaérobies. Finalement, le gradient de pH entre le fluide alcalin et l'eau de mer légèrement acide aurait permis l'obtention d'un gradient de proton naturel entre des espaces compartimentés.

4.3.2. *L'origine de la vie dans un monde Fer-Soufre*

La théorie de Wächtershäuser suppose que le CO_2 aurait été réduit de manière abiotique par la catalyse de centres fer-soufre produits lors de la formation de pyrite dans les cheminées hydrothermales acides, formant de petites molécules organiques. Ces molécules se seraient condensées à la surface des minéraux, tels que la pyrite, pour former des polymères via des réactions autocatalytiques. Ces voies de fixation du carbone auraient par la suite donné une forme primitive de la voie réductive de l'acide citrique (rTCA) dépendante du soufre (Braakman and Smith, 2014; Kitadai et al., 2017). Depuis l'établissement de cette théorie en 1998, de nombreuses études se sont intéressées à déterminer les conditions de synthèse prébiotique des différents éléments indispensables à la vie (Rushdi and Simoneit, 2001; Schoonen et al., 2004; Varma et al., 2018; White et al., 2011). Dans la même lignée et beaucoup plus récemment, une étude reprend les arguments précédents pour placer l'émergence de la vie en contexte hydrothermal mais au niveau sédimentaire ; par percolation de fluide hydrothermal au sein de sédiments marins (Westall et al., 2018). Cependant, la problématique reste sensiblement la même : la compartimentation entre le fluide hydrothermale et le l'eau de mer implique un transport physique des donneurs d'électrons d'origine inorganique (H_2, CH_4, H_2S) à un point donné pour effectuer les réactions précédemment décrites. Ces phénomènes de diffusion ne permettraient qu'un apport limité en électrons pour la réduction du CO_2 et ne permettraient pas l'accumulation rapide de molécules organiques en un espace délimité pour permettre la polymérisation de molécules plus complexe. D'autres sources d'électrons en flux constant et directes pourraient être envisagées pour favoriser l'émergence de la vie en contexte hydrothermal.

4.4. LUCA et l'origine de la vie

Outre les études des géochimistes sur l'origine de la vie, les biologistes se sont également intéressés à définir les conditions au moment de l'apparition de la vie sur Terre. Pour cela, ils étudient l'origine et l'histoire évolutive de métabolismes cellulaires clefs, et investiguent des transitions majeures dans l'histoire de la Vie sur notre planète en utilisant la phylogénomique microbienne. Ils tentent ainsi de dresser une carte génétique de LUCA, et ainsi définir les métabolismes et éléments d'adaptation à son environnement. Ainsi LUCA possédait des membranes, des protéines, de l'ARN et de l'ADN, la capacité de réaliser la réplication, la transcription et la traduction, mais aussi un métabolisme basé sur l'obtention d'énergie par un gradient ionique avec une ATP synthase. LUCA était également capable d'utiliser l'hydrogène comme source d'énergie via une hydrogenase à Nickel-Fer. De plus, de nombreuses protéines inférées à LUCA ont un cluster Fer-Soufre et autre cofacteurs basés sur des ions de métaux de transition, indiquant un environnement riche en ces éléments (Sutherland, 2017). De nombreuses études se sont aussi intéressées à définir les conditions de température de croissance de LUCA, passant régulièrement de la mésophilie à l'hyperthermophilie et inversement suivant les gènes étudiés (Gaucher et al., 2010).

Cependant, il faut noter que LUCA correspond au point de séparation entre les *Archaea*/*Eukarya* et les *Bacteria*. Il était déjà doté de systèmes enzymatiques et métaboliques complexes, indiquant une distance phylogénétique et temporelle potentiellement importante entre LUCA et l'origine de la vie. D'autres lignées du vivant ont pu coexister avec LUCA mais ont fini par s'éteindre (Cornish-Bowden and Cárdenas, 2017). Ainsi l'inférence des conditions d'apparition de la vie par l'étude phylogénétique de LUCA est à nuancer.

5. UN COURANT ELECTRIQUE AU SEIN DES SOURCES HYDROTHERMALES PROFONDES

5.1. Origine géochimique de ce courant électrique

Récemment, une équipe de recherche japonaise a mis en évidence l'existence d'un courant électrique au sein de cheminées hydrothermales acides ou mixtes (Nakamura et al., 2010 ; Yamamoto et al., 2013). En effet, comme évoqué précédemment, les parois de ces cheminées sont constituées de sulfures polymétalliques (Pyrite (FeS_2) ou Chalcopyrite ($CuFeS_2$)), électriquement conducteurs ou semi-conducteurs, avec des résistivités variant entre 0.1 à 10^5 Ω.m (Karato and Wang, 2013). Ces minéraux sont donc capables de conduire des électrons sur des distances de plusieurs centimètres entre des environnements à différents potentiels d'oxydo-réduction (Nakamura et al., 2010). La paroi des cheminées hydrothermales peut alors être schématisée comme une membrane poreuse et conductrice séparant deux compartiments aux conditions physico-chimiques radicalement différentes. Ainsi, la différence de potentiels entre le fluide réduit riche en sulfure d'hydrogène (estimé à -0.4 V vs ESH) et l'eau de mer oxygénée (estimé à +0.4V vs ESH) conduit à une force électromotrice à travers la paroi des cheminées permettant la production d'un courant éléctrique en continu. Ce courant électrique a été mesuré *in-situ* et reproduit en laboratoire (Yamamoto et al., 2013, 2017) en mimant les conditions retrouvées au sein de sources

hydrothermales acides. Ces conditions peuvent produire jusqu'à 200 mW/m² en laboratoire (Yamamoto et al., 2013).

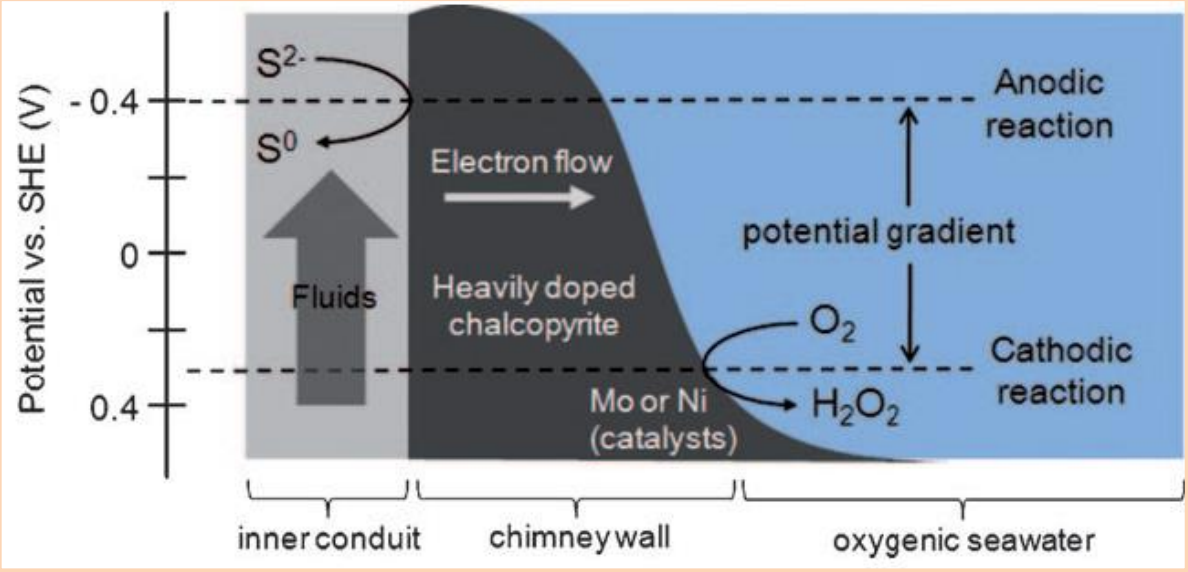


Figure I-18 : Schéma du courant électrique au sein des cheminées hydrothermales. (Nakamura et al., 2010)

5.2. Implication de ce courant électrique dans les hypothèses d'origine de la vie

Cette découverte soulève de nombreuses questions quant au rôle de ce courant électrique dans l'origine de la vie en contexte hydrothermal. En effet, tout laisse à croire que les conditions pour la formation de ce courant électrique étaient également réunies durant l'Hadéen. Les fluides hydrothermaux de l'Hadéen étaient également composés de sulfure d'hydrogène et autres composés réduits, produisant des cheminées hydrothermales de structure similaire aux cheminées modernes. L'absence d'oxygène dans l'eau de mer était très probablement compensée par la présence de molécules oxydées comme le sulfate ou le nitrate, jouant le rôle d'accepteur d'électrons dans ces réactions électrochimiques. Ainsi, cette source d'énergie pourrait avoir eu un rôle important dans la formation de molécules organiques en alimentant en électrons des réactions se déroulant à la surface des cheminées hydrothermales. En allant dans ce sens, des études récentes ont démontré que ce courant électrique pouvait catalyser de manière électrochimique la réduction du CO_2 en CO et CH_4 sur des dépôts hydrothermaux de $FeNi_2S_4$ (violarite) en condition légèrement acide (Yamaguchi et al., 2014). Une étude plus récente a montré la production électrochimique de monoxyde de carbone et de formiate sur des cristaux de sulfures métaliques (CdS et CuS) à partir de CO_2, le CO étant l'élément de base pour la condensation de molécules organiques (Kitadai et al., 2018).

5.3. Implication de ce courant électrique dans les écosystèmes hydrothermaux modernes

Outre l'implication probable de ce courant électrique dans la synthèse prébiotique de molécules organiques aux origines de la vie, ce courant pourrait également avoir un rôle important dans le développement de la biocénose dans les systèmes hydrothermaux actuels.

En effet, il pourrait servir de source d'énergie inorganique pour des microorganismes capables de capter ce flux d'électrons à leur avantage. Or, depuis une vingtaine d'année, de nombreux scientifiques se sont intéressés à l'étude de certains microorganismes dit « électro-actifs », qui sont justement capables de transférer des électrons extracellulairement depuis et vers un support conducteur. Cependant, jusqu'à récemment, aucun microorganisme des sources hydrothermales n'avait été décrit comme électro-actifs.

Une étude récente a cependant montré la capacité et une affinité particulière des pyrites à transférer les électrons à des molécules organiques, telles que les quinones, connues pour être des transporteurs d'électrons communément retrouvés dans les systèmes respiratoires microbiens (Taran, 2017). Point intéressant, les *Archaea* retrouvées fréquemment dans les sources hydrothermales profondes, sont connues pour synthétiser des menaquinones saturées caractéristiques d'une ancestralité commune (Elling et al., 2016). Ainsi ces molécules pourraient venir se charger et se décharger entre la paroi de la cheminée et les cellules pour les alimenter en électrons (voir Chapitre I - 3.1.1 Transfert indirect d'électrons par l'oxydation d'un produit issu du métabolisme bactérien).

Ainsi, il est de grand intérêt d'étudier la présence de ces microorganismes au sein des sources hydrothermales :

- pour tenter d'évaluer l'impact de ce courant dans le développement de microorganismes ;
- pour comprendre le rôle de ce courant dans le développement de la biodiversité microbienne des sources hydrothermales actuelles ;
- pour tenter d'évaluer l'impact de ce courant dans les synthèses prébiotiques et comme source d'énergie à l'émergence de la vie ;
- pour identifier de potentiels microorganismes extrêmophiles capables de capter cette électricité pour des applications biotechnologiques.

Pour mieux comprendre comment enrichir ces microorganismes électroactifs, il est nécessaire de s'intéresser à la discipline émergente de l'électromicrobiologie, mêlant microbiologie et électrochimie.

CHAPITRE II - L'ELECTROMICROBIOLOGIE – L'ETUDE DES MICRO-ORGANISMES ELECTROACTIFS

Des microorganismes électriquement connectés



1. LE CONCEPT D'ELECTROACTIVITE

1.1. Histoire de l'électroactivité microbienne

C'est en 1911 que Michael C. Potter, professeur de botanique à l'université de Durham (Royaume-Unis), fit la découverte d'un courant électrique entre deux électrodes de platine plongées dans une culture de *Saccharomyces cerevisiae* et *Escherishia coli*. A l'époque, Michael C. Potter suppose que ce courant proviendrait de la dégradation de la matière organique par les microorganismes (Potter, 1911). Vingt ans après cette découverte, Barnet Cohen, de l'Université de Cambridge, a poursuivi ces recherches en connectant plusieurs de ces mêmes demi-piles microbiennes en série pour augmenter la tension totale des piles microbiennes et ainsi obtenir une tension jusqu'à 35 V pour un courant de 2 mA (Cohen, 1931). Cette découverte est laissée de côté jusque dans les années 1960, quand la NASA tente de développer cette capacité dans des technologies pour la production d'électricité pour les vols spatiaux par le recyclage de la matière organique (Berk and Canfield, 1964; Davis, 1963; Davis and Yarbrough, 1962; DelDuca et al., 1963; Konikoff and Reynolds, 1963; Rohrback et al., 1962). Ces travaux resteront sans succès d'application. Dans les années 1980, des études s'intéressent à d'autres microorganismes, tel que *Clostridium butyricum*, à produire du courant électrique (Suzuki et al., 1980). Dans la même période, les premiers travaux sur les aspects mécanistiques du transfert d'électrons extracellulaire sont menés sur *Saccharomyces cerevisiae* et *Proteus vulgaris* par Thurston et Peter Benetto du Queen Elisabeth College de Londres, notamment par l'ajout de médiateurs électrochimiques (phénotiazine) améliorant les transferts électroniques (Bennetto et al., 1981, 1983; Thurston et al., 1985). Il faudra attendre le début des années 2000 pour voir s'envoler le nombre de publications sur le sujet (Figure II-1), et l'apparition de l'adjectif « électroactif » pour qualifier ces microorganismes capables de réaliser des transferts d'électrons extracellulaires. Ces recherches ont notamment permis le développement d'une diversité d'applications industrielles potentielles, telles que les Piles à Combustible Microbiennes (Microbial Fuel Cells, MFC) ou les Cellules à Electrosynthèses Microbiennes (Microbial electroSynthesis Cells, MSC), décrites plus tard dans ce chapitre. Cependant les rendements et capacités métaboliques des espèces électroactives restent limités et les études dans le domaine se sont plutôt intéressées à l'identification d'espèces microbiennes électroactives, issues de divers écosystèmes. L'étude de cette biodiversité électroactive a également permis de poser les premiers éléments mécanistiques d'espèces modèles, tels que ceux observés chez des espèces de *Geobacter* et de *Shewanella*.

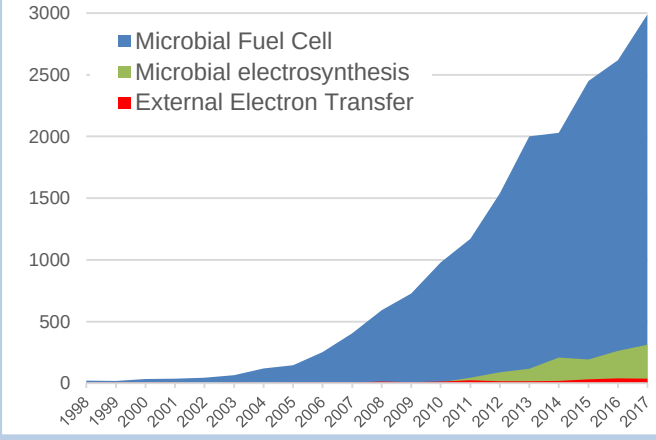


Figure II-1 : Nombre de référence au terme « Microbial Fuel Cell », « Microbial Electrosynthesis » et « External Electron Transfer » par an dans la littérature scientifique depuis 1998 (d'après Google Scholar Juillet 2018)

1.2. Définition d'électroactivité et électromicrobiologie

A quelques exceptions près, les micro-organismes chimiotrophes tirent leur énergie de réactions d'oxydations de substrats en présence d'oxydants exogènes. Ces oxydations génèrent la synthèse d'ATP par un processus biochimique appelé phosphorylation oxydative. Outre l'oxygène (respiration aérobie), certains micro-organismes ont la capacité d'utiliser une variété d'accepteurs d'électrons alternatifs pour assurer une respiration dite anaérobie. Le nitrate ou le sulfate sont des exemples bien connus d'accepteurs d'électrons qui sont utilisés en absence d'oxygène. D'autres accepteurs d'électrons inorganiques sont réduits par des micro-organismes anaérobies tels que le fer et le manganèse et des oxy-anions comme le sélénate, l'arsenate, et l'uranate (Richter et al., 2012). Le Fe(III) et dans une moindre mesure le Mn(IV), sont les accepteurs d'électrons inorganiques les plus abondants dans certains sols, sédiments et sources hydrothermales (Jannasch and Mottl, 1985). Contrairement aux autres accepteurs d'électrons qui pénètrent à l'intérieur de la cellule avant d'être réduits, la plupart des accepteurs d'électrons inorganiques sont insolubles, ce qui nécessite des mécanismes physiologiques spécifiques pour permettre à la cellule de transférer ses électrons de l'intérieur vers l'extérieur. C'est en 1988 que Lovley et Phillips ont mis en évidence un métabolisme énergétique original en étudiant la réduction dissimilatrice du fer ferrique Fe(III) sous forme insoluble. Ils ont observé une croissance de la bactérie *Geobacter metallireducens* GS-15 lorsque celle-ci était cultivée en présence d'acétate et de magnétite, un oxyde de fer dit amorphe (insoluble) de formule Fe_3O_4 (Lovley and Phillips, 1988). Cette bactérie a donc la possibilité de réaliser un transfert d'électrons extracellulaire (TEE) vers un accepteur d'électrons insoluble.

Ainsi, l'électroactivité peut être définie comme la capacité de certains microorganismes à transférer des électrons vers et depuis un accepteur exogène insoluble, telles que des électrodes en laboratoire, ou des particules métalliques, comme les oxydes de fer dans l'environnement. On retrouve deux types d'électroactivité. Le premier type consiste au transfert d'électrons, obtenus par oxydation de matière organique ou de composés inorganiques réduits, à un support conducteur servant d'accepteur final d'électrons. On parle alors de microorganismes exoélectrogènes, c'est-à-dire « générateurs d'électrons ». Le deuxième utilise le support conducteur comme source d'énergie, on parle alors de microorganismes électrotrophes, c'est-à-dire « qui se nourrissent d'électrons ».

Avec l'émergence de ces nouvelles capacités métaboliques et des applications potentielles, une nouvelle discipline a vu le jour : l'électromicrobiologie. Celle-ci fût définie en 2012 par le professeur Derek Lovley de l'Université de Pennsylvanie, comme étant l'étude des interactions entre les microorganismes électroactifs et des supports électriquements conducteurs, artificiel ou naturel (Lovley, 2012a).

2. LES MICROORGANISMES ELECTROACTIFS

2.1. Les microorganismes électroactifs isolés

Au cours des 10 dernières années, une centaine d'espèces microbiennes différentes ont été référencées comme électroactives essentiellement exoélectrogéniques. Ces diverses

espèces proviennent de milieux totalement différents avec des métabolismes énergétiques très variés. Une étude récente a tenté d'analyser les caractéristiques communes des environnements de ces microorganismes pour définir une niche écologique dans laquelle les microorganismes électroactifs se développeraient préférentiellement (Koch and Harnisch, 2016). Cependant il apparaît que cette capacité électroactive est ubiquitaire et répartie dans tout l'arbre du vivant (Figure II-2). En effet, on la retrouve aussi bien chez les *Proteobacteria*, que chez les *Firmicutes*, les *Actinobacteria* et des études récentes ont même identifié cette capacité chez des *Archaea*. De plus, on retrouve aussi bien des microorganismes exoéléctrogènes qu'électrotrophes dans tous les phyla. On remarque cependant le faible nombre d'*ε-proteobacteria*, avec seule une espèce exoéléctrogène décrite à ce jour (Fedorovich et al., 2009). Ces bactéries vivent principalement au niveau des sources hydrothermales ou en tant que parasites ou symbiotes d'animaux, expliquant leur faible représentation dans les biofilms électro-actifs. De plus, la plupart des microorganismes électroactifs décrits à ce jour sont mésophiles, et se développent donc entre 15 et 45°C. Seules trois espèces hyperthermophiles (*Geoglobus ahangari*, *Ferroglobus placidus* et *Pyrococcus furiosus*) et quelques espèces thermophiles ont été décrites ces dernières années. Certaines levures ont également montré une activité électrogène mais restent peu étudiées (Babanova et al., 2011; Prasad et al., 2007; Rawson et al., 2012).

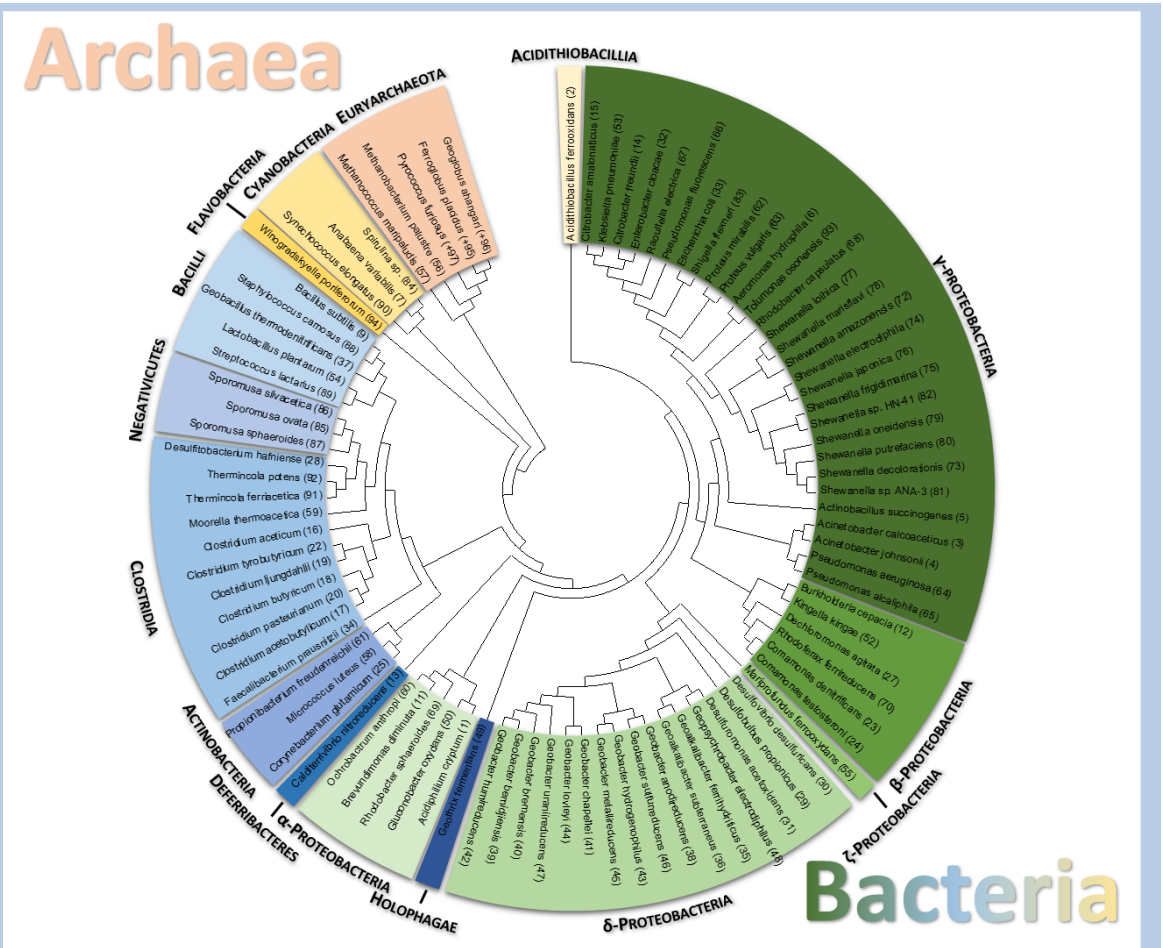


Figure II-2 : Arbre phylogénétique des espèces microbiennes décrites comme électroactives dans la littérature. Pour références se reporter aux numéros dans Koch et Harnisch, 2016. (+) indique l'ajout de ces espèces décrites suite à la publication de l'article de référence.

De nombreux et divers environnements ont été testés pour identifier la présence de microorganismes électroactifs, tels que les eaux usées, les rivières, les rizières ou les composts (Cercado et al., 2013; Erable et al., 2009; García-Muñoz et al., 2011; Huang et al., 2011a; Mocali et al., 2012). L'isolement d'espèces électrochimiquement actives de ces environnements naturels a permis de montrer que des espèces « sauvages » issues directement de l'environnement étaient souvent plus performantes pour le production d'électricité que des souches « types » cultivées en laboratoire (Nercessian *et al.*, 2012). D'autres études ont montré que les consortia microbiens issus de l'environnement étaient plus performants que les cultures pures des espèces constituantes (Nevin *et al.*, 2008; Sydow *et al.*, 2014).

2.1. Les microorganismes électroactifs modèles

Les premières études mécanistiques pour comprendre le fonctionnement des transferts d'électrons extracellulaire ont été réalisées sur des Bactéries Réductrices de Métaux Dissimilatrices (DMRB en anglais), capables de réduire des particules métalliques comme accepteurs d'électrons finaux. Lors de ces études, deux bactéries modèles ont été utilisées appartenant l'une aux *δ-Proteobacteria* et l'autre aux *γ-Proteobacteria*

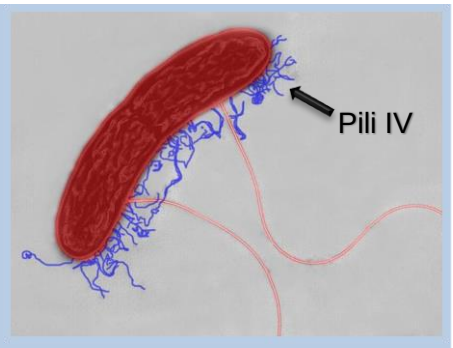


Figure II-3 : Nanofilaments de Geobacter sulfureducens composé de pili de type IV électriquement conducteur. (Crédit photo : D. Lovley, G. Reguera, K. McCarthy)

La première fût *Geobacter sulfurreducens*, *δ-Proteobacteria* de l'ordre des *Desulfuromonadales,* gram négatif connue depuis 1987 pour sa capacité à réduire les métaux et le soufre en anaérobie. Les premières études mécanistiques ont débuté en 2002 par l'équipe de Derek Lovley de l'université du Massachusetts (Childers et al., 2002). La deuxième fût *Shewanella oneidensis*, *γ-Proteobacteria* de l'ordre des *Ateromonadales* gram négatif connue pour se développer notamment dans des environnements anaérobies contaminés par des métaux lourds tels que le fer, le plomb et l'uranium. Outre ces métaux lourds, elle est capable d'utiliser les sulfates, nitrates et les chromates comme accepteur d'électrons. L'étude de ces bactéries électroactives et de leur génome a permis de poser les bases des mécanismes de transferts d'électrons extracellulaires.



Figure II-4 : Nanopodes électriquements conducteurs produits par Shewanella oneidensis (crédit photo : R. Bencheikh et B. Arey)

3. LES MECANISMES DE TRANSFERT D'ELECTRONS EXTRA-CELLULAIRE

L'étude des mécanismes de transfert d'électrons extracellulaire (TEE) est encore à ses débuts, comme le montre le faible nombre de publications sur le sujet depuis 2009 (Figure II-1 : « External Electron Transfer »). En effet, il est encore difficile d'identifier précisément les

systèmes enzymatiques impliqués et leurs fonctions. Cependant, des avancées ont été réalisées sur les mécanismes de transfert exoélectrogénique et trois mécanismes ont été, à l'heure actuelle, observés et caractérisés: (i) un transfert d'électrons indirect, médié par la sécrétion ou l'ajout de transporteur d'électrons permettant le transfert électronique de la cellule vers ces accepteurs d'électrons exogène et insolubles ; (ii) la présence de nano-filaments ou nanopodes conducteurs d'électrons permettant un lien physique avec les support insolubles ; (iii) les transferts par contacts directs de systèmes enzymatiques membranaires externes (Schröder, 2007).

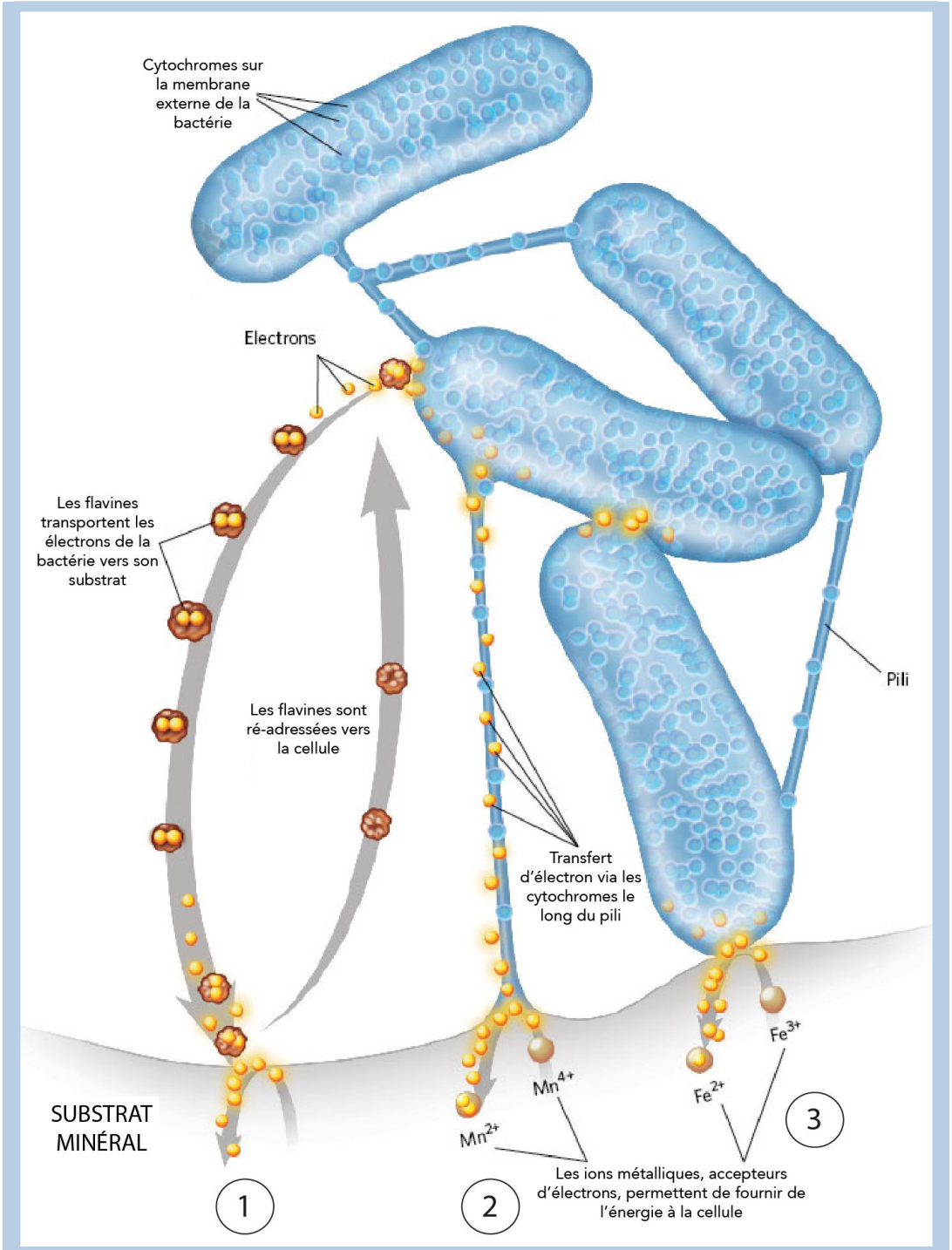


Figure II-5 : Schéma des différents types de mécanisme d'électroactivité décris. (Credit: The Scientist, "Live Wires" par Mohamed Y. El-Naggar et Steven E. Finkel)

3.1. Transfert d'électrons via un médiateur

3.1.1. Transfert indirect d'électrons par l'oxydation d'un produit issu du métabolisme bactérien

Les premières études sur l'électroactivité ont montré que des microorganismes pouvaient transférer des électrons à un support conducteur par l'oxydation de produit du métabolisme énergétique microbien (Figure II-6). Parmi ces molécules du métabolisme, les chercheurs ont identifié notamment, des produits de fermentation, tels que l'hydrogène ou des alcools, qui pouvaient réagir spontanément sur des électrodes au platine (Lovley, 2006). Il faudra attendre les années 2000 pour que cette capacité soit exploitée dans des biofilms anodiques de *Clostridium* sp. ou *Escherichia coli* produisant de l'hydrogène par fermentation et servant par la suite de combustible s'oxydant sur une électrode (Niessen et al., 2004a, 2004b). D'autres produits du métabolisme microbien peuvent également être utilisés comme médiateurs électroniques, comme l'H_2S produit par la réduction du sulfate ou du soufre élementaire par des microorganismes sulfato- ou sulfo-réducteurs. Cet H_2S va alors s'oxyder sur anode pour donner du S^0, ce dernier pouvant alors être réutilisé (Reimers et al., 2006).

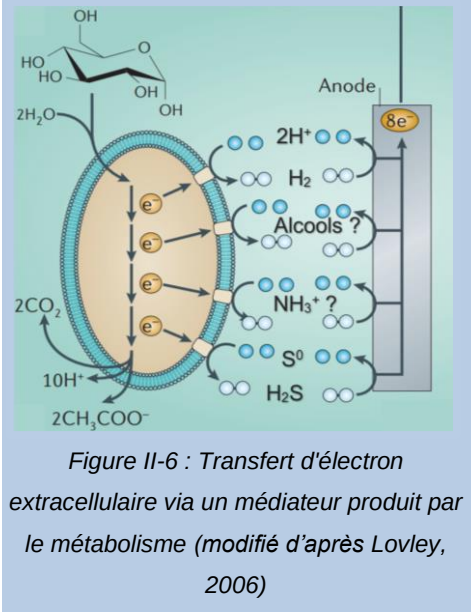


Figure II-6 : Transfert d'électron extracellulaire via un médiateur produit par le métabolisme (modifié d'après Lovley, 2006)

3.1.2. Transfert indirect d'électrons par des médiateurs physiologiques

Outre les produits du métabolisme, les microorganismes sont également capables de produire des médiateurs électroniques physiologiques. En effet, de nombreuses bactéries, comme les membres des genres *Geobacter, Shewanella* et *Pseudomonas* sont capables de produire des molécules réactives, comme des pyocianines, phénazines, flavines ou des quinones, qui peuvent servir de transport d'électrons extracellulaire (Canstein et al., 2008; Marsili et al., 2008; Pham et al., 2007; Rabaey et al., 2004; Schaetzle et al., 2008).

3.1.3. Transfert indirect d'électrons par des médiateurs artificiels

Suite à la découverte des médiateurs physiologiques exposés précédement, des chercheurs se sont intéressés à l'ajout de médiateurs chimiques exogènes dans des cultures de microorganismes non-électroactifs. Suite à cet ajout, des microorganismes comme *Escherichia coli* et *Actinobacillus succinogenes* (Park and Zeikus, 2000), *Proteus vulgaris* (Kim et al., 2000), *Erwinia dissolvens*, *Pseudomonas* spp. et

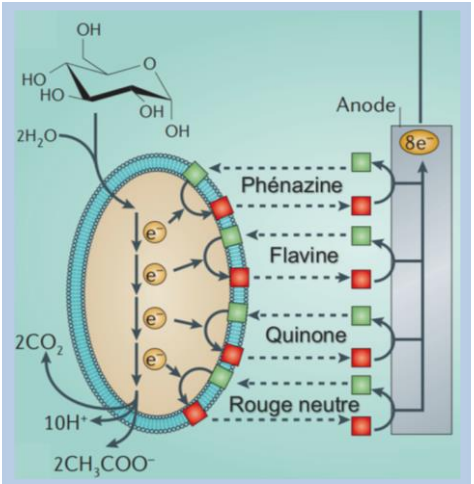


Figure II-7 : Transfert d'électron extracellulaire via un médiateur endogène ou artificiel (modifié d'après Lovley, 2006)

Bacillus spp. (Shukla et al., 2004) ont pu montrer une capacité électroactive acquise qui leur était impossible sans ajout de médiateurs artificiels. Les médiateurs artificiels les plus utilisés sont le rouge neutre (Park and Zeikus, 2000), la thionine (Shukla et al., 2004), le chélate de fer (Lovley, 2006), les dérivés de la quinone comme l'AQDS (Newman and Kolter, 2000; Sun et al., 2013), la phénazine (Rabaey et al., 2005), la phénoxazine et la phénothiazine (Lovley, 2006) les flavines et les acides humiques (Sun *et al.*, 2013). Ces médiateurs artificiels (exogènes) sont capables de traverser les membranes cellulaires et de capter des électrons des chaines d'oxydo-réduction du métabolisme respiratoire pour les transférer à une électrode (Lovley, 2006). Suivant le potentiel des médiateurs, ils vont pouvoir capturer ces électrons plus ou moins haut dans les chaînes d'oxydoréduction (Figure II-8).

L'utilisation des médiateurs artificiels a pour effet d'améliorer les transferts d'électrons extracellulaires des bactéries électroactives (Wu *et al.*, 2014) mais également de permettre à certains microorganismes de devenir électroactifs (Shukla et al., 2004). Cependant, leur utilisation présente plusieurs inconvénients :

- certains médiateurs comme le méthylviologène ou la thionine sont toxiques et présentent un risque pour l'environnement (Schroder, 2007)
- ces médiateurs sont pour la plupart instables et nécessitent un apport constant dans le milieu pour compenser les pertes, augmentant les coûts en cas d'application biotechnologique (Lovley, 2006; Shukla et al., 2004)
- certains médiateurs pourraient avoir un effet inhibiteur sur la croissance des microorganismes en captant trop d'électrons nécessaires au métabolisme microbien.

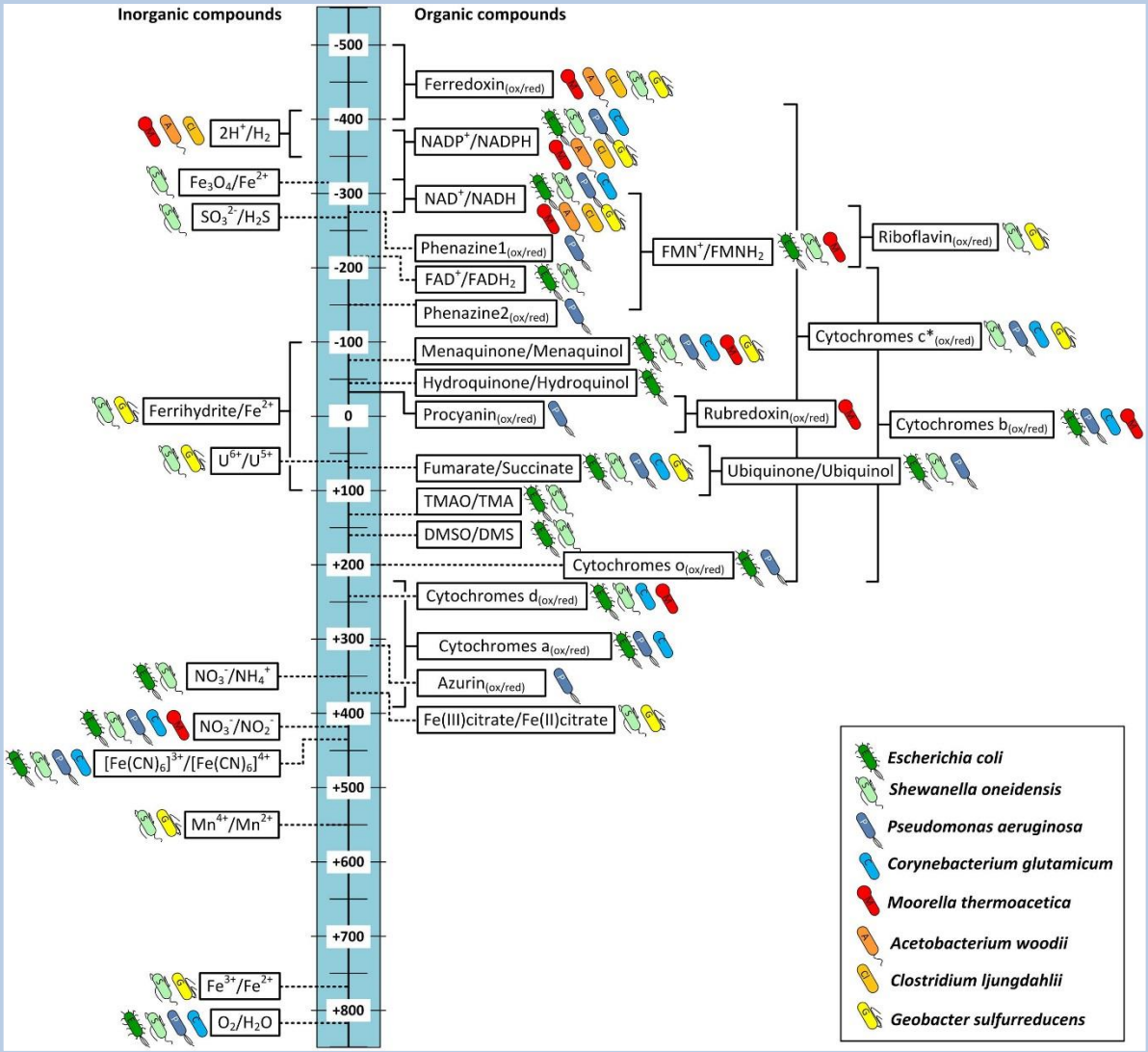


Figure II-8 : Potentiel d'oxydoréduction dans les chaînes de transferts d'électrons catalysées par différentes bactéries et potentiel des médiateurs électroniques endogènes ou artificiels et complexes enzymatiques impliqués dans les transferts d'électrons extracellulaires (d'après Kracke et al., 2015)

3.2. Transfert d'électrons via des connections à distance

En 2005, un autre type de mécanisme de transfert d'électrons extracellulaire a été découvert. Ce mécanisme permet le transfert d'électrons à l'échelle du micromètre grâce à la mise en place de deux types de connections à distance : (i) par la formation de nanofilaments conducteurs ; (ii) par la formation de nanopodes conducteurs. L'utilisation de nanofilaments conducteurs a été étudiée chez *Geobacter sulfurreducens* alors que l'utilisation de nanopode, fût étudiée chez *Shewanella oneidensis*. Longtemps considérés comme des analogues dans leurs fonctionnement, il a été montré que ces deux types de « connections » utilisaient des mécanismes totalement différents.

3.2.1. Transfert via les nanofilaments composés de pili conducteurs

Chez *G. sulfurreducens*, la découverte et l'étude de nanofilaments permettant le transfert d'électrons (Figure II-9) a commencé en 2002 par la délétion du gène codant pour la

protéine PilA (monomère du pilus de type IV), inhibant la réduction des oxydes de Fe(III) (Mehta et al., 2002). En 2005, l'observation microscopique montre l'association d'oxydes de Fe(III) de l'ordre du nanomètre avec ces pili de type IV dont le diamètre moyen est de 3-5 nm et une longueur d'environ 10-20 µm. Cette étude montre également que ces pili sont électriquement conducteurs à travers leur diamètre. Il fût alors suggéré que le transport des électrons pouvait se faire par une voie indépendante de contacts membranaires directs par des cytochromes (Reguera et al., 2005). Outre l'aspect conducteur, les pili de type IV sont connus pour avoir de multiples fonctions, comme l'adhésion, la mobilité pour la collecte de ressources et même la reproduction (Lovley, 2012b). L'utilisation de ces pili de type IV permet le développement de biofilms épais conducteurs par transfert des électrons de cellules en cellules par un réseau dense de nanofilaments. Ce transfert d'électrons a été estimé comme pouvant parcourir des distances de plus de 50 µm (Lovley, 2011a). C'est en 2010 que le mécanisme de transfert des électrons au travers de ces pili de type IV commence à être appréhendé avec l'observation du cytochrome c multi-héminique OmcS spécifiquement localisé à la base du pilius conducteur (Leang et al., 2010).

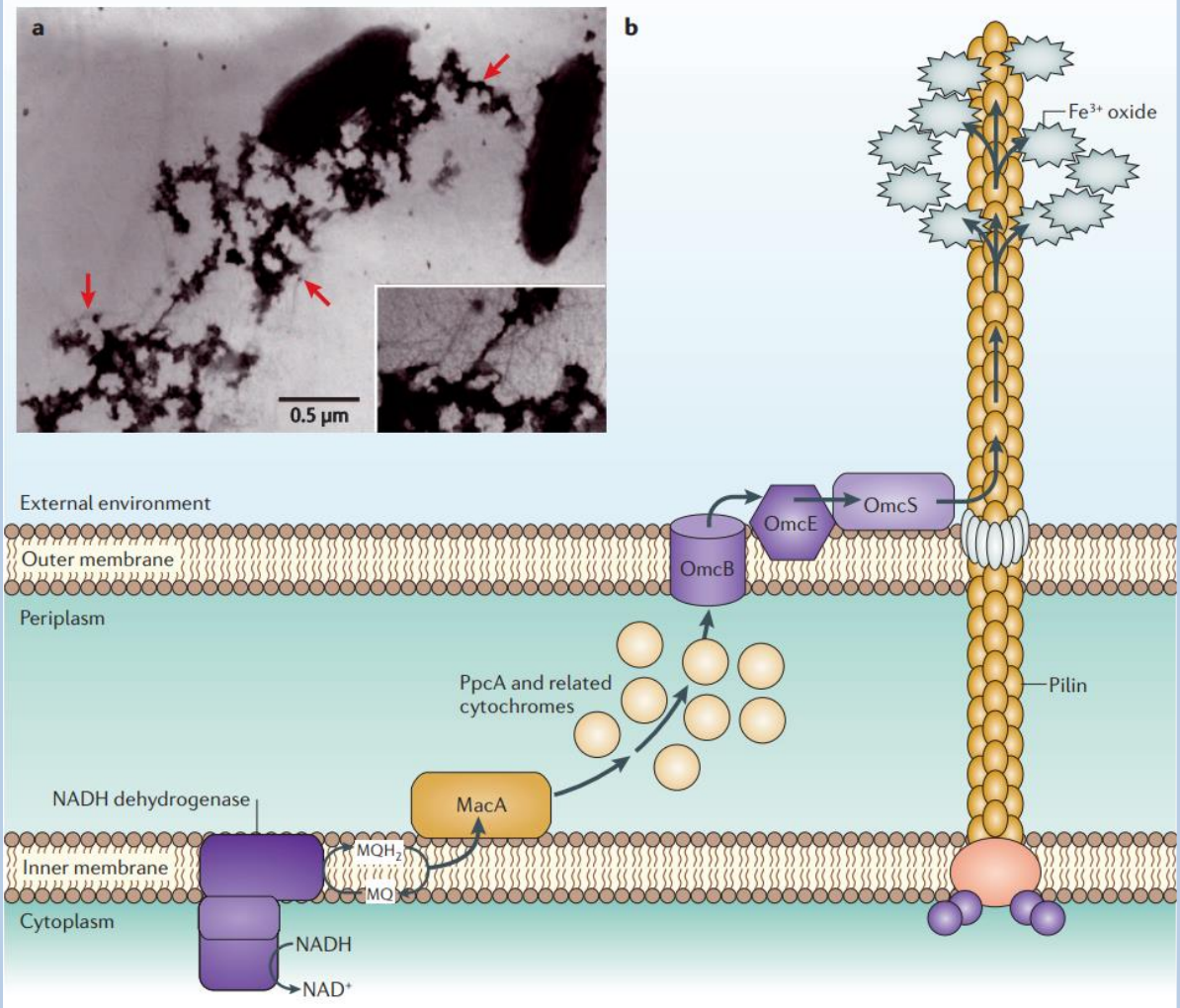


Figure II-9 : A) Micrographe à transmission électronique de l'association d'oxyde de fer (III) avec les pili de Geobacter sulfurreducens. B) Mécanisme de transfert d'électron extracellulaire à distance de Geobacter sulfurreducens. (d'après Lovley, 2006)

Différentes hypothèses voient le jour sur le mécanisme de conductivité éléctrique supposé de ces pili, principalement basées sur des sauts d'électrons de cytochrome en cytochrome le long du pilus. Cependant, différentes études vont réfuter cette hypothèse. En effet, l'observation microscopique par AFM (Microscopie par Force Atomique) et l'étude structurale des OmcS montrent que les cytochromes sont trop espacés pour permettre des « sauts » d'électrons (Liu et al., 2014; Malvankar et al., 2012a; Vargas et al., 2013). De plus, une autre étude montre que la dénaturation des cytochromes associés au pili n'a pas d'impact sur la conductivité du pili et la réponse de la conductivité aux variations de température ou de pH n'est pas cohérente avec un mécanisme de « saut » électronique mais plutôt semblable à la réponse d'une conductivité de type métallique (~6 $\mu S.cm^{-1}$) (Malvankar et al., 2011; Vargas et al., 2013). Des études en EFM (Microscopie par force électrostatique) montrent que les charges se propagent de la même manière dans un pili que dans un nano-tube de carbone. Dans le cas du carbone, l'hybridation sp2 des atomes de carbone résulte en un chevauchement orbital de type π-π. (Malvankar et al., 2014). Cette structure est retrouvée par diffraction de rayons X sur le pili de type IV de *G. sulfurreducens* au niveau de la position des acides aminés aromatiques positionnés en chevauchement π-π (Figure II-10a) (Malvankar et al., 2011; Vargas et al., 2013). Ce constat est renforcé par une comparaison des séquences du gène de PilA de *Pseudomonas aeruginosa* et *G. sulfurreducens* qui sont hautement conservés en N-terminal, mais diffèrent totalement en C-terminal (Liu et al., 2014). Or, il a été démontré que le pili de *P. aeruginosa* n'est pas conducteur (Reguera et al., 2005), même lorsqu'il est exprimé chez *G. sulfurreducens* (Liu et al., 2014). Dans le même sens, Le remplacement de 5 acides aminés aromatiques en C-terminal par de l'Alanine chez *G. sulfurreducens* a permis la production de pili associé à son cytochrome OmcS proprement localisé, mais ceci a diminué d'un facteur 10 la conductivité du pili (Vargas et al., 2013). Cette souche mutante perd également les phénotypes liés aux transferts d'électrons à distance comme la capacité de réduire les oxydes Fe(III) ou de former des biofilms conducteurs capables de générer des densités de courant élevées dans des piles à combustible microbiennes (Vargas et al., 2013). De plus, la configuration en π-π des acides aminés n'est pas retrouvée par diffraction des rayons X (Malvankar et al., 2014). Une étude récente fait la revue des différents mécanismes de transferts d'électrons connus évoquant d'autres possibilités pour le mécanisme de conductivité des pili de *G. sulfurreducens* (Creasey et al., 2018).

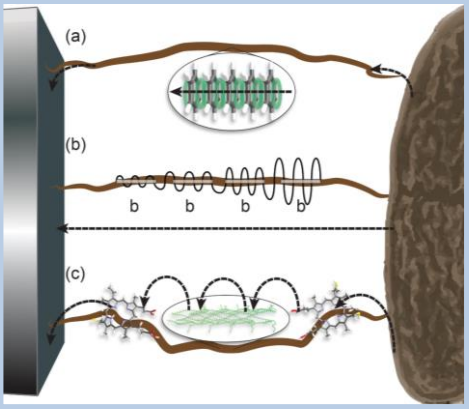


Figure II-10 : Vue schématique de 3 mécanismes simplifiés de transport d'électrons à travers un nanofilament ; (a) transfert par délocalisation éléctronique à travers des résidus aromatiques. (b) tunnel cohérent à travers les états de pont [étiquetés 'b'] ou superéchange (c) sauts incohérents à travers des groupements rédox actifs reliés ou des groupes d'acides aminés actifs rédox inhérents (d'après Creasey et al., 2018)

3.2.2. Transfert via les nano-podes composés d'extension de la membrane externe

Tout comme *G. sulfurreducens*, *Shewanella oneidensis* présente également la capacité de transférer des électrons par contact à distance. Cette capacité fût pour la première fois décrite en 2006, en observant des « nanofilaments » conducteurs plus épais (diamètre de 50 à 150 nm) que ceux observés chez *G. sulfurreducens* (diamètre de 3 à 5 µm) (Gorby et al., 2006). Il est tout d'abord suggéré que ces « nanofilaments » sont des faisceaux de pili conducteurs. Cependant, contrairement aux pili de *Geobacter*, la conductivité des « nano-filaments » de *Shewanella* est corrélée avec la capacité à produire des protéines redox extra-membranaires de type cytochrome C (El-Naggar et al., 2010), suggérant un mécanisme de saut redox en plusieurs étapes pour le transfert extracellulaire d'électrons (Pirbadian and El-Naggar, 2012; Polizzi et al., 2012).

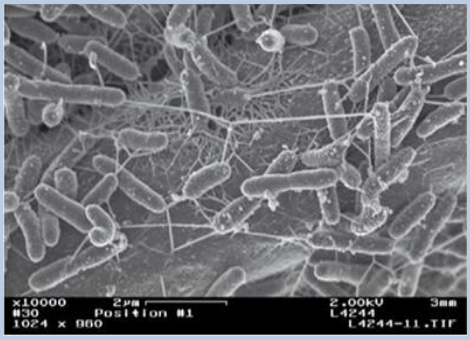


Figure II-11 : Observation par microscopie électronique à balayage de S. oneidensis MR-1 montrant les nano-podes qui connectent des cellules bactériennes entre elles (d'après Gorby et al., 2006)

Finalement, l'étude de Pirbadian et al. (2014) a montré que le filament conducteur observé chez *S. oneidensis*, était en fait une extension de la membrane externe de la cellule riche en cytochromes. La microscopie par fluorescence des cellules vivantes en temps réel à révélé la croissance d'une extension de cette membrane externe avec des protubérances parfois plus longues que la cellule elle-même (jusqu'à 9µm) (Figure II-12). Une fois déshydratée, la taille de cette protubérance diminue d'un facteur 10, lui donnant l'apparence d'un pili (10nm de diamètre). Cette déshydratation collapse le matériel cellulaire, formant un agrégat protéique permettant alors aux cytochromes d'être assez proches (1-2 nm de distance) pour permettre le « saut » d'électrons de cytochrome à cytochrome (Figure II-10c) (Lovley and Malvankar, 2015). Ce transfert d'électron pourrait également être possible dans le cas d'une membrane hydratée mais n'a pas encore été prouvé. Toutefois, dans le cas d'une membrane protéique hydratée les protéines ne pourraient pas être assez proches sans une augmentation importante de leur concentration dans la membrane, phénomène encore jamais observé chez des microorganismes Gram négatif (Malvankar et al., 2011, 2012b). Des méthodes de mesure de la conductivité ou de microscopie AFM sur des cellules hydratées pourraient élucider cette question.

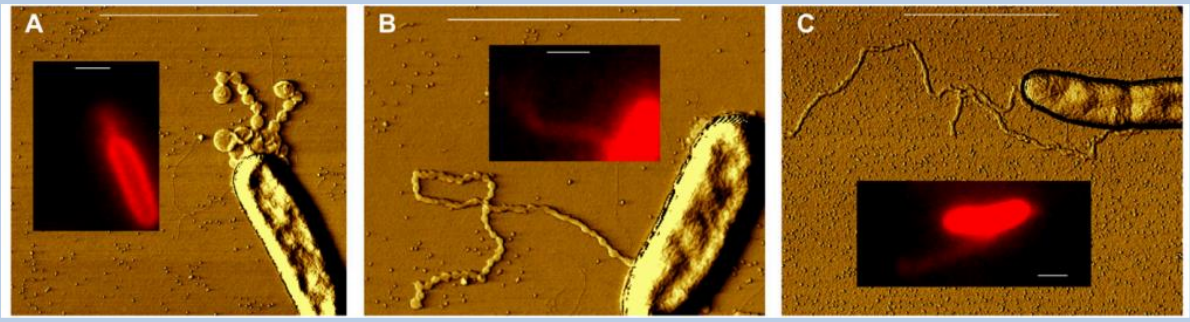


Figure II-12 : Observation des nano-podes de Shewanella oneidensis en microscopie par force atomique (AFM) (Barre d'échelle : 2 µm) et microscopie à fluorescence de cellule vivante (Barre d'échelle : 1 µm). (d'après Pirbadian et al., 2014).

Dans leur mini-revue de 2015, Lovley et Malvankar insistent sur la différence de mécanisme entre *G. sulfurreducens* et *S. oneidensis*. Ils proposent ainsi d'utiliser une désignation différente pour les deux mécanismes, en gardant le terme de nanofilaments (nanowires) ou e-pili pour des pili qui présentent une conductivité sur leur longueur dans des conditions physiologiques et le terme de nanopodes microbiens pour *S. oneidensis*, dont le mécanisme de transfert d'électrons serait plutôt orienté vers des sauts d'électrons entre cytochromes répartis sur des excroissances de la membrane externe (Lovley and Malvankar, 2015).

3.3. Transfert d'électrons par contact direct

Les transferts d'électrons extracellulaires par contact direct, limités à l'échelle du nanomètre, font appel à des complexes enzymatiques présents au sein des parois microbiennes. Parmi ces complexes enzymatiques on retrouve principalement des cytochromes contenants des groupements héminiques constitués d'un noyau porphyrine enfermant un atome de fer ou de cuivre. C'est cet atome (Fe ou Cu) qui confère ses propriétés oxydoréductrices à l'enzyme, en changeant de valence après avoir capté ou relargué un ou plusieurs électrons. Certains de ces cytochromes sont des éléments intermédiaires de la chaîne respiratoire microbienne. Il en existe plusieurs classes (a, b, c, d, f) suivant la structure du groupe héminique, leur sensibilité aux inhibiteurs et leur potentiel d'oxydo-réduction. D'autres mécanismes sont proposés dans la littérature mais restent hypothétiques et ne seront donc pas abordés dans ce manuscrit.

3.3.1. Mécanisme de transfert d'électrons extracellulaire de Geobacter sulfurreducens

Chez *Geobacter sulfurreducens*, il a été supposé que ce sont les cytochromes de type c : OmcB, OmcS, OmcE et OmcZ qui assurent le transfert d'électrons depuis le pool de menaquinones (MQ) cellulaires vers une électrode (anode) ou des oxydes de fer. Chacun de ces cytochromes possède une gamme de potentiel d'oxydo-réduction propre, se chevauchant ce qui leur permet d'intéragir à différents stades de la chaîne respiratoire (Figure II-8). Plus de 110 gènes codant pour des cytochromes c putatifs ont été identifiés dans son génome, dont 73 contenant deux hémes ou plus. La Figure II-13A montre un modèle simplifié du mécanisme de transfert d'électrons extracellulaire chez *Geobacter sulfurreducens*. La première étape de

ce mécanisme est effectuée par un cytochrome c peroxidase dihéminique (MacA pour « metal-reduction-associated cytochrome »), qui transmet les électrons de la membrane interne vers le cytochrome c triheminique périplasmique (PpcA) présent dans le périplasme. Ce dernier transmet les électrons aux cytochromes de la membrane externe (OMCs), regroupant OmcB, OmcC, OmcS et OmcZ, qui transmettent les électrons à l'accepteur d'électron extracellulaire (particule métallique ou électrode) (Kracke et al., 2015). Le fonctionnement des OMCs n'est pas encore complétement compris et différents OMCs semblent intervenir en fonction de la nature de l'accepteur final d'électron (Levar et al., 2012). Par exemple, le cytochrome octohéminique OmcZ est plus abondant dans des biofilms cultivés sur électrode et une délétion du gène associé conduit à une diminution de 90% du courant produit alors qu'aucun effet n'est observé sur la réduction de particules métalliques (Nevin et al., 2009; Richter et al., 2009). A l'opposé, les cytochromes OmcB et OmcS sont essentiels à la réduction de particules d'oxyde de fer (III) et leur délétion n'a que peu d'effet sur la production de courant sur électrode (Kim et al., 2008; Richter et al., 2012).

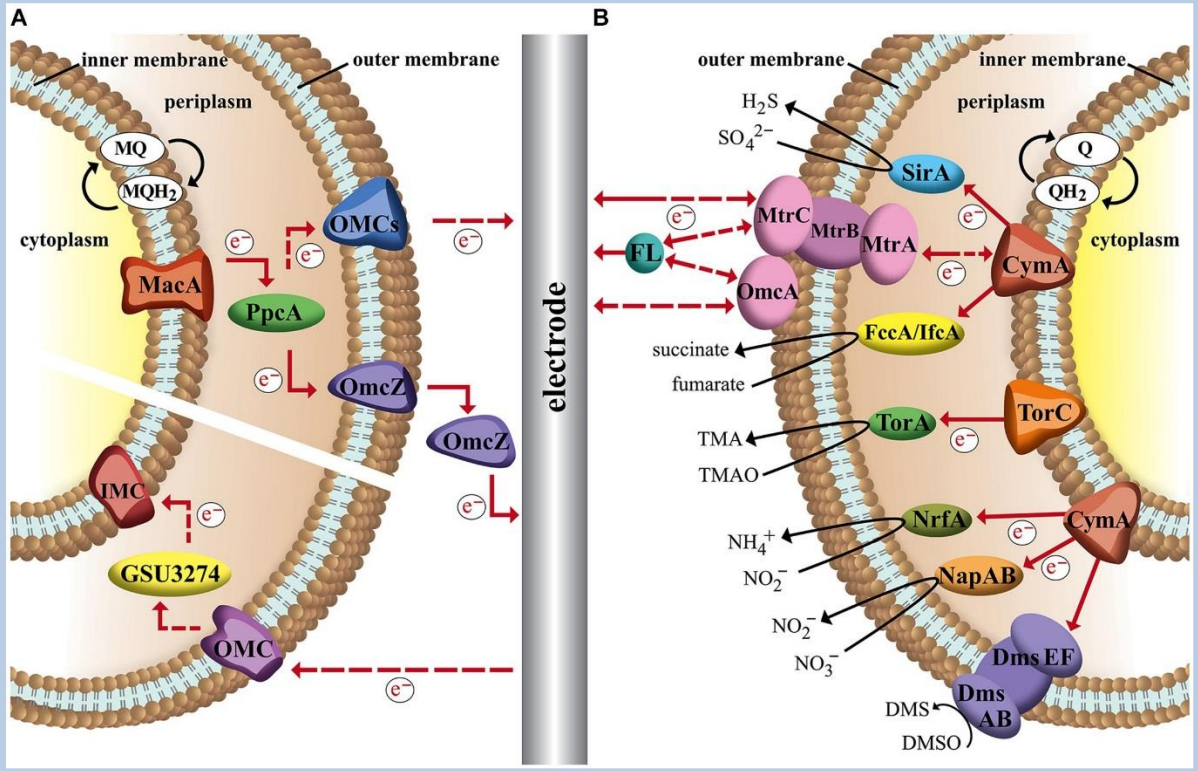


Figure II-13 : Schéma du mécanisme de transfert électronique par contact direct chez (A) Geobacter sulfurreducens et (B) Shewanella oneidensis. Les flêches pointillées indiquent des flux d'électrons hypothétiques. OMC : Outer membrane cytochrome, MQ : Menaquinones, Q : Quinone, FL : Flavine, TMAO : trimethylamine N-oxyde, TMA : trimethoxyamphetamine (d'après Kracke et al., 2015)

3.3.2. *Mécanisme de transfert d'électrons extracellulaire de Shewanella oneidensis*

Chez *Shewanella oneidensis*, on retrouve le rôle important des cytochromes c, avec 42 cytochromes putatifs retrouvés dans son génome, dont 80% sont exportés au sein de la membrane externe (Heidelberg et al., 2002; Lower et al., 2005). Cependant, les voies de transferts d'électrons sont sensiblement différentes (Figure II-13B). En effet, celles-ci commencent par l'oxydation de quinols, permettant la réduction des cytochromes

tétrahéminiques TorC ou CymA. Dans le cas de la voie TorC, les électrons sont transférés à une réductase périplasmique TorA, qui permet la réduction d'un composé soluble exogène à la cellule, le trimethylamine N-oxyde (TMAO) en trimethoxyamphetamine (TMA). Dans le cas de la voie CymA, différents partenaires redox du périplasme peuvent être réduits, permettant par la suite la réduction de composés solubles, tel que le sulfite, le nitrite, le nitrate ou le fumarate (Kracke et al., 2015). Seule la voie CymA permet le transfert d'électrons à un accepteur insoluble. Dans celle-ci les électrons transitent par le complexe MtrCAB, composé d'une molécule porine MtrB qui stabilise le complexe et permet le transfert entre les deux cytochromes decahéminiques MtrA et MtrC. MtrC transfert ensuite les électrons soit directement à l'accepteur d'électron insoluble, soit via la réduction de flavine faisant médiateur avec l'électrode (Coursolle and Gralnick, 2010).

3.4. Mécanismes de transfert d'électrons à la cathode

Contrairement aux bactéries électrogènes, l'étude sur les mécanismes inverses, c'est-à-dire électrotrophe (transfert d'électrons d'un support conducteur vers un microorganisme) est encore très peu étudié. Les premiers travaux scientifiques sur des microorganismes électrotrophes (cathode potentialisée à -0.3 V ESH) réduisant les nitrates en nitrites, ont été réalisés en 2004 (Gregory et al., 2004). Cependant, les voies exactes de transferts d'électrons à partir de la cathode sont toujours inconnues à l'heure actuelle. De nombreux mécanismes potentiels ont été proposés (Huang et al., 2011b; Lovley, 2011b; Rabaey and Rozendal, 2010; Rosenbaum et al., 2011) et sont supposés similaires aux procédés présents chez les microorganismes électrogènes, mais opérant à des potentiels redox différents (Rosenbaum et al., 2011). Rabaey et Rozendal (2010) proposent quelques voies potentielles sur l'électrotrophie comme illustré dans la Figure II-14 :

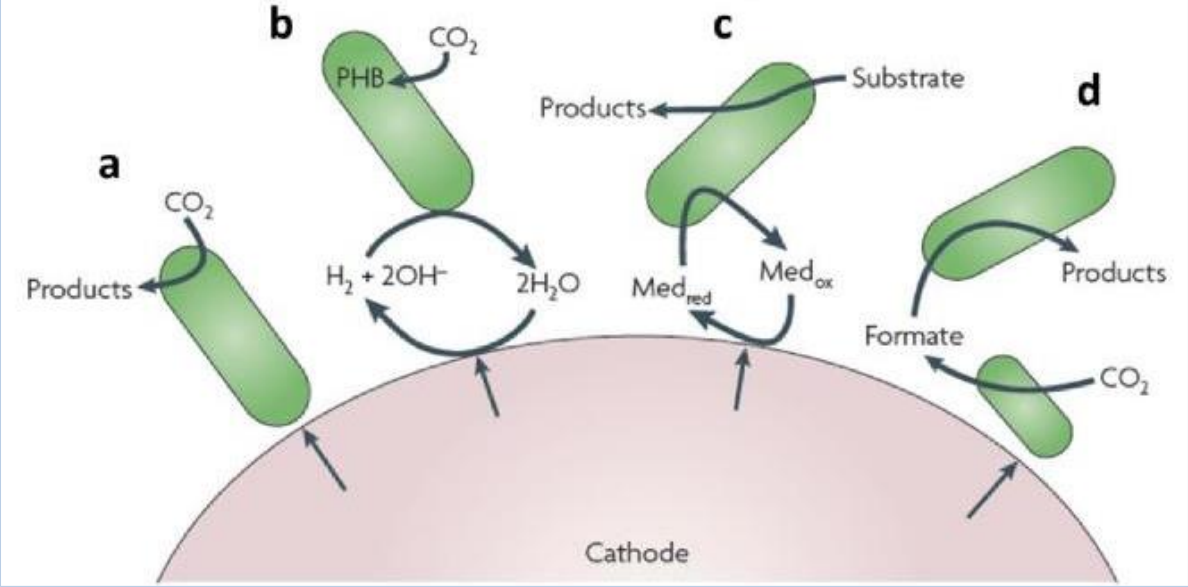


Figure II-14 : Mécanismes proposés par Rabaey et Rozendal, (2010), pour le transfert électronique depuis les électrodes vers les microorganismes: a)Le transfert d'électrons direct; b) Le transfert d'électrons via la médiation de l'hydrogène; c) Le transfert d'électrons via un médiateur oxydé et réduit ; d) via la formation de blocks de constructions intermédiaires comme le formate.

Le premier mécanisme proposé reprend le principe de transferts directs d'électrons observé chez les microorganismes électrogènes. D'un point de vue biotechnologique, ce mécanisme est le plus prometteur car il diminue les intermédiaires et simplifie la récupération des produits synthétisés à partir de CO_2 (Figure II-14a). Un transfert indirect utilisant un médiateur servant de navette électrochimique entre l'électrode et la cellule a également été proposé (Figure II-14b). Ce médiateur pourrait être exogène ou endogène, mais également être produit par électrolyse de l'eau, comme l'hydrogène (Figure II-14c). Dans ce derniers cas de figure, n'importe quel microorganisme hydrogènotrophe pourrait être utilisé comme catalyseur de biocathode. Cependant, ces transferts indirects présentent quelques limites pour des applications pratiques comme évoqué par Thrash and Coates (2008). Finalement, plusieurs espèces microbiennes pourraient travailler en synergie pour transférer les électrons vers les produits finaux via des intermédiaires métaboliques ou par transfert d'électrons directe inter-espèce (Figure II-14d). Des études plus approfondies ont besoin de confirmer ces mécanismes de transferts électroniques et interactions microbiennes.

De plus, dans l'état de l'art actuel, la capacité de microorganismes cathodiques pour conserver l'énergie et être auto-suffisant avec l'électrode comme seule source d'électrons et le dioxyde de carbone comme seule source de carbone n'a pas été reportée à ce jour (Jourdin, 2015).

3.5. Mutualisme électronique

L'électroactivité n'est pas cantonnée au transfert d'électrons de microorganismes vers ou à partir d'un accepteur/donneur d'électrons inorganique insoluble exogène. En effet, il a été observé des transferts d'électrons entre microorganismes de différentes espèces ou entre différentes cellules d'une même espèce électroactive. Ces transferts électroniques entre espèces ont été définis comme des transferts d'électrons directs inter-espèces (Direct interspecies electron transfert, DIET). Cependant, depuis sa découverte en 2010, peu d'études ont été réalisées sur le sujet (Summers et al., 2010). Différentes hypothèses sur les mécanismes de DIET ont été proposées par D. Lovley (2017), hypothèses présentées Figure II-16. On y retrouve les transferts à travers les e-pili (Figure II-16a), par les systèmes enzymatiques membranaires externes (Figure II-16c) mais également via l'utilisation de particules électriquement conductrices (Figure II-16b).

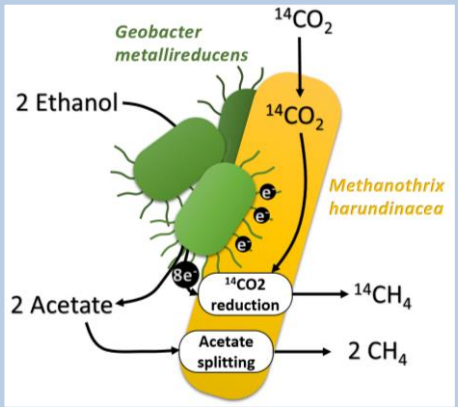


Figure II-15 : Transfert d'électrons direct inter-espèce entre Geobacter metallireducens et Methanothrix harundinacea (modifié d'après Rotaru et al., 2014b)

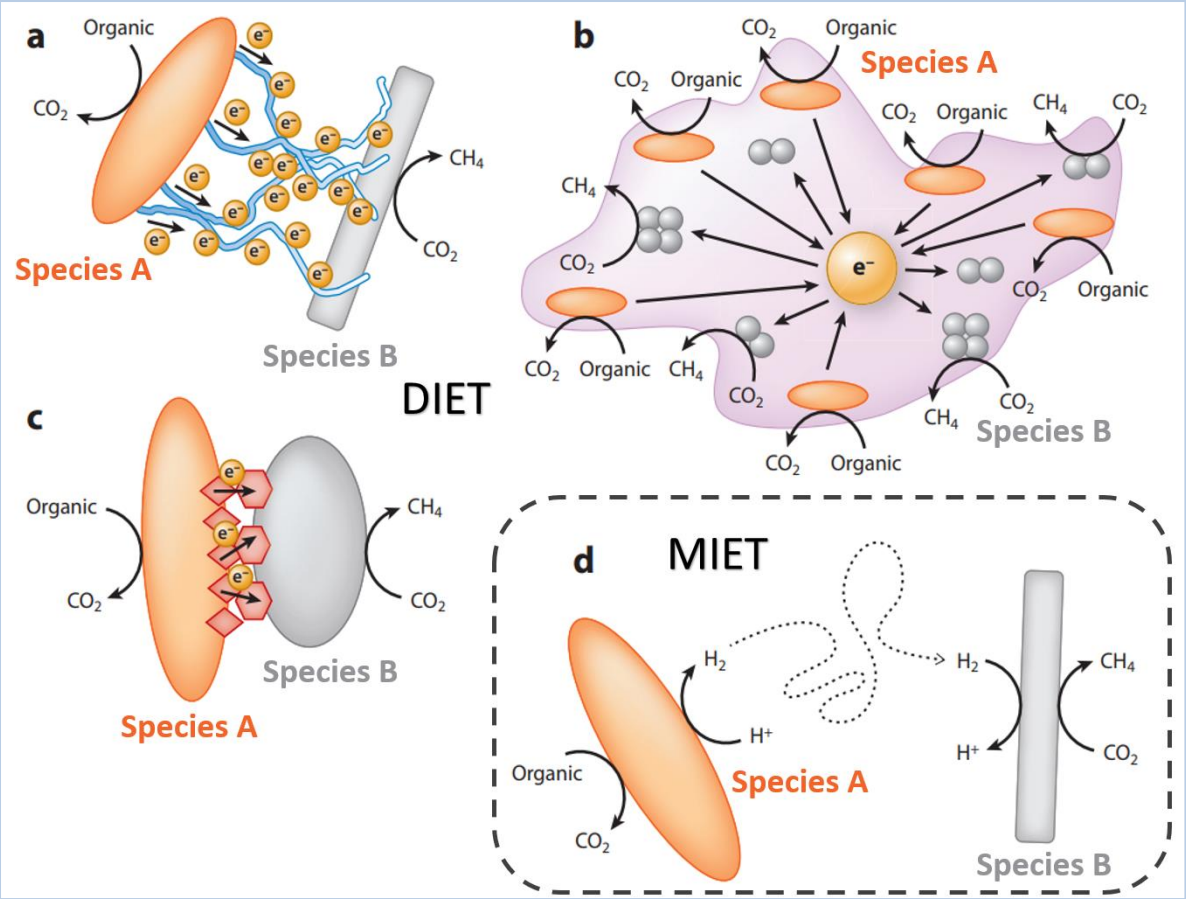


Figure II-16 : Mécanismes de transferts d'électrons directs inter-espèces (DIET) incluant (a) le transfert d'électrons via des pili électriquement conducteurs (bleu), (b) le transfert d'électrons via un matériaux électriquement conducteur (violet), et (c) le transfert d'électrons entre des transporteurs d'électrons protéiques (rouge) associé à la surface membranaire externe. (d) Les transferts d'électrons inter-espèces médiés (MIET) quant à eux utilisent des médiateurs électroniques solubles comme l'H_2. (d'après Lovley, 2017)

La majorité des études sur les DIET s'est focalisées sur les intéractions entre une Geobacter sp. et des méthanogènes (Methanosarcina et Methanothrix …) (Rotaru et al., 2014a, 2014b, Figure II-15) ou au sein d'une culture de la bactérie photosynthétique *Prosthecochloris aestaurii* (Ha et al., 2017). Ces DIET ont été, pour la plupart, médiés par des pili conducteurs et ont été initialement démontrés dans des co-cultures de *Geobacter metallireducens* et *G. sulfurreducens*, qui se sont adaptés pour échanger des électrons dans le but de promouvoir leur métabolisme et croissance mutuels (Summers et al., 2010). En effet, seul G. *metallireducens* pouvait utiliser l'éthanol du milieu comme donneur d'électrons mais n'avait pas d'accepteur d'électrons métabolisable et seul *G. sulfurreducens* avait la capacité d'utiliser le fumarate comme accepteur final d'électrons mais n'était pas capable d'utiliser l'éthanol comme donneur d'électron. La co-culture a pu se développer en couplant les métabolismes des deux espèces via un transfert d'électrons direct entre les deux espèces. Les deux espèces se sont développées sous forme d'agrégats (1-2 mm de diamètre) ayant une conductivité similaire au métal et similaire aux biofilm de *G. sulfurreducens* (Malvankar et al., 2011; Summers et al., 2010). Une étude sur l'oxydation anaerobie du méthane en thermophilie a montré un DIET entre une archée méthanotrophe (ANME) et une bactérie sulfato-réductrice

(SRB) via des nanofilaments (Wegener et al., 2015). Dans des études de coculture entre une espèce de *Geobacter* et des méthanogènes, *Geobacter* sp. dégradait de la matière organique (éthanol) pour produire des électrons qui ont été directement transférés à *Methanothrix sp.*, incapable d'utiliser le donneur d'électron organique, mais réalisant la réduction du CO_2 en méthane (Figure II-15). Des études de métatransciptomique et métagénomique d'une de ces co-cultures ont montré l'expression plus importante de gènes codant pour les e-pili et cytochromes associés chez *Geobacter* et des gènes codant pour la réduction du CO_2 chez *Methanothrix sp.* (Holmes et al., 2017).

Des substituts au pili peuvent être utilisés pour promouvoir les DIET (Figure II-16b), réduire le temps nécessaire pour les espèces d'établir des connexions électriques et permettre aux souches déficientes en pili de participer aux DIET. On retrouve le biochar, un additif pour le sol (Chen et al., 2014a), des matériaux carbonés conducteurs comme le tissu de carbone (Chen et al., 2014b), des granules activées de carbone (Liu et al., 2012). La magnétite, suggérée comme analogue au cytochrome de type C, pourrait également fonctionner comme substitut du pili pour les DIET (Kato et al., 2012, Liu et al., 2015).

Ces transferts sont à differencier des transferts d'énergie via des molécules issues du métabolisme (Figure II-16d), tels que les transferts d'hydrogène inter-espèces, n'utilisant pas de mécanisme électroatif. Ces transferts énergétiques sont appelés des transferts d'électrons inter-espèces médiés (Mediated Interspecies Electron Transfer : MIET). Ces MIET sont associés aux phénomènes de syntrophie entre différents microorganismes, comme dans le cas d'une bactérie fermentaire, productrice d'hydrogène, et une méthanogène hydrogénotrophe, consommatrice du H_2.

4. LES SYSTEMES ELECTROCHIMIQUES MICROBIENS (SEM)

4.1. Concept du Système Electrochimique Microbien

Peter Benetto du Queen Elisabeth College de Londres fut le premier en 1981, à évoquer l'architecture d'un système électrochimique microbien composé d'une cathode et d'une anode séparées par une membrane échangeuse d'ions (Bennetto et al., 1981). Par extension, les systèmes électrochimiques microbiens (SEMs) peuvent être définis comme des systèmes utilisant la capacité de certains microorganismes dit « électroactifs » à transférer des électrons vers un support inerte conducteur ou à partir de ce support conducteur vers la cellule. Cela permet soit d'utiliser ces microorganismes comme catalyseurs pour oxyder de la matière organique ou inorganique (donneurs d'électrons) et générer un courant électrique (biofilm exoélectrogène), soit de récupérer les électrons d'un courant électrique pour synthétiser des molécules d'intérêt par réduction d'un accepteur final d'électrons (ex : le CO_2) (biofilm éléctrotrophe).

Au fil du développement des SEMs, de nombreux systèmes et dénominations ont vu le jour avec tout d'abord le terme de Pile à Combustible Microbienne ou Microbial Fuel Cell (MFC) en anglais, qui représente une des applications des SEMs, puis les cellules à électrolyses microbiennes, les cellules à électrosynthèses microbiennes etc., rendant le paysage de l'électromicrobiologie confus. Nous utiliserons ici le terme de SEM pour désigner l'ensemble des systèmes électrochimiques microbiens développés au cours du temps, utilisant le principe décrit plus haut.

Quelque soit l'application, un SEM (Figure II-17) est composé de deux compartiments délimités par un séparateur ionique, contenant chacun une éléctrode, l'anode et la cathode, plongées dans un liquide chargé en ions, appellé électrolyte. Les deux électrodes sont reliées à un système électrique externe contrôlant les flux d'électrons dans le système. Suivant l'application considérée, l'une des éléctrodes, voire les deux, portent le biofilm électroactif comme catalyseur biologique de réaction d'oxydation à l'anode ou de réduction à la cathode. L'électrode sans biofilm électroactif est souvent recouverte d'un catalyseur chimique, comme le platine, permettant de réaliser la réaction d'oxydo-réduction chimique complémentaire (oxydation du H_2 à l'anode ou réduction de l'O_2 à la cathode par exemple). Dans tous les cas, un flux d'électron et d'ions est crée par le couplage de l'oxydation à l'anode et de la réduction à la cathode. Le flux d'électron traverse le circuit électrique externe tandis que le flux d'ions transite à travers l'électrolyte et le séparateur ionique, de l'anode vers la cathode. Le circuit externe peut être composé d'un collecteur d'électricité, comme une résistance ou un appareil électrique, permettant de récupérer l'énergie produite par des réactions d'oxydo-réduction spontannées (voir Chapitre I - 4.3.1 Les Piles à Combustible Microbiennes (MFC)). Le circuit externe peut également servir de source d'énergie pour fixer le potentiel des électrodes et favoriser des réactions d'oxydoréduction non spontannées (voir Chapitre I - 4.3.2 Les Cellules à Electrosynthèses Microbiennes (MSC) et l'électrofermentation). La combinaison de toutes ces variantes permet une gamme d'application biotechnologique en plein essor. Dans tous les cas, les réactions d'oxydo-réduction aux électrodes ne sont possibles que si elles respectent les lois de la thermodynamique.

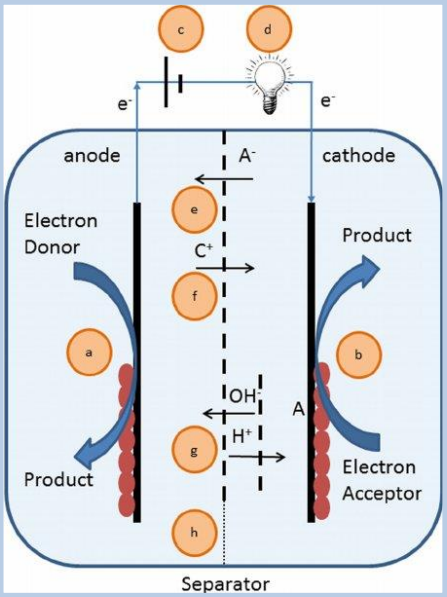


Figure II-17 : Représentation schématique d'un système électrochimique microbien. Ce système est composé de deux électrodes [a) une anode et b) une cathode] recouverts d'un catalyseur chimique ou biologique, d'un circuit électrique externe [servant de c) source d'énergie ou d) de collecteur d'électricité] et d'un séparateur ionique [membrane e) anionique, f) cationique, g) bipolaire ou h) sans séparateur].

4.2. Notion d'électrochimie

Un SEM ne peut fonctionner que si la reaction chimique globale est thermodynamiquement favorable en fonction des potentiels des deux électrodes, anode et cathode. En effet, suivant la valeur de l'enthalpie libre de la réaction globale (ΔG_r) de l'oxydation à l'anode et de la réduction à la cathode, une source d'énergie externe supplémentaire peut parfois être nécessaire ($\Delta G_r > 0$) pour réaliser la réaction ou de l'énergie peut être collectée du système ($\Delta G_r < 0$) (Dopson et al., 2015). Cette enthalpie libre est calculée comme pour celle des métabolismes microbiens (voir 3.2.1.1, Équation 5) entre le donneur et l'accepteur d'électrons. Par analogie, les électrodes (avec ou sans catalyseur) représentes les premières et dernières enzymes redox du métabolisme, et le système électrique externe (par exemple une résistance) correspond aux chaines d'oxydo-réduction permettant la collecte d'énergie. De la même manière un transport d'ions se forme parrallélement au transport d'électrons, ici entre l'anode et la cathode à travers l'électrolyte.

Équation 8 : Expression de la différence de potentiel d'un SEM en fonction de l'enthalpie libre de la réaction globale

$$\Delta E = -\frac{\Delta G_r}{nF}$$

ΔE : Différence de potentiel du SEM (V)
ΔG_r : enthalpie libre globale (kJ.mol^{-1})
n : nombre d'électrons
F : constante de Faraday (96 485 C.mol−1)

Équation 7 : Différence de potentiel d'un SEM en fonction des potentiels des électrodes

$$\Delta E = E_{cathode} - E_{anode}$$

ΔE : Différence de potentiel du SEM (V)
$E_{cathode}$: potentiel de la cathode (V)
E_{anode} : potentiel de l'anode (V)

Équation 6 : La Loi d'Ohm

$$U = RI$$

U ou ΔE : Différence de potentiel du SEM (V)
R : résistance du système (Ω)
I : intensité de courant (A)

Dans les SEM, il est plus pratique d'exprimer l'enthalpie libre de la réaction globale (en kJ.mol^{-1}) comme la différence de potentiel entre les réactions d'oxydation (anode) et de réduction (cathode), noté ΔE (en Volts), et relié au ΔG_r par l'Équation 8. Cette différence de potentiel peut également être obtenue par la différence entre le potentiel de l'anode et celui de la cathode (voir Équation 7), tous deux mesurés par rapport à une référence commune (Sleutels et al., 2012). La référence utilisée en électrochimie est la réaction de l'hydrogène à pH0 en condition standard via des Electrodes Standard à Hydrogène (ESH). Une électrode standard à hydrogène étant peu pratique, on utlise plus communément des électrodes basées sur le couple de l'Argent et du Chlorure d'argent (électrode Ag/AgCl), ou le couple du mercure et chlorure de mercure (électrode au calomel).

Tout comme en électronique, la différence de potentiel (ou tension) entre deux électrodes est fonction de l'intensité du courant électrique, I (mA) et de la résistance du système R (Ohms). Cette relation est régie par la loi d'Ohm suivant l'Équation 6. Cette relation peut être imagée comme un barrage. La différence de niveau d'eau entre le haut et le bas du barrage représente la différence de potentiel. La résistance correspond au degré d'ouverture des évacuations d'eau alors que l'intensité de courant correspond au débit d'eau à travers les évacuations. Ainsi, si l'ouverture d'évacuation est grande, la résistance sera faible et le débit d'eau sera plus important. Ceci entraine les niveaux d'eau de part et d'autre du barrage plus

rapidement à l'équilibre. En pratique, la différence de niveau d'eau (et donc la différence de potentielle des électrodes) reste constante lorsque l'apport d'eau en amont et l'évacuation en aval sont suffisants. Il en va de même dans les SEM lorsque l'apport d'électrons par les réactions d'oxydation à l'anode est équivalent à l'évacuation d'électrons par les réactions de réduction à la cathode. Si l'une des réactions est limitante, le potentiel de l'électrode va tendre vers l'équilibre et la différence de potentiel va diminuer.

Connaissant la tension (U) et l'intensité de courant (I) du système, il est possible de calculer la puissance P (W) d'un SEM suivant l'Équation 9. Souvent les valeurs d'intensité et de puissance sont exprimées par rapport à la surface de l'anode ou de la cathode en termes de densité de courant J ($A.m^{-2}$) et densité de puissance ($W.m^{-2}$).

Équation 9 : Puissance d'une pile

$$P = UI = RI^2$$

P : Puissance (W)
U : Tension du système (V)
R : résistance du système (Ω)
I : Intensité de courant (A)

Une fois ces notions de thermodynamique prises en compte, il est possible d'imaginer une large gamme d'applications potentielles au SEM, suivant le donneur et l'accepteur d'électrons utilisés et la catalyse microbienne sélectionnée à l'une ou aux deux électrodes.

4.3. Les applications des Systèmes Electrochimiques Microbiens

Suite au développement des Systèmes Electrochimiques Microbiens, de nombreuses applications ont pu être développée. Pour simplifier la nomenclature de ces systèmes Wang et Ren ont proposé des catégories de SEM suivant l'application utilisée. En effet, le principe de transfert électronique d'une cellule à une électrode, ou d'une électrode à une cellule a permis d'ouvrir le champ de l'électromicrobiologie à de nombreux domaines, regroupés sous le terme générique anglais de MXCs où X est la fonction principale du système (Wang and Ren, 2013). On y retrouve :

- La production d'électricité via l'oxydation de substrats à l'anode par un biocatalyseur (Microbial Fuel Cells, MFCs)
- L'électrolyse de l'eau en H_2 par la baisse du potentiel de la cathode d'une MFC, via une source d'énergie externe couplée à une bioanode pour diminuer l'apport énergétique nécéssaire (Microbial electroLysis Cells, MLCs[1])
- La synthèse de composés organiques d'intérêt par des biocatalyseurs cathodiques (Microbial electroSynthesis Cells, MSCs)
- L'élimination de contaminants par un biofilm électroactif (Microbial Remediation Cells, MRCs)
- La désalinisation d'eau de mer par le gradient ionique créé par une bioanode (Microbial Desalination Cells, MDCs)

4.3.1. Les Piles à Combustible Microbiennes (MFC)

Les MFC utilisent la capacité des microorganismes exoélectrogéniques à produire un courant électrique en transférant les électrons de l'oxydation de matière organique vers une

[1] Initiallement abbrévié en MEC dans l'article de reference, ici abbrévié en MLC pour plus de cohérence et pour éviter la confusion avec le terme générique Microbial Electrochemical Cells

anode comme accepteur d'électrons. Les électrons vont ensuite migrer vers la cathode recouverte d'un catalyseur chimique, comme le platine, pour réduire une molécule oxydée, telle que l'oxygène. Une résistance ou un appareil électrique est placé entre les deux électrodes pour récupérer l'énergie électrique créée. La résistance utilisée doit être optimisée pour maximiser le courant en fonction du voltage de la pile (différence de potentiel entre les deux électrodes) et ainsi maximiser la puissance produite (Équation 9). De nombreuses études ont été réalisées pour augmenter les densités de puissance produite en jouant sur : (i) la composition du biofilm électroactif à l'anode ; (ii) le substrat utilisé ; (iii) la composition des électrodes et des membranes ioniques séparant les deux chambres ; (iv) l'architecture des bioréacteurs utilisés ou (v) l'accepteur final d'électrons (Li and Sheng, 2012; Logan et al., 2006; Sengodon and Hays, 2012).

Les performances maximales des MFCs actuelles sont de l'ordre de 7 W/m² de surface d'électrode. Malgré quelques améliorations encore possibles, les scientifiques actuels pensent qu'il ne sera pas possible de dépasser les 10 W/m² (Dewan *et al.*, 2008) essentiellement dû à la perte de courant au cours du temps dû à l'augmentation de la résistance interne du système (augmentation du biofilm, cristallisation et précipitation des sels présents dans les milieux de culture etc.). La consommation d'électricité moyenne mondiale est de 309W par personne, représentant ainsi 30m² d'électrode par personne, soit un peu plus de la surface de Grande Bretagne d'électrode pour produire suffisament d'électricité pour la polutation mondiale. Ces faibles densités de puissance générées par les MFCs resteront un verrou majeur quant à leur développement pour la production d'électricité à grande échelle. Ainsi, jusqu'à présent l'application directe de cette technologie reste marginale.

Cependant, depuis quelques années des investigations sont menées pour le développement de MFC pour la production d'énergie dans des environnements reculés comme les zones rurales ou les profondeurs océaniques (Gong *et al.*, 2011; Guzman *et al.*, 2010; Nielsen *et al.*, 2008; Reimers *et al.*, 2006; White *et al.*, 2009). En effet, malgré leur faible potentiel pour la production d'énergie à grande échelle, ces technologies se sont montrées intéressantes pour une insertion naturelle dans des environnements humides, comme par exemple dans les sédiments ou les sols, où elles sont alimentées par les cycles biogéochimiques naturels, sans apport d'énergie solaire. Ces technologies sont de conceptions simples, robustes et abordables. De plus, ces MFCs sont plus performantes à faible température que la plupart des batteries. Par exemple, une MFC déployée au dessus de sédiments sulfurés en mer profonde à 7°C, peut produire environs 110 $mW.m^{-2}$ continuellement (Nielsen *et al.*, 2008; Reimers *et al.*, 2006). Des systèmes de MFC benthique ont également été installés au sein de sources hydrothermales produisant 250 à 500 mA/m² (Girguis and Holden, 2012). Ainsi, cette technologie peut être utilisée pour alimenter des capteurs et appareils de télécommunication embarqués, comme des modems acoustiques ou optiques, pour construire un réseau sans fil extensible de capteurs autour des sources hydrothermales et permettre un suivi des variations physicochimiques au cours du temps. Un système a déjà été mis en place avec un capteur d'oxygène et un modem acoustique dans des sédiments marins (Gong *et al.*, 2011). D'autres projets ont également vu le jour pour la production d'électricité dans des villages d'Afrique isolés, comme le projet Dirt Power de

l'entreprise Lebone, fondé en 2008 par des étudiants d'Harvard. On trouve également sur le marché des systèmes de MFC utilisant des sédiments comme « The MudWatt™ Architecture » de Keego Technologies.

4.3.2. Les Cellules à Electrosynthèses Microbiennes (MSC) et l'électrofermentation

Les MSC utilisent la capacité des microorganismes électrotrophes à se servir des électrons apportés par la cathode pour la production de molécules organiques par assimilation du CO_2. Cependant, les réactions mises en jeu ne sont thermodynamiquement pas favorables et nécessitent l'apport d'énergie via un générateur externe. L'intérêt de cette technologie a considérablement augmenté durant ces dix dernières années, notamment pour la production de biocarburants (électrofuels) et de molécules à haute valeur ajoutée. En effet, cette technologie tire son intérêt dans le stockage d'énergie de sources intermittentes, comme l'énergie solaire ou l'éolien, sous forme solide et stable (Jourdin, 2015).

On distingue deux types d'applications suivant l'origine des électrons du métabolisme. En effet, pour faire simple, si la totalité des électrons entrant dans le métabolisme, provient de l'électrode, on parle d'électrosynthèse. Si une partie des électrons provient en parallèle de molécules organiques, on parle d'électro-fermentation (Moscoviz et al., 2016). Dans ce derniers cas, l'électrode sert de force électro-motrice pour diriger le métabolisme vers une voie fermentative particulière ou pour améliorer les rendements de fermentation classique. Les produits de fermentation doivent donc avoir une valeur ajoutée suffisament élevée pour compenser l'apport énergétique nécessaire pour orienter la réaction.

L'électrosynthèse de molécules organiques est encore à ses débuts, comme le montre le nombre de publications assez restreint sur le sujet (voir Figure II-1). Cette technologie a pour avantage d'être indépendante de matière organique et des contraintes liées (compétition économique avec d'autres secteurs, ressources en eau etc.), de fixer le CO_2 atmosphérique responsable du déréglement climatique global, et d'avoir une accessibilité illimitée en substrat (CO_2, vent, soleil etc.) (Jourdin, 2015). Ainsi depuis quelque années des travaux ont été réalisés pour la production d'hydrogène (Liu et al., 2016; Logan et al., 2008; Wagner et al., 2009), de méthane (Beese-Vasbender et al., 2015; Cheng et al., 2009; Wagner et al., 2009), de peroxyde d'hydrogène (Rozendal et al., 2009) et d'acide gras à chaines courtes ou longues (Jourdin et al., 2015; Marshall et al., 2012; Steinbusch et al., 2011; Van Eerten-Jansen et al., 2013; Xiang et al., 2017). L'électrosynthèse la plus répandue est la production d'acétate par des cultures pures acétogènes, telles que *Sporomusa* sp. ou *Clostridium* sp et par l'utilisation de consortia microbien permettant des rendements de production plus importants (Jourdin, 2015).

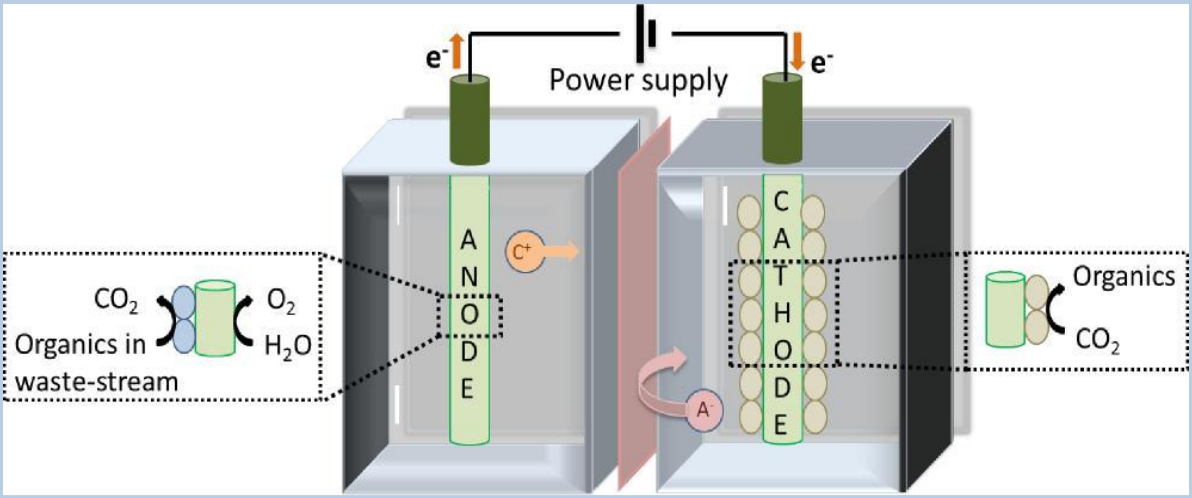


Figure II-18 : Cellule à électrosynthèse microbienne catalysant la fixation du CO_2 en molécule organique. La réaction anodique peut être catalysée par du platine ou par un biofilm exoélectrogénique pour diminuer l'apport énergétique nécessaire (d'après Jourdin, 2015).

4.3.3. Les Cellules à Electrolyse Microbiennes (MLC)

Les cellules à électrolyse microbienne ou MLC utilisent le même principe que les électrolyseurs chimiques transformant l'eau en H_2 et en O_2. Conventionnellement, des matériaux couteux comme le platine sont utilisés comme catalyseurs pour diminuer l'énergie d'activation nécessaire à l'électrolyse de l'eau. De plus, cette réaction n'est pas spontanée et nécessite l'ajout d'une source d'énergie externe pour permettre d'imposer une différence de potentiel suffisante, pour initier la réaction d'électrolyse. Ainsi l'utilisation de ces matériaux spécifiques et l'apport d'énergie nécessaire ont diminué la viabilité économique de ces systèmes (Jourdin, 2015). Cependant, des équipes de recherche se sont intéressées à remplacer les catalyseurs anodiques et cathodiques par des biocatalyseurs enzymatiques ou microbiens. Par exemple, l'utilisation d'enzyme, comme les hydrogénases, fixées sur la cathode permet de diminuer les coûts financiers en remplacement du platine. Cependant les biocathodes enzymatiques n'étant pas autorégénérantes, l'activité catalytique est instable et diminue avec le temps (Jourdin, 2015; Morozov et al., 2002). Ainsi l'utilisation de microorganismes entiers possédant des hydrogénases comme biocatalyseur a été développée, avec par exemple l'utilisation de *Desulfovibrio* sp. immobilisé sur la cathode, avec l'ajout de méthyl viologène comme médiateur chimique pour catalyser la production d'hydrogène (Lojou et al., 2002; Tatsumi et al., 1999). Contrairement aux MSC, le biofilm électroactif des MLC ne sert que de catalyseur enzymatique via une seule enzyme (hydrogénase ou autre) et ne permet par la croissance des microorganismes. Finalement, l'utilisation combinée d'une bioanode et d'une biocathode a été étudiée, montrant des perspectives intéressantes à cette application (Jeremiasse et al., 2010). Comme nous l'avons vu précedemment, l'utilisation d'une bioanode permet la production d'électricité via l'oxydation de matière organique dans des systèmes MFCs. Dans de nombreuses études en MLC, ce courant électrique a été directement utilisé pour contribuer à la polarisation de la cathode à un potentiel favorable pour réaliser l'électrolyse de l'eau en H_2. Cela a permis de diminuer l'apport énergétique apporté par le générateur externe et de diminuer les coûts énergétiques associés.

Afin d'optimiser la contribution de la bioanode, des études ont été réalisées sur différents consortia exoélectrogènes, à partir de différents effluents riches en matière organique, ainsi que sur l'architecture et les matériaux utilisés (Ki et al., 2016; Kuntke et al., 2012; Logan et al., 2008; Rago et al., 2015; Rozendal et al., 2006, 2007).

4.3.4. Les Piles à Assainissement Microbien (MRC)

Outre la production d'électricité, d'hydrogène ou de biomolécules, les SEM peuvent être utilisés comme des piles à Assainissement Microbien (MRC) pour assainir des effluents pollués, tels que les boues de station d'épuration, les sédiments ou les eaux usées d'industrie. En effet, certains microorganismes électroactifs ont la capacité de métaboliser des molécules considérées comme polluantes. Ces molécules peuvent être organiques, comme dans les boues de station d'épuration (Seelam et al., 2015), ou inorganique, comme l'uranium (Gregory and Lovley, 2005), l'arsenic (Li et al., 2016), les nitrites (Cai et al., 2015; Oon et al., 2016), les perchlorates (Butler et al., 2010) ou les molécules chlorées (Aulenta et al., 2010). Ainsi, suivant la nature du composé et son rôle de donneur ou accepteur d'électrons dans le métabolisme, le biofilm électroactif se trouvera à l'anode ou à la cathode du système (Jourdin, 2015).

De plus, le courant ionique généré avec la production de courant électrique peut également être utilisé pour conduire des procédés de séparation, comme la récupération d'ammoniaque (Kuntke et al., 2012) ou d'uranium (Gregory and Lovley, 2005).

4.3.5. Les Piles à Désalinisation Microbienne (MDC)

Les piles à désalinisation microbienne (MDC) couplent le principe d'une MFC à l'électrodialyse, permettant le traitement d'eau usée, la désalinisation d'eau salée et la production d'énergie renouvelable. Les procédés classiques de désalinisation par électrodialyse nécessitent un apport d'énergie pour créer une migration des ions Na^+ et Cl^- d'eau salée à travers des membranes ioniques et ainsi diminuer la salinité de l'effluent. Les MDC quant à elles utilisent le champ éléctrique produit par une bioanode pour alimenter la migration des ions à travers les membranes ioniques. Elles sont composées de trois chambres en série, incluant une chambre anodique avec une bioanode servant à la production d'électricité par le traitement d'eau usée, un compartiment d'eau salée et une chambre cathodique. Des membranes anionique et cationique séparent le compartiment d'eau salée des chambres anodique et cathodique respectivement. Dans le même principe que la MFC, la bioanode va produire un courant électrique par oxydation de la matière organique. La circulation des électrons et le flux ionique dans l'électrolyte produit par ces réactions, va conduire au déplacement des ions Cl^- et Na^+ de l'eau salée du compartiment central vers les chambres anodiques et cathodiques, diminuant progressivement la salinité de l'eau salée (Saeed et al., 2015). Cette technologie n'a été évoquée pour la première fois qu'en 2009 par un groupe de chercheurs de l'Université de Tsinghua en Chine, en collaboration avec l'Université de Penn State aux Etats-Unis (Cao et al., 2009). Depuis, quelque études ont été entreprises pour développer le concept en travaillant sur l'architecture et les matériaux dans le but d'améliorer les performances, permettant d'enlever jusqu'à 99% des sels (Chen et al., 2011; Jacobson et al., 2011; Kim and Logan, 2011; Sophia and Bhalambaal, 2015).

4.3.6. Combinaison des applications et expansion du paysage des MXC

Outre ces applications, on trouve dans la littérature de plus en plus de concepts mélant les avantages de plusieurs des applications précédement exposées, telles que les Piles à Electrodialyse inverse microbienne (MREC). Ces systèmes associent une MLC avec l'électrodialyse inverse (Reverse Electrodialysis, RE). Ceci permet de combiner la force motrice obtenue lors de l'oxydation de matière organique à l'anode et l'énergie du gradient salin pour la production d'hydrogène à la cathode. L'apport énergétique des deux forces motrices est suffisant pour atteindre le potentiel d'électrolyse de l'eau à la cathode sans source d'énergie externe supplémentaire. Ce système est constitué de la même manière qu'une MDC avec une alternance de compartiments d'eau salée et d'eau douce séparés par des membranes anioniques et cationiques. Le but ici n'étant pas la désalinisation mais l'électrolyse de l'eau par le couplage des deux forces motrices. En pratique, un effet de synergie est observé entre les deux phénomènes dont les performances sont nettement supérieure à la somme des deux systèmes séparés (Modin et al., 2011; Post et al., 2007; Rabaey et al., 2010).

4.4. Les techniques électrochimiques d'étude des biofilms électroactifs

4.4.1. Performances idéales

La performance idéale d'un SEM dépend des réactions électrochimiques qui ont lieu entre le donneur d'électrons ayant un faible potentiel et l'accepteur final d'électrons à un potentiel élevé, (Rabaey and Verstraete, 2005). Cependant, le voltage idéal du système est incertain dû au fait que les électrons sont transférés du substrat vers l'anode ou de la cathode vers l'accepteur d'électrons à travers la chaine respiratoire des microorganismes électroactifs. En effet, celle-ci varie d'une espèce à l'autre et même chez la même espèce suivant les conditions de croissance. Par exemple, dans le cas d'utilisation de médiateurs, la réaction qui impose le voltage sera la réaction finale de transfert de l'électron du médiateur vers l'électrode. Dans le cas de contacts directs via des cytochromes ou de pili, le potentiel de l'électrode peut être évalué par le ratio de cytochromes selon s'ils sont sous formes réduites ou oxydés. Les potentiels de différentes réactions redox sont listés dans la Table II-1. Le potentiel théorique idéal du SEM peut être calculé par l'équation de Nernst, allant de quelques centaines de mV à plus de 1000 mV (Du et al., 2007). En pratique de nombreux phénomènes vont affecter cette performance, rendant sont estimation plus complexe.

Table II-1 : Réaction de couples redox sur les électrodes d'un SEM et leur potentiel redox associé (Du et al., 2007)

Oxidation/reduction pairs	$E^{\circ\prime}$ (mV)
H^+/H_2	−420
NAD^+/NADH	−320
S^0/HS^-	−270
SO_4^{2-}/H_2S	−220
$Pyruvate^{2-}/Lactate^{2-}$	−185
2,6-AQDS/2,6-AHQDS	−184
$FAD/FADH_2$	−180
Menaquinione ox/red	−75
Pyocyanin ox/red	−34
Humic substances ox/red (Straub et al., 2001)	−200 to +300
Methylene blue ox/red	+11
$Fumarate^{2-}/Succinate^{2-}$	+31
Thionine ox/red	+64
Cytochrome $b(Fe^{3+})$/Cytochrome $b(Fe^{2+})$	+75
Fe(III) EDTA/Fe(II) EDTA	+96
Ubiquinone ox/red	+113
Cytochrome $c(Fe^{3+})$/Cytochrome $c(Fe^{2+})$	+254
O_2/H_2O_2	+275
Fe(III) citrate/Fe(II) citrate	+372
Fe(III) NTA/Fe(II) NTA	+385
NO_3^-/NO_2^-	+421
$Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$	+430
NO_2^-/NH_4^+	+440
O_2/H_2O	+820

4.4.2. *Evaluation des performances réelles d'un SEM*

4.4.2.1. Etats d'une pile

Afin d'évaluer les performances réelles d'un SEM, il est nécessaire de s'intéresser aux quatres facteurs du système que sont la tension (U, en Volts), l'intensité de courant (I, en Ampères), la résistance (R, en Ohms) et la puissance du système (P, en Watts). Il est possible de tracer une courbe de l'intensité d'une pile en fonction de la différence de potentiels des électrodes (Figure II-19). Cette courbe permet de définir trois états:

- **Circuit ouvert**. En circuit ouvert (rouge), les deux électrodes sont déconnectées, la résistance peut donc être considérée comme tendant vers l'infini (R=+∞ Ω). Le mouvement des électrons est donc impossible et le courant est donc nul (I=0 mA). Ainsi, la puissance délivrée est également nule (P=0 mW) et la différence de potentiel (tension) entre anode et cathode est maximale.
- **Fonctionnement**. En fonctionnement (vert) la pile débite un courant I_n. La tension de la pile peut être extraite des courbes intensité-potentiel en portant l'intensité I_n sur les caractéristiques de l'anode et de la cathode.
- **Court circuit**. En court circuit (bleu), la résistance est nulle (R=0 Ω), le courant est alors maximal mais la puissance est nulle car le potentiel de l'anode et de la cathode étant identique la tension U est nulle.

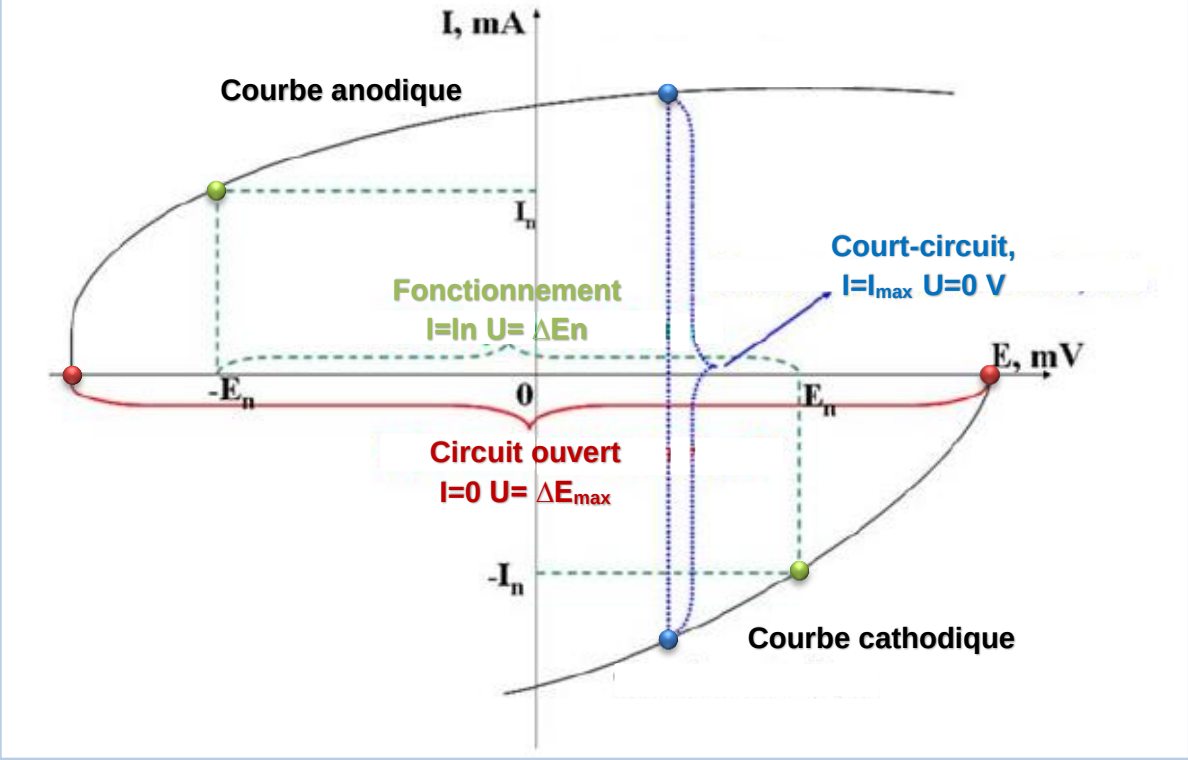


Figure II-19 : Courbes intensité-potentiel de l'anode et de la cathode d'une MFC

4.4.2.2. Courbe de polarisation d'une pile

Dans le cas des piles à combustibles microbiennes (MFC), les performances sont classiquement évaluées en traçant une courbe de polarisation. Celle-ci s'obtient classiquement en faisant fonctionner la MFC après croissance du biofilm électroactif en modifiant la résistance externe du système. Des valeurs de tension et d'intensité sont obtenues pour chaque palier de résistance imposée. La puissance du système est calculée, grâce à l'Équation 9, pour chaque palier de résistance. Une représentation de cette puissance en fonction de la résistance R ou de l'intensité I (Figure II-20) permet d'obtenir une courbe en cloche avec un maximum de puissance (P_{max}). Ce maximum correspond au point de fonctionnement optimal de la pile, donnant la résistance externe (R_{opt}), la tension (U_{opt}) et l'intensité (I_{opt}) optimales permettant de maximiser la puissance produite par le biofilm électroactif. Il apparait souvent que la résistance externe optimale pour maximiser la puissance débitée par le SEM soit égale à la résistance interne du système.

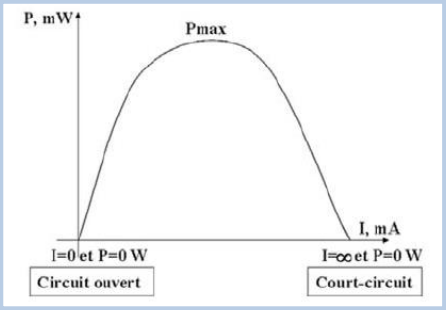


Figure II-20 : Courbe de polarisation d'une pile à combustible microbienne

4.4.2.3. Notion de résistances internes du système et de courant capacitif

Dans la pratique, les performances réelles du système sont bien inférieures aux performances théoriques à cause de résistances internes qui éloignent les processus réels de l'état d'équilibre. La différence de potentiel réelle entre anode et cathode est toujours inférieure à la tension théorique d'équilibre. L'Équation 10 met en évidence les facteurs de résistance interne, telles que les surtensions d'activation et de concentration et les chutes ohmiques inhérentes au système :

Équation 10 : Différence de potentiel d'un SEM corrigé par les résistances internes du système

$$U_{pile} = E_{cathode} - \left|\eta_{act,c} + \eta_{conc,c}\right| - E_{anode} - \left|\eta_{act,a} + \eta_{conc,a}\right| - \eta_{ohmique}$$

$\eta_{act,c}$, $\eta_{act,a}$: surtension d'activation de la cathode et de l'anode
$\eta_{conc,c}$, $\eta_{conc,a}$: surtension de concentration à la cathode et à l'anode
$\eta_{ohmique}$: chutes ohmiques

- *Surtensions d'activation*

On parle de surtension d'activation dans le cas où la vitesse globale de la réaction d'oxydoréduction à chaque électrode est limitée par le transfert. Du côté du biofilm éléctroactif, la limitation peut être due au transfert d'électrons du complexe enzymatique ou du médiateur électrochimique depuis ou vers l'électrode. Les surtensions d'activation peuvent être réduites en améliorant les propriétés catalytiques du biofilm électroactif. Dans le cas d'électrodes polarisées, cette surtension d'activation est compensée par la source d'énergie externe.

- *Surtensions de concentration*

La surtension de concentration est due au gradient de concentration de l'espèce redox réactive vers la surface de l'électrode ou du biofilm électroactif. Ce gradient de concentration

est produit par la consommation de l'espèce réactive au plus près de la surface électrochimique (électrode ou biofilm) et de sa vitesse de déplacement dans le milieu. Ce déplacement se fait selon 3 mécanismes, la diffusion, due à la déplétion en espèce réactive des couches les plus proches de l'électrode, la convection produite par un moyen mécanique ou thermique et la migration due au champ électrique entre l'anode et la cathode.

- *Chutes ohmiques*

Les chutes ohmiques sont dues à la résistance des déplacements des ions entre l'anode et la cathode à travers l'électrolyte et les éventuelles membranes ioniques. Ces pertes ohmiques augmentent avec la diminution de la conductivité ionique de l'électrolyte ou de la membrane (ex : lors du colmatage). Elles peuvent être limitées en réduisant la distance entre les deux électrodes, en éliminant le séparateur ionique (membrane anionique ou cathionique) ou en augmentant la conductivité ionique de la solution (ajout de sel ionique).

- *Pertes liée aux courants internes*

Des courants internes (ou crossing-over) peuvent également apparaitre lorsque le séparateur ionique est également perméable à d'autres espèces électroactives (oxydants, réducteurs et électrons) et que les électrodes manquent de sélectivité chimique et sont capables de catalyser des réactions parasites. La combinaison de ces deux phénomènes conduit à l'apparition d'un potentiel mixte aux électrodes. L'écart entre le potentiel apparent de la réaction d'oxydoréduction attendue et le potentiel mixte donne une indication de performance liée à la sélectivité électrochimique intrinsèque du système.

- *Courant faradique et courant capacitif*

On distingue deux types de courant dans un système électrochimique, le courant faradique et le courant capacitif. Le courant faradique est associé aux réactions d'oxydoréduction à la surface des électrodes. Les électrons sont alors transférés entre la surface de l'électrode et une molécule en solution via une réaction d'oxydoréduction. Le courant capacitif correspond quant à lui à la charge ou la décharge des électrons à la surface de l'électrode (double couche électrochimique) lors de changement de potentiel. Ce courant n'entraîne pas de transfert d'électrons vers l'extérieur, mais seulement un changement de répartition des charges électriques de la surface réactive. Le courant capacitif augmente lorsque la surface réactive de l'électrode est modifiée, par exemple lors du développement d'un biofilm électroactif.

1.1.1.2. Notions de rendements faradiques et efficacité coulombique

- *Rendement faradique*

Afin de quantifier l'éfficacité d'un SEM pour la production d'électricité, il est possible de calculer le rendement faradique (ε_{farad}) global du système (Équation 11). Celui-ci quantifie le taux de conversion de la matière organique en électron à l'anode. Il fait le rapport entre la quantité d'électrons produits sous forme de courant électrique (C_E), en coulombs, et la quantité d'électrons théoriques (8 électrons pour une mole d'acétate par exemple) provenant de l'oxydation du substrat (C_t). Pour les milieux complexes comprenant plusieurs substrats organiques potentiels, comme les boues de station d'épuration, on exprime le substrat en termes de Demande Chimique en Oxygène (DCO) qui correspond à la quantité d'oxygène

totale théorique nécessaire à l'oxydation complète du substrat. Ce rendement est théoriquement toujours inférieur à 100%. En effet, les cellules ont besoin de bifurquer une partie des électrons vers la production d'ATP et l'anabolisme pour survivre.

Équation 11 : Rendement faradique

$$\varepsilon_{farad} = \frac{C_E}{C_T} \cdot 100 = \frac{\int_{t_0}^{t} i(t) \cdot dt}{F \cdot n_e \cdot \Delta[S] \cdot V_{anolyte}} \cdot 100 = \frac{\int_{t_0}^{t} i(t) \cdot dt}{4 \cdot F \cdot \Delta DCO \cdot V_{anolyte}} \cdot 100$$

C_E : quantité d'électrons produits mesurée expérimentalement (C)
C_T : quantité d'électrons théorique dans le substrat (C)
I(t) : courant produit à l'instant t (A)
F : constante de Faraday
n_e : nombre de moles d'électrons issues de l'oxydation d'une mole de substrat (mol)
$\Delta[S]$: variation de la concentration en substrat entre t_0 et t ($mol.L^{-1}$)
ΔDCO : variation de la concentration en DCO entre t_0 et t ($mol.L^{-1}$)
$V_{anolyte}$: volume de l'anolyte (L)

- *Efficacité coulombique*

Afin de quantifier l'éfficacité d'un transfert d'électrons de l'électrode vers un biofilm électrotrophe, on peut calculer l'efficacité coulombique du système. Celui-ci fait le rapport entre le nombre d'électrons présents dans les molécules produites par le biofilm électrotrophe et la quantité d'électrons consommés à la cathode.

Équation 12 : Efficacité coulombique

$$CE\ (\%) = \frac{C_T}{C_E} \cdot 100 = \frac{F \cdot n_e \cdot \Delta[P] \cdot V_{catholyte}}{\int_{t_0}^{t} i(t) \cdot dt} \cdot 100$$

C_E : quantité d'électrons consommés mesurée expérimentalement (C)
C_T : quantité d'électrons théorique dans les produits (C)
I(t) : courant consommé à l'instant t (A)
F : constante de Faraday
n_e : nombre de moles d'électrons présents par mole de produit créé (mol)
$\Delta[P]$: variation de la concentration en produit entre t_0 et t ($mol.L^{-1}$)
$V_{catholyte}$: volume du catholyte (L)

1.1.2. *Techniques électrochimiques*

Afin de mesurer et d'étudier les réactions d'oxydoréduction d'un SEM, différentes techniques électrochimiques peuvent êtres utilisées faisant intervenir 3 grandeurs que sont : le potentiel (E en Volt), le courant (I en Ampère) et le temps (t). Les trois techniques les plus utilisées sont : (i) la chronoampérométrie ; (ii) la décharge à résistance constante et (iii) la voltammétrie cyclique. Ces techniques sont réalisées grâce à un potentiostat. Dans chaque cas, on distingue 3 électrodes, l'électrode de travail (WE) où se situe le biofilm électroactif qui peut servir d'anode (acceptrice d'électrons) ou de cathode (donneuse d'électrons), l'électrode de référence qui permet de mesurer les potentiels d'après un couple d'oxydoréduction de référence (H_2/H^+, Ag/AgCl …) et une contre électrode servant à fermer le système et réaliser la réaction d'oxydoréduction complémentaire de la WE.

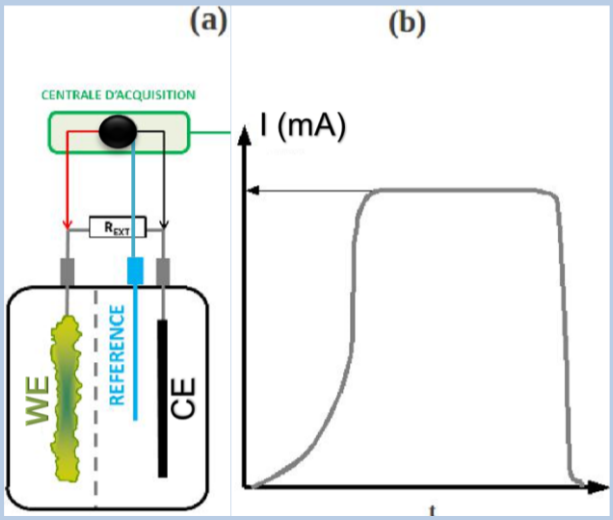


Figure II-21 : (a) Schéma du montage de la chronoampérométrie. (b) Exemple de chronoampérogramme

1.1.2.1. Chronoampérométrie

La chronoampérométrie est une technique électrochimique qui permet de mesurer un courant électrique au cours du temps en polarisant l'électrode de travail à un potentiel fixe. Suivant le potentiel appliqué à la WE, celle-ci va être utilisée comme anode (potentiels élevés), ou cathode (bas potentiels), par le biofilm électroactif à sa surface, servant ainsi respectivement d'accepteur ou de donneur d'électrons. Le courant traversant le système augmente du fait de la production ou de la consommation des électrons par les microorganismes électroactifs. Cette technique, consommatrice d'énergie pour maintenir le potentiel à la WE, n'est utilisé que dans le cadre d'électrosynthèse ou d'électrolyse ou pour étudier le développement de biofilm électroactif à différents potentiels.

1.1.2.2. Décharge à résistance constante

Cette technique est celle utilisée dans les MFC ayant pour objectif la production d'électricicté. En effet, on applique simplement une résistance entre l'électrode de travail (ici l'anode) et la contre électrode (ici la cathode). Cette résistance est choisie en fonction de la courbe de polarisation, exposée précédement, afin de maximiser la puissance de la pile. Cette méthode ne nécessite donc pas d'apport énergétique sous forme d'électricité pour fonctionner, contrairement à la chronoampérométrie. De plus, les potentiels des deux électrodes sont libres et vont fluctuer suivant les réactions d'oxydo-réduction à leur surface et la disponibilité des accepteurs et donneurs d'électrons.

1.1.2.3. Voltammétrie cyclique

La voltammétrie cyclique, ou cyclovoltammétrie, est une technique couramment utilisée pour obtenir des informations qualitatives et quantitatives sur les réactions électrochimiques se déroulant aux interfaces avec les électrodes (Figure II-22). Celle-ci permet de mesurer les potentiels d'équilibres, les courants d'oxydoréduction ou les constantes d'équilibre des réactions. Elle consiste à balayer le potentiel de la WE de manière linéaire et cyclique entre deux bornes fixées et de mesurer le courant produit tout au long de la varition de potentiel. Lorsque le potentiel varie de sa borne la plus basse à la borne la plus haute, on mesure les courants produits par l'oxydation de composé. Lorsque la variation de potentiel est inversée, on mesure les courants de réduction de molécules électroactives. Plus la distance est grande entre la courbe d'oxydation et de réduction, plus le courant capacitif du système est élevé. En effet, le système a besoin de fournir plus de d'électrons pour réussir à répartir les charges sur la couche réactive de la WE afin de la polariser au potentiel désiré. Lorsque des composés réagissent sur électrode, des pics d'oxydation ou de réduction apparaissent sur le cyclovoltamogramme. Il est nécessaire de définir précisément les vitesses de balayage du potentiel afin de faire apparaitre et affiner ces pics. Si la vitesse de balayage est faible (sigmoïde en bleu turquoise sur la Figure II-22b) devant la cinétique de diffusion des composés, un état stationnaire s'établit à la surface de l'électrode (concentration constante des composés à l'électrode). A forte vitesse de balayage, l'état stationnaire n'a pas le temps d'atteindre un régime stabilisé ; le courant augmente avec la consommation de plus en plus de réactif. Le pic de courant, se manifeste dès lors que la limite de vitesse de diffusion est atteinte : le flux de réactifs atteignant la surface de l'électrode n'est alors plus suffisant pour maintenir ce courant ce qui conduit alors à une chute du courant.

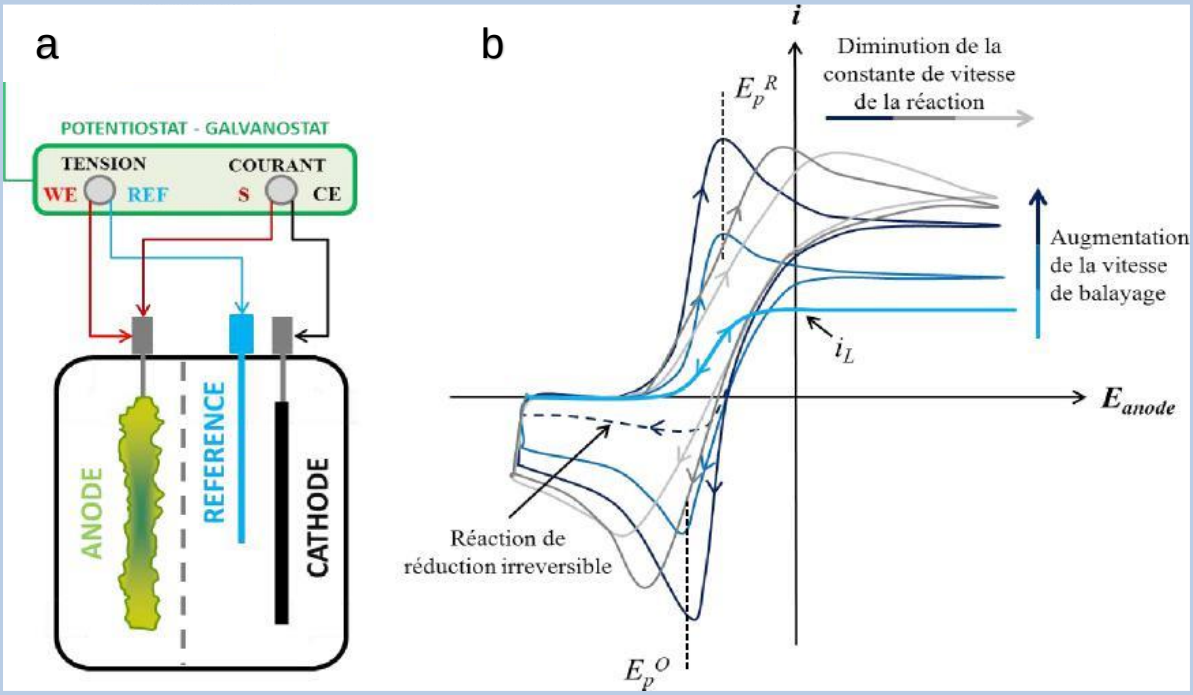


Figure II-22 : (a) Schéma du montage de la cyclovoltammétrie. (b) Exemple de cyclovoltamogramme

5. POTENTIALITE DES MICROORGANISMES EXTREMOPHILES ELECTROACTIFS

5.1. Définition des microorganismes extremophiles

La recherche de micro-organismes, capables de catalyser la réduction ou l'oxydation d'une électrode dans un SEM, a été essentiellement axée sur des bactéries mésophiles. Les bactéries qui fonctionnent de façon optimale dans des conditions extrêmes commencent à être examinées, car elles pourraient servir de catalyseurs plus efficaces (activité plus élevée, plus grande stabilité, durée de vie plus longue, capables d'utiliser ou de produire une plus large gamme de molécules) dans les SEM (Mathis et al., 2007). Les extrêmophiles sont des microorganismes se développant dans des conditions extrêmes, normalement mortelles pour la plupart des autres organismes. On retrouve différentes dénominations suivant le type de conditions extrêmes auxquelles peut résister l'extrêmophile (Dopson et al., 2015) :

- Acidophile : organisme vivant dans des environnements acides (pH optimum de croissance inférieur à 5).
- Alcalophile : organisme vivant dans des environnements basiques (pH optimum de croissance proche de 9 et plus).
- Halophile : organisme vivant dans des milieux très salés (forte concentration en NaCl).
- Métalotolérant : organisme tolérant de hautes concentrations en métal (cuivre, cadmium, arsenic, zinc).
- Psychrophile ou psychrotolérant : organisme vivant dans des environnements froids (abysses, glaciers etc.).
- Piézophile ou barophile : organisme vivant dans des environnements soumis à des pressions élevées (fonds océaniques profonds jusqu'à -11 000 mètres ; fosse des Mariannes)
- Radiorésistant : organisme pouvant survivre à des radiations ionisantes élevées.
- Thermophile : organisme vivant dans des environnements chauds avec des optimums de croissance proche de 60 °C.
- Hyperthermophile : organisme vivant dans des environnements très chauds avec des optimums de croissance proche de 90 °C à plus de 100 °C ; ils peuvent par conséquent vivre dans un milieu d'eau portée à ébullition.
- Xérophile : organisme capable de résister à la dessiccation (ayant besoin de peu d'eau pour survivre).

On retrouve ce type de microorganismes dans des environnements présentant des conditions extrèmes, telles que les sources chaudes alcalines d'eau douce, les champs de solfatares acides, les boues et sols géothermiques anaérobies, les zones acides de soufre et de pyrite, les ressorts carbonatés et sols alcalins, les lacs hypers salés et de soude et finalement les sources hydrothermales profondes (Kristjánsson and Hreggvidsson, 1995).

La plupart des études, sur des microorganismes extrêmophiles potentiellement électroactifs, a été réalisée en condition exoélectrogéne, avec l'anode comme accepteur d'électrons. Les principaux étudiés sont des acidophiles, alcalophiles, halophiles, thermophiles

et hyperthermophiles. L'un des avantages à l'utilisation d'acidophiles ou alcalophiles en SEM est la possibilité de fixer le pH à des valeurs très acides ou très basiques ce qui permet d'améliorer la ionisation de composés impliqués dans le transport ionique (anion ou cation suivant la membrane utilisée). L'utilisation d'halophiles permet d'augmenter la salinité des électrolytes permettant ainsi d'augmenter le transport ionique en SEM. L'utilisation de thermophiles et hyperthermophiles permet d'augmenter la température des SEM afin d'augmenter les cinétiques métaboliques et donc d'augmenter les rendements de production. D'autre part, toutes ces conditions ont pour avantage de diminuer les risques de contamination des SEM en sélectionnant les espèces extremophiles.

Concernant les thermophiles et hyperthermophiles, *a priori*, l'augmentation de la température d'un système électrochimique semble nécessiter un apport énergétique sous forme de chaleur, qui pourrait contrebalancer le gain de densité de courant obtenu. Cependant, de nombreuses entreprises ont besoin de refroidir des effluents industriels (eau de refroidissement, eau de chauffage, eaux usées d'industrie alimentaire etc.) par des moyens consommateurs d'énergie alors qu'ils pourraient être recyclés pour chauffer ou même alimenter en matière organique des SEM.

5.2. Les microorganismes acidophiles et alcalophiles électroactifs

Différentes espèces acidophiles et alcalophiles ont été utilisées en MFC avec notamment *Acidithiobacillus ferrooxidans* et *Acidiphilium* spp. à des pH allant de 2 à 4 (Borole et al., 2008; Carbajosa et al., 2010; ter Heijne et al., 2007; Malki et al., 2008), et *Bacillus* spp., *Pseudomonas alcaliphila, Corynebacterium* sp. *et Geoalkalibacter ferrihydriticus* à des pH de 9 à 11 (Badalamenti et al., 2013; Liu et al., 2010; Ma et al., 2012; Zhang et al., 2011). Des consortia issus d'environnements acides ou basiques on également étés enrichis en MFC, tels que des compostes, des boues activées, des effluents d'industrie ou des eaux usées (Dopson et al., 2015).

Un des avantages des SEM à bas pH est l'absence de limitation de la diffusion des ions dans le compartiment cathodique pour la reduction de l'oxygène, et donc ne limite pas la production de courant électrique. Cependant, une conséquence de la croissance microbienne à bas pH est la nécessité pour la cellule de maintenir un pH neutre dans son cytoplasme, consommant ainsi une partie de son énergie dans le transport de proton (Dopson et al., 2015).

L'utilisation d'une bioanode en MFC alcaline a plusieurs avantages pour la production d'électricité. En effet, à haut pH, le potentiel de l'anode est plus bas, résultant en une augmentation de la différence de potentiel entre électrodes. De plus, un pH élevé permet de restreindre certains metabolismes qui pourraient détourner les sources d'énergies, tels que la méthanogénèse acétotrophe consommatrice d'acétate au lieu d'être oxydé sur électrode (Dopson et al., 2015).

5.3. Les microorganismes halophiles électroactifs

Depuis une dizaine d'années, l'intêret pour les microorganismes halophiles a considérablement augmenté, avec une vingtaine d'études reportant la capacité éléctroactive de différentes espèces ou consortia en MFC salée ou hypersalée (35 à 346 g/l). Parmis ces

espèces identifiées on trouve des *δ-Proteobacteria,* telles que des *Desulfuromonas* (Badalamenti et al., 2016; Marone et al., 2016) ou des *Geoalkalibacter* (Badalamenti et al., 2013; Carmona-Martínez et al., 2013), des *γ-Proteobacteria* telles que *Shewanella marisflavi* EP1 (Xu et al., 2016), *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (Monzon et al., 2016, 2017), *Stenotrophomonas* spp. (Jayashree et al., 2016), *Alteromonas* (Vandecandelaere et al., 2008a) ou *Chromohalobacter* sp. (Shrestha et al., 2018) et des *α-Proteobacteria* telles que *Ruegeria scottomollicae* et *Nautella italic* (Vandecandelaere et al., 2008b, 2009). On trouve également des *Bacteroidetes* tels que des *Bacteroides* (Shehab et al., 2017), des *Firmicutes* comme *Exiguobacterium acetylicum* (Chen et al., 2013), et *Halanaerobium praevalens* (Monzon et al., 2016, 2017). Finalement, deux *Archaea* de l'ordre des Halobacteriales tels que *Haloferax volcanii* et *Natrialba magadii* (Abrevaya et al., 2011) ont été isolées. On retrouve également des consortia issus de Mer Mediterranée (Rousseau et al., 2013), du Grand Lac Salé du nord des États-Unis (Grattieri et al., 2017) et de boues de station de désalinisation (Naraghi et al., 2015).

Les densités de courant obtenues dans ces études varient entre 0.82 et 8.3 A/m² L'utilisation de ces microorganismes halophiles pourrait permettre d'augmenter la production de courant en MFC par 100 comparé à des espèces non halophiles (Abrevaya et al., 2011). Cependant la mise en application de ces systèmes fait face à quelques défis techniques. En effet, l'utilisation d'électrolyte hypersalé à la cathode réduit la solubilité de l'oxygène, principal accepteur d'électrons utilisé. De plus, des phénomènes d'alcalinisation, d'évaporation, de sorption et de cristalisation peuvent poser des problèmes de colamatage des membranes échangeuses d'ions et donc augmenter la résistance interne du système (Shrestha et al., 2018).

5.4. Les microorganismes thermophiles électroactifs

Depuis une dizaine d'années, de plus en plus d'études font état d'enrichissement de biofilms électroactifs thermophiles en SEM. L'isolement ou l'identification des microoganismes constituant ces biofilms a permis d'augmenter la biodiversité électroactive thermophile connue. Ainsi on retrouve des bactéries exoélectrogéniques appartenant aux phyla des Firmicutes comme *Ureibacillus defluvii* à 55°C (Zhou et al., 2014),*Thermincola* sp. à des températures entre 55 et 60°C (Marshall and May, 2009; Mathis et al., 2007; Parameswaran et al., 2013; Wrighton et al., 2008) et *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* en MEC à 60°C (Lusk et al., 2015), mais aussi des Deferribacteres, comme *Calditerrivibrio nitroreducens* (Fu et al., 2013a) et une nouvelle espèce proche à 88% de *Deferribacter desulfuricans*, cultivées à 55°C (Jong et al., 2006; Mathis et al., 2007). On trouve également des *δ-Proteobacteria* comme une *Geobacter* thermophile associée à une *α-Proteobacteria*, *Arcobacter sp.,* et des méthanogènes incultivées appartenant aux *Methanothermobacterium* et *Methanobacterium*, dans une MFC à 50°C, utilisant du gaz de synthèse (syngas) comme seul donneur d'électrons (Hussain et al., 2012). Des études en MEC à 55°C ont montré d'une part le développement sur cathode d'un consortia complexe composé de 6 phyla différents dominés par des Firmicutes (Fu et al., 2013b) et d'autre part l'enrichissement d'une Firmicute incultivée sur anode à partir d'éthanol(Dai et al., 2017). Un biofilm électrotrophe a aussi été enrichi en thermophilie, permettant de réaliser de l'électromethanogénèse à 55°C par un consortia

composé de *Synergistetes, Thermotogae* et *Methanothermobacter* (Fu et al., 2015a)**.** Ces microorganismes ont été enrichis à partir de sediments marins, boues de digesteur anaérobie thermophile et autres environnements à haute température.

L'utilisation de microorganismes thermophiles a permis d'augmenter les densités de courant obtenues, avec des maximums de 8 A/m² en MEC (Parameswaran et al., 2013) et 2.3 A/m² en MFC (Ha et al., 2012). Le principal donneur d'électrons étudié est l'acétate, mais on retrouve également des études sur cellulose, éthanol, glucose, xylose et autre sucres ainsi que des effluents de composition complexe provenant de formation d'eau de réservoir pétrolier ou de boue anaérobie (Shrestha et al., 2018).

5.5. Les microorganismes hyperthermophiles électroactifs

Depuis quelques années, quelques espèces hyperthermophiles ont été décrites comme électroactives dans la littérature. Parmi ces microorganismes on retrouve deux bactéries, *Caldanaerobacter subterraneus et Thermodesulfobacteria commune* dominant la biodiversité d'un biofilm sur l'anode d'une MFC inoculée à partir de formation d'eau en subsurface d'un réservoir pétrolier. L'augmentation de la température du système de 75 à 95°C a conduit à l'augmentation par quatre de la densité de puissance maximale, jusqu'à 165 $mW.m^{-2}$ (Fu et al., 2015b). Il faudra ensuite attendre 2017 et 2018 pour voir la description de 3 archées hyperthermophiles électroactives initialement isolées de sources hydrothermales avec deux *Archaeoglobales* en MEC à 80°C, *Geoglobus ahangari* et *Ferroglobus placidus* (Yilmazel et al., 2018), et une *Thermococcales* en MFC à 90°C, *Pyrococcus furiosus* (Sekar et al., 2017)*. G. ahangari* et *F. placidus* avaient déjà été présumées électroactives par leur capacité à se développer sur oxyde de fer (III) insoluble. Des études mécanistiques avaient montré un transfert d'électrons par contact direct via des appendices observés au microscope et des protéines héminiques de la membrane externe de la cellule (Manzella et al., 2013). Une analyse in silico chez *F. placidus* a montré la présence de 30 gènes putatifs codant pour des protéines de type c cytochrome (plus que tout autre archée qui a été séquencée à ce jour), dont cinq contenaient 10 ou plusieurs motifs héminiques. Des études transcriptomiques ont montré la surexpression de 8 gènes correspondant aux cytochromes multi-hèmes de type c et de gènes codant pour les deux protéines de domaine de piline de type IV quand *F. placidus* a été cultivé sur oxyde de Fe(III) insoluble par rapport au citrate de Fe (III) soluble comme accepteur d'électrons (Smith et al., 2015). En applicant un voltage de 0.7V enMEC, ces deux archaeoglobales ont montré des pics catalytiques à -0.39V vs Ag/AgCl pour *F. placidus* et -0.37V pour *G. ahangari* en CV. Les résultats obtenus suggéraient également un transfert d'électrons par contact direct (Yilmazel et al., 2018). *P. furiosus* quant à lui a montré une production de densité de courant de 2 A/m² et une densité de puissance de 225 mW/m². L'observation microscopique semblait indiquer un transfert d'électrons par contact direct sur électrode (Sekar et al., 2017).

Face aux intérêts grandissants pour les SEMs et leur potentiel en production de biocarburants, les chercheurs et industriels commencent à s'intéresser aux communautés microbiennes (hyper)thermophiles des sources hydrothermales profondes pour leur propriété à transférer des électrons à et depuis des surfaces conductrices. L'augmentation de la

température de ces piles permettrait d’augmenter les vitesses de réactions de manière exponentielle et la production de haute densité de courant ou de biocarburants. Cependant, des verrous technologiques restent encore à débloquer avant l’application industrielle (Girguis and Holden, 2012).

CHAPITRE III - OBJECTIF DE THESE ET DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE



1. OBJECTIF DE THESE

C'est dans ce contexte scientifique qu'ont été initiés ces travaux de thèse. Les sources hydrothermales sont constituées de cheminées dont les parois sont riches en particules métallique conductrices d'électricité. Ces parois permettent de séparer le fluide hydrothermal réduit, de l'eau de mer oxydée conduisant à la production d'un courant électrique spontanée et répandu dans la majorité de ces écosystèmes. Ceci étant, cette production d'électricité dans les systèmes hydrothermaux profonds doit certainement affecter les processus biogéochimiques environnants et surtout le développement des communautés microbiennes. C'est en partant de ce postulat que 2 objectifs clairs ont été proposés : (i) démontrer la présence éventuelle de microorganismes définis comme étant des électrolithoautotrophes. Ces microorganismes auraient alors la capacité de croitre grâce à cette source d'énergie électronique facilement accessible, en se basant sur les mêmes principes que la chimiolithoautotrophie ou la phototrophie ; (ii) démontrer que des microorganismes peuvent se servir de la surface d'une cheminée polysulfurée métallique comme accepteur d'électrons. Ces microorgnaismes qualifiés d'électrogènes pourraient donc se servir de ce support conducteur comme accepteur insoluble permettant une respiration couplée à l'oxydation de la matière organique.

Outre ces aspects écologiques, l'identification de microorganismes électroactifs hyperthermophiles pourrait également avoir un intérêt certain dans des applications biotechnologiques. En effet, la diversité métabolique ainsi que des molécules organiques produites et consommée de ces microorganismes, couplés à la cinétique élevées des réactions chimiques/enzymatiques à ces températures pourrait permettre d'améliorer les performances des systèmes électrochimiques microbiens actuels.

Pour réaliser l'étude et la croissance de ces microorganismes électroactifs hyperthermophiles, différents développements technologiques préalables ont été nécessaires et réalisés dans le cadre de cette thèse, tels que le développement d'un SEM hyperthermophile, la conception d'amorces de qPCR spécifiques aux populations microbiennes enrichies ou le développement de méthodes d'observation microscopique de biofilms électroactifs sur électrodes.

2. DESIGN D'UN SYSTEME ELECTROCHIMIQUE MICROBIEN HYPERTHERMOPHILE

Afin d'enrichir ces microorganismes électroactifs hyperthermophiles, un système électrochimique microbien a dû être développé au sein du laboratoire. En effet, à l'heure actuelle, moins d'une dizaine de publications font mention de système électrochimique microbien fonctionnant à très haute température. La plupart des SEM à haute température décrits à ce jour, présentent de très petits volumes sans contrôle continu des paramètres de croissance (Température, pH, ORP, composition des gaz). Grâce au savoir faire du laboratoire, axé sur la culture de microorganismes hyperthermophiles en bioréacteurs, un cahier des charges a pû être établi dans le but de concevoir un SEM fonctionnant à très haute température et dans lequel les paramètres de coissance peuvent être facilement contrôlable. En effet ce SEM doit :

- Résister à des températures jusqu'à 95°C.
- Ne pas monter en pression lors de la montée en température et lors du fonctionnement.
- Rester en anaérobie tout au long de l'expérience.
- Permettre une bonne homogénéisation des conditions (température, pH, concentration en substrat) au sein du milieu liquide et à la surface de l'électrode de travail.
- Contenir un volume de milieu de culture suffisant pour réaliser des prélèvements liquides réguliers et éviter l'évaporation du milieu à haute température.
- Contenir suffisament de ports d'entrées pour l'insertion d'électrodes de mesure (pH, ORP, O_2, Spectromètre de masse embarqué), le bullage de gaz, la sortie des flux gazeux, le prélèvement et l'ajout de milieu liquide, l'ajout d'acide ou de base pour la régulation du pH et le branchement de l'électrode de travail, de la contre-électrode et de l'électrode de référence.
- Etre électriquement isolant pour éviter les perturbations électriques extérieures.
- Permettre la séparation des deux électrodes par une membrane échangeuse d'ions
- Résister à la corrosion par l'eau de mer.
- Utiliser des matériaux bio-compatibles et électrochimiquement inertes.
- Utiliser des électrodes à 2 dimensions permettant l'observation microscopique confocale.

Afin de respecter ces critères, nous avons sélectionné un système (Figure III-1) composé de deux demi-cellules en verre borosilicaté de 2 L maximum (Verre Labo Mula, France), entouré d'une double enveloppe pour la circulation d'eau de chauffage régulé par un thermostat (Julabo SE 6, France). Une tubulure latérale d'un diamètre interne de 10cm traversant la double enveloppe permet le raccordement des deux demi-cellules par une bride métallique et le maintien d'une membrane ionique (Membrane International Inc., Ringwood, NJ) séparant les deux compartiments. Le compartiment biologique, contenant le biofilm electroactif, est fermé par une platine en PEEK comportant 10 ports de 12mm et un port central pour introduire l'axe d'agitation du système. Une armature en téflon fixée à la platine maintient le cadre de l'électrode de travail (anode ou cathode contenant le biofilm électroactif), en tissu de carbone (PaxiTech SAS, France), face aux pales d'agitation et à la connection avec l'autre compartiment. Une sonde température (Prosensor pt 100, France) dans un doigt de gant est placée dans le compartiment biologique pour le contrôle de la température interne du système. Le compartiment abiotique est quant à lui surmonté d'une platine en Teflon comportant 4 ports de 12mm, 2 ports de 8 mm et un port central pour l'axe d'agitation. Une contre-électrode (cathode ou anode abiotique) en tissu de carbone, recouvert de platine (Pt) et d'une couche protectrice de poly-analine suivant le protocole du laboratoire Angenent (http://www.umsl.edu/~biofuels/MFC/MFCexperiments.pdf), est fixée à la platine en téflon. Dans les deux compartiments, des bulleurs sont introduits en dessous de l'axe d'agitation et un condenseur à serpentin est placé en sortie de gaz, alimenté en eau à 4°C par un second thermostat (Julabo SE 6, France). Une sonde multiparamètre pH-ORP-Température et une électrode de référence 3M Ag/AgCl (Mettler Toledo InPro 3253, Switzerland) sont introduites

dans le compartiment biologique. Des tubes en polyamide ou en PEEK sont introduits dans les deux compartiments pour l'ajout et le prélèvement de milieu liquide et la régulation du pH.

Ce SEM est placé sur une plateforme de culture cellulaire comportant un automate de régulation (Decobecq Automatismes, France) en lien avec différents systèmes d'analyses. Les deux compartiments sont placés sur une balance (Sartorius Combics 1, Allemagne) permettant le contrôle du volume de liquide dans le SEM. Les bulleurs sont raccordés aux arrivées de gaz (N_2, CO_2, O_2, H_2) munies de régulateurs de débits massiques (Bronkhorst, Netherlands), permettant de définir le débit et les concentrations de chaque gaz du mélange entrant dans chaque compartiment du SEM. La composition gazeuse en sortie du SEM, après le condenseur, est analysée par un micro-GC équipé d'un détecteur catharométrique (MS5A, SRA Instrument, France) et d'une sonde CO_2 CARBOCAP (Vaisala GMT 221, Finland). Les entrées et sorties de liquide, ainsi que les entrées d'acide et de base pour la régulation du pH sont reliées à des pompes péristatiques contrôlées par l'automate. La sonde multiparamètre est reliée à un transmetteur (Mettler Toledo M300, Switzerland), relié à l'automate. L'automate est commandé par un ordinateur grâce au logiciel BatchPro (Decobecq Automatismes, France). L'électrode de travail, la contre électrode et l'électrode de référence sont reliées par un fil de titane (GoodFellow SARL, France) à un potentiostat SP-240 commandé par le logiciel EC-Labs (BioLogic, France)

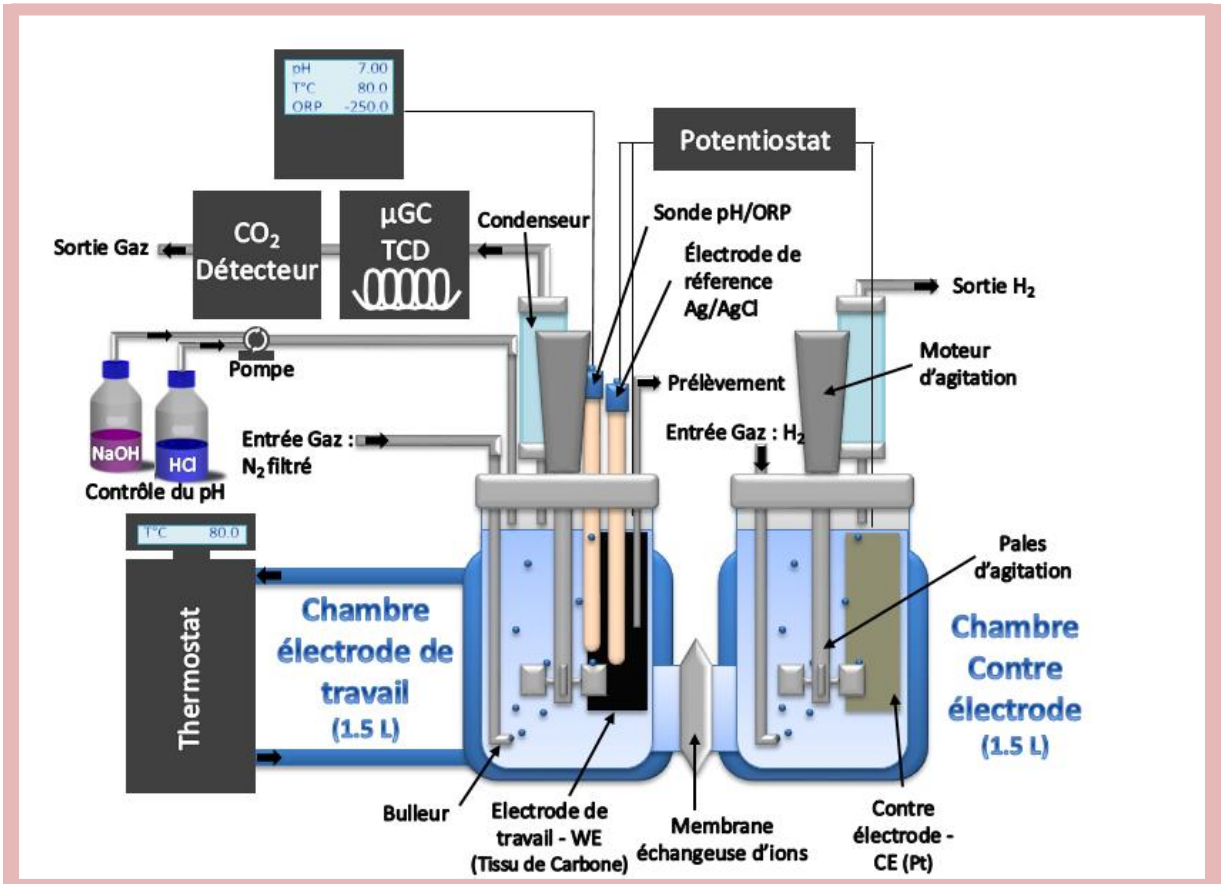


Figure III-1 : Schéma du Système Electrochimique Microbien Hyperthermophile développé au laboratoire couplé à une plateforme de suivi de culture microbienne.

Les conditions spécifiques à chaque enrichissement sont décrites dans les parties « Material and methods » des articles présentés dans les chapitres suivants.

3. MISE AU POINT D'OUTILS D'OBSERVATION MICROSCOPIQUE DE BIOFILMS ELECTROACTIFS

3.1. Microscopie confocale à balayage laser couplée à des sondes FISH

Afin d'étudier la localisation des différents représentants des ordres phylogénétiques dominants sur électrode, une technique de microscopie confocale à balayage laser couplée à des sondes FISH a été développée au laboratoire. Pour cela, des sondes FISH spécifiques aux Bactéries, Aquificales, Archées, Euryarchées, Crenarchées, Thermococcales et Archaeoglobales ont été trouvées dans la litterrature (Rusch and Amend, 2004) et sur la probeBase du site Arb-Silva (https://www.arb-silva.de/).

Table III-1 : Liste des sondes oligonucléotidiques marquées par un fluorochrome utilisées dans les observations microscopiques par méthode FISH.

Population visée	Nom de la sonde	Séquence	% de Formamide	Fluorochrome
Bactéries	EUB338	5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3'	35%	FITC
Aquificales	Aqui1197	5'- GCA TAA AGG GCA TAM TGA YC -3'	30%	CY3
helper nucleotide	hAqui1045	5'-ACG GCC ATG CAC CAC CTG TG-3'		
Archées	ARCH917	5'- GTG CTC CCC CGC CAA TTC -3'	20%	CY3
Euryarchées	Eury806	5'- CAC AGC GTT TAC ACC TAG -3'	20%	CY3
Crenarchées	Cren537	5'- TGA CCA CTT GAG GTG CTG -3'	20%	CY3
Thermococcales	Tcoc164	5'- CAV RCC TAT GGG GGA TTA GC -3'	20%	FITC
Archaeoglobales	Arglo32	5'- TTA GTC CCA GCC GGA TAG CA -3'	25%	FITC

Des morceaux d'électrodes portant un biofilm électroactif ont été fixés dans une solution tampon PBS contenant 2% de formol pour 3h à 4°C. Les morceaux d'électrodes ont ensuite été rincés par immersion dans un tampon PBS (pH=7.3). Les échantillons fixés ont été incubés dans une chambre d'humidité équilibrée à 46°C pendant 2 à 3 heures avec les sondes oligonucléotidiques marquées par fluorescence (Biomers.net GmbH, Germany), présentées Table III-1. Pour minimiser la liaison non spécifique des sondes aux particules, une quantité de formamide spécifique à chaque sonde a été ajoutée au tampon d'hybridation. Après rinçage à l'eau distillée, les électrodes hybridées ont été colorées avec du 4'-6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI), rincées brièvement avec de l'eau distillée puis séchées à l'air dans l'obscurité.

Une fois les morceaux d'électrodes hybridés avec les sondes FISH, une observation microscopique confocale a été réalisée sur un microscope confocal LSM780 (Zeiss, Allemagne) equipé avec un objectif x10, EC Plan-Neofluar. Les émissions de fluorescence bleu, verte et rouge ont été acquises par excitation à respectivement 358, 488 et 561 nm, en utilisant trois lazers. Un empilement de coupes horizontales à 0.5-1µm d'interval sur toute

l'épaisseur de l'électrode, a été obtenu grâce au photomultiplicateur GaAsP. L'acquisistion de ces micrographes a été réalisée à l'aide du logiciel Zen (Zeiss, Allemagne). Une projection du signal obtenu sur l'ensemble des coupes transversales a été obtenue grâce au plugin Z Project du logiciel FIJI (https://fiji.sc/). De même, des profils de profondeur ont été réalisés grace au logiciel FIJI par projection latérale des coupes horizontales

4. DESIGN D'AMORCES QPCR SPECIFIQUES A DES GROUPES PHYLOGENETIQUES SPECIFIQUES

4.1. Design des amorces

Afin de dessiner des amorces spécifiques aux groupes phylogénétiques retrouvés dans nos biofilms électroactifs, deux logiciels du pipeline Obitools (https://git.metabarcoding.org/obitools), développés par le LECA et Helix-Project, ont été utilisés. Pour cela, les séquences de référence du gène codant pour l'ARN 16S ribosomale, des espèces appartenant aux ordres phylogénétiques dominants, ont été récupérées de la base SILVA. Le fichier obtenu, sous format fasta, a été converti en format ecoPCR via la fonction ecoPCRFormat.py en utilisant la base de données taxonomiques de NCBI comme référence. Ce fichier a ensuite été utilisé dans la fonction ecoPrimers suivante :

> ecoPrimers –d « fichier fasta format ecoPCR » –l X –L X –O X –r X –i X > « nom fichier sortie »

Avec : –d : fichier de séquences nucléotidiques de référence pour dessiner les amorces
–l : longueur minimale du fragment amplifié, sans les amorces
–L : longueur maximale du fragment amplifié, sans les amorces
–O : longueur des amorces (par défaut = 18)
–r : TAXID des séquences de référence à inclure pour dessiner les amorces (optionnel)
–i : TAXID des séquences de référence à exclure pour dessiner les amorces (optionnel)

Ces différents paramètres ont été optimisés pour que les amorces respectent les conditions suivantes :

- Le produit de PCR doit mesurer entre 75 et 250 pb avec un optimum à 150-200 pb
- La taille des amorces doit être comprise entre 20 et 30 pb avec un optimum à 25pb
- La température de fusion des amorces doit être comprise entre 57 et 63°C avec un optimum à 60°C
- La proportion de GC doit se situer entre 30 et 70%
- Un maximum de 3 nucléotides identiques à la suite.

Les différentes propositions de couples d'amorces obtenus grâce à la fonction ecoPrimers pour chaque ordre phylogénétique ont été testées en PCR *in silico* grâce au logiciel TestPrime du site Silva (https://www.arb-silva.de/search/testprime/) pour vérifier la sélectivité des amorces. Les couples d'amorces présentant les meilleurs résultats ont été sélectionnés et sont présentés en Table III-2.

Table III-2 : Séquences et caractéristiques des amorces spécifiques aux groupes phylogénétiques désinnées dans cette étude

Cible	Nom d'amorce	Sens	Localisation	Séquence	Taille	%GC	T°C de fusion (Tm)	Taille amplicon	TestPrime
Thermococcales	***Tcoc_F959***	Forward	959-979pb	CGTGAGGCGTCCACTTAAGTGTGGT	25pb	56	61,0	297pb	85.9% *Thermococcales*
	Tcoc_R1233	Reverse	1233-1256pb	GATGATGACRCGCGGGTACTAGGG	24pb	60,4	61,7		
Archeoglobales	***Argl_F1077***	Forward	1077-1098pb	CGGGCAACGGCAGGTCCGTATG	22pb	68,2	62,3	135pb	78.3% *Archaeoglobales*
	Argl_R1191	Reverse	1191-1212pb	GTTGCAGCCCTCGATCCCAGGT	22pb	63,6	60,4		
Thermales/Deino-coccales	***Thml_F341***	Forward	341-363pb	GGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTC	23pb	52.2	57.1	363pb	91% Thermales 87% Deinococcales
	Univ516R	Reverse	497-517pb	GTDTTACCGCGGCKGCTGRCA	21pb	63.5	58.9		
Thermodesulfo-bacteriales	***Tdsb_F1025***	Forward	1025-1047pb	GCACAGGTGCTGCATGGCTGTCG	23pb	65.2	62.4	312pb	83% Thermodesulfobacteriales
	Tdsb_R1312	Reverse	1312-1337pb	GCCRTTACTAGCGATTCCGGCTTCAC	26pb	55.8	61.9		
Desulfurococcales	***Univ516F***	Forward	456-476pb	TGYCAGCMGCCGCGGTAAHAC	21pb	63.5	58.9	318pb	81% Desulfurococcales
	Dsco_R748	Reverse	748-774pb	AACASYTAGCCCGCATCGTTTACAGCC	27pb	53.7	62.0		
Bacillales	***Univ516F***	Forward	456-476pb	TGYCAGCMGCCGCGGTAAHAC	21pb	63.5	58.9	367pb	84% Geobacillus 88% Caldibacillus 55% Bacillus 91% Aeribacillus 73% Anoxybacillus 90% Falsibacillus 100% Saccharococcus 50% Thermolongibacillus
	Bacl_R805	Reverse	805-823pb	CCCTCTAACACTTAGCACT	19pb	47.4	56.0		

4.2. Validation des amorces qPCR

Afin d'assurer un dénombrement réaliste du nombre de cellules appartenant à chaque ordre phylogénétique, la méthode de dénombrement par qPCR, avec les amorces précédement dessinées, a été comparée à une méthode de dénombrement par microscopie optique. Cependant, cette comparaison nécessite l'obtention d'une culture pure d'un représentant de chaque ordre phylogénétique. Lors de cette étude, seuls des représentants de deux ordres, les *Thermococcales* et les *Archaeoglobales*, ont pû être obtenus. En effet, soit aucun représentant des autres ordres n'était disponible dans les banques de souches du laboratoire, soit les cultures n'ont pas permis d'obtenir des densités de cellules suffisantes pour le dénombrement. Ainsi, une validation technique des amorces *Thermococcales* et *Archaeoglobales* a été réalisée à partir de cultures pures de *Thermococcus kodakarensis* et de *Geoglobus ahangari* sur leurs milieux de culture respectifs en condition optimale de croissance.

5.5.1. Réalisation des gammes étalons qPCR

Afin de réaliser une quantification par qPCR, une gamme étalon a été réalisée pour chaque couple d'amorce. Si la culture pure d'un représentant est possible, notamment pour les *Thermococcales* et *Archaeoglobales*, une extraction d'ADN de la culture a été réalisée grâce au kit Wizard Plus SV Minipreprs DNA Purification System (Promega, Madison, WI) et le gène codant pour l'ARNr 16S a été amplifié par les amorces universelles DGGE300F/1391R. Dans le cas d'absence de représentant cultivable, une amplification du fragment du gène codant pour l'ARNr 16S a été réalisée sur un consortium obtenu pendant les enrichissements électroactifs directement avec les amorces spécifiques. Dans les deux cas, le fragment ADN obtenu a été inseré dans un plasmide pGEM-t easy (Promega, Madison, WI) et transformé dans une cellule compétente JM109 (Promega, Madison, WI). Les cellules portant le gène codant pour l'ARNr 16S du représentant ont été criblées sur milieu gélosé LAXI (Milieu LB additionné d'ampiciline à 100 mg/L, X-galactose à 80 mg/L, et IPTG à 0.5mM) puis cultivées 12-24h en milieu LB à 37°C. Une extraction d'ADN plasmidique est ensuite réalisée, grâce au kit PureYield Plasmid Miniprep system (Promega, Madison, WI), sur le culot cellulaire obtenu après centrifugation. L'ADN plasmidique est ensuite quantifié sur un Nanospec et converti en nombre de copies du gène codant pour l'ARNr16S. Une gamme étalon est réalisée à partir de cet ADN plasmidique par dilutions successives au 1/10ème.

5.5.2. Quantification par qPCR

Grâce à la gamme étalon précédement obtenue, une quantification par qPCR du nombre de copies d'ADN codant pour l'ARNr 16S a été réalisée en triplicat avec les amorces spécifiques sur les dilutions des cultures de *T. kodakarensis* et *G. ahangari*. Les températures d'hybridation ont été optimisées pour chaque couple d'amorces suivant les Tm indiquées Table III-2. Ces quantifications par qPCR ont été réalisées avec un SsoAdvanced™ Sybr Green Supermix (Promega, Madison, WI) sur un Thermocycleur CFX96 Real-Time System (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, CA) avec un programme PCR optimisé pour chaque couple d'amorces. Les résultats obtenus ont été convertis en nombre de copies du

gène codant pour l'ARNr 16S/ml de culture. Ce résultat peut directement être comparé à un nombre de cellules par millilitre car les représentants des *Thermococcales* et des *Archaeoglobales* ne comptent qu'une seule copie du gène codant pour l'ARNr 16S par cellule (voir rrnDB, https://rrndb.umms.med.umich.edu).

5.5.3. Dénombrement par microscopie par epifluorescence

Afin de réaliser des dénombrements par microscopie par epifluorescence, les cultures de *T. kodakarensis* et de *G. ahangari* ont été fixées au formol à une concentration finale de 2%. Des dilutions en cascade au 10ème des échantillons fixés ont été réalisées et filtrées sur filtre en polycarbonate à 0.2µm. Les cellules sur filtre ont été marquées au DAPI à 2 µg/ml pendant quelques minutes. Les dénombrements par microscopie optique ont été réalisés à partir de prise de photos du plan optique au grossisement x1000 sur les filtres des dilutions permettant d'obtenir entre 20 et 100 cellules par plan. Ainsi, 10 à 20 photos sont prises de manière aléatoire sur l'ensemble du filtre. Les photos sont ensuite analysées par le logiciel cellc (http://en.bio-soft.net/draw/CellC.html) en ajustant les différents paramètres pour l'identification précise des cellules. Les résultats de comptage (obtenus en nombre moyen d'éléments par plan optique) sont convertis en nombre de cellules par millilitre en utilisant l'équation suivante :

Équation 13 : Formule de conversion des dénombrements cellulaires par plan optique en nombre de cellules par millilitre de culture.

$$C = x_{moy} * \frac{aire\ du\ filtre}{aire\ de\ la\ grille\ de\ comptage} * \frac{v_{ech} + v_{formol}}{v_{ech}} * \frac{1}{D * v_{filtré}}$$

avec aire du filtre = $\pi * 18\ 200\ \mu m^2$

aire de la grille de comptage = 133 * 133 µm²

v_i le volume

D le facteur de dilution

5.5.4. Comparaison des méthodes

Les résultats obtenus avec les deux méthodes de dénombrement sont présentées en Table III-3. Les résultats par qPCR sont significativement équivalents avec les amorces Archées et spécifiques à l'ordre phylogénétique, tandis que les quantifications obtenues sont inférieures au seuil de détection avec des amorces non-spécifiques (ciblant un autre ordre phylogénétique), indiquant une bonne sélectivité des amorces et une amplification complète de la culture cellulaire avec les amorces spécifiques. Les résultats obtenus par les deux méthodes sont significativement équivalents pour les *Thermococcales* et légèrement sous-estimés par qPCR pour les *Archaeoglobales*. Cette sous-estimation en qPCR pour les *Archaeoglobales* peut-être expliquée par la présence d'ions ferriques Fe(III) comme accepteur d'électrons dans les cultures de *G. ahangari*, pouvant partiellement inhiber la polymérase réalisant l'amplification PCR.

Table III-3 : Résultat de comparaison de dénombrement par microscopie et par qPCR avec les amorces Archées et spécifique à l'ordre phylogénétique en Log10(Cellules/ml). Seuil de détection technique de la quantification par qPCR à 3 Log.

	T. kodakarensis	G. ahangari
Dénombrement par microscopie optique	8.31 ± 0.15	7.70 ± 0.11
Dénombrement par amorces Archées	8.44± 0.15	7.12 ± 0.7
Dénombrement par amorces spécifiques	8.29 ± 0.11	7.23 ± 0.13
Dénombrement par amorces non-spécifiques	>3.00 (Argl)	>3.00 (Tcoc)
Recouvrement (qPCR/Microscopie)	99.75%	93.89%

Ainsi, nous pouvons conclure sur la validité de nos amorces qPCR spécifiques aux *Archaeoglobales* et aux *Thermococcales*. Des études complémentaires doivent être réalisées sur les couples d'amorces spécifiques aux autres ordres phylogénétiques après l'obtention de représentants cultivables.

CHAPITRE IV - ETINCELLE DE VIE DANS LES PROFONDEURS

Électrotrophie et électrosynthèse de pyruvate pour la colonisation primaire des cheminées hydrothermales acides



1. PROLOGUE AU CHAPITRE IV

Comme présenté précédemment, les systèmes hydrothermaux sont des écosystèmes complexes basés sur des communautés microbiennes présentant des métabolismes énergétiques très variés. En effet, pour survivre dans ces conditions extrêmes, ces microorganismes ont dû développer des voies métaboliques permettant l'utilisation de sources d'énergie variées et des mécanismes de conservation de l'énergie au sein des biofilms. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à un type trophique encore non identifié, qui ne serait observé uniquement au niveau des sources hydrothermales profondes : l'électrotrophie en comparaison des concepts de chimiotrophie et de phototrophie. Ce type trophique serait basé sur la capacité de certains microorganismes à capter des électrons directement d'un support conducteur. La démonstration ces dernières années, de la présence d'un courant électrique d'origine chimique traversant les cheminées hydrothermales conductrices, a soulevé la question de l'importance de l'électrotrophie dans les processus de colonisation primaire de ces environnements. A l'heure actuelle, aucune démonstration dans ce sens n'a été publiée. Les métabolismes énergétiques chimiolitho(organo)autotrophiques supposés à la base des chaînes alimentaires de ces écosystèmes, sont axés sur l'oxydation d'hydrogène moléculaire, de méthane, de sulfure d'hydrogène ou d'acétate. L'utilisation potentielle de l'électroactivité comme métabolisme énergétique permettrait aux microorganismes, définis comme électrolithoautotrophes, d'utiliser une source d'énergie d'origine électronique (électrique) en captant directement leur source d'électrons sans passer par une étape d'oxydation de molécules inorganiques réduites (Chimiolithoautotrophe).

De plus, étant donné la présence de plus en plus importante de cette capacité à transférer des électrons dans l'arbre du vivant, il est raisonnable de se poser la question de l'ancestralité de ce mécanisme. Ainsi, l'étude de cette capacité au sein des sources hydrothermales, représentant les conditions les plus probables de l'émergence de la vie, est un bon point de départ pour évaluer la possibilité d'un tel mécanisme dans l'origine de la vie. En effet, cette hypothèse est intéressante car, comme évoqué précédemment, l'apport constant d'électrons à un point donné serait thermodynamiquement plus favorable pour la réduction prébiotique du carbone inorganique (CO_2) en molécules organiques. Ainsi nous faisons le postulat que l'électrotrophie potentiellement présente au sein des sources hydrothermales profondes pourrait refléter un mécanisme plus primitif à l'origine des premiers proto-métabolismes.

Afin de répondre à ces hypothèses, nous avons entrepris d'enrichir les potentiels électrotrophes de sources hydrothermales sur un support conducteur comme source d'énergie électronique, de CO_2 comme source de carbone et de divers accepteurs d'électrons abondants dans l'environnement des sources hydrothermales profondes. Pour cela, le compartiment cathodique d'une MSC a été inoculé à partir d'échantillon de cheminée hydrothermale, la cathode polarisée à un potentiel négatif (-590 mV vs ESH) sous un bullage de N_2:CO_2 (80:20) dans de l'eau de mer synthétique à 80°C. Différents enrichissements ont été réalisés sur chacun des accepteurs d'électrons potentiels (Nitrate, Oxygène, Sulfate et oxyde de fer(III)). Des analyses de métabarcoding 16S ont permis d'identifier les communautés microbiennes

enrichies sur électrode et en milieu liquide. Les résultats de cette étude sont en cours de valorisation sous forme d'article et ne sont pas présentés dans cette thèse. Cependant, les résultats obtenus montrent un enrichissement significatif de la biodiversité présente dans l'inoculum de départ (fragment de cheminée hydrothermale). Chaque expérience montre des différences significatives au niveau des ordres enrichis, en fonction des accepteurs d'électrons utilisés. En revanche, à chaque culture les mêmes composés organiques (glycérol, pyruvate, acétate) ont été rejetés dans le milieu liquide, quel que soit l'accepteur d'électrons utilisé. Finalement, afin de mieux comprendre les relations trophiques entre les membres des consortia obtenus sur électrode, et d'identifier les premiers colonisateurs, nous avons choisi d'étudier de manière plus approfondie l'enrichissement sur Nitrate. Des suivis de consommation du courant, de l'évolution du nitrate/nitrite et des ordres dominants par qPCR ont été réalisés au cours du temps, ainsi que des dosages des molécules organiques relarguées en milieu liquide. En mettant en parallèle toutes ces données, une succession de métabolismes et de populations microbiennes associées, a pu être observée. Le point de départ de ces métabolismes est affilié à un nouveau type trophique : l'électrolithoautotrophie. Ces résultats sont présentés dans un article en suivant.

2. ARTICLE 1: ELECTROSYNTHESIS AND ELECTROFERMENTATION OF PYRUVATE DRIVING BIODIVERSITY'S INCREASE IN HYPERTHERMOPHILIC NITRATE-REDUCING ELECTROTROPHIC COMMUNITY FROM DEEP HYDROTHERMAL VENT ENRICHED IN BIOELECTROCHEMICAL SYSTEM.

Guillaume Pillot[1], Sylvain Davidson[1], Laetitia Shintu[3], Lisa Tanet[1], Anne Godfroy[2], Patricia Bonin[1], Pierre-Pol Liebgott[1*]

[1] Aix Marseille Université, IRD, Université de Toulon, CNRS, MIO UM 110, Marseille, France

[2] IFREMER, CNRS, Université de Bretagne Occidentale, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes - UMR6197, Ifremer, Centre de Brest CS10070, Plouzané, France.

[3]Aix Marseille Université, Centrale Marseille CNRS, iSm2 UMR 7313, 13397, Marseille, France

Article en cours de préparation

2.1. Introduction

Deep-sea hydrothermal vents, discovered for the first time in 1977, represent complex ecosystem sheltering extremophilic life forms (Kelley et al., 2002; Kristall et al., 2006). These hydrothermal chimneys result from the infiltration of sea water in the sea-bed, heated by an underlying magma chamber and reacting with surrounding minerals to produce a hot hydrothermal fluid (ca. 300-400°C) rich in minerals and reduced compounds (H_2, H_2S, CO_2) This hot reduced fluid under pressure will move back to the surface to precipitate in contact with the cold (ca. 2°C) and oxidized surrounding seawater. These reactions form an area of intense mixing and severe thermal and chemical gradients allowing the development of a complex and extremophilic biosphere. During their formation, these ecosystems are considered as sterile because of the very high temperature of the effluent waters (Wirth, 2017). Therefore, the question of first colonizers of these newly formed hydrothermal chimney was studied and discussed (McCliment et al., 2005; Pagé et al., 2008; Wirth, 2017). It is now accepted that, in the absence of organic matter and light, only chemolithoautotrophs can grow in the first stage of colonization. They would use reduced compounds from hydrothermal fluid as energy source and carbon dioxide as carbon source to produce organic matter. Some studies have attempted to study the microbial diversity in newly formed chimney through formation of new chimney in mineral chambers and sampling units or on thermocouples placed in the hydrothermal fluid (McCliment et al., 2005; Pagé et al., 2008). They highlighted the presence of *Desulfurococcaceae,* mainly members of the genus *Ignicoccus,* and its symbiont *Nanaoarchaeum* in addition of *Thermococcus* sp. and *Methanocaldococcus* spp. This primary production of organic matter would subsequently supports the growth of a diversity of heterotrophs through complex trophic chain and microbial interactions (Flores et al., 2011b; Reysenbach et al., 2000). In addition to these enrichments of hyperthermophilic *Archaea*, recent study postulated and attempted to demonstrate that colonization of a newly erupted black smoker occurs by hyperthermophiles (Wirth et al., 2018). It has been shown the ability of two hyperthermophilic species - from *Thermococcales* and *Methanococcales* - to swim to mineral surface, scanning the surface to find best temperature condition and finally adhere directly to it by mechanisms that could be similar to bacterial pili IV.

Most of methods used to enrich these first colonizers in laboratory have postulated the use of reduced compounds from hydrothermal fluid as energy source. However, recent studies have shown the presence of an abiotic electrical current inside the chimney wall produced by chemical oxidation of hydrogen sulfide from hydrothermal fluid coupled with oxygen reduction from seawater (Yamamoto et al., 2017). Since, it has been made the hypothesis that this electrical current could be used as direct energy source by electroactive microbes. These microbes, extensively studied for 20 years, have the ability to perform external electron transfer to or from a conductive support for their metabolism (Lovley, 2012a). Microorganisms able to use direct electron flow as energy source are called electrotrophs. To allow the energetic metabolism of these specific microbes, electrons flowing through the metabolism have to be transferred to an electron acceptor as in standard respiration metabolism. In the literature, many studies have aimed to enrich these electrotrophs on the cathode of Microbial Electrochemical System (MES) from environmental samples (Fu et al., 2013b, 2015a; He and

Angenent, 2006; Luo et al., 2017), or in axenic culture (Aryal et al., 2017; Beese-Vasbender et al., 2015). However, it is only recently that we have performed enrichment of hyperthermophilic electrotrophs on hydrothermal vent samples (article in progress). It has been shown that the electron uptake from this abiotic electrical current coupled with carbon dioxide is sufficient to allow the growth of microbes called “electro-autotrophs” in hydrothermal context. The community obtained in the electrotrophic biofilm was mainly composed of archaea from *Archeoglobales* and *Thermococcales* with specificity of some species according to the electron acceptor used. However, is this first primary production enough to drive the development of a more complex biodiversity through food web and microbial interactions? Moreover, this raised the question of the importance of this electro-autotrophic ability in the theory of origin of life in hydrothermal context.

The aim of this study was to observe the possible development of a complex biodiversity with hyperthermophilic-electrotrophic microbes as primary producer of the ecosystem in condition similar to those assumed during the emergence of life in Hadean. To do so, the cathode chamber of a MES thermostated at 80°C was inoculated with a sample of hydrothermal chimney collected in Lucky strike hydrothermal field. We choose to use nitrate as electron acceptor for its importance in theory of origin of life in hydrothermal context. Indeed, despite the low concentration of modern diffuser like in Lucky Strike hydrothermal field (ca. 10-20µM), this compound is suspected to be really abundant in Hadean period when emergence of life is expected and potentially one of the first electron acceptor of life (Wong et al., 2017). In a first time, current and nitrate consumption were monitored during 1 month of culture, along with measurements of organic and gaseous compounds production and quantification by qPCR of dominant phylogenetic orders. In a second part, two subsequent subcultures were performed from spent media in a new sterile MES. 16S rDNA barcoding where performed at the end of each experiment to follow the communities during electrode colonization and microorganisms released in the liquid media.

2.2. Material and methods

2.2.1. Sample collection and preparation

A hydrothermal chimney was collected on the Capelinhos site on Lucky Strike hydrothermal field (37°17.0’N, MAR) during the MoMARsat cruise in 2014 (doi: 10.17600/14000300) led by IFREMER (France) on board R/V *Pourquoi Pas?* (Sarradin and Cannat, 2014). The sample (PL583-8) was collected and prepared in anaerobic conditions as previously described to inoculate a Microbial Electrochemical Systems (cf. Chapitre V - 3.3.1).

2.2.2. Electrotrophic enrichment in a microbial electrochemical system

A Microbial Electrochemical System (MES) was filled with 1.5 L of sterile mineral medium as previously described (Pillot et al., 2018) with 0.1 g/l of Cysteine-HCl and supplemented with 10mM Nitrate, continuously flushed with N_2:CO_2 (90:10, 100 ml/min) to anaerobic condition and set at 80°C and pH 6.0 throughout platform monitoring. The working electrode (WE) composed of 20 cm² of carbon cloth was poised at -590mV vs SHE using SP-240 potentiostats and EC-Lab software (BioLogic, France). The WE served as sole electron donnor for electrotrophs development. The system was inoculated with 8 g of crushed chimney

in anaerobic conditions. Current consumption was monitored via the chronoamperometry method with current density and counter-electrode potential measurements taken every 10 s. The potential of the WE was selected the lowest possible before apparition of abiotic current consumption. In order to evaluate the enrichment of biodiversity over time on the electrode (WE) and in the liquid medium (LM), three successive cultures were performed. For the first culture, shown in Figure IV-1, a fraction of a crushed chimney from the capelinhos site was used to inoculate the MES.

After 25 days of incubation, the electrode (C1-WE) and the liquid medium (C1-LM) were harvested. For the second culture, a new MES with sterile electrode was inoculated with 100 ml of the C1-LM in fresh mineral medium. The electrode (C2-WE) and liquid media (C2-LM) were harvested after enrichment. The third culture was performed with inoculation from 100 ml of C2-LM. Abiotic control without inoculation didn't show current consumption or nitrate depletion during the same time of experiment.

2.2.3. *Nitrate/Nitrite quantification*

Nitrate consumption was analyzed using a wet oxidation technique with automated colorimetry as described in (Aminot and Kérouel, 2007) after culture medium centrifugation at 14000 rpm for 5 min.

2.2.4. *Identification and quantification of organic compounds production*

To identify and quantify organics productions from the biofilm, samples of liquid media were collected every 24 to 48h and analysed by ^{1}H NMR Spectroscopy. Four hundred microlitres of each culture medium was added to 200 µl of PBS solution prepared in D2O (NaCl, 140 mM; KCl, 2.7 mM; KH2PO4, 1.5 mM; Na2HPO4, 8.1 mM, pH 7.4) supplemented with 0.5 mM of trimethylsilylpropionic acid-d4 (TSP) as NMR reference. All the 1D ^{1}H NMR experiments were carried out at 300 K on a Bruker Avance spectrometer operating at 600 MHz for the ^{1}H frequency and equipped with a 5-mm BBFO probe.

Spectra were recorded using the1D nuclear Overhauser effect spectroscopy pulse sequence (Trd-90°-t1-90°-tm-90°-Taq) with a relaxation delay (Trd) of 12.5 s, a mixing time (tm) of 100 ms and a t1 of 4 µs. The sequence enables an optimal suppression of the water signal that dominates the spectrum. One hundred twenty-eight free induction decays (FID) of 65,536 data points were collected using a spectral width of 12 kHz and an acquisition time of 2.72 s. For all the spectra, the FIDs were multiplied by an exponential weighting function corresponding to a line broadening of 0.3 Hz and zero-filled before Fourier transformation. NMR spectra were manually phased using Topspin 3.5 software (Bruker Biospin Corporation) and automatically baseline corrected and referenced to the TSP signal (δ = -0.015 ppm) using Chenomx NMR suite (version 7.5) software (Chenomx Inc.). A 0.3 Hz line-broadening apodization was applied prior to spectral analysis and ^{1}H-^{1}H TOCSY (Bax and Davis, 1985) and ^{1}H-^{13}C HSQC (Schleucher et al., 1994) experiments were recorded on selected samples in order to identify the detected metabolites. Quantification of identified metabolites was done using Chenomx NMR suite (version 7.5) software (Chenomx Inc.) using the TSP signal as internal standard.

2.2.5. Biodiversity analysis

Taxonomic affiliation was performed according to (Zhang et al., 2016). DNA was extracted from 1 g of the crushed chimney and at the end of each period of culture from the scrapings of half of the working electrode and from centrifuged pellets of 50 mL of spent media. DNA extraction was carried out using the MoBio PowerSoil DNA isolation kit (Carlsbad, CA). The V4 region of the 16S rRNA gene was amplified using the universal primers 515F (5′-GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3′) and 806R (5′-GGA CTA CNN GGG TAT CTA AT-3′) (Bates et al., 2011) with Taq&Load MasterMix (Promega). PCR reactions, amplicons sequencing and taxonomic affiliation were carried as previously described (Pillot et al., 2018). To analyze alpha diversity, the OTU tables were rarefied to a sampling depth of 13190 sequences per library, and three metrics were calculated: the richness component represented by number of OTUs observed, the evenness index (Pielou's index) which measures distribution of individuals within species independently of species richness and the Shannon's biodiversity index. Rarefaction curves for each enrichment approached an asymptote, suggesting that the sampling depths were sufficient to capture overall microbial diversities in the studied samples. The raw sequences for all samples are present in European Nucleotide Archive (accession number: XXXXXXX).

2.2.6. Microscopy observation with fluorescent in-situ hybridization

Prior to perform microscopic observation, the working electrode from the end of each experiment was fixed with 2% paraformaldehyde and kept at 4°C. To highlight the presence and abundance of microbes from different domain and order, fluorescently labelled (CY3, FITC) probes (Biomers.net GmbH, Germany) were used to label nucleic acids (Syto9), *Bacteria* (EUB338-FITC), *Archaea* (ARCH917-CY3), *Euryarchaeota* (Eury806), *Crenarcheota* (Cren537), *Thermococcales* (Tcoc164) and *Archeoglobales* (Arglo32) (Rusch and Amend, 2004; Teira et al., 2004). Samples of working electrode or cells on filter were incubated with fluorescent probes in an equilibrated humidity chamber at 48°C for 2–6 h and then wash with washing buffer at 42°C for 15min. Samples were then dried in 80% ethanol and mount on glass slide with antifadent AF1 (Citifluor, USA) added with 4'-6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma Aldrich) for counterstain at a final concentration of 2 $\mu g.ml^{-1}$. Samples observation were performed on a confocal LSM780 microscope (ZEISS, Germany) equipped with a x10, EC PLAN-NEOFLUAR objective. Blue, green and red fluorescence emissions were acquired by excitation at 358, 488 and 561 nm, respectively, using three lasers. Image stacks (at 0.5–1 µm steps) were acquired with GaAsP photomultiplier tube detectors. Epifluorescence micrographs were processed using the Zen software (Zeiss, Germany).

Table IV-1: 16S rRNA primer for qPCR quantification of Bacteria, Archaea, specific phylogenetic orders and 16S rRNA labelled probes for FISH Microscopy

qPCR PRIMERS				
Target	**Name**	**Sequence**	**T_{hyb}**	**Ref.**
Bacteria	GML5F	GCCTACGGGAGGCAGCAG	55°C	(Michotey et al., 2012)
	Univ516	GTDTTACCGCGGCKGCTGRCA		
Archaea	Arc931F	AGGAATTGGCGGGGGAGCA	62°C	(Einen et al., 2008)
	m1100R	BTGGGTCTCGCTCGTTRC C		
Thermococcales	Tcoc_F959	CGTGAGGCGTCCACTTAAGTGTGGT	63°C	This study
	Tcoc_R1233	GATGATGACRCGCGGGTACTAGGG		
Archaeoglobales	Arglo_F1077	CGGGCAACGGCAGGTCCGTATG	62°C	
	Arglo_R1191	GTTGCAGCCCTCGATCCCAGGT		
Desulfurococcales	Univ516F	TGYCAGCMGCCGCGGTAAHAC	61°C	
	DSC_748R	AACASYTAGCCCGCATCGTTTACAGCC		
Thermales	Therma/Deino_341F	GGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTC	59°C	
	Univ516R	GTDTTACCGCGGCKGCTGRCA		
FISH PROBES				
Target	**Name**	**Sequence**	**Label**	**Ref.**
Bacteria	EUB338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	FITC	(Rusch and Amend, 2004)
Archaea	ARCH917	GTG CTC CCC CGC CAA TTC	CY3	
Euryarchaeota	Eury806	CAC AGC GTT TAC ACC TAG	CY3	
Crenarchaeota	Cren537	TGA CCA CTT GAG GTG CTG	CY3	
Thermococcales	Tcoc164	CAV RCC TAT GGG GGA TTA GC	FITC	
Archaeoglobales	Arglo32	TTA GTC CCA GCC GGA TAG CA	FITC	

2.2.7. Quantitative PCR of phylogenetic orders

Quantification of *Bacteria*, *Archaea* and specific phylogenetic orders retrieved in MiSeq analysis were carried out by qPCR method. SsoAdvanced™ Sybr Green Supermix was used on a CFX96 Real-Time System (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, CA) with the primers specified in Table IV-1. 16S rRNA primers were specifically and manually designed for quantification of most represented orders using MEGA6 Software (Tamura et al., 2013) and 16S rRNA reference sequences from Silva database (http://www.arb-silva.de). Newly designed primers were validated *in silico* on TestPrime software (https://www.arb-silva.de) and on different cultures of species belonging or not to targeted order. The PCR program was composed of a 5min initial denaturation step at 98°C followed by 50 cycles of 10s denaturation step at 98°C, a hybridization step of 20 s at temperature indicated in table 1 and a 40 s elongation step at 72°C, with melting curves generated at the end of each reaction to ensure product specificity. A standard curve from 10^2 to 10^{10} 16S rRNA gene copies was obtained by diluting pGEM-T plasmids harboring 16 rRNA gene fragments specific to bacteria, archaea or specific members of each order. qPCR quantification were compared to quantification on 1ml culture of targeted species filtered on 0.2µm filter and stained with DAPI. Average cell count per ten optical field has been reported to the total area of the filtration zone and then to 1ml of culture. Results of qPCR were expressed in number of 16s rRNA gene copies per per milliliter of liquid media. Due to the qPCR protocol, a minimum threshold of detection of 3 $\log_{10}$/ml was observed.

2.3. Results

2.3.1. Current and Nitrate consumption.

Firstly, a control in open circuit conditions (without current on the electrode) was carried out by inoculating a chimney fragment at 1.5 % into the mineral medium without other electron sources. No growth was observed after four days of culture. Thus, the only reducing power will be provided by means of the cathode to allow growth. To allow the enrichment of electrotrophs microorganisms respiring on nitrate, a MES was filled with synthetic seawater with the poised cathode (-590 mV vs SHE) as sole electron donor, carbon dioxide as sole carbon source and nitrate as sole electron donor. Representative curves of nitrate, nitrite and current variations are reported Figure IV-1. The nitrate reduction can be divided in two phases. During the first 4 days, the nitrate is consumed (from 4 mM to 0.22 mM) correlated with low production of nitrite (up to 1mM). After day 4th, a slow consumption of nitrite (from 1mM to 0.33mM) was observed until the 12th day. During these first two phases, a slow increase of current consumption was measured (up to -180 mA m^{-2}) while nitrate and nitrite are consumed. Then, a drastic increase of current consumption was observed to reach -750 mA/m² during day 20th. At day 22, the addition of 2 mM of nitrate, which is rapidly reduced, has allowed to reach back the maximum current consumption (-765 mA/m²) before quick drop again.

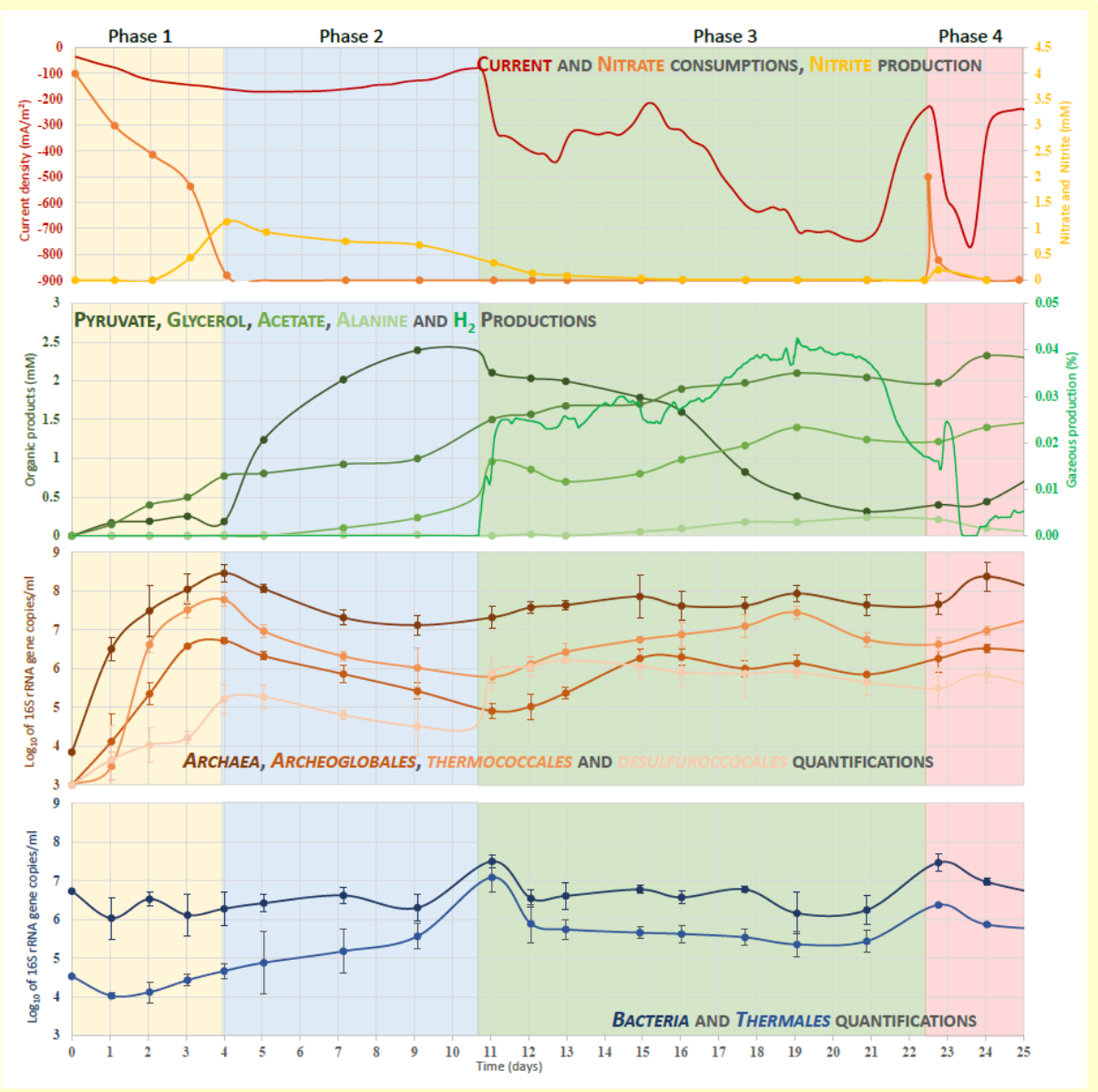


Figure IV-1 : Consumption, production, and microbial 16S genes quantification over time of the enrichment of Nitrate-reducing eletrotrophic community in Microbial Electrochemical System.

2.3.2. *Electrosynthesis of organic compounds.*

During the growth of nitrate-reducing electrotrophic community, different organic compounds were released in the liquid media (Figure IV-1B). Analysis of liquid samples over time by RMN method allowed to identify and quantify the production of significant amount of acetate, glycerol, pyruvate and alanine. Glycerol was continuously and slowly produced over time to reach 2.3 mM at day 24th. Pyruvate started to be produced at day 4^{th,}, to reach a maximum of 2.4 mM at day 9th followed by a decrease (until 0.25 mM; day 21st) due to a microbial consumption over time. This pyruvate production occurred following the total depletion of nitrate in the liquid media. Acetate started to be produced at day 11th to reach a maximum (1.4 mM; day 19th) correlated with the pyruvate decrease, the current consumption and H_2 production. Moreover, a low production of alanine was detected after day 11th to reach a maximum (0.12 mM; day 21st) and decrease later.

H_2 production has appeared strongly related to the variation of current consumption. This production has increased quickly in 24h (0.025 ml.min-1), is stayed stable for 5 days and then slowly increased to reach a maximum (0.04 ml.min-1; day 19). This production decreased from day 21st, correlated with the depletion of the pyruvate leading to the decrease of current consumption (-220 mA/m²; day 22nd). The addition of 2 mM of nitrate (day 22.4) was followed by a peak production of H_2 (0.025 ml/min; day 23rd), to disappear quickly in 8h.

Others organic compounds have been produced during this experiment. Peak of production of methanol and ethanol was measured at day 4th (9 mM and 0.16 mM respectively, data not shown). Moreover, slow production of acetamide (maximum of 69 µM at day 12th), benzoate like molecule (slow increase up to 0.13 mM at day 21th), 2-aminoisobutyric acid (maximum of 22 µM at day 12th) and formate (variations between 8 to 70 µM between days 1 and 4) were also observed over the experimentation period (data not shown).

These H_2 and organic compounds productions were not observed in abiotic control with nitrate, meaning that this production is catalyzed by the growth of microorganisms on the electrode. Moreover, the inoculum shows only poor organic composition (less than 60 µM of pyruvate, glycerol and glucose observed by NMR method) which has been inoculated at 1% (v/v) in our experiment.

2.3.3. Enrichment over time of dominant phylogenetic orders.

To identify the role and succession of each significant order in the development of electrotrophic community, a quantifications by qPCR of amplified 16S rRNA gene by specific primer couples of *Bacteria* (Michotey et al., 2012), *Archaea* (Einen et al., 2008) and primers designed in this study, specific of orders *Thermococcales*, *Archeoglobales*, *Desulfurococcales* and *Thermales* (Table 1, Figure IV-1C&D). These quantifications were performed on harvested liquid samples over time. Due to the presence of only the electrode as energy source, microorganisms found in liquid media necessarily arise from on-electrode biofilm release. During the first 4 days, a quick increase of archaeal 16S rRNA gene copies was observed (from 3.8 to 8.4 $\log_{10}$), simultaneously to the increase of *Thermococcales* during 4 days (from <3 to 7.8 $\log_{10}$) and *Archeoglobales* during 2 days (from <3 to 6.7 $\log_{10}$). These increases corresponded to nitrate reduction and nitrite accumulation. Between days 3 and 4 *Desulfurococcales* 16-rRNA-gene copies have increased correlated to the acceleration of the nitrate reduction and nitrite production. No increase of bacterial 16S-rRNA-gene copies was observed during this period. From 3 to 11 days, *Archeoglobales, Desulfurococcales* and *Thermococcales* 16S-rRNA-gene copies slowly decreased of 1-1.5 $\log_{10}$ at the same time as the pyruvate accumulation in the liquid media. During this period, the *Thermales* 16S-rRNA-gene copies, increased (from 4 to 7 $\log_{10}$) related to the nitrite reduction. From 10.8 to 22.5 days, corresponding to the pyruvate degradation and the production of acetate, hydrogen and alanine (fermentation products), has been observed the enrichment of *Thermococcales* and *Desulfurococcales* species while other orders slowly decreased or maintained in the liquid media. It is worth noting that *Archaeoglobales* species increase also between days 11 and 13 correlated to the weak degradation of acetate (from 1 mM to 0.6 mM). Finally, during the last

days, the nitrate addition allowed the specific enrichment of heterotrophic *Thermales* species in a first time followed by *Archeoglobales* species.

2.3.4. Statistical analysis of correlation between variables.

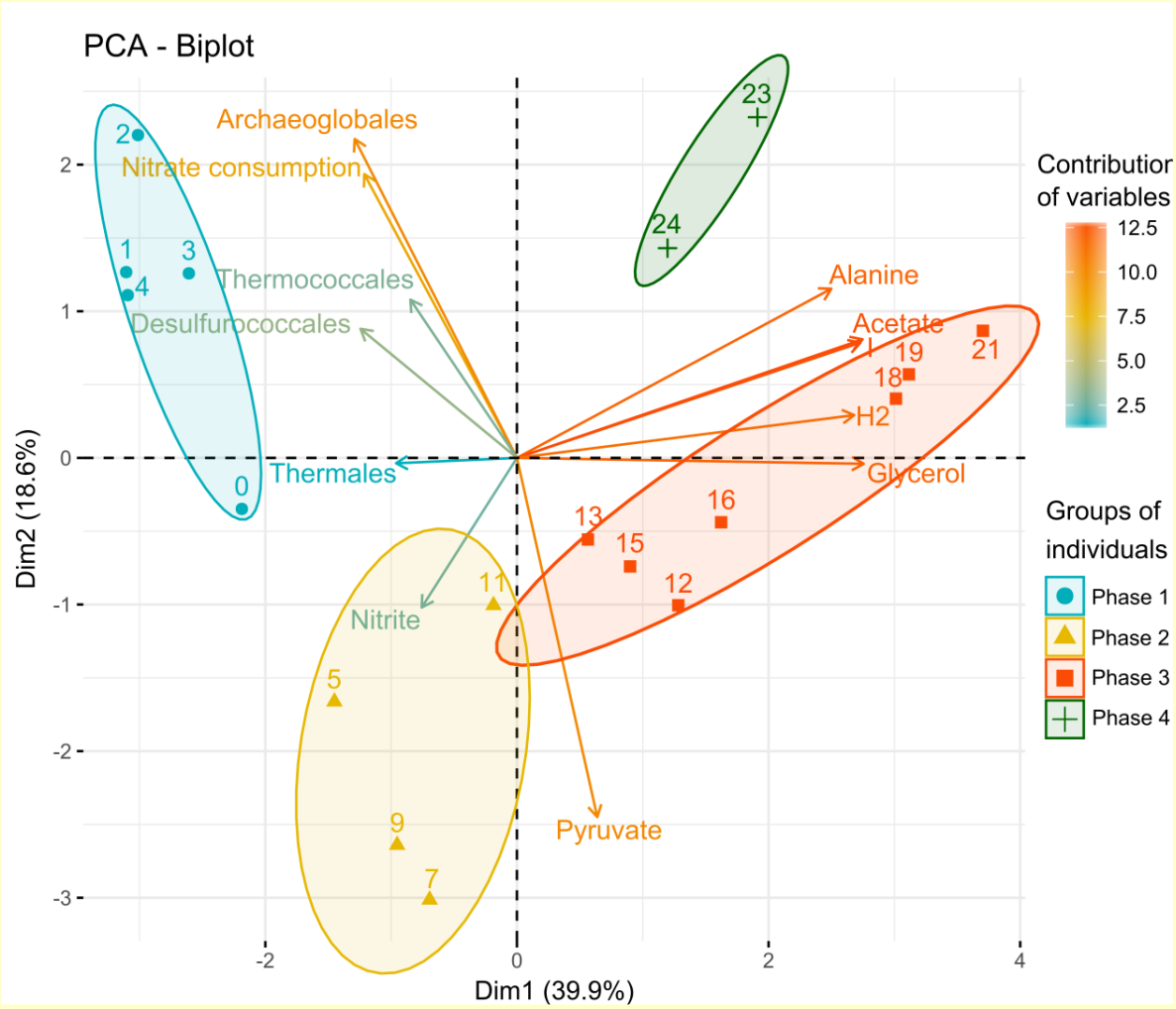
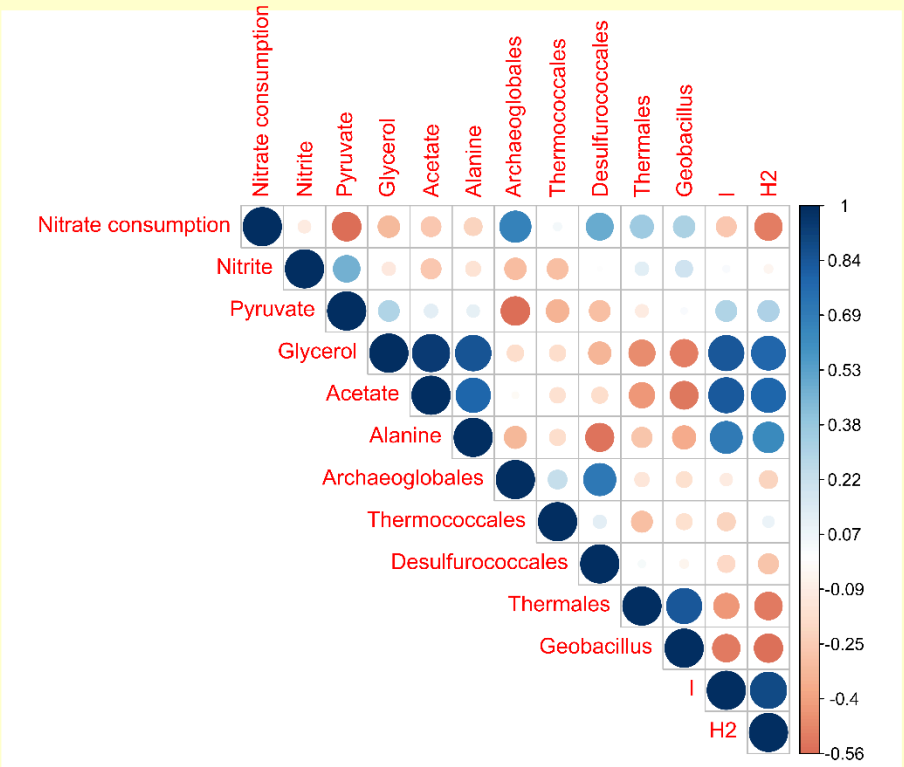


Figure IV-2 : PCA Analysis of nitrate, nitrite, organic measurements and evolution of qPCR quantifications of dominant phylogenetic orders as variables over the days of culture as samples. A) 4 groupes of samples were made according to their distribution along the two firsts principal components. B) Contribution to each variable in the building of the principal component.

To study the correlation between the different variables measured during the experiment and presented in Figure IV-2, a PCA analysis was performed on the evolutions of current, nitrate-, nitrite- and organics concentrations as well as qPCR results. The Figure IV-2 represent the distribution of each sample (represented by the day number post-inoculation) on a Biplot composed of the two first dimensions, explaining respectively 37.7% and 17.9% of total variances with the representation of the contribution of each variable on the Biplot. These two dimensions allowed to discriminate four temporal groups, called phases in this study. The first phase was represented by samples from 0 to 4 days of culture, mainly explained by the *Archeoglobales* evolution and the nitrate consumption but also inversely correlated with pyruvate and fermentation products (Supplementary Figure IV-3). The second phase between

days 5 to 11, is mainly explained by the evolution of *Thermales,* nitrite and accumulation of pyruvate. The third phase from 12 to 22 days, mainly explained by the first dimension, was linked with fermentation products accumulation (alanine, acetate, H_2) and current consumption. Finally, the fourth and last group, represented by the samples of day 23 and 24, was significantly different from each other groups but didn't link specifically with some parameters. It is worth noting that the contribution of Thermococcales and Desulfurococcales was very weak in the building of the 2 dimensions of the PCA. Indeed, there evolutions could not be linked to one temporal group by the PCA analysis. This can be explained by their evolution in more than one phase or independently of other variables.



Supplementary Figure IV-3 : matrix of correlation between the different variables of the PCA analysis

2.3.5. Microscopic observation of electrotrophic biofilm.

Confocal observation of electrotrophic biofilm on electrode of the first experiment was performed with FISH probes specific to *Bacteria*, *Archaea*, *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Thermococcales* and *Archeoglobales* (Figure IV-4). It allowed to highlight the preferential presence of *Bacteria* (*Thermales*) and *Archeoglobales* in the depth of electrode (Figure IV-4A and E), while *Thermococcales* and *Crenarchaeota* (*Desulfurococcales*) (Figure IV-4C and D) are growing mostly on the external surface of the electrode. These observations suggest the colonization of nitrate reducing microorganisms (e.g. some *Archeoglobales* and *Thermales*) in the depth of the electrode while fermentative microbes (e.g. *Thermococcus* and *Thermodiscus* sp.) growth in peripheral of this colonization.

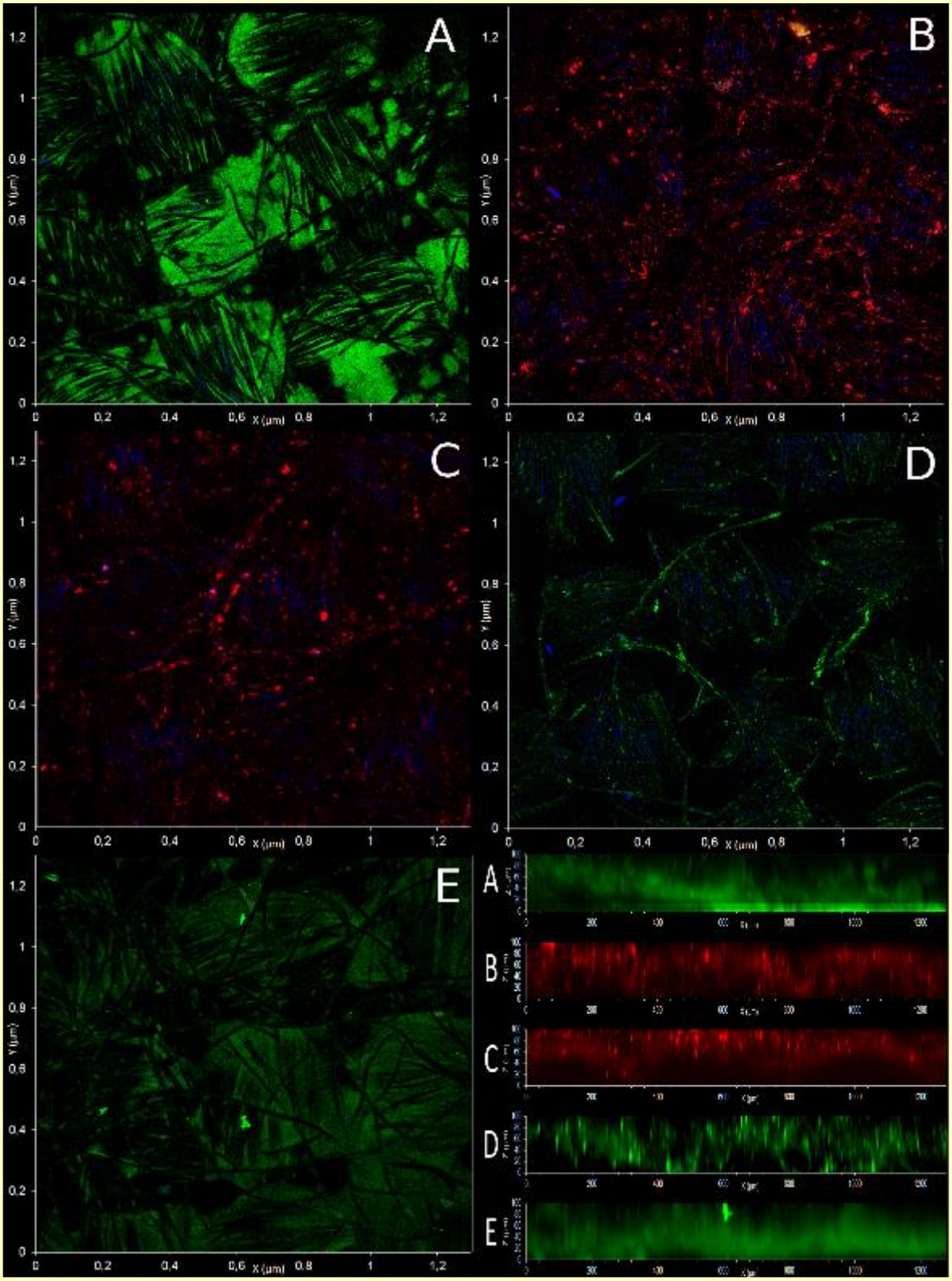
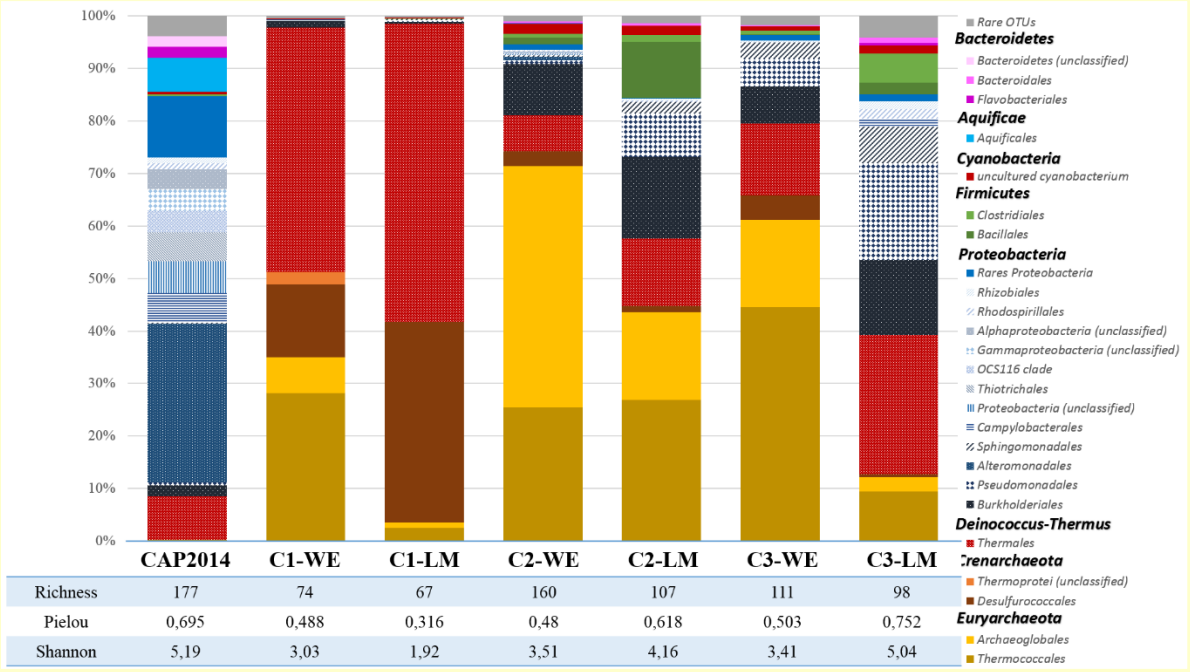


Figure IV-4 : Confocal observation and depth profile of biofilm stained with FISH probes specific to Bacteria (A, green), Euryarchaeota (B, red), Crenarchaeota (C, red), Thermococcales (D, green) and Archeoglobales (E, green) at x100. Blue signal correspond of the reflectance of carbon fiber.

2.3.6. Biodiversity on electrode and liquid media over experiments.



	CAP2014	C1-WE	C1-LM	C2-WE	C2-LM	C3-WE	C3-LM
Richness	177	74	67	160	107	111	98
Pielou	0,695	0,488	0,316	0,48	0,618	0,503	0,752
Shannon	5,19	3,03	1,92	3,51	4,16	3,41	5,04

Figure IV-5 : Dominant taxonomic affiliation at order level and biodiversity indices of microbial communities from a crushed chimney sample, as plotted on the working electrode (WE) and liquid media (LM) over the subcultures. OTUs representing less than 1% of total sequences of the samples are pooled as 'Rare OTUs'.

In order to evaluate the enrichment of biodiversity over time on the electrode (WE) and in the liquid medium (LM), two regular subcultures (cf. Material and methods) were performed once the current-density consumption decreased back to the basal current. To identify the microbes present on electrodes (C1-, C2- and C3-WE) and in liquid media (C1-, C2- and C3-LM), a microbial diversity study through sequencing of the hypervariable V4 region of 16S rRNA gene have been performed at the end of each enrichments (Figure IV-5). While the environmental sample showed a large biodiversity with a good relative evenness (Shannon index = 5.19 and Pielou's evenness index = 0.695), the three cultures have shown an increase of the enrichment of microorganisms mainly in the liquid media (Shannon indexes: C1-LM=1.92; C2-LM=4.16, C3-LM=5.04). The relative evenness in these enrichments showed equally a good distribution of species (evenness indexes: C1-LM= 0.316; C2-LM=0.618; C3-LM=0.752). However, the enrichment on electrode remained equivalent over the subcultures (Shannon index ~3.3 and evenness index ~0.49).

Based on average abundance analysis, the microbial diversity in the first culture (C1-WE and C1-LM) was mainly dominated by species belonging to 4 orders: *Thermococcales* (28.2 – 2.5 %), *Archeoglobales* (6.8 – 1 %), *Desulfurococcales* (13.9 - 38.1 %) and *Thermales* (46.5 – 56.8 %) respectively on electrode and in liquid media. The remaining biodiversity represent only 0.46 % on electrode and 0.16% in liquid media, shared between *Proteobacteria*, *Firmicutes* and *Actinobacteria* species. The 2nd enrichment (C2-WE and C2-LM) showed specific enrichment of *Archeoglobales* on electrode (45.8%) and in liquid media (16.8%). Moreover, the *Thermococcales* remained stable on electrode (25.5%) while it enriched in liquid media (26.8%). By contrast, the proportions of *Desulfurococcales* (2.8 – 1.2%) and *Thermales*

(6.85% - 12.7%) have drastically dropped on electrode and liquid media. Interestingly, we observed an increase of the remaining biodiversity with enrichment of *Burkholderiales* (9.75% - 15.64%), *Pseudomonadales* (8.22% only in liquid) and *Bacillales* (10.7% only in liquid) in this second subculture. Finally, the last enrichment (C3-WE and C3-LM) showed the massive enrichment of *Bacteria* in liquid media (87.3%), mainly affiliated to *Thermales* (26.4%), *Burkholderiales* (14.3%), *Pseudomonadales* (18.4%), *Sphingomonadales* (6.9%) and *Clostridiales* (5.46%) while the composition of the biofilm on electrode is substantially the same as in the second enrichment. The taxonomic affiliation of dominant OTUs obtained by Illumina-based analysis (MiSeq; 290 bp) has allowed identifying the *Thermococcales* as closely related to around twenty *Thermococcus* spp., *Archeoglobales* to *Geoglobus ahangari* strain 234 (99%), *Archaeoglobus sp.* Fe70 (99%), and Ferroglobus placidus (98%) and *Desulfurococcales* to *Aeropyrum* sp. AF1T6.18 (98%) and *Thermodiscus maritimus* (97%). For *Bacteria*, *Thermales* are composed of 2 OTUs, mainly affiliated to *Vulcanithermus mediatlanticus* strain TR (99%) and a new species of *Thermaceae* (close at 95% to *Vulcanithermus* sp. BF2T511) respectively, *Bacillales* to *Geobacillus thermodenitrificans*, *Burkholderiales* to *Ralstonia* spp. and *Pseudomonadales* to *Pseudomonas* spp.

2.4. Discussion

2.4.1. Electrotrophic hyperthermophilic nitrate reduction

In order to understand the different metabolisms and trophic relations which were set up starting from the electrotrophic community on electrode, different parameters such as current and nitrate consumptions, organics production and quantification of 16S RNA gene copies from representatives of main phylogenetic orders were measured. The study of correlations between each parameter through PCA analysis (Figure IV-2) and the qualitative observations (Figure IV-1) allowed to separate the experiment in 4 phases. First of all, it is important to note that the sole energy source has been brought by the electrode. The control in open circuit potential didn't show a growth of the biodiversity present in our inoculum.

The first phase, from inoculation to day 4th, correspond to the nitrate reduction with a transient nitrite accumulation while current is consumed. This is related to the growth of *Archaeal* species, mainly *Archaeoglobales* followed by *Thermococcales* and *Desulfurococcales* species. Alongside, low production of organics is observed, mainly glycerol and pyruvate and a weak production of H_2 and CO_2. Some species of the order *Archaeoglobales* (*Geoglobus ahangari* and *Ferroglobus placidus*) have already been described as being capable of performing extracellular electron transfers by using an electrode as electron acceptor (Yilmazel et al., 2018). In our case the electrode serves as an electron donor and this is the first time that an electrotrophic growth has been observed for hyperthermophilic archaeal species. Among the three enriched orders, *Archaeoglobales* are the first species growing from CO_2 as carbon source and electrode as electron donor. The taxonomic affiliations of two dominant *Archaeoglobales* OTUs obtained after 24 days of growth are closely related to the three genus belonging to this orders: *Geoglobus* spp., *Archaeoglobus* spp. and *Ferroglobus* spp.. These three genera are known to perform a lithoautotrophic growth through the reductive acetyl-CoA/Wood-Ljundahl pathway. However, *F. placidus* is currently the only member of the *Archaeoglobales* which has been shown to be able to use nitrate as

electron acceptor accompanied of transient nitrite accumulation and production of N_2O (Vorholt et al., 1997). Nonetheless, a cluster of genes encoding a putative nitrate reductase has though been identified in *Geoglobus ahangari* and different *Archaeoglobus* spp. (Cabello et al., 2004; von Jan et al., 2010; 2014) but the physiological evidence of nitrate reduction is still missing in conditions of classical cultures. We can suggest here, that present *Archaeoglobales* (*Geoglobus* spp., *Archaeoglobus* spp. or *Ferroglobus* spp.) on electrode, used the nitrate as electron acceptor with cathode as reducing power allowing the production of organic compounds from CO_2 reduction during the first four days. These compounds could have served as carbon and energy source for different heterotrophic microorganisms.

Alongside, *Thermococcales,* whose OTUs were affiliated to 38 validated species of *Thermococcus*, increased during the first three days. All members of the *Thermococcales* are characterized by their ability to use complex or simple peptides as energy and carbon source by necessarily using elemental sulfur as electron acceptor (Schut et al., 2014). The breakdown of peptides and amino acids leads to the subsequent production of organic acids linked to substrate-level phosphorylation. However, many *Thermococcales* species can also grow by fermentation of various carbohydrates without the need for S° (Chou et al., 2007). The major fermentation products are acetate, H_2 and CO_2. However, we didn't observe the organic acid accumulation such as acetate despite the significant growth of *Thermococcales* (7.9 log) in liquid medium. Also, by contrast to *Archaeoglobales*, representatives of *Thermococcales* have never been shown to be able of nitrate reduction. Notwithstanding, some *Thermococcales* have been described as carboxytrophic which use the oxidation of carbon monoxide to produce CO_2 and H_2 (Lee et al., 2008; Sokolova et al., 2004). The carbonyl branch of the reductive acetyl-CoA pathway, present in *Archaeoglobales*, is known to start from the reduction of CO_2 to CO by a bifunctional CO dehydrogenase (CODH). In excess of electron donor or CO_2, CO can be released in liquid media (Seravalli and Ragsdale, 2000). In microbial electrosynthesis system, overfeeding of electron from the polarized cathode (here at -590 mV vs SHE) could favor the production and release of carbon monoxide by *Archaeoglobales* on the surface of the electrode, then diffusing in liquid medium. Indeed, significant amounts of CO have been measured during the first three days of culture. The transient and weak accumulation of H_2 and CO_2 could explain this metabolism described for several *Thermococcus* (Lee et al., 2008; Sokolova et al., 2004). However, autotrophic growth has not been demonstrated nor have autotrophic pathways been predicted in the available genome sequences. Indeed, carboxydotrophic growth required a source of organic carbon in the form of peptides (Bae et al., 2012; Oger et al., 2011) but we assume that the growth of *Archaeoglobales* could supply of organic carbon source through the excretion of extracellular polymeric substances which would promote *Thermococcales* growth. Another explanation, concerns the mechanism of Direct Interspecies Electron Transfers (DIET) already observed in various co-cultures (Lovley, 2017; Rotaru et al., 2014b). In this hypothesis, *Thermococcales* would have served as electron acceptor for *Archaeoglobales*, feeding *Thermococcales* with electrons for its metabolism. This suggests that the *Thermococcales* would be much more metabolically diverse than simple peptide and sugar-fermenting heterotrophs and would have the capacity to utilize additional energy sources present in hydrothermal vent systems such as the abiotic electron flux (Yamamoto et al., 2017).

Alongside with *Archaeoglobales* and *Thermococcales* growths and nitrate consumption, the growth of heterotrophic *Desulfurococcales* and *Thermales* have been observed. While only one species of *Desulfurococcales*, *Pyrolobus fumarri,* have been shown to reduce nitrate (Huber and Stetter, 2015), most of *Thermales*, such as *Vulcanithermus* spp, or *Oceanithermus* spp. are able to grow through Nitrate reduction or even some through nitrite reduction (Albuquerque and Costa, 2014). Moreover, some representatives of these orders, without functional evidence of nitrate/nitrite reduction, however exhibit genes encoding some enzymes of nitrate/nitrite reduction pathways. Indeed, representatives of *Desulfuroccocales*, such as *Aeropyrum pernix* have genes of dissimilatory nitrate reduction pathway (Cabello et al., 2004). Nevertheless, the delay before *Desulfurococcales* and *Thermales* growths suggest their heterotrophic growth from syntrophic relations. These trophic relations would have been set by (i) fermentation of organics produced and/or by (ii) partially performing the last step of the Dissimilatory Nitrate Reduction from nitrite produced by nitrate-reducing microorganisms.

2.4.2. Electrosynthesis of pyruvate

The second phase is marked by the increase of pyruvate production. Monitoring of microbial population and organic production allowed to show by PCA analysis that pyruvate production is inversely correlated with nitrate consumption and *Archaeoglobales* increase. Indeed, this effect occurred only from day 4th, while the nitrate reached its complete depletion and *Archeoglobales* stop growing. Thus, we can suggest that pyruvate production is attributed to lithoautotrophic *Archeoglobales* fixed on electrode, closely affiliated to *Geoglobus* spp., *Ferroglobus* spp. and *Archaeoglobus* spp. As previously mentioned, these *Archaeoglobales* use the Wood Ljungdahl pathway for carbon fixation through the bifunctional CODH/acetyl-CoA synthase complex, which allow to link methyl and carbonyl branches and enable acetyl-CoA production (Borrel et al., 2016). Acetyl-coA can be used directly for biosynthesis or converted to pyruvate by the reversible reaction of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFOR) [EC: 1.2.7.1] (Berg et al., 2010). This pyruvate is then used for biosynthesis through conversion to oxaloacetate by pyruvate carboxylase (Utter and Keech, 1963) which uses one mole of ATP. This conversion of CO_2 to Pyruvate uses reduced ferredoxins, normally regenerated by membrane hydrogenases. But, from 4th day, the electron acceptor (nitrate) has been totally consumed and in the presence of excess of electrons, continuously injected into the cells through the cathode (-590 mV vs SHE), the accumulation of reduced ferredoxins led to the production of pyruvate (Figure IV-6). This continuous production of pyruvate is however not enough energetic to allow the growth of the *Archaeoglobales*. However, *Archaeoglobales* seems to sustain during several days with new type of energetic coupling that remains to be fully explored. Interestingly, *Thermococcales* have stopped to grow while they are known to be able to perform pyruvate fermentation to acetate through the oxidative decarboxylation of the pyruvate by the pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (POR) (Blamey and Adams, 1993). The transient accumulation of nitrite could cause the inhibition of POR preventing the pyruvate fermentation as already observed to *Pyrococcus furiosus* (Blamey and Adams, 1993).

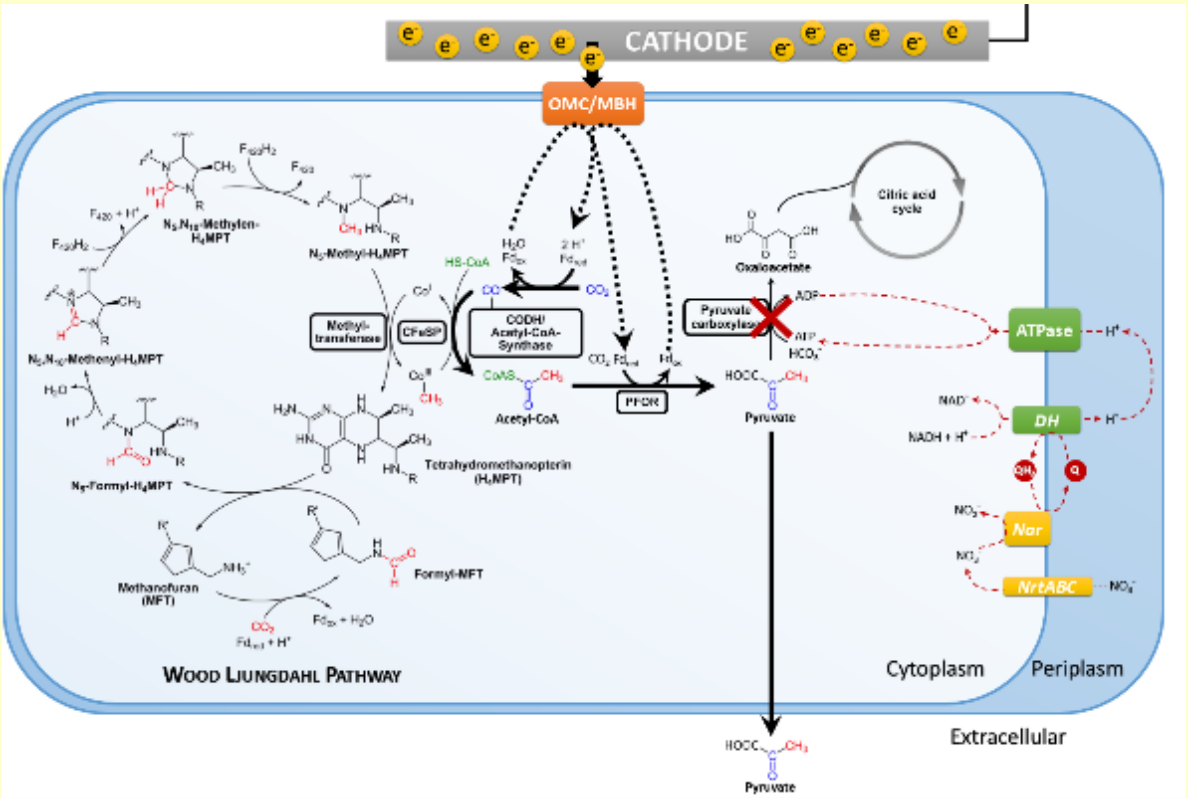


Figure IV-6 : Electrosynthesis pathway through the Wood-Ljungdahl carbon fixation pathway. Red dot lines represent the inhibition of those reaction in absence of electron acceptor such as Nitrate.

2.4.3. *Electrofermentation of pyruvate*

The third phase of our experiment is characterized by an increase of current consumption concomitant to a consumption of pyruvate and an increase of acetate, alanine and H_2 in liquid media or gaseous outlet. These compounds are characteristic of fermentation process by heterotrophic and fermentative microorganisms. During these phenomenon, two distinct populations increase in liquid media. First, members of *Desulfurococcales*, affiliated most probably to *Thermodiscus* sp., increase in liquid media from day 9th to 13th. *Thermodiscus* species are poorly studied but are described as obligatory heterotrophic *Crenarchaeota* able of sulfur respiration and fermentation on complex organic compounds (Huber and Stetter, 2006). The second population are *Thermococcales*, also known to be heterotrophic and fermentative *Euryarchaeota*, increasing from day 12th to 19th with a maximum current consumption of -750 mA m^{-2} and H_2 production of 0.04 ml min-1. Thermococcus species are known to be able to growth through pyruvate fermentation [39, 40], as from the moment when there is no more nitrite in the medium (11th day) to inhibit fermentation enzymes (Blamey and Adams, 1993). Interestingly, this fermentation from 11th day, is related to a current consumption and to the growth of *Archaeoglobales* in spite of the electron acceptors lack. A phenomena of DIET seems to have been developed between the fermentative microorganisms and *Archaeoglobales* species (Rotaru et al., 2014b). The microscopic observations (Figure IV-4) have shown the peripheral development of *Thermococcales* and *Desulfurococcales* on the electrode around *Archaeoglobales*, which were located in close contact with the carbon fibers. This spatial configuration would allowed a direct contact between electrode, *Archaeoglobales*

and fermentative microorganisms. Thus, *Thermococcales* would have served as electron acceptors for *Archaeoglobales* allowing their growth again, in absence of nitrate. The electron flow introduced by *Archaeoglobales* to *Thermococcales* would have led to the electrofermentation of pyruvate linked to current consumption and the production of acetate, alanine and H_2. Thereafter, this compounds could have been used as electron donor for *Archaeoglobales* (Brileya and Reysenbach, 2014), in addition to electrode's electron-downflow. Thus, the established DIET would have allowed the concomitant growth of *Archaeoglobales* and *Thermococcales* through electron transfer (11th to 13th).

2.4.4. *Trophic chain from electro-autotrophic nitrate reduction to heterotrophy*

In the 4th and last phase, the successive addition of nitrate after day 22nd, showed the concomitant course of the different metabolisms with consumption of nitrate, increase of heterotrophic then autotrophic nitrate-reducing microorganisms, alongside with the production of fermentation products (H_2 and acetate). This indicate that in mature communities, a metabolic plasticity is developed to allow trophic interaction between auto- and hetero-trophs but also respiring (including DIET) and fermentative microorganisms to allow their mutual survival in hardish and quickly-changing conditions in hydrothermal context (Figure IV-7).

2.4.5. *Development of microbial biodiversity from deep hydrothermal vents*

After the 4th phase, the electrode and the mineral medium of MES has been renewed then inoculated to 1% (v/v) with the harvested liquid media during the 4th phase. The current density has been followed during one week in the same previous conditions (nitrate, CO_2 and polarized electrode to -590mV vs. SHE), then the electrode and liquid media have been harvested to analyze the enriched biodiversity. Another similar culture was performed in the same conditions, by using the harvested liquid media of the previous culture. During all these culture, the electrode was the sole energy source. The MiSeq results exhibited the enrichment of a part of the biodiversity initially present in the inoculum. Subcultures of electrotrophic biofilm from successive planktonic cells allow the development over time of more and more diverse species in liquid media and on the cathode. These species growing late are affiliated to *Proteobacteria*, mainly members of *Burkholderiales*, *Pseudomonadales* and *Sphingomonadales*. These bacterial orders are only represented by heterotrophic species. Thus, their late development after the autotrophic condition of the experiment suggests trophic interaction between electro-autotrophic and heterotrophic species.

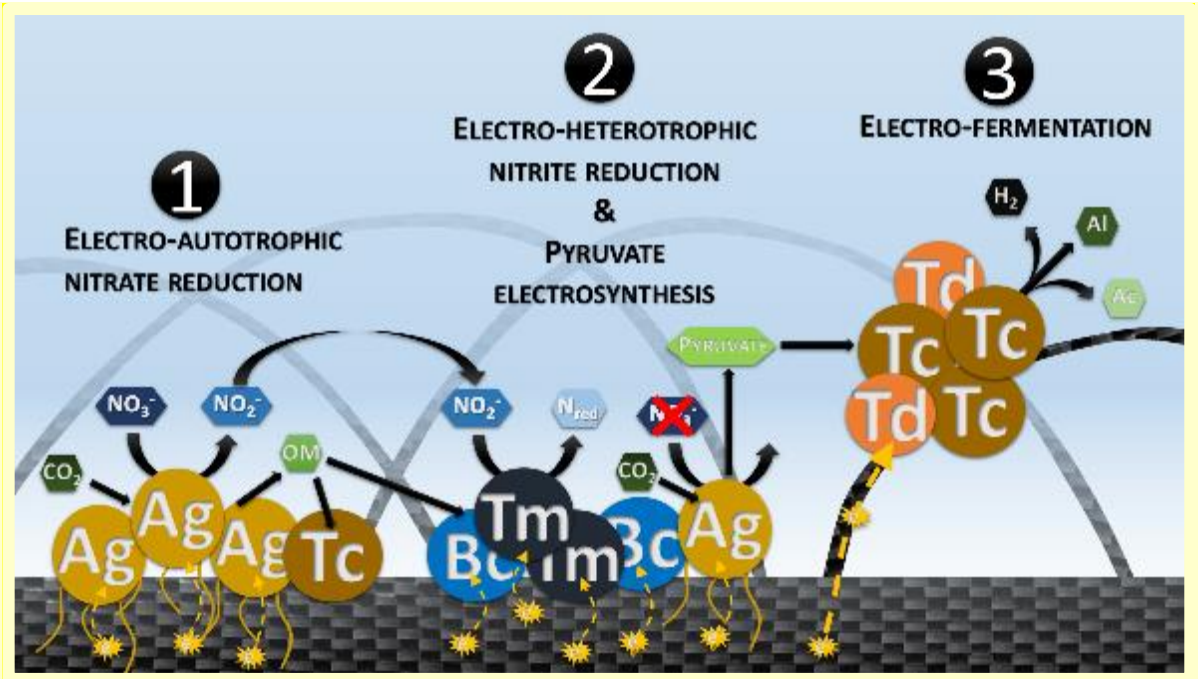


Figure IV-7 : Schematic representation of trophic chain model obtained from the monitoring of electrotrophic community enrichment.

As supposed by Yamamoto et al. 2017, electricity generation in deep hydrothermal systems is expected to affect surrounding biogeochemical processes and the development of microbial communities. Here, we have demonstrated that some microorganisms are able to directly use the available electrons on the surface of hydrothermal mineral deposits as an alternative energy source to other and conventional electron donor molecules, such as molecular hydrogen, hydrogen sulfide or methane. Thus some microbial populations, in particular belonging to the *Archaea* domain, can grow from electrons produced by the spontaneous and generalized production of electricity between the hydrothermal fluids and the seawater through the hydrothermal chimneys. This presence of those specific microorganisms, which can be described as electrolithoautotrophic microorganisms, allows to highlight a new trophic type considered as electrotrophic compared to the chemotrophic and phototrophic ecosystems found on our planet. In addition, the presence of DIET within the studied microbial populations, allows to extrapolate these results on a metabolic alternation in these ecosystems, which would permit the electroactive species of *Archaeoglobales*, *Thermococcales* or *Desulfurococcales* to maintain or grow according to the presence or absence of an electron acceptor. These microorganisms are also recognized as the first colonizers found in newly formed chimneys (McCliment et al., 2005; Pagé et al., 2008). Thus, this source of electronic energy would be one of the easily accessible energy means for these electroautotrophic microorganisms on the same basis as molecular hydrogen, hydrogen sulfide or methane for chemotrophic microorganisms. In the same sense, electroautotrophic microorganisms enriched at the beginning of our experiment and using the reductive way of acetyl-CoA show that pyruvate would certainly be one of the central molecules in the development of the heterotrophic microbial biocenosis of these extreme ecosystems. Finally, this electrosynthesis of pyruvate by deep-branching *Archaea* through the ancient WL pathway could be compared to prebiotic organic synthesis from inorganic compounds involved in origin

of life theories in hydrothermal context. Pyruvate could so have been key metabolite for proto-metabolisms and be a building-block for complex organic molecules synthesis. The constant production of electricity in the deep hydrothermal systems over time could have served as energetic driving force allowing the slow prebiotic synthesis reaction in a delimited space (organic micelles or mineral microcavity) to form the protometabolism and the protocell.

2.5. Acknowledgments

This work received financial support from the CNRS national interdisciplinary research program (PEPS-ExoMod 2016). The authors thank Erwan Roussel (LM2E, IFREMER Brest) for helpful suggestions, Céline Rommevaux and Françoise Lesongeur for sampling during the MOMARSAT 2014 cruise, the MIM platform (MIO, France) for allowing providing access to their confocal microscopy facility, and the GeT-PlaGe platform (GenoToul, France) for DNA sequencing. The project leading to this publication has received funding from European FEDER Fund under project 1166-39417. The authors declare no conflict of interest.

3. CONCLUSION SUR L'ELECTROTROPHIE HYPERTHERMOPHILE ET IMPLICATION DANS L'ORIGINE DE LA VIE

3.1. Courant électrique et colonisation primaire

L'un des objectifs de ces travaux de thèse était de montrer la présence de microorganismes hyperthermophiles électrotrophes au sein de source hydrothermale. L'étude sur l'enrichissement de communautés électrotrophes en SEM, avec une électrode polarisée comme seule source d'énergie (-590 mV vs SHE), le CO_2 comme seule source de carbone et les différents accepteurs d'électrons (nitrate, sulfate, oxygène et oxyde de fer (III)), a permis de confirmer la présence d'électrotrophes au sein des sources hydrothermales profondes. En effet, quel que soit l'accepteur d'électrons, nous avons observé le développement d'un biofilm conséquent sur la cathode permettant d'affirmer l'enrichissement d'électrotrophes à partir d'un support conducteur comme seule source d'énergie. Les conditions utilisées, mimant celles retrouvées au sein des sources hydrothermales (potentiel de la surface conductrice, pH, T°C, composition nutritive), nous permet de supposer que de tels mécanismes sont utilisés par certains microorganismes retrouvés dans ces écosystèmes. Ainsi nous pouvons affirmer avoir démontré la présence d'un nouveau type trophique, au même titre que la photo- ou chimio-trophie, définie comme de l'électrolithoautotrophie. Notre étude montre pour la première fois un enrichissement réel, en conditions environnementales, à partir d'une électrode donneuse d'électrons et de CO_2 comme seule source de carbone. A notre connaissance, tous les biofilms électrotrophes étudiés jusqu'à maintenant, nécessitaient une préculture préalable, avec des donneurs d'électrons moléculaires (H_2, acétate etc.) ou des conditions « artificielles » pour promouvoir la croissance (Beese-Vasbender et al., 2015; Nevin et al., 2011; Rabaey and Rozendal, 2010; Xiang et al., 2017).

Les biofilms électrotrophes enrichis dans nos conditions étaient composés principalement par une dizaine d'OTUs dominants, avec la présence systématique *d'Archaeoglobales* et de *Thermococcales*. En fonction de l'accepteur d'électrons utilisé, d'autres espèces spécifiques chimioorganohétérotrophes pour la plupart, (ex : *Thermales* nitratoréductrices ou *Pseudomonadales* et *Bacillales* aérobies) se sont développées. Dans toutes ces communautés, seules les *Archaeoglobales* sont décrites comme autotrophes. L'étude approfondie de l'enrichissement sur Nitrate (dynamique des populations microbiennes par qPCR) nous a permis de les identifier comme les premiers colonisateurs de l'électrode. Ces *Archaeoglobales* font partie des microorganismes retrouvés sur les jeunes cheminées hydrothermales, renforçant l'hypothèse que ce groupe phylogénétique serait l'un des premiers colonisateurs des cheminées hydrothermales profondes (Nercessian et al., 2003; Takai et al., 2004). Nous avons également montré que ces *Archaeoglobales* pouvaient produire des quantités importantes de molécules organiques, grâce à leur voie spécifique d'assimilation du CO_2. Par exemple, la voie de Wood-Ljungdahl qu'elles utilisent, permet une surproduction de pyruvate lorsque le biofilm est alimenté continuellement en électrons. Les ferrédoxines réduites impliquées dans les premières étapes de fixation du CO_2 sont régénérées de manière intensive et continue, par des systèmes protéiques membranaires électrotrophes. Ceci conduit à l'augmentation du pouvoir réducteur au sein des cellules microbiennes entrainant

irrémédiablement à la suractivité d'oxydoréductases nécessaires à la transformation du CO_2 en pyruvate et à la régénération du pool de ferrédoxines oxydées. Normalement, le pyruvate est transformé en oxaloacétate pour rentrer dans le cycle de Krebs et produire l'énergie nécessaire à la croissance par phosphorylation oxydative (respiration). Cependant cette étape de transformation du pyruvate en oxaloacétate nécessite une mole d'ATP. Ainsi, lorsque l'accepteur d'électrons devient limitant, la production d'ATP ralentit considérablement et cette étape de transformation du pyruvate en oxaloacétate est limitée, conduisant à une accumulation de pyruvate. On peut supposer que ce phénomène se produit également dans l'environnement très instable des sources hydrothermales, où les accepteurs d'électrons deviennent parfois limitants à la surface des cheminées, tandis que le flux d'électrons d'origine géo-électrochimique reste constant.

Cette production de molécules organiques permet par la suite le développement de plus en plus de microorganismes hétérotrophes, entrainant l'enrichissement de la biodiversité initialement présente. Les premiers hétérotrophes à se développer dans nos conditions sont les *Thermococcales* et les *Desulfurococcales*. Ces deux groupes phylogénétiques sont également très présents à la surface des jeunes cheminées hydrothermales (Nercessian et al., 2003; Takai et al., 2004). D'autre part, ces microorganismes hétérotrophes pourraient également profiter du courant électrique directement ou indirectement (DIET) comme source d'énergie, par électrohétérotrophie et/ou électrofermentation. En effet, des mécanismes de transfert direct d'électrons inter-espèce (DIET) se mettraient également en place au sein de la communauté, permettant le développement et le maintien d'un nombre important d'espèces présentant des capacités métaboliques diversifiées. Certaines espèces pourraient même améliorer les transferts électroniques au sein des biofilms électrotrophes par la production de nano-cristaux métalliques conducteurs, tels que des greigites par les *Thermococcales* (Gorlas et al., 2018), de la même manière que l'insertion artificielle de magnétite dans les biofilms électroactifs en applications biotechnologiques (Kato et al., 2012; Liu et al., 2015). Ces interdépendances et complémentarités de métabolismes pourraient permettre la survie de ces communautés dans les conditions extrêmes et changeantes des sources hydrothermales profondes.

Le mécanisme électroactif utilisé pour le transfert d'électrons de l'électrode à la cellule reste encore à être élucidé. Différents mécanismes ont été supposés dans la littérature, même si encore jamais démontrés, tels que le contact direct, l'utilisation d'un médiateur (artificiel ou physiologique) ou la production électrochimique d'un donneur d'électrons soluble (ex : H_2 par électrolyse) (Rabaey and Rozendal, 2010). Cependant, dans notre étude, des tests abiotiques dans les mêmes conditions n'ont pas montré de production d'hydrogène, même lorsque le potentiel de l'électrode est descendu à -1.2V vs SHE, favorisant normalement l'électrolyse de l'eau. En effet, dans notre cas, un élément de l'eau de mer, utilisée comme milieu de culture, semble réagir préférentiellement à l'électrolyse de l'eau, conduisant à un trouble du milieu sans détection d'H_2. Le milieu n'étant composé que de sels minéraux, une étude plus approfondie de cette réaction pourrait permettre d'identifier le composé réactif.

3.2. Un modèle hypothétique d'émergence de la vie par électrochimie dans les fumeurs acides

L'identification de microorganismes électrotrophes au sein des sources hydrothermales profondes modernes nous permet également de nous interroger sur l'ancestralité de ce métabolisme. En effet, les conditions globales des sources hydrothermales profondes ne semblent pas avoir beaucoup changé au cours du temps depuis la stabilisation de la Terre Primitive. Un courant d'origine abiotique était donc très probablement présent lors de l'émergence de la vie en contexte hydrothermal. De plus, les capacités électroactives sont réparties dans tout l'arbre du vivant procaryote (Koch and Harnisch, 2016), évoquant une ancestralité commune potentielle. Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'hypothèse de l'utilisation de ce courant électrique comme source d'énergie potentielle, pour l'émergence de la vie en contexte hydrothermal. En nous basant sur les processus déjà connus de synthèses prébiotiques, notamment ceux regroupées dans la théorie du monde fer-soufre, nous avons développé une hypothèse de mécanisme d'émergence de la vie en contexte hydrothermal acide ou mixte.

3.2.1. Fixation du CO_2 par électrochimie et autotrophie primitive

Dans toutes les hypothèses d'origine de la vie, il est nécessaire de s'intéresser au passage de l'inorganique à l'organique. Ces synthèses prébiotiques ont été étudiées depuis des décennies, mais restent encore une étape limitante de compréhension de l'émergence de la Vie. Depuis 1988, les travaux de Wächtershäuser et ses successeurs se sont intéressés à étudier les mécanismes de synthèse prébiotiques en contexte hydrothermal, mettant en évidence différentes réactions de polymérisation de matière organique, sans jamais réussir à montrer la réduction du CO_2 en condition réaliste. Cependant, une étude récente a montré que le courant abiotique au sein des cheminées hydrothermales pouvait conduire à la réduction de CO_2 en CO grâce à des catalyseurs en sulfures métalliques typiquement retrouvés dans ces environnements (Kitadai et al., 2018). Cette découverte alimente les hypothèses de production abiotique de molécules organiques par fixation du CO_2 dans une soupe primordiale, condensée à la surface des cheminées hydrothermales, et constituant les éléments de base pour la formation d'un organisme vivant. Ces synthèses prébiotiques auraient notamment pu permettre la production de molécules amphiphiles, se regroupant en micelles pour constituer les proto-membranes des premières cellules (Budin et al., 2009; Rushdi and Simoneit, 2001). Cependant, sans système énergétique pour constituer le proto-métabolisme, l'émergence de la vie n'aurait pas été possible. Il est donc nécessaire de s'intéresser à la mise en place d'un système énergétique viable.

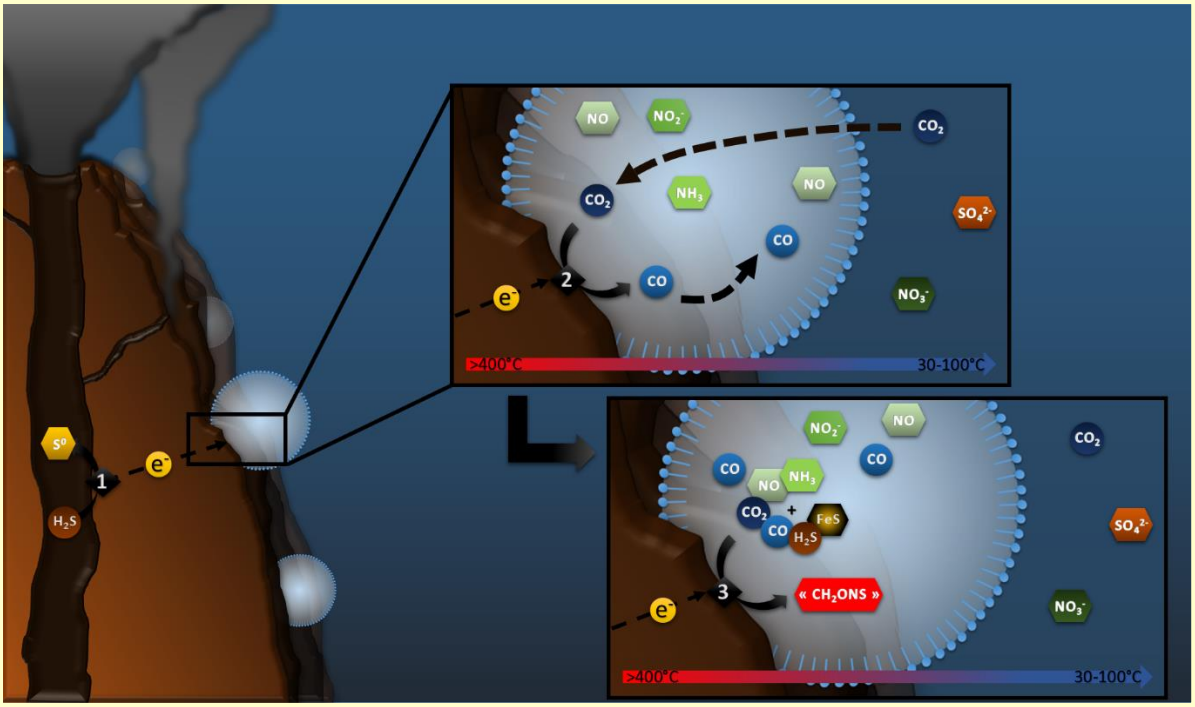


Figure IV-8 : Réduction géoélectrochimique du CO_2 en CO par le courant électrique d'origine abiotique des cheminées hydrothermales. Les molécules de CO produites sont supposées pouvoir réagir entre elles et avec d'autres molécules réactives pour former des molécules organiques de plus en plus complexes (symbolisé ici par « CH_2ONS »).

3.2.2. Un courant électrique comme source d'énergie pour la proto-cellule.

En 1944, Erwin Schrödinger évoquait déjà la nécessité d'un apport d'énergie constant provenant de l'environnement pour la synthèse de matériel biologique et la mise en place de fonctions biologiques pour l'émergence de la vie. De nombreuses études se sont intéressées à étudier les potentiels donneurs d'électrons disponibles en quantités suffisantes dans les sources hydrothermales profondes de la Terre Primitive.

La vie ne peut exister (et a fortiori émerger) qu'en étant alimentée par un apport d'énergie fourni en permanence par son environnement.

« What is life » (1944), Erwin Schrödinger

Basé sur la chimiosynthèse moderne, trois principales molécules furent identifiées comme suffisamment énergétiques (à bas potentiel) pour pouvoir servir de sources d'énergie au proto-métabolisme : le H_2, le CH_4 et l'H_2S (Deamer and Weber, 2010). Par la suite, l'H_2S fût considéré comme étant trop réactif pour permettre la synthèse et la maturation de molécules organiques. Pendant une dizaine d'année, l'H_2 fût considéré comme un bon candidat, donnant lieux aux hypothèses d'origine de la vie à partir des phénomènes de serpentinisation des fumeurs alcalins, très riches en H_2 (Russell, 2016, 2007). Finalement, ces dernières années, les hypothèses se tournent vers le CH_4, produit par des réactions de type Fischer-Tropsch à partir d'H_2 et CO_2, et pouvant servir aussi bien de source d'électrons que de carbone (Russell and Nitschke, 2017; Russell and Russell, 2018). Le débat continue donc

dans la communauté scientifique sur la source d'énergie la plus probable pour l'émergence du proto-métabolisme.

Avec la récente découverte des courants électriques au sein des sources hydrothermales profondes (Nakamura et al., 2010), une nouvelle source d'énergie potentielle a été identifiée. Cependant, jusqu'à présent, aucune preuve n'avait montré la croissance potentielle d'un microorganisme à partir de cette source d'énergie en condition hydrothermale autotrophe. Grâce aux résultats de ces travaux de thèses, nous avons démontré la capacité de microorganismes modernes à croître à partir d'un courant électrique externe, couplé à la fixation de CO_2 et la réduction d'un accepteur d'électrons définissant ainsi un nouveau type trophique : l'électrolithoautotrophie.

Pour certains chercheurs, le nitrate est considéré comme étant le plus probable accepteur d'électrons à l'origine de la Vie sur Terre (Ducluzeau et al., 2009; Russell et al., 2014). En effet, celui-ci aurait été produit par réactions photochimiques atmosphériques, déversant des quantités significatives de NO_3^- dans les océans, s'accumulant au fil des millénaires (Wong et al., 2017). Ainsi, en absence d'oxygène dans l'océan primitif, le nitrate, la molécule au potentiel le plus oxydé présent, aurait remplacé l'oxygène comme accepteur d'électrons pour la production du courant abiotique (Figure IV-9). En effet des études ont montré la réduction naturelle à 120°C en condition acide de nitrate en ammonium sur des particules de pyrite, constituant les sources hydrothermales profondes (Singireddy et al., 2012).

Comme évoqué précédemment, des proto-membranes se seraient très probablement formées par l'association de micelles de molécules amphiphiles à la surface des cheminées hydrothermales (Budin et al., 2009). L'incorporation de nanoparticules métalliques, de type FeS, dans ces membranes aurait permis la conduction des électrons de la cheminée vers l'intérieur de ces proto-cellules. Ces incorporations métalliques dans les membranes peuvent être assimilées aux sites actifs des métallo-enzymes modernes, tel que les cytochromes, notamment impliqués dans les transferts d'électrons extracellulaires des microorganismes modernes.

Ainsi la compartimentation de la réaction cathodique dans cette proto-membrane aurait été la première étape pour la mise en place d'un proto-métabolisme. Cependant, dans les organismes modernes, l'énergie produite par la réduction d'un accepteur d'électrons est utilisée pour transférer un proton à l'extérieur de la membrane cytoplasmique. Ceci crée une force proton-motrice alimentant l'ATP synthase pour finalement conduire à la production d'ATP, forme de stockage et de transport d'énergie intracellulaire. Cependant ce système apparaît déjà complexe et un système plus archaïque a probablement initié cette force proton-motrice.

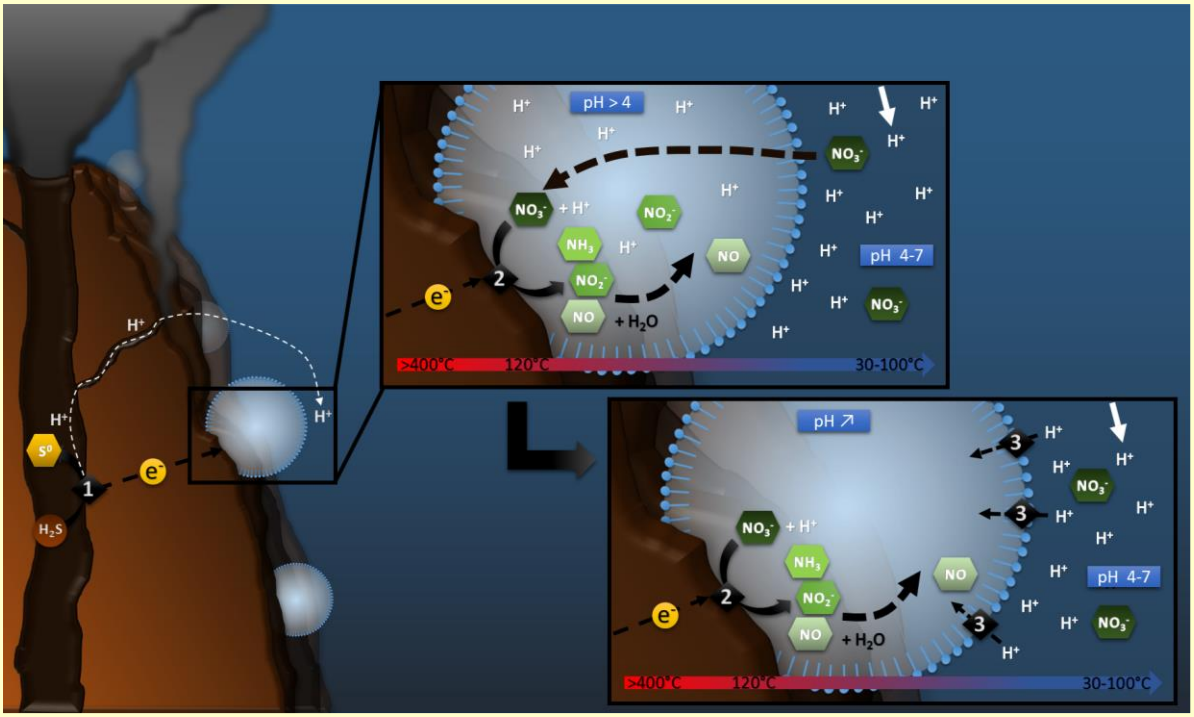


Figure IV-9 : Schéma de l'hypothèse de proto-métabolisme par électrotrophie. La réaction 1 correspond à l'étape d'oxydation de l'H_2S du fluide hydrothermal conduisant à la production du courant électrique et la libération de protons. La réaction 2 correspond à la réduction du nitrate en consommant les protons et les électrons du courant électrique. Le confinement dans un espace délimité par les proto-membranes semi-perméables conduit à la déplétion progressive en proton de l'espace intracellulaire en cas de réduction du nitrate plus rapide que le transport de proton à travers la proto-membrane. Cette différence de proton conduirait à créer une force proton motrice (réaction 3) pouvant être à l'origine des proto-systèmes d'ATP synthase.

3.2.3. Un gradient ionique électrochimique à l'origine de la force proton motrice.

Il est bien connu que dans tous systèmes électrochimiques, un transfert ionique s'opère entre l'anode et la cathode du système à travers l'électrolyte, de manière parallèle au transfert d'électron dans le circuit externe. L'utilisation de membranes ioniques pour séparer les deux électrodes peut freiner ce transport ionique et conduire à la création de différence de pH entre les deux compartiments. En effet, l'anode produit des protons lors de l'oxydation tandis que la cathode consomme ces protons lors de la réduction. Si le transport ionique est freiné, les protons s'accumulent à l'anode, diminuant le pH du compartiment anodique, alors que le pH du compartiement cathodique augmente par consommation des protons à la cathode.

La proto-membrane de la proto-cellule peut être assimilée à la membrane ionique séparant l'anode et la cathode. L'anode est représentée par la paroi interne de la cheminée où se déroule la réaction d'oxydation de l'H_2S (Réaction n°1, Figure IV-9), tandis que la cathode est représentée par la paroi externe de la cheminée où se déroule la réduction du nitrate médiée par la proto-cellule (Réaction n°2, Figure IV-9). Dans ce cas, la réduction de nitrate dans la proto-cellule, entraînerait la consommation « intracellulaire » de protons. Or la membrane micellaire semi-perméable pourrait limiter l'entrée de protons extracellulaires, permettant de créer un gradient de concentration d'H^+. La résultante de ce gradient de concentration et de potentiel électrique (incorporation de nanocristaux métalliques

conducteurs) aurait constitué le gradient électrochimique permettant l'établissement d'une force proton motrice (Réaction n°3,Figure IV-9) similaire à celle observée dans les microorganismes modernes. Le système moderne de transport des protons à l'extérieur de la cellule, nécessaire à la création de la force proton motrice actuelle, serait donc potentiellement apparu après la mise en place du système ATP synthase primitif, comme supposé dans les hypothèses d'origine de la vie dans les fumeurs alcalins (Lane, 2017). Le système ATP synthase se serait probablement construit autour du flux de proton naturel produit par la délocalisation des réactions d'oxydoréduction du proto-métabolisme par le phénomène géo-électrochimique.

3.2.4. La mise en place d'un métabolisme autotrophique primitif

Une fois la mise en place d'un système énergétique au sein de la proto-cellule, il est nécessaire maintenant, de s'intéresser au proto-système de fixation du CO_2 en molécules organiques. Dans nos expériences, nous avons démontré l'implication de la voie autotrophique de Wood-Ljungdahl. Cette voie autotrophique est considérée comme étant la plus ancienne, dont les gènes étaient présents chez LUCA (Nitschke and Russell, 2013) car la moins coûteuse en énergie (1 mole d'ATP). Une voie primitive similaire était donc probablement à l'origine de la fixation du CO_2 en matière organique. La voie moderne repose sur des métallo-enzymes et est composée de deux branches, (i) la branche du carbone et (ii) la branche du méthyl, permettant la formation de l'Acétyl-CoA. La branche du carbone est composée d'une CO déshydrogénase (CODH), transformant le CO_2 en CO, liée à l'Acétyl-coA synthase, combinant un CO, une coenzyme A et un méthyle pour former l'Acétyl-CoA. Cette branche est commune aux archées et bactéries. En revanche, la branche du méthyle diffère entre les archées (méthanogènes et *Archaeoglobales*) et les bactéries (acétogènes). Toutes les étapes de cette voie sont indépendantes de l'ATP et utilisent des ferrédoxines réduites pour permettre de transférer les électrons nécessaires à la réduction du CO_2.

Nos expériences ont montré que dans les conditions mimant les cheminées hydrothermales, le courant électrique avait un effet direct sur cette voie chez les *Archaeoglobales*. En effet, l'afflux constant d'électrons dans la cellule provoque une suractivité de cette voie d'assimilation du CO_2, par le renouvellement rapide et continu des ferrédoxines réduites, conduisant à l'accumulation de pyruvate dans le milieu. Les enzymes impliquées dans cette voie sont composées d'un site actif métallique (protéines fer-soufre contenant du nickel pour certaines), mais restent très complexes et sont le résultat d'une longue évolution. Cependant, une étude récente a montré la catalyse abiotique des réactions de cette voie par des métaux (Fe^0, Ni, Mo, Co, Mn) en conditions hydrothermales, conduisant à la production spécifique des différents intermédiaires métaboliques (acétate et pyruvate) de la voie de WL. Cette démonstration semble faire le lien entre les synthèses prébiotiques et la voie de WL, telle qu'elle est présente dans les colonisateurs primaires de cheminées hydrothermales modernes.

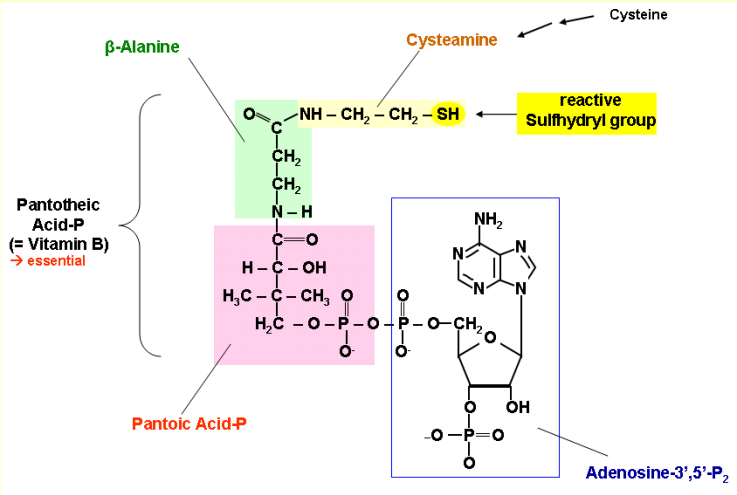


Figure IV-10 : Structure de la coenzyme A impliquée dans la production de l'Acétyl-coA

De plus, le pyruvate, produit en masse dans nos expériences, semble être un élément clé dans l'émergence de la vie. Patel et al. (2015) suggèrent que lors de l'émergence de la vie, les précurseurs des ribonucléotides, des acides aminés et des lipides proviendraient simultanément d'une seule source. Dans les organismes modernes, la synthèse de glucides et d'acides aminés est réalisée à partir du pyruvate résultant de la glycolyse ou de voie autotrophe de fixation du carbone. La synthèse de lipide quant à elle est initiée à partir de l'Acétyl-coenzyme A, molécule plus complexe (Figure IV-10) provenant de la décarboxylation du pyruvate par la PFOR. Ainsi, il est vraisemblable de considérer que le pyruvate pourrait avoir été la première molécule organique produite, conduisant par la suite aux autres molécules organiques par amination, polymérisation etc.

3.2.5. *Des sources hydrothermales alcalines aux sources hydrothermales électrifiées*

Une fois cette hypothèse d'émergence de la vie posée, il est nécessaire de s'intéresser à sa vraisemblance comparée aux autres hypothèses actuelles. L'hypothèse que nous posons est à différencier de celle situant l'origine de la vie dans les sources hydrothermales alcalines. En effet ces dernières sont principalement composées de carbonates dus à l'absence de contexte magmatique, apportant les composés soufrés à l'origine de la formation de pyrite dans les sites acides ou mixtes. Or les carbonates ne sont électriquement pas conducteurs et ne contiennent pas assez de particules métalliques pour permettre une conduction électrique à longue distance. Toutefois, l'hypothèse de l'origine de la vie dans les sources hydrothermales alcalines, plutôt qu'en milieu acide, repose sur plusieurs points qu'il est nécessaire de réviser sous un nouvel éclairage :

3.2.5.1. La source d'énergie

La réaction de serpentinisation, à l'origine des sources alcalines, produit de l'H_2 en grande quantité pouvant être transformé en CH_4 et acétate par des procédés de type Fischer-Tropsch. Ces molécules auraient alors fourni l'énergie nécessaire au proto-métabolisme. Cependant, l'H_2 est une molécule peu soluble et présente une diffusion longue et fluctuante au même titre que le méthane ou l'acétate. Dans les fumeurs acides, très peu d'H_2 est produit,

tandis que de grandes quantités d'H_2S sont relarguées. L'H_2S est considéré comme trop réactif pour permettre la synthèse et la polymérisation de molécules organiques. Or dans notre hypothèse, l'oxydation du donneur d'électrons (H_2S) se déroule à longue distance de la réduction de l'accepteur d'électrons, par la conduction des électrons à travers la cheminée hydrothermale conductrice. Ainsi, l'H_2S ne peut réagir avec les éléments de la proto-cellule, situé beaucoup trop loin mais permet la production d'un courant électrique. Ainsi, l'apport d'électrons se fait de manière intensive et continue sur toute la surface conductrice de la cheminée hydrothermale, présentant une gamme de conditions très variées et permettant une plus vaste zone de développement des proto-cellules.

3.2.5.2. Le gradient de proton

Dans l'hypothèse de l'origine de la vie dans les sources hydrothermales alcalines, le gradient de proton transmembranaire est produit par l'encapsulation dans un espace délimité (micelle ou microcavité) de fluide alcalin, entouré par de l'eau de mer légèrement acide. Dans ce cas, le gradient de proton n'est pas alimenté et finira par s'équilibrer rapidement de part et d'autre des membranes (micellaires ou minérales). Dans notre hypothèse, le gradient ionique, produit par les réactions d'oxydoréduction, alimente la différence de pH entre l'espace interne et externe de la proto-cellule, comme exposé précédemment. Ainsi dans notre hypothèse, une force proton motrice est déjà établie entre l'intérieur et l'extérieur, conduisant par pression adaptative, à ce que la proto-cellule profite de ce courant ionique pour le développement de mécanisme énergétique de type ATP Synthase.

3.2.5.3. Les synthèses prébiotiques

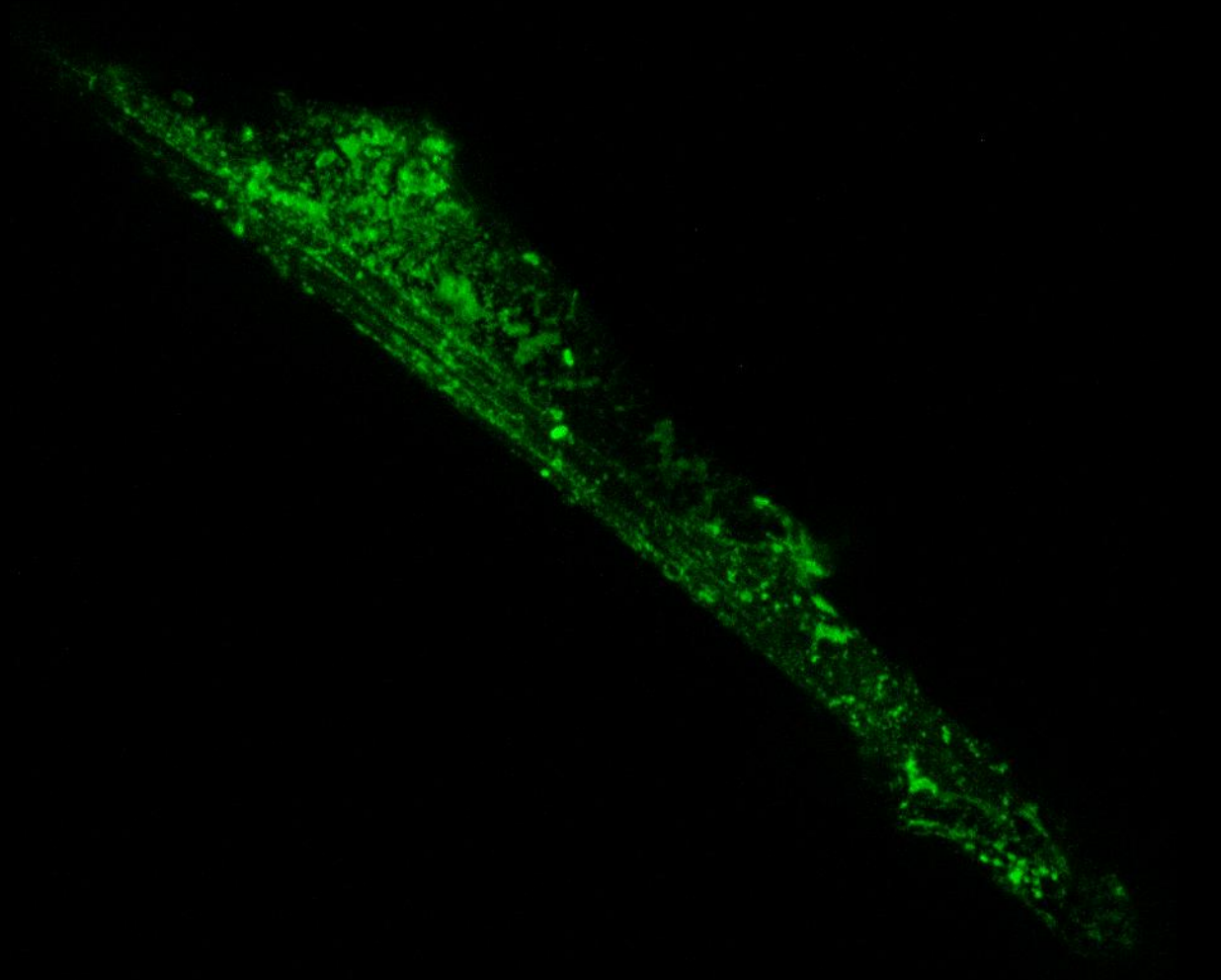
Dans le cadre des conditions des sources hydrothermales alcalines, les premières molécules organiques, comme l'acétate, aurait été produites par réaction de type Fischer Tropsch dans le fluide hydrothermal. Ces composés auraient alors dû diffuser jusqu'aux surfaces minérales pour être adsorbés et pouvoir réagir entre elles pour polymériser. Dans le cadre de la réduction géo-électrochimique du CO_2, la réaction se déroule dès lors sur une surface minérale, constituée principalement de sulfure polymétalliques connu pour adsorber facilement les molécules organiques et favoriser les catalyses (Schoonen et al., 2004). Le deuxième aspect concerne le pH, facteur primordial dans les réactions de synthèse prébiotiques. Il est important de rappeler que l'émergence de la vie en contexte acide fût à l'origine rejetée car les réactions de polymérisations, nécessaires à la formation d'acides aminés, sont impossibles à pH acide (Russell et al., 2014). Cependant, cette idée reste controversée car de nombreuses autres réactions chimiques à l'origine de composés organiques ne sont favorisées, voire possibles, qu'en milieu acide. De plus, dans notre hypothèse, l'augmentation interne du pH de la proto-cellule par le gradient ionique électrochimique pourrait potentiellement conduire à des pH suffisamment alcalins pour permettre la polymérisation d'acides aminés.

Pour conclure, les différentes hypothèses proposées ici sont basées sur l'observation d'un type trophique moderne complexe. Il est donc nécessaire d'étudier plus en détails la viabilité de ces théories d'un point de vue thermodynamique, phylogénétique ou géochimique pour valider nos postulats. Des approches pluridisciplinaires pourraient également être

envisagée pour reconstruire ces conditions dans un contexte hydrothermal acide de l'Océan primitif.

CHAPITRE V - PRODUCTION D'ELECTRICITE EN MILIEU EXTREME

Communautés electrogènes hyperthermophile de sources hydrothermales et chaines trophiques



1. PROLOGUE AU CHAPITRE V

Suite à l'identification de microorganismes électrotrophiques hyperthermophiles au sein des sources hydrothermales profondes, il est établi que des microorganismes peuvent croître de manière autotrophique en utilisant le courant électrique abiotique présent dans la paroi des cheminées des fumeurs acides comme source d'énergie. Cependant, il est également nécessaire de s'intéresser à la potentielle communauté exoélectrogénique capable de contribuer à la production de ce courant électrique par dégradation de la matière organique produit par les autotrophes ou oxydation de molécules inorganiques du fluide hydrothermal. Cependant, l'étude de l'oxydation de composés inorganiques est techniquement compliquée. En effet, les molécules réduites du fluide hydrothermal réagissent spontanément et de manière abiotique sur électrode, comme l'H_2S sur pyrite, rendant la différentiation des courants d'origine chimique et biologique difficile. Ainsi nous nous sommes intêressés uniquement à l'oxydation biologique de composés organiques sur électrode au cours de deux expériences distinctes.

La première étude a consisté en la comparaison des biodiversités obtenues sur deux supports conducteurs différents comme accepteur d'électrons finaux, des particules d'oxyde de fer d'une part, et une électrode polarisée d'autre part. Les enrichissements sur particules d'oxyde de fer ont été réalisés en flacon d'eau de mer synthétique à partir d'acétate, inoculé avec de la cheminée hydrothermale du site mixte Rainbow et incubé à 80°C. Les enrichissements sur électrode ont été réalisés en MLC, polarisé à -0.110 V vs Ag/AgCl, contenant de l'eau de mer synthétique thermostatée à 80°C et inoculé à partir de cheminée hydrothermale. Afin de confirmer la spécificité du support conducteur sur la biodiversité des communautés obtenues, un second SEM a été inoculé avec l'enrichissement en flacon sur oxyde de fer. Des analyses de métabarcoding 16S ainsi que des quantifications microbiennes par qPCR ont été réalisées à la fin des enrichissements dans le milieu liquide des flacons et des SEM et sur les biofilms formés sur électrode.

La deuxième étude avait pour but de mettre en évidence les substrats organiques impliqués dans la production de courant sur une communauté hétérotrophe enrichie sur un mélange riche de substrats. Pour cela, un échantillon de la cheminée hydrothermale acide Capelinhos du site Lucky Strikes a été inoculé dans une MFC remplie d'eau de mer synthétique thermostatée à 80°C, additionnée d'un mélange de substats organiques de type acide organique (acétate, formiate, pyruvate), peptidique (extrait de levure et peptone) et polysacharides (amidon et glycogène). Suite à 3 enrichissements successifs à partir de l'inoculum et d'une fraction de cellules planctoniques de l'enrichissement précédent, la biodiversité obtenue sur électrodes et en milieu liquide a été analysée par séquençage de la région V4 du gène codant pour l'ARNr 16S et quantifiée par qPCR. Des observations microscopiques confocales par méthode FISH ont permis de localiser les différentes populations sur électrode. Un dernier enrichissement a été réalisé pour observer spécifiquement la production de courant sur chacun des donneurs d'électrons.

Ces deux études sont présentées par la suite sous la forme de deux articles scientifiques, l'un publié et l'autre en cours de publication.

2. ARTICLE 2: SPECIFIC ENRICHMENT OF HYPERTHERMOPHILIC ELECTROACTIVE ARCHAEA FROM DEEP-SEA HYDROTHERMAL VENT ON ELECTRICALLY CONDUCTIVE SUPPORT.

Guillaume Pillot[1], Eléonore Frouin[1], Emilie Pasero[1], Anne Godfroy[2], Yannick Combet-Blanc[1], Sylvain Davidson[1] & Pierre-Pol Liebgott[1]*

1 Aix Marseille Université, IRD, Université de Toulon, CNRS, MIO UM 110, Marseille, France.

2 IFREMER, CNRS, Université de Bretagne Occidentale, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes - UMR6197, Ifremer, Centre de Brest CS10070, Plouzané, France.

Journal of Bioresource Technology (2018),

Volume 259, Juillet 2018, Pages 304-311

2.1. Abstract

While more and more investigations are done to study hyperthermophilic exoelectrogenic communities from environments, none have been performed yet on deep-sea hydrothermal vent. Samples of black smoker chimney from Rainbow site on the Atlantic mid-oceanic ridge have been harvested for enriching exoelectrogens in microbial electrolysis cells under hyperthermophilic (80 °C) condition. Two enrichments were performed in a BioElectrochemical System specially designed: one from direct inoculation of crushed chimney and the other one from inoculation of a pre-cultivation on iron (III) oxide. In both experiments, a current production was observed from 2.4 A/m² to 5.8 A/m² with a set anode potential of -0.110 V vs Ag/AgCl. Taxonomic affiliation of the exoelectrogen communities obtained on the electrode exhibited a specific enrichment of *Archaea* belonging to *Thermococcales* and *Archeoglobales* orders, even when both inocula were dominated by *Bacteria*.

Keywords :

Hyperthermophilic exoelectrogens; Deep-sea hydrothermal vent; Microbial electrolysis cell; External Electron Transfer

2.2. Introduction

Since the discovery of the first deep-sea hydrothermal vent in 1977, many studies have expanded our understanding of extremophilic life forms in those environments. Considered as primordial environments similar to the early Earth conditions (Martin et al., 2008; Takai et al., 2006), the deep-sea hydrothermal ecosystems are regarded as a good model to study the origins and evolution of life on Earth (Takai et al., 2006). In addition, in recent years many authors have focused on the great potential of extremophilic marine microbes for their use as prolific producers of bioactive substances (enzymes, metabolic products...) (Poli et al., 2017).

The "black smoker" deep-sea hydrothermal vents, located along the ridges of the Atlantic, Pacific and Indian oceans, are the result of volcanic activities that generate hydrothermal chimneys composed of polymetallic sulfide minerals (heterogeneous pyrite) (Dick et al., 2013). Those environments exhibit dynamic habitats that are characterized by large steep thermal and chemical gradients. These gradients provide a wide range of growth conditions for many extremophilic microorganisms growing as biofilms and being the base of these specific deep-sea ecosystems (Flores et al., 2011a; Kristall et al., 2006). Thermophilic microorganisms from the Archaea domain, mainly belonging to the orders *Thermococcales*, *Methanococcales*, and *Archaeoglobales* have been identified in these environments, as well as mesophilic and thermophilic microorganisms from the *Bacteria* domain belong to *Epsilon-proteobacteria* (Huber et al., 2010; Vetriani et al., 2014) and to the orders *Aquificales* and *Thermotogales* (Miroshnichenko and Bonch-Osmolovskaya, 2006). Considering the mineralogical composition of these hydrothermal chimneys (polymetallic massive sulfide), it appears likely that a significant proportion of its microbial populations is dependent on energetic metabolisms based on the dissimilatory reduction of insoluble "metals" or sulfur compounds (Cao et al., 2014; Konn et al., 2015).

As the microbial cell envelope is neither physically permeable to insoluble minerals nor electrically conductive, microorganisms have evolved strategically to exchange electrons with insoluble extracellular minerals, a mechanism known as the extracellular electrons transfer (EET) (Hinks et al., 2017; Shi et al., 2016). The first described EET capable bacteria were *Shewanella* and *Geobacter* (Shi et al., 2007). The role of membrane bound electron transport chains in carrying out EET was well acknowledged, but the exact mechanisms are still not completely understood (Kumar et al., 2017). Most of the knowledge about EET in microbes is derived from studies in bioelectrochemical systems (Allen and Bennetto, 1993; Logan et al., 2006; Schröder et al., 2015) which helped to define a novel group of microorganisms called exoelectrogens. These exoelectrogenic microorganisms are capable of extracellular electron transfer to a solid electrode, which are used in Microbial Electrochemical Technologies (METs) such as Microbial Fuel Cells (MFC) and microbial electrolysis cells (MEC) (Doyle and Marsili, 2015). In the past years, exoelectrogenic activity has been reported in almost 100 microbial species which are mostly affiliated with the bacterial phylum *Proteobacteria* (Koch and Harnisch, 2016). All these microorganisms are mesophilic and grow optimally at moderate temperatures, ranging from 20 °C to 45 °C.

To date, only four thermophiles isolated from extreme natural environments, *Thermincola ferriacetica* (Marshall and May, 2009), *Thermincola potens* strain JR (Wrighton et al., 2011), *Calditerrivibrio nitroreducens* (Fu et al., 2013a) and *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* (Lusk et al., 2015), were shown to generate electricity in MFCs operating at a temperature higher than 50°C. Moreover, it is only very recently that three hyperthermophilic strains, *Pyrococcus furiosus, Geoglobus ahangari* and *Ferroglobus placidus* have been shown to have the capacity to produce electricity in MFC or MEC (Sekar et al., 2017; Yilmazel et al., 2018). This would be the three first hyperthermophilic archaeon strains described having the capacity of EET. Several studies reported the enrichment of mixed cultures of efficient thermophilic exoelectrogens on the anode of METs (Ha et al., 2012; Mathis et al., 2007; Wrighton et al., 2008). More recently, two exoelectrogenic biofilms have been enriched at 70 °C from a high-temperature petroleum reservoir (Fu et al., 2015b) and at 80 °C from Red Sea brine pools (Shehab et al. 2017) on the anode of MFC systems.

To the best of our knowledge, no exoelectrogenic biodiversity enrichment from deep-sea hydrothermal vents has been achieved yet, while it seems likely that some microbial populations require this type of energy metabolism to expand in these particular environments. Interestingly, a MFC was installed at a hydrothermal vent field (Girguis and Holden, 2012) showing for the first time, the *in situ* electricity generation in those extreme ecosystems. More recently it has been demonstrated that there is a widespread and distant electron transfer through the electrically conductive hydrothermal chimney by the internal oxidation of the hydrothermal fluid coupled to the reduction of oxygenated seawater at the external side of the chimney (Yamamoto et al., 2017). This electricity generation in deep-sea hydrothermal systems must affect the surrounding biogeochemical processes and the development of microbial communities through potential EET-capable microorganisms.

The aim of this study was to promote and identify a part of the exoelectrogenic microbial community from a hydrothermal chimney of the Rainbow site on the Atlantic mid-oceanic ridge. For this investigation, two experiments were carried out using a semiautomatic two-chamber BioElectrochemical System Stirred-Reactor (BES) prototype (graphical abstract), operating at high temperatures (80 °C). The first one was performed to enrich microbes after direct inoculation of the BES with a chimney fragment. The second enrichment in BES was carried out from an inoculum obtained by a microbial enrichment culture in flask on Fe (III) oxide particles as electron acceptor using the same hydrothermal sample. This was done in order to pre-cultivate potential exoelectrogenic microbes on iron oxide and observing the impact on biodiversity obtained subsequently in BES. The evolution of current production, of microbial diversity and biomass during the different enrichments were studied through electrochemical method and molecular biology survey.

2.3. Material and methods

2.3.1. Sample collection and preparation

The inoculum used for all the experiments was collected on the Rainbow hydrothermal vent field (36°14′N, MAR) by the Remote Operated Vehicle VICTOR 6000 during EXOMAR cruise in 2005 led by IFREMER (France) on board RV L'Atalante (Godfroy, 2005). Sample

(EXO8E1) was collected from the breaking off of a piece of a high temperature active black smoker using the arm of the submersible and bring back to the surface into a decontaminated insulated box. On board, chimney fragments were anaerobically crushed into an anaerobic chamber (La Calhene, France) and stored into flasks under anaerobic conditions (anoxic seawater at pH 7 with 0.5 mg/L of Na_2S and N_2:H_2:CO_2 (90:5:5) gas atmosphere) and kept at 4 °C. Prior to the experiment, pieces of hydrothermal chimney were removed from the sulfidic seawater flask, crushed in a sterile mortar and pestle in an anaerobic chamber (Coy Laboratories Inc.) and distributed in anaerobic tubes for use in various experiments.

2.3.2. Enrichment on iron oxide in flask

To obtain enrichment of electro-active microbes on insoluble Fe (III) oxide as electron acceptor, 2.5 g of crushed hydrothermal chimney was inserted in 500 mL flask with butyl rubber stopper under nitrogen gas atmosphere filled with 250 mL of anaerobic mineral medium at pH 7 containing 30 g/L NaCl, 0.65 g/L KCl, 0.5 g/L NH_4Cl, 0.3 g/L KH_2PO_4, 0.3 g/L K_2HPO_4, 0.1 g/L $MgCl_2$, 0.1 g/L $CaCl_2$, 0.35 g/L Cysteine HCl, 0.2 g/L of yeast extract and 10 mL/l of Balch trace mineral solution (Uzarraga et al., 2011). The media was supplemented with 10 g/L of Fe (III) oxide, 10 mM of acetate and 4 g/L of yeast extract as electron donor and carbon source. The flasks were incubated at 80 °C in static condition until a dark coloration of iron oxide was observed. Two subcultures were performed in the same condition with 1% of inoculum from the previous culture.

2.3.3. Semi-Automated Bioelectrochemical Systems

A prototype of semi-automated BioElectrochemical System in Stirred-Reactor (BES) has been developed to assess the enrichment of hyperthermophilic electroactive microorganisms. The system was composed of a two-chamber jacketed glass reactor (Verre Labo Mula, France) with a 1.5 L working volume, thermostated with a Heating Circulator (Julabo SE 6, France) at 80 °C ± 1 °C, and separated by an Anion Exchange membrane (Membrane International Inc.). The working electrode was a 20 cm² carbon cloth (PaxiTech SAS, France) with a 3 M Ag/AgCl reference electrode and the counter electrode a 20cm² carbon cloth coated with platinum (Hogarth, 1995).

The bioelectrochemical system was connected to a semi-automated platform previously described (Boileau et al., 2016) to control the composition and rate of gas input (H_2, CO_2, O_2, N_2) with mass flowmeters (Bronkhorst, Netherlands). A continuous monitoring of output gas composition (H_2, N_2, CH_4, O_2, CO_2) were performed using a micro-GC equipped with a catharometric detector (MS5A, SRA Instrument, France) and a CARBOCAP CO_2 probe (Vaisala GMT 221, Finland). To ensure anaerobic condition, the culture medium was continually sparged with a 50 mL/min flow of N_2. The pH was maintained at 7 ± 0.1 by the addition of sodium hydroxide (NaOH 0.5 mM) or hydrochloric acid (HCl 0.5 mM). The stirring, driven by two axial impellers, was set to 150 rpm. All the parameters, as pH and ORP (Mettler Toledo InPro 3253, Switzerland), temperature (Prosensor pt 100, France), stirring speed, gaseous H_2, N_2, CH_4, O_2 and CO_2 concentration and NaOH and HCl consumption, were measured and managed by the BatchPro software (Decobecq Automatismes, France). SP-240 potentiostats and EC-Lab software (BioLogic, France) were used to poise the electrodes

at a fixed potential and measure current. All the measured currents are expressed in ampere per square meter of electrode area.

2.3.4. Operating conditions in BES

Before each experiment, the BES was dismantled, washed, and sterilized by autoclaving at 120 °C for 20 min. Then, the system was connected to the platform and 1.5 L of mineral medium was injected and supplemented with 10 mM acetate and 0.15 g/L of Yeast Extract (YE). The liquid media was set in the operational condition for a few hours prior to perform a cyclic voltammetry (CV, 20 mV/s). First, the system (BES1) was inoculated with 15 g of crushed hydrothermal chimney in anaerobic condition. A chronoamperometry was carried out by the potentiostat to poise the electrode at -0.110 V vs Ag/AgCl (+0.05 vs Standard Hydrogen Electrode), and a measurement of the current was taken every 10 s. A cyclic voltammetry was also performed at the end of the experiment. Secondly, a new system (BES2) was inoculated in the same condition with 1% of the last enrichments in flask on Fe (III) oxide on yeast extract. An abiotic control and an inoculated but non-polarized control have been performed in the same conditions to exhibit the exoelectrogenic specificity of the biofilm on the polarized electrode.

2.3.5. Taxonomic and phylogenetic classification

Taxonomic affiliation was performed according to (Zhang et al., 2016). DNA were extracted from 1g of the crushed chimney and at the end of each experiment (BES-1 at 14 days and BES-2 at 11 days): on the scrapings from half of the 20 cm^2 of working electrode and from 50 mL of the liquid media of the BES and flask enrichments, which were centrifuged and suspended in 1 mL of sterile water. The DNA extraction was carried out using the MoBio PowerSoil DNA isolation kit (Carlsbad, CA USA). The V4 region of the 16S rRNA gene was amplified using the universal primers 515F (5′-GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3′) and 806R (5′-GGA CTA CNN GGG TAT CTA AT-3′) (Bates et al., 2011) with Taq&Load MasterMix (Promega) and PCR reactions were carried out using C1000 Thermal Cycler (BioRad) with the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 3 min followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, primers annealing at 50 °C for 30 s and extension at 72 °C for 90 s, followed by a final extension step of 5 min at 72 °C. The amplified gene regions were sequenced on Illumina MiSeq 2500 platform (GeT-PlaGe, France) to generate paired-end 150 bp reads. The reads were merged using the FLASH software. The taxonomic affiliation was performed with the QIIME software package v 1.9.1. Chimera were removed from the merged sequenced using UCHIME Algorithm. Then, the filtered sequences were clustered into OTUs using the RDP method with a minimum bootstrap confidence of 0.8 and OTUs were affiliated using the Silva database as reference. To analyze the alpha diversity, the OTU tables were rarified to a sampling depth of 10770 sequences per library and two metrics were calculated: the richness component represented by the number of OTUs observed, and the Pielou's index representing the evenness component of our biodiversity. The raw data of barcoding analysis were deposited in the European Nucleotide Archive with the accession number PRJEB24019. The construction of clone library was performed by amplifying the 16S rRNA genes by previously described PCR method with a FD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and R6 (5'-TACGGCTACCTTGTTACG-3') primer set (Brosius et al., 1981) using Taq&Load MasterMix

(Promega). The amplicons were cloned into the pGEM-T easy vector (Promega) and transformed into *E. coli* JM109 competent cells that were grown overnight in LB agar at 37 °C. Fragment of 16S rRNA gene (~1300 bp) of the clones were sequenced by ABI3730xl (GATC Biotech) sequencers. The nucleotide sequences obtained from clone library were deposited in the GenBank database with the accession numbers MG694212 through MG694233

2.3.6. Quantitative PCR of archaeal and bacterial 16S rRNA gene copies

Bacterial and archaeal quantification was carried out by qPCR with SsoAdvanced™ Sybr Green Supermix on a CFX96 Real-Time System (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) with the primers GML5F (5'-GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') and Univ516 (5'-GTD TTA CCG CGG CKG CTG RCA-3') specific to Bacteria (Michotey et al., 2012) and Arc931F (5'-AGG AAT TGG CGG GGG AGC A-3') and m1100R (5'-BTG GGT CTC GCT CGT TRC C-3') for Archaea (Einen et al., 2008). The PCR program was composed of a 10 s denaturation step at 94 °C, a hybridization step of 10 s at 55 °C (Bacteria) or 62 °C (Archaea) and a 10 s elongation step at 72 °C, with melting curves performed at the end of each reaction to ensure product specificity. A standard curve from 10^2 to 10^{10} 16S rRNA gene copies was obtained by diluting pGEM-T plasmids harboring hyperthermophilic bacterial or archaeal rRNA gene fragment obtained from microbial community of interest. The results were expressed in copies number of 16s rRNA gene per gram of crushed chimney, per milliliter of liquid media or per cm^2 of surface of electrode.

2.4. Results and discussion

2.4.1. Microbial diversity of hydrothermal chimney from Rainbow site of Atlantic Ocean

Prior to study specifically the electroactive community putatively present on a chimney of the hydrothermal Rainbow site, an analysis of the total microbial diversity present in our crushed chimney inoculum was done by using the Illumina method. The chimney biodiversity (Figure V-1) was composed of 160 OTUs representing a high richness of species. As indicated by the Evenness index (0.677), the sequences were distributed relatively equally in the different OTUs. Furthermore, the taxonomic affiliation of the 160 OTUs showed that 66% were assigned to *Bacteria* and 33% to *Archaea* domains. This was consistent with the quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) assays which showed a dominance of *Bacteria* compared to *Archaea* (6.38 ± 0.05 vs 4.77 ± 0.19 log of 16S rRNA gene copies per gram of chimney, respectively). The difference of ratio obtained can be explained by the overestimation of the bacterial quantification by 16S rRNA gene qPCR, because of the high number of gene copies per cells compared to *Archaea* (generally equal to 1 per cell) (cf. rrnDB, (Stoddard et al., 2015)). Within the bacteria domain, the OTUs were mainly assigned to 5 phyla: *Proteobacteria* (58%), *Firmicutes* (3%), *Aquificae* (1%), *Bacteroidetes* (1%) and *Thermodesulfobacteria* (1%) whereas the archaeal OTUs were only identified as *Euryarchaeota* represented by *Thermococcales* (23%) and *Archaeoglobales* (11%). This taxonomic profile was substantially similar to those previously reported on Rainbow chimneys (Cerqueira et al., 2017; Flores et al., 2011a), except for the proportion of methanogens and *Desulfurococcales* found significantly lower in our samples. Despite a recognized stability in the conservation of hyperthermophilic microorganisms at low temperature (Wirth, 2017), our samples have been

conserved more than 12 years at 4 °C, this could mostly explain the decrease in Archaea diversity.

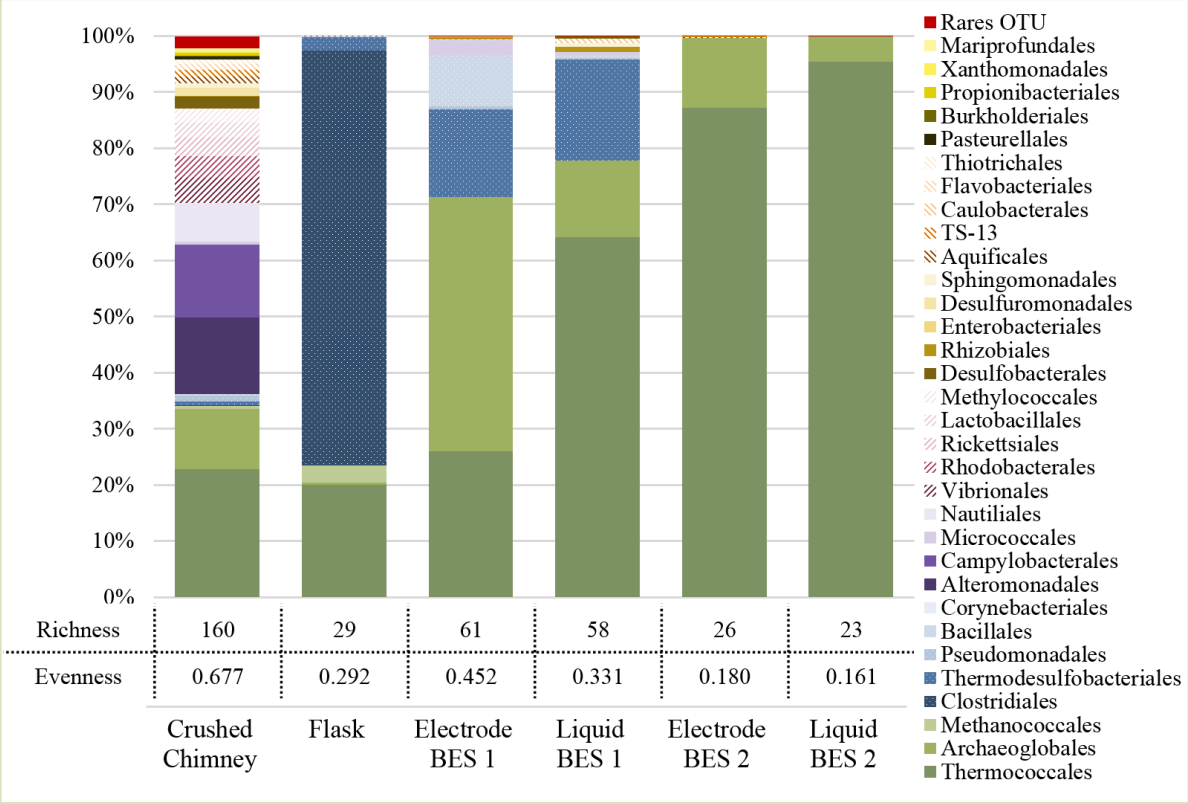


Figure V-1 : Dominant taxonomic affiliation and biodiversity indices of microbial communities from Crushed Chimney, Flask enrichment on iron (III) oxide, Electrode and Liquid media from BES1 and BES2. OTUs representing lower than 0.5% of total sequences of the sample was grouped as Rares OTU. Biodiversity indexes of Richness and Evenness represent the number of observed OTU and the Pielou's J' evenness index respectively.

2.4.2. Enrichment of anode-respiring community in BES from crushed chimney

To assess the diversity of hyperthermophilic exoelectrogenic microbes from deep hydrothermal vent on conductive electrode, a fraction of a crushed chimney from the Rainbow site was used to inoculate the BES1. To mimic the hydrothermal vent conditions in the BES, a synthetic seawater medium, containing acetate and yeast extract as carbon and energy sources, was used. Indeed, in hydrothermal vent fluid, acetate can be chemically synthesized through Fischer-Tropsch Type (FTT) reaction from H_2 and CO_2, both produced otherwise during serpentinization reaction (Schrenk et al., 2013). Acetate can also be biologically produced during fermentative metabolisms. It should be noted that acetate is not fermentable in the absence of acetoclastic methanogens and needs an exogenous electron acceptor to be used as energy source for microorganisms' growth. On the other hand, YE mimicked here the organic compounds produced by autotrophic and heterotrophic communities of hydrothermal chimney available for the fermentative/respiratory growth of microorganisms.

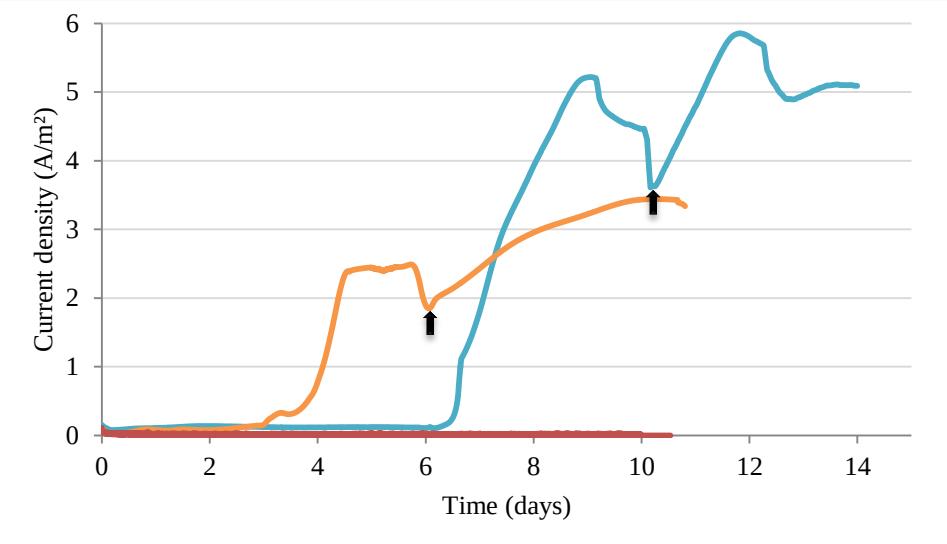


Figure V-2 : Current monitoring (A/m²) of BES1 Enrichment inoculated with crushed hydrothermal chimney (blue line), BES2 Enrichment inoculated with flask subculture (green line) and abiotic control (orange line). Electrode potential was poised at -0.110V vs Ag/AgCl. Arrows represent the renewal of the liquid media.

While no notable current was observed during the 10 days of experiment in the control experiments (abiotic and killed inoculum), a raise of current density was observed after 6 days of incubation in the BES1 inoculated with crushed chimney (Figure V-2). The maximum current density reached 5.9 A/m² at 8.7 days and remained stable for few hours. The 3 mM of acetate consumed during this period as attested by HPLC measurements (data not shown) was in good agreement with the current production assuming a maximum faradic efficiency at 95-100%, as previously obtained in literature (Sengodon and Hays, 2012). After this period the current density decrease progressively probably due to the exhaustion of growth factors present in the medium and necessary to the biofilm metabolic activity. Indeed after 10 days of culture, the renewal of the medium led again to a current increase of up to 6 A/m² at maximum current density. Similarly, the current decreased after a few hours but remained stable in absence of medium renewal.

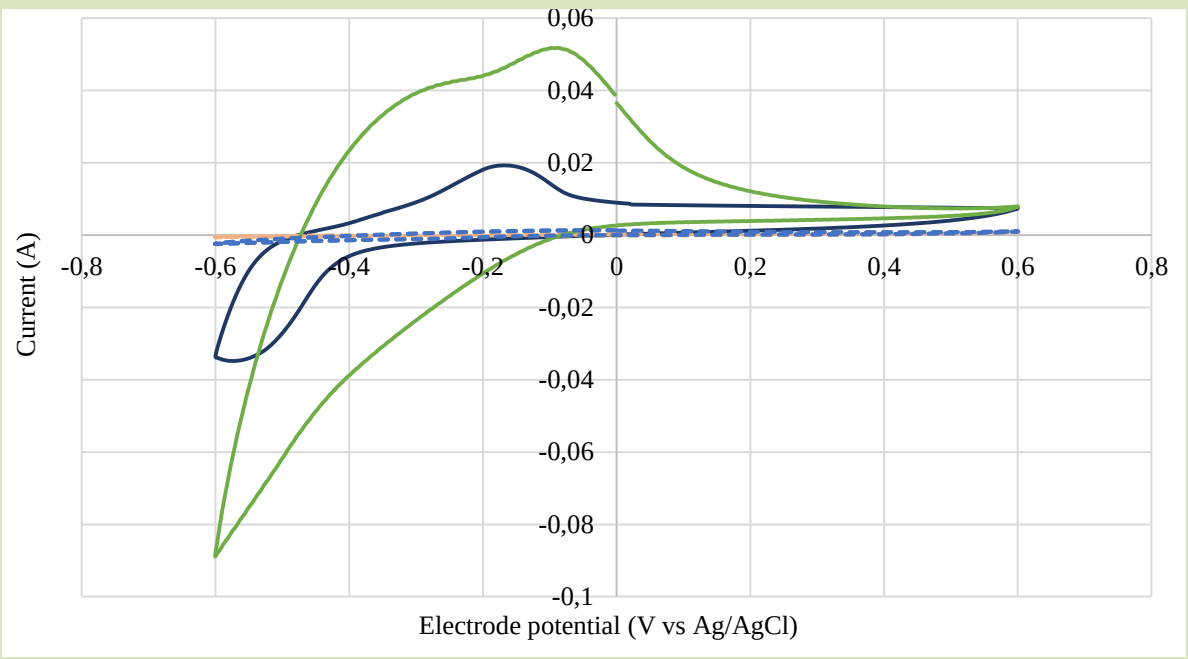
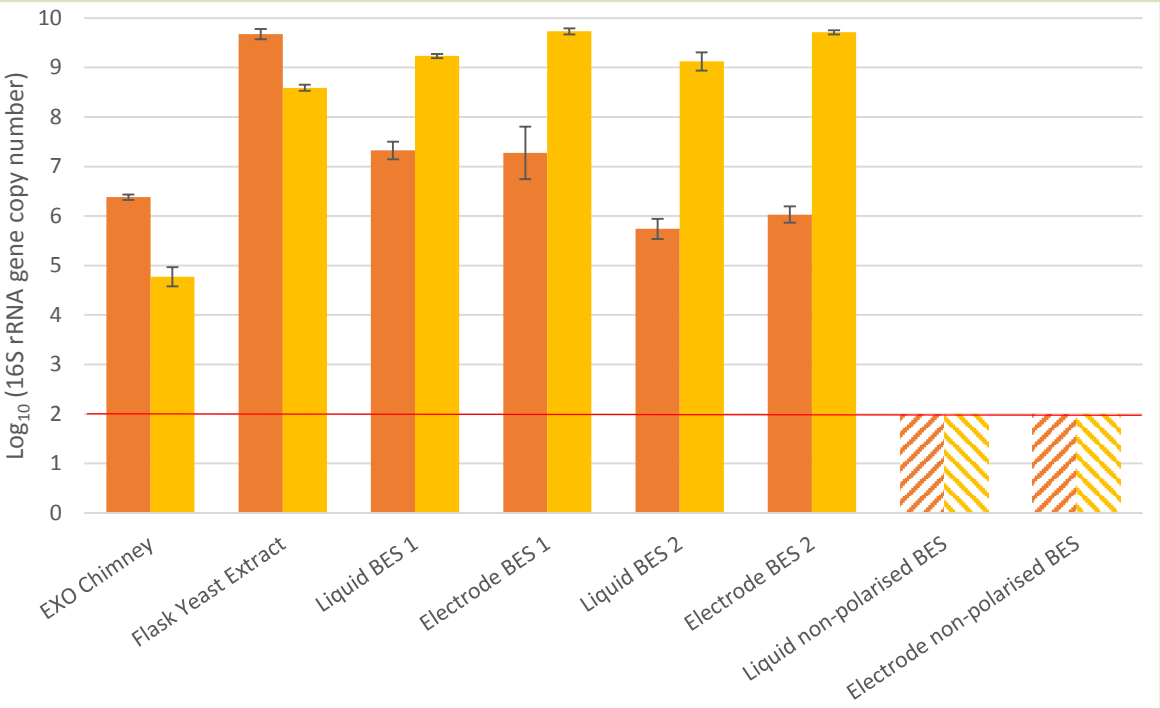


Figure V-3 : Cyclic Voltammetries between -0,6V and +0,6V at 20mV/s of Working Electrode at initial time (dot lines) and final time (full line) in BES1 (blue line), BES2 (green line) and abiotic control (orange line).

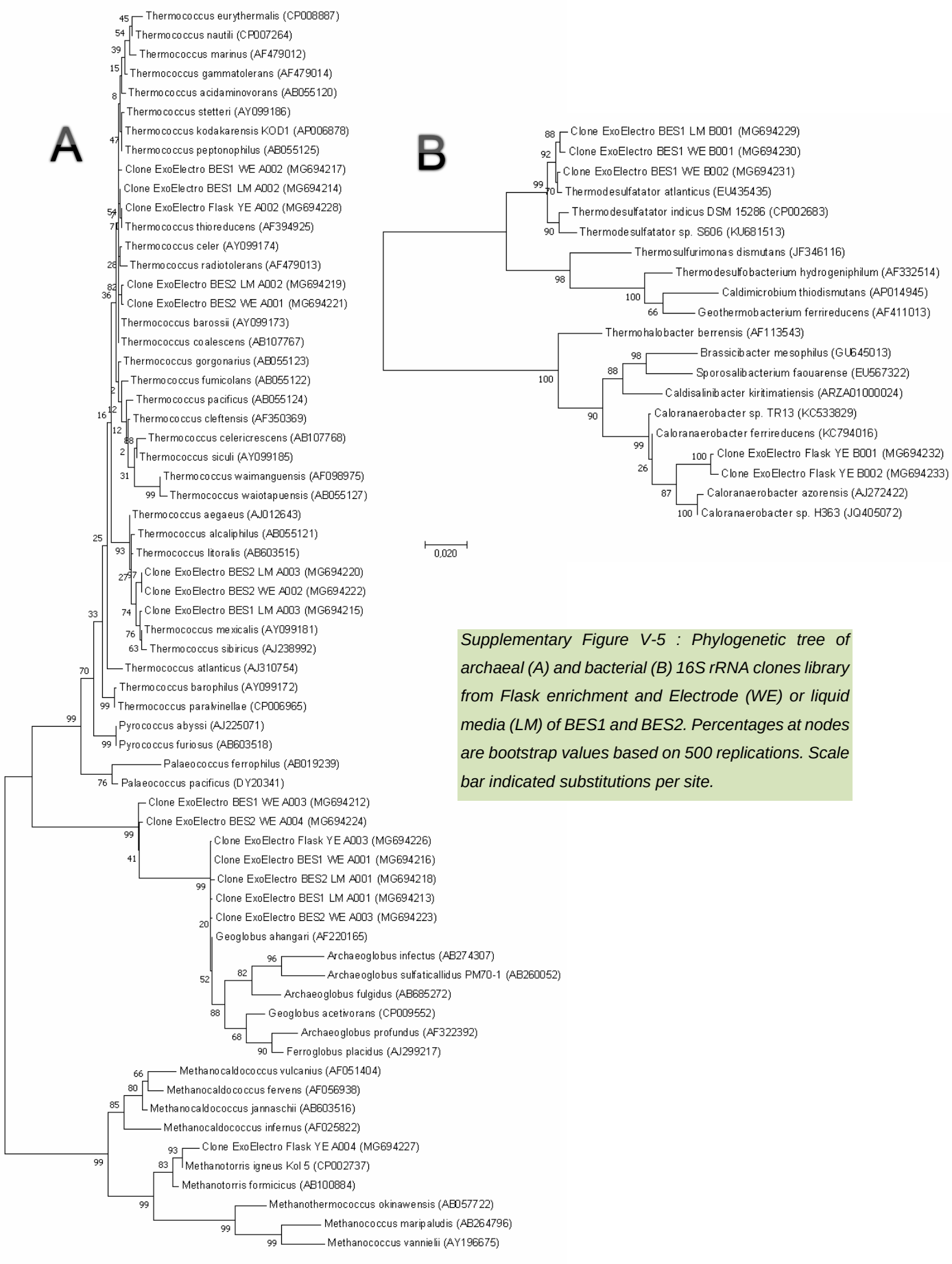
Cyclic voltammetries (Figure V-3) have been performed after inoculation and at the end of experiment in polarized condition to observe the electrochemical profile of ElectroActive Biofilms (EAB) as catalyst of the bioelectrochemical oxidation of acetate. The anode showed the apparition of an oxidation peak with a midpoint potential at -0.100 V (vs. Ag/AgCl) at the end of the experimentation. No oxidation peak was observed for the spent media with a new sterile electrode, suggesting that EET mechanisms were not involving mediators (data not shown). Moreover, the capacitive current (vertical distance between oxidation and reduction waves) increasing between beginning and end of the culture experiments reports an increase of the electrochemical double layer and suggests the presence of a biofilm on the surface of the electrode. Thus, these results suggest the development of EAB with direct EET using acetate as electron donor.

In contrast to the non-polarized culture conditions, microscopic observations over time have revealed the presence of planktonic microorganisms (in the liquid medium) after 9 days of incubation in the polarized electrode culture condition. In addition, the microbial quantification by qPCR (Supplementary Figure V-4) of the enrichment in BES1 shows 7.3 ± 0.18 and 9.23 ± 0.04 log of bacterial and archaeal 16S rRNA gene copies per milliliter of liquid media and 7.28 ± 0.53 and 9.73 ± 0.06 log per square centimeter of electrode, respectively. On the contrary, in the non-polarized control, quantification of 16S rRNA copies was under the 2 log of sensitivity threshold of the method, indicating that no significant growth was observed under these conditions in liquid media or on the non-polarized electrode. Thus, the polarization of the electrode (-0.110 V vs Ag/AgCl), which served as an obligatory electrons acceptor to allow the oxidation of acetate or the weak amount of YE, seems essential also for the planktonic microbial growth.



Supplementary Figure V-4 : Quantification of 16S rRNA gene copies from Bacteria (orange) or Archaea (yellow) per gram of crushed chimney, per milliliter of liquid or per cm² of working electrode. The red line represents the minimum threshold of sensitivity of the qPCR method. Error bar represent the standard deviation obtained on triplicates.

To identify the microbes present on the electrode (Electrode BES1) and in liquid medium (Liquid BES1), a microbial diversity study through sequencing of the hypervariable V4 region of 16S rRNA gene (Figure V-1) have been performed at the end of the enrichment (day 14). 61 OTUs were obtained on Electrode 1 and 58 OTUs in Liquid Media 1, indicating of a loss of biodiversity from environmental chimney (160 OTUs). The sequences obtained are distributed in the different OTUs with however some OTUs more represented than in environmental sample (evenness at 0.452 on Electrode 1 and 0.331 in Liquid Media 1). This can be explained by our selective conditions of enrichment with high temperature and substrate specificity. Based on average abundance analysis, the microbial diversity of enrichment culture was dominated by *Euryarchaeota* phyla (> 70%), either on electrode or in liquid medium. Interestingly, at the genus level, the dominating archaeal OTUs on electrode were closely related to *Geoglobus* spp. (45.2%) and *Thermococcus* spp. (25.6%) whereas the planktonic microbial diversity in liquid medium is especially dominated by uncultured *Thermococcus* spp. (64.1%) rather than *Geoglobus* spp. (13.3%). The bacterial diversity on the electrode and in liquid media were mainly assigned to *Thermodesulfatator* spp. (15.6% and 18% respectively), while the remaining were distributed between members of *Bacillaceae* and *Micrococcaceae* families. These specific enrichments of *Archaea* compared to *Bacteria* demonstrate a shift in initial microbial community structure from the crushed chimney, surely driven by the specific BES characteristics (i.e., polarized electrode, hyperthermophilic condition).



Supplementary Figure V-5 : Phylogenetic tree of archaeal (A) and bacterial (B) 16S rRNA clones library from Flask enrichment and Electrode (WE) or liquid media (LM) of BES1 and BES2. Percentages at nodes are bootstrap values based on 500 replications. Scale bar indicated substitutions per site.

Due to the limitation for taxonomic affiliation at species level of the Illumina techniques on 290 bp 16S fragments, we performed 16S rDNA clone libraries on ~1300 bp 16S sequence (Supplementary Figure V-5). It allowed identifying the *Thermococcus* spp. as closely related to *Thermococcus thioreducens*, *T. coalecens*, *T. barossi*, *T. peptonophilus*, *T. celer* (98% similarities with them) and an unidentified *Thermococcus* species (95% similarity with *Thermococcus thioreducens*). However, because of the high levels of similarity between species of the genus *Thermococcus*, the taxonomic affiliation through the coding gene for 16S rRNA is not sufficient to determine the *Thermococcus* species present in enrichments.

However, among the Geoglobus spp. the taxonomic affiliation from clone libraries (Supplementary Figure V-5) has allowed to identify two species: Geoglobus ahangari (99% similarity) and a novel genus or species of the Archaeoglobaceae family (MG694212 and MG694224: 95 % of similarity vs Geoglobus ahangari). This novel taxon is exclusively found on the electrode surface. Interestingly, this affiliation has been possible only through near full 16S rRNA gene sequence (1300 bp) alignment. Indeed, the hypervariable V4 region of the rRNA gene (~290 bp), used to the study of microbial diversity by Illumina-based analysis, did not allow to phylogenetically differentiate this novel taxon from Geoglobus ahangari. Differences are remarkable at level of hypervariable V6 to V8 regions.

The discovery of *Geoglobus* species enrichment on the electrode is remarkable. The two species of *Geoglobus* described so far (*G. ahangari* and *G. acetivorans*) are known to grow autotrophically using H_2 or heterotropically using a large number of organic compounds with in both cases soluble or insoluble Fe (III) oxide as a final electrons acceptor (Manzella et al. 2013). More recently, it has been shown that *Geoglobus ahangari* was exoelectrogenic by direct contact when placed in one-chamber microbial electrolysis cells at 80 °C. In contrast to our results, the current produced was particularly weak probably due to its use as an axenic culture, and its lack of enzymatic component to resist to oxidative stress on electrode (Yilmazel et al., 2018)

Phylogenetic analysis of 16S rRNA clone libraries (Supplementary Figure V-5) has led to the identification of taxon *Thermodesulfatator atlanticus* among the *Thermodesulfatator spp.* previously identified in high throughput sequencing. This bacterium, also isolated from a Rainbow site chimney, is known to be chemolithoautotrophic, sulfate-reducing obligate bacterium that uses H_2 as electron donor and CO_2 as carbon source. Alternatively, it is able to use methylamine, peptone or yeast extract as carbon sources (Alain et al., 2010). A close related species, *Thermodesulfobacterium commune* has already been identified in EAB on electrode of a MFC (Fu et al., 2015b).

2.4.3. Enrichment of hyperthermophilic microorganisms on crystalline Fe (III) oxide

In parallel of the first BES previously described, flask enrichments with insoluble metallic electron acceptor were done. Crushed chimney was inoculated in anaerobic mineral medium added with 10 g/L of crystalline Fe (III) oxide (α-Fe_2O_3: hematite) as electron acceptor (Wahid and Kamalam, 1993), acetate (10 mM) and yeast extract (4 g/L) as energy and carbon source. After 2 days of static incubation at 80 °C, the hematite was completely reduced to black compounds (magnetic particles) and the head space of the flask contained 32% of CO_2, 0.2%

of H_2 and 10% of CH_4. A production of acetate was also observed in the liquid media, reaching 12 mM at the end of the experiment. The next subcultures reached the black coloration in less than 24 hours with similar concentration of each gas in the headspace of the flasks and same profile of metabolites in the liquid media. The presence of a thin biofilm could be observed on the surface of the agglomerated iron oxide. An abiotic control with a mix of acetate, yeast extract, H_2, CH_4 and CO_2 didn't show black coloration of iron oxide after one month of incubation at 80 °C. These results suggest the development of a community of both fermentative organisms, producing acetate, and electroactive microorganisms, able to oxidize organic compounds brought by the YE (peptides, carbohydrates, etc.) and acetate in the culture medium for the reduction of crystalline Fe (III) oxide.

The biodiversity enriched in flask was composed of 29 OTUs, and the sequences were relatively concentrated in dominant OTUs (evenness at 0.292). At the family level, the microbial diversity was dominated by bacterial OTUs related to *Clostridiaceae* (73%), and *Thermodesulfobacteriaceae* (3%). The archaeal OTUs represented only 24% of the biodiversity distributed between *Thermococcaceae* (20.5%), *Methanococcaceae* (3%) identified as *Methanotorris igneus* species and *Archaeoglobaceae* (0.5%). The quantification showed an enrichment of 9 log of bacterial and 7 log of archaeal 16S rRNA gene copies which demonstrated a shift of enrichment toward the preferential bacterial growth in opposition with BES enrichment. Interestingly, the taxonomic affiliation showed that members of the *Clostridiaceae* OTUs were closely related in clone libraries to *Caloranaerobacter ferrireducens* (97% of identity). This later microorganism is known to use crystalline Fe (III) reduction as a minor pathway for electron flow while fermenting sugars or amino acids to a mixture of volatile fatty acids (acetate, butyrate) and hydrogen (Zeng et al., 2015). *Archaeoglobaceae* accounted for only 0.5% of the microbial communities in this enrichment and have been closely related from clone libraries analysis to *Geoglobus ahangari* (99% of identity). As mentioned above, *Geoglobus ahangari* is known to reduce amorphous Fe (III) oxide but these culture conditions with crystalline form do not seem to favor its growth (Wahid and Kamalam, 1993). All these results could suggest the organization of a kind of trophic chain in our flask enrichment. The new iron reducing species close to *Caloranaerobacter ferrireducens* would have used organic compounds from yeast extract to reduce crystalline Fe (III) oxide. The *Thermococcus* would have grown on peptides or carbohydrates from yeast extract or partly produced by *Firmicutes,* and both would have produced H_2. The methanogens such as *Methanotorris igneus* would then have used the H_2 to produce methane.

2.4.4. Solid electron acceptor determine the microbial ecology of electroactive enrichment

In this context, a new BioElectrochemical System (BES2) was inoculated with the flask enrichment on YE/acetate to assess the specificity of the microbial community obtained on the electrode with a different initial microbial composition in the inoculum. Experimental conditions were exactly the same as for BES1. Contrary to BES1, a lag time of 3 days (Figure V-2) has been observed before the increase of the current. After 4.5 days the current has reached 2.4 A/m² and stayed stable during about 1 day before decreasing rapidly. Phase contrast microscopic observations before the culture medium renewal in BES2 have shown the only

presence of irregular coccoid cells. Thereafter, the current density reached a maximum of 3.4 A/m² at 4 days after the renewal of the culture medium. This phase of current production came along with a decrease of acetate as observed in the BES1 (data not shown). Cyclic voltammetry (Figure V-3) exhibited oxidation peak appearing between initial time and final time with a midpoint potential at -0.107 V (vs. Ag/AgCl), slightly offset compared to the one obtained with BES1.

The biodiversity indexes between YE enrichment in flask and BES2 showed a loss of richness of species from 29 to 26 OTUs, and evenness from 0.292 to about 0.17, indicating a loss of biodiversity dominated only by a few OTUs. Furthermore, only *Archaea* were detected in BES2, when they were trivial in Flask enrichment. The dominating OTUs (Figure V-1) were closely related to *Thermococcaceae* uncultured species at 87.2% on electrode and 95.4% in liquid media of total OTUs. The remaining archaeal diversity was composed of *Archaeoglobaceae* spp. (12.7% and 4.5%), with clones affiliated to *Geoglobus ahangari* (99% identity) and unknown species belonging to *Archaeoglobaceae* family (95% identity with *Geoglobus ahangari*) similarly found on BES1 electrode. No *Caloranaerobacter* spp. or *Thermodesulfobacteriaceae* spp. growth was observed on the BES2 neither on electrode nor in liquid media. This is supported by the qPCR, which has shown a drastic difference of 4 log between archaeal (9 log) and bacterial (5 log) 16S rRNA copies per milliliter of liquid media and square meter of electrode.

It should be pointed out that the flask YE enrichment did not promote growth of *Archaeoglobales* or *Archaea* in general, whereas they seemed to be re-enriched in the BES2 conditions. These results suggest the specific enrichment on polarized electrode of *Archaea* belonging to *Thermococcales* and *Archeoglobales* in our BES condition. It is noteworthy that the biodiversity indexes showed a loss of biodiversity in BES compared to crushed chimney due to selective condition of our experiment to enrich preferentially the electroactive microorganisms. However, in each BES, the richness and the evenness are more important on polarized electrode than in liquid media, suggesting a specific enrichment of more diverse species and better distribution of microbial population on polarized support. According to the absence of growth in non-polarized electrode and the more important diversity on electrode than in liquid, the microbial diversity found in liquid media would arise from EAB which develop on the electrode. This is supported by the really low H_2 production in BES (data not shown) - H_2 being normally produced by *Thermococcus* sp. during fermentative metabolisms - which could be explained by a lack of carbon and energy source in liquid media. Thus, in absence of possible known metabolism for *Thermococcus* species in liquid, we would suggest *Thermococcus* cells to be in quiescent conditions after it is released from EAB. Its growth would thus have an obligatory dependence on the polarized electrode.

If the presence of *Geoglobus* species is consistent with its known capacity to transfer EET with acetate as electron donor (Yilmazel et al., 2018), *Thermococcus* species abundance on polarized electrode is more surprising. *Thermococcales* are known to share an energetic peptidic or carbohydrate metabolisms, associated necessarily or not with the reduction of elemental sulfur (Bertoldo and Antranikian, 2006). In addition, it was shown that some species have the capacity to grow by using Extracellular Polymeric Substances (EPS) of microbial

origin (dextran, pullulan, peptides, etc.) (Legin et al., 1998). So far, no respiration ability on electrode or direct EET mechanism have been reported about this archaeal genus, even if some *Thermococcus* species have been shown to reduce amorphous Fe (III) oxide. However, the mechanism is still unclear and could be mediated through electron transfer to humic substances and other extracellular quinones (Lovley et al., 2000; Slobodkin et al., 2001). Furthermore, a recent study has highlighted the possibility of hydroquinone for microbial electron transfer to electrically conductive minerals, especially with pyrite composing hydrothermal chimney, or electrode (Taran, 2017). Nevertheless, no current was obtained with replacement of electrode with spent media, indicating no mediated electron transport in our condition. However, species of *Thermococcus* genus have been reported to produce nanopods or nanotubes by budding of their cellular envelope, but their function have not been fully understood (Marguet et al., 2013). As suggested by the authors, these archaeal nanopods or nanotubes could be used to expand the metabolic sphere around cells, promote intercellular communication or act in sulfur detoxifying mechanisms (Gorlas et al., 2015). We can therefore suppose a potential role of these nanotubes in EET. Thus, *Thermococcus* sp. could potentially be exoelectrogenic microorganisms through a still unknown mechanism.

Remarkably, the obligatory presence of both *Thermococcus* and *Geoglobus* species found in each BES on the polarized electrode did not seem fortuitous. Assuming that the *Thermococcus* species found in our enrichment are heterotrophic, after consumption of YE traces, their only carbon source available would be the EPS or organic compounds produced by *Geoglobus* spp. present on polarized electrode. Then, their fermentative metabolism would lead to the production of acetate, H_2 and CO_2 which could then be used by *Geoglobus* species to grow using the electrode as the ultimate electrons acceptor. However, recent data have shown the inability of *Geoglobus* to transfer electrons to an electrode from H_2 (Yilmazel et al., 2018). Previous studies have shown that some electroactive bacteria are also able to grow syntrophically with other microorganisms via direct interspecies electron transfer (DIET) (Shrestha and Rotaru, 2014). As explained previously, *Geoglobus ahangari* has shown a weak electron transfer capacity when grown in pure culture. The higher current density obtained in our conditions would suggest that the *Geoglobus sp.* and *Thermococcales* enriched on our polarized electrodes live syntrophically to improve their growth, and subsequently increased the quantity of electrons transferred to the electrode. Thus we would suggest that there is a syntrophic mechanism, with potentially DIET, between *Thermococcus* and *Geoglobus* in deep hydrothermal vents.

2.5. Conclusion

This study is the first to report on the enrichment of electroactive consortium in ex-situ conditions that mimic the conductive chimney of a hydrothermal vent with polarized carbon cloth in anaerobic artificial seawater at 80 °C. Moreover, we demonstrate the specificity of enrichment of *Bacteria* on Fe (III) oxide compared to the enrichment of *Archaea* (mainly *Thermococcus sp.* and *Geoglobus sp.*) on BES, where the biodiversity is more conserved. These results support the hypothesis of electroactivity as a well-represented metabolism in this type of environment by confirming the presence of exoelectrogenic microorganisms capable of external electron transfer to conductive support.

3. ARTICLE 3 : PRODUCTION OF CURRENT BY SYNTROPHY BETWEEN EXOELECTROGENIC AND FERMENTATIVE HYPERTHERMOPHILIC MICROORGANISMS IN HETEROTROPHIC BIOFILM FROM A DEEP-SEA HYDROTHERMAL CHIMNEY.

Guillaume Pillot[1], Sylvain Davidson[1], Richard Auria[1], Yannick Combet-Blanc[1], Anne Godfroy[2] & Pierre-Pol Liebgott[1*]

1 Aix Marseille Université, IRD, Université de Toulon, CNRS, MIO UM 110, Marseille, France.

2 IFREMER, CNRS, Université de Bretagne Occidentale, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes - UMR6197, Ifremer, Centre de Brest CS10070, Plouzané, France.

3.1. Abstract

To study the role of exoelectrogens within the trophic network of deep-sea hydrothermal vents, we performed successive subcultures of a hyperthermophilic community from a hydrothermal chimney sample on a mix of electron donors in a microbial fuel cell system. Electrode (the electron acceptor) was swapped every week to enable fresh development from spent media as inoculum. The MFC at 80°C yielded maximum current production increasing from 159 to 247 mA m^{-2} over the subcultures. The experiments demonstrated direct production of electric current from acetate, pyruvate and H_2 and indirect production from yeast extract and peptone through the production of H_2 and acetate from fermentation. The microorganisms found in on-electrode communities were mainly affiliated to exoelectrogenic *Archaeoglobales* and *Thermococcales*species, whereas in liquid media the communities were mainly affiliated to fermentative *Bacillales* and *Thermococcales* species. We found evidence of interactions between fermentative microorganisms degrading complex organic matter into fermentation products that are then used by exoelectrogenic microorganisms oxidizing these reduced compounds while respiring on a conductive support. We posit that with carbon cycling, the syntrophic relations between fermentative microorganisms and exoelectrogens could enable some microbes to survive as biofilm in extremely unstable conditions.

3.2. Introduction

The deep-sea hydrothermal vents located along the mid-ocean ridges of the Atlantic, Pacific and Indian oceans (Dick et al., 2013; Konn et al., 2015) are dynamic habitats characterized by large steep thermal and chemical gradients. Around the hydrothermal chimneys, these gradients provide a wide range of growth conditions for the many extremophilic micro- and macro-organisms composing these specific deep-sea ecosystems (Kelley et al., 2002; Kristall et al., 2006). The origin of these ecosystems is thought to be based on (hyper) thermophilic chemolithoautotrophs that use chemical energy from the oxidization of reduced chemical substances to convert inorganic carbon into organic carbon. These organics then serve as primary nutrients for the whole ecosystem (Reysenbach et al., 2000; Takai et al., 2006), enabling the development of heterotrophic microorganisms and macro-organisms through the food web. Studies on the microflora of deep-sea hydrothermal vents have identified hyperthermophilic autotrophs and heterotrophs of both the *Bacteria* and *Archaea* domains in the chimney structures (Nakagawa and Takai, 2008). These autotrophic and heterotrophic microorganisms use a wide diversity of metabolisms based on different electron donors (H_2, H_2S, CH_4, Fe^0, Fe^{2+}, S^0, organic matter) and acceptors (O_2, NO_3^-, SO_4^{2-}, CO_2, Fe^{3+}) found in the environment or produced by other microorganisms (Frank, 2013). These diverse metabolisms support a complex food web and lend the biocenosis stability in response to critical changes in conditions. Recent studies on samples from deep-sea hydrothermal vents have revealed a new type of metabolism based on microorganisms called exoelectrogens, which are able to transfer electrons directly from cells to an electrically conductive support like the chimney walls (Pillot et al., 2018; Sekar et al., 2017; Yilmazel et al., 2018).

A decade of research has shown the possibility of electron transfer through the electrically conductive chimney composed of polymetallic massive sulfide. The electric current was produced by chemical reaction between reduced compounds in the hydrothermal fluid and the oxidative conditions surrounding the chimney (Nakamura et al., 2010), but could also be generated from biological catalysis by exoelectrogenic microorganisms (Pillot et al., 2018). Thus, a proportion of the hydrothermal vent chimney's microbial populations is likely dependent on energetic metabolism based on these extracellular electron transfers (EET) to insoluble extracellular minerals. Most of what we know about EET in microbes comes from studies using bioelectrochemical systems such as microbial fuel cells (MFCs) (Allen and Bennetto, 1993; Logan et al., 2006; Schröder et al., 2015). An MFC is a bioelectrochemical device that supports microorganism growth on an anodic electrode, where the microorganisms oxidize substrates used as energy source and transfer electrons to the anode which serves as electron acceptor. The electron flux is then routed toward the cathodic electrode where the reduction of the terminal electron acceptor, usually the oxygen, takes place. In the past few years, exoelectrogenic activity has been reported in almost 100 mesophilic microbial species, mainly affiliated to the bacterial phylum *Proteobacteria* (Koch and Harnisch, 2016). Studies have shown electric current production by *in-situ* benthic MFCs on hydrothermal systems, with in one case the dominant presence of mesophilic *Bacteriodetes*, *Firmicutes* and *δ-Proteobacteria* (Girguis and Holden, 2012; Gong et al., 2011; Nielsen et al., 2007). Just recently, three hyperthermophilic archaea, *Pyrococcus furiosus*, *Geoglobus ahangari* and

Ferroglobus placidus, were shown to be capable of producing electricity in MFCs (Sekar et al., 2017; Yilmazel et al., 2018). These microorganisms belonging to the orders *Archaeoglobales* and *Thermococcales* have been found in hydrothermal chimneys where they could use a conductive support like the pyrite composing the chimney wall (Yamamoto et al., 2017) as electron acceptor for their metabolism. Another recent study showed the dominant presence of *Archaeoglobales* and *Thermococcales* in a hyperthermophilic exoelectrogenic community from a deep-hydrothermal vent sample enriched using acetate as electron donor in a microbial electrolysis cell (MEC) system with the anode poised at -0.110 V vs Ag/AgCl (Pillot et al., 2018). While only few electrogenic species should be able to grow under these very selective physicochemical conditions, it is reasonable to think the deep-sea hydrothermal ecosystem harbors a broader exoelectrogenic biodiversity.

The importance of exoelectrogens in the biosphere of hydrothermal ecosystems and their roles within the food web are still unclear. There have been attempts to investigate trophic relationships among the different species inhabiting these environments (Desbruyères et al., 2000; Portail et al., 2016), but most studies to date have focused on relations between microflora and macrofauna, and none have integrated exoelectrogenic ability as a potential metabolism and electron sink. Here we set out to gain further insight into the role of hyperthermophilic exoelectrogens in the hydrothermal biosphere. An exoelectrogenic community sampled from a deep-sea hydrothermal vent was grown using a hyperthermophilic MFC system. The system was configured with a free-potential anode as sole electron acceptor, and a broad diversity of substrates was tested to enrich an exoelectrogenic community. In order to select a community including both exoelectrogens and other closely-related species, the community was grown over one month on an anodic support that was replaced each week. Current production was monitored in real time, and changes in biodiversity of the on-electrode biofilm and free cells in the liquid media were determined at each electrode change. During the fourth week, when current density was stabilized, the different substrates (acetate, formate, pyruvate, hydrogen, glycogen, starch, yeast extract, peptone, and without substrate) were separately tested alone to determine the current density production attributable to each one. The results obtained here, along with knowledge on the metabolisms of each species retrieved on both electrode and liquid media, argue for interspecies interactions inside the community, prompting us to propose a putative syntrophic model.

3.3. Material and methods

3.3.1. Sample collection and preparation

A hydrothermal chimney sample was collected on the Capelinhos site on the Lucky Strike hydrothermal field (37°17.0'N, MAR) by the remotely operated underwater vehicle VICTOR 6000 during the MoMARsat cruise in 2014 (doi: 10.17600/14000300) led by IFREMER (France) on board R/V *Pourquoi Pas?* (Sarradin and Cannat, 2014). The sample (PL583-8) was collected by breaking off a piece of a high-temperature active black smoker using the submersible's robotic arm and bringing it back to the surface in a decontaminated insulated box. On board, chimney fragments were anaerobically crushed in an anaerobic chamber under H_2:N_2 atmosphere (2.5:97.5)(La Calhene, France), placed in flasks under anaerobic conditions (anoxic seawater at pH 7 with 0.5 mg L^{-1} of Na_2S and N_2:H_2:CO_2 (90:5:5)

gas atmosphere), and stored at 4°C. Prior to the experiment, pieces of hydrothermal chimney were removed from the sulfidic seawater flask, crushed with a sterile mortar and pestle in an anaerobic chamber (Coy Laboratories, Grass Lake, Mich.), and distributed into anaerobic tubes for use in the various experiments.

3.3.2. Exoelectrogenic enrichment in a bioelectrochemical system

A BioElectrochemical System (BES) was filled with 1.5 L of sterile mineral medium as previously described (Pillot et al., 2018), and set at 80°C (monitored by an internal temperature probe) and pH 6.5 throughout platform monitoring (see Supplementary Material & Methods). The liquid media, stirred at a constant 300 rpm, was supplemented with 10 mM acetate, 10 mM formate, 10 mM pyruvate, 0.5 g L^{-1} yeast extract, 0.5 g L^{-1} peptone, 0.5 g L^{-1} starch and 0.1 g L^{-1} glycogen as substrate. These compounds, added in excess, can be found in hydrothermal systems through Fischer–Tropsch process reactions, produced by microorganisms for energy storage or released during cell degradation. The working electrode (WE) composed of 20 cm^2 of carbon cloth (PaxiTech SAS, France) served as potential electron acceptor for exoelectrogen growth. An anion exchange membrane (Membrane International Inc., Ringwood, NJ) separated the two chambers. The counter-electrode (CE) was a 20 cm^2 carbon cloth coated with platinum. The system was inoculated with 5 g of crushed chimney in anaerobic conditions. Current production was monitored using SP-240 potentiostats and EC-Lab software (BioLogic, France) via the constant load discharge method, with titanium wire connected to the WE and CE and to a 3M Ag/AgCl reference electrode (Mettler Toledo InPro 3253, Switzerland). Current density and WE and CE potential were measured every 10 s. The resistance imposed between the WE and CE was set at 700 Ω, based on the maximum power density obtained on the polarization curve (see Supplementary Figure V-7), and the system's internal resistance of 675 Ω. The WE was swapped 3 times for a new sterile one, once maximum current density had stabilized for a few days, adding 1250 mL of fresh mineral medium supplemented with substrates. A volume of 250 mL of spent media from the previous experiment with the environmental inoculum (crushed chimney) was left in the bottom of the reactor before starting each subculture. After the first week, an open-circuit control was performed in a similar way as for week-2 enrichment but with the electrodes disconnected from the potentiostat. Tests on substrates were carried out by emptying the spent medium and filling with fresh medium supplemented with a single substrate in the same concentrations as described above. Tests on H_2 were carried out at 50 mL min^{-1} of H_2 flux sparged in the agitated bioreactor, which is far higher than observed by fermentation in order to overcome the lack of information on the solubility of our H_2 gas supply compared to the solubility of H_2 produced by fermentation in close vicinity to the electrode. An abiotic control with H_2 was performed in rich liquid media, but no current production was observed. A spent media control was performed in sterile BES filled with 0.2µm-filtered culture media from the end of first culture. A killed-inoculum control was performed in same conditions as the enrichment experiment but inoculated with chimney sample sterilized at 121°C during 20 min. Cyclic voltammetries were carried out at initial time and prior to collecting the WE at 20 mV s^{-1} between -0.5 V and 0.5 V *vs* the Ag/AgCl reference electrode. Due to the limited inoculum quantity and accessibility and its quick degradation when opened, even in anaerobic conditions, the experiment could not be replicated.

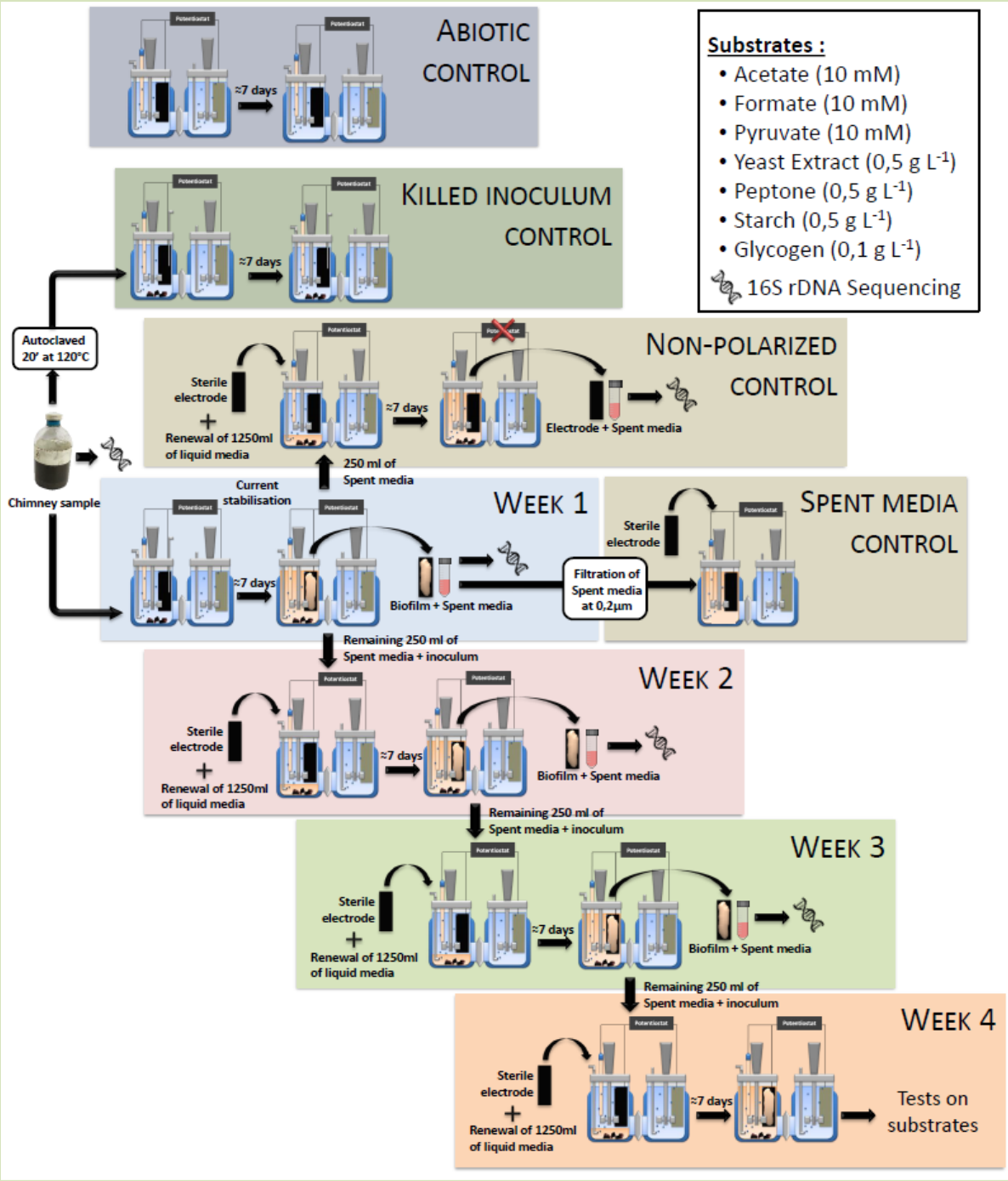
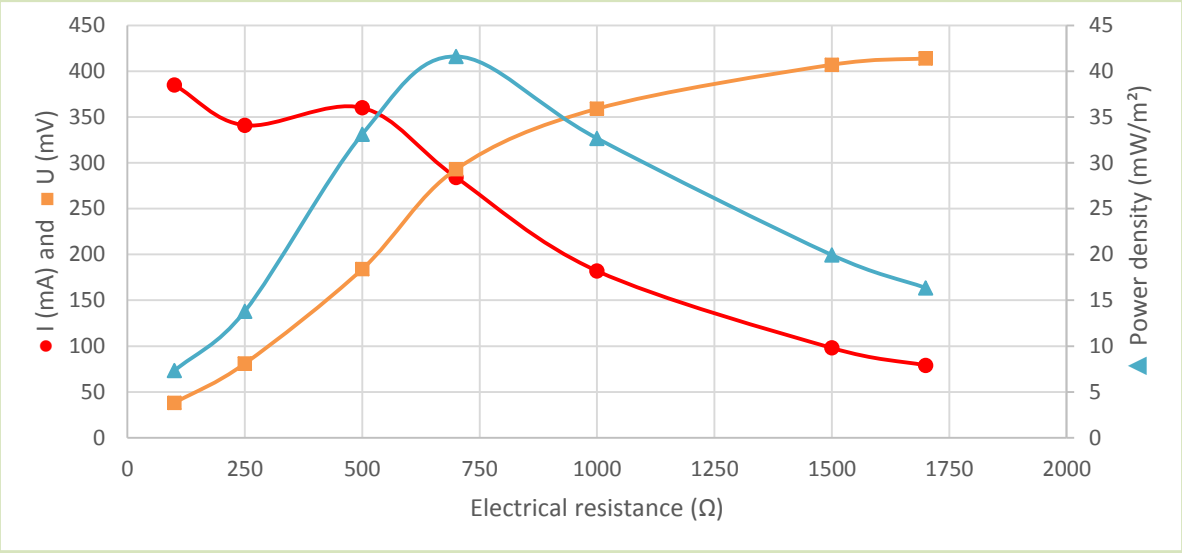


Figure V-6 : Schematic representation of the different experiments (Supplementary material and method)

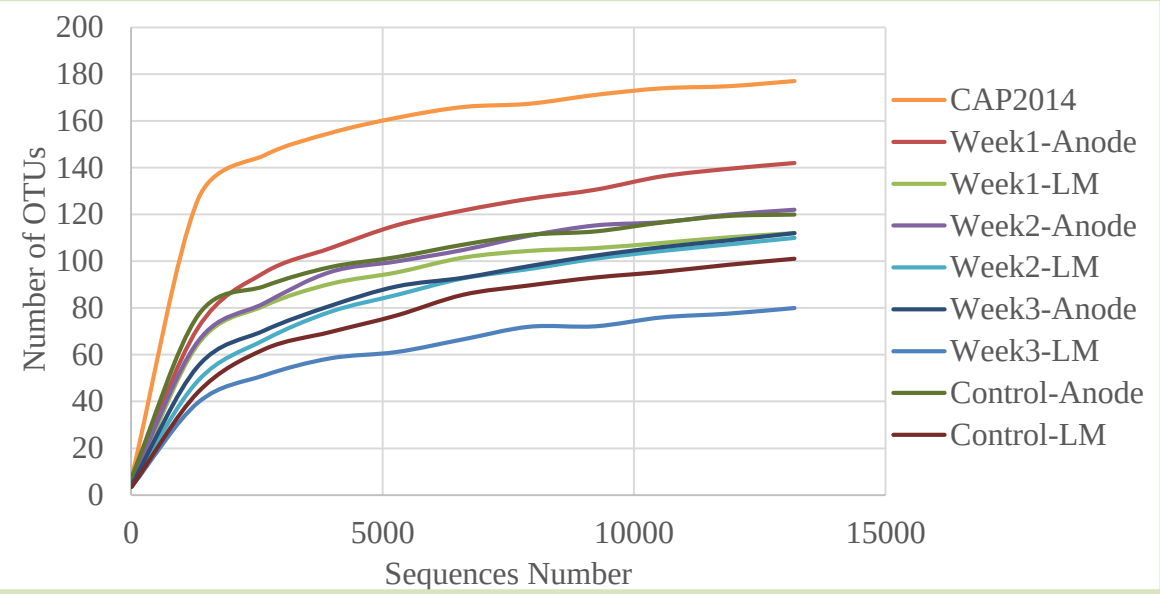


Supplementary Figure V-7 : Polarization curve at the end of the first week.

3.3.3. Biodiversity analysis

Taxonomic affiliation was performed according to (Zhang et al., 2016)). DNA was extracted from 1 g of the crushed chimney and at the end of each week of culture from scrapings of half of the WE and from centrifuged pellets of 50 mL of spent media. DNA extraction was carried out using the MoBioPowerSoil DNA isolation kit (Carlsbad, CA). The V4 region of the 16S rRNA gene was amplified using the universal primers 515F (5′-GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3′) and 806R (5′-GGA CTA CNN GGG TAT CTA AT-3′) (Bates et al., 2011) with Taq-&Load PCR MasterMix (Promega , Madison, WI). PCR reactions were carried out using a C1000 Thermal Cycler (BioRad) in the following conditions: initial denaturation at 94°C for 3 min followed by 30 denaturation cycles at 94°C for 30 s, primer annealing at 50°C for 30 s and extension at 72°C for 90 s, followed by a final extension step at 72°C for 5 min. The amplified gene regions were sequenced on an IlluminaMiSeq 2500 platform (GeT-PlaGe, France) to generate paired-end 150-bp reads. Reads were merged using FLASH software (V1.2.7, http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/). Taxonomic affiliation was done using the QIIME software package (v 1.9.1, http://qiime.org/index.html). Chimera were removed from the merged sequence using the UCHIME algorithm (http://www.drive5.com/usearch/manual/uchime_algo.html). The filtered sequences were then clustered into OTUs using the RDP method with a minimum bootstrap confidence of 0.8, and OTUs were affiliated using the Silva database as reference (http://www.arb-silva.de). To analyze alpha diversity, the OTU tables were rarefied to a sampling depth of 13190 sequences per library, and two metrics were calculated: the richness component represented by number of OTUs observed, and the evenness index (Pielou's index) which measures distribution of individuals within species independently of species richness. Rarefaction curves (see Supplementary Figure V-8) for each enrichment approached an asymptote, suggesting that the sampling depths were sufficient to capture overall microbial diversities in the studied samples. Week-4 biodiversity was not studied due to the bias of further analysis on substrates which would have specifically influenced the exoelectrogenic community, so we cannot

compare week-4 biodiversity to weeks 1–3. The raw sequences for all samples are registered in the European Nucleotide Archive (accession number: PRJEB25397).



Supplementary Figure V-8 : Rarefaction curves of 16S rDNA sequences for bacterial and archaeal diversities in the different samples. Curves were calculated on OTUs at 97% similarity.

3.3.4. Quantitative PCR of archaeal and bacterial 16S rRNA gene copies

Bacterial and archaeal quantification was carried out by qPCR with SsoAdvanced™ Sybr Green Supermix on a CFX96 Real-Time System (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, CA) with the primers GML5F (5'-GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') and Univ516 (5'-GTD TTA CCG CGG CKG CTG RCA-3') specific to *Bacteria* (Michotey et al., 2012) and Arc931F (5'-AGG AAT TGG CGG GGG AGC A-3') and m1100R (5'-BTG GGT CTC GCT CGT TRC C-3') for *Archaea* (Einen et al., 2008). The PCR program was composed of a 10 s denaturation step at 94°C, a hybridization step of 10 s at 55°C (*Bacteria*) or 62°C (*Archaea*), and a 10 s elongation step at 72°C, with melting curves generated at the end of each reaction to ensure product specificity. A standard curve from 10^2 to 10^{10} 16S rRNA gene copies was obtained by diluting pGEM-T plasmids harboring hyperthermophilic bacterial or archaeal rRNA gene fragments obtained from the microbial community of interest. Results were expressed in number 16s rRNA gene copies per gram of crushed chimney per milliliter of liquid media or per cm² of electrode surface.

3.3.5. Microscopy observation with fluorescent in-situ hybridization

Prior to microscopic observation, the WE and the liquid media from the end of the week-2 experiment were fixed with 2% paraformaldehyde and kept at 4°C. The liquid media (100 mL) was then filtrated on a 0.2 µm polycarbonate Whatman Nuclepore membrane. To highlight the presence of microorganisms on the electrode surface, Syto9 was used as total fluorescent nucleic acid stain. FISH probes specific to *Bacteria* (EUB338-FITC), *Archaea* (ARCH917-CY3), *Thermococcales* (Tcoc164-FITC) and *Archeoglobales* (Arglo32-FITC) (Rusch and Amend, 2004) were used separately on different areas of the electrode. Total cell staining was performed by immersing a patch of electrode in 10 µM of Syto9 for 15 min then rinsing it several

times in sterile water. For FISH observation, samples of WE or cells on filter were incubated with fluorescent probes in an equilibrated humidity chamber at 48°C for 2–6 h and then washed with washing buffer at 42°C for 15 min. Samples were then dried in 80% ethanol and mounted on glass slides with antifadent AF1 (Citifluor, Hatfield, PA) added with 4'-6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma Aldrich) as counterstain at a final concentration of 2 µg mL^{-1}. Electrode samples were observed under a confocal LSM780 microscope (ZEISS, Germany) equipped with a x10 EC PLAN-NEOFLUAR objective. Blue and green fluorescence emissions were acquired by laser excitation at 358 and 488 nm, respectively. Image stacks (at 0.5–1 µm steps) were acquired with GaAsP photomultiplier tube detectors. Epifluorescence micrographs were processed using Zen software (ZEISS, Germany) and Fiji software (http://imagej.nih.gov/; http://fiji.sc/Fiji). Liquid samples on filters were observed on a Olympus BX61 microscope with a Hamamatsu digital camera c11440, and processed with Olympus cellSens™ software.

3.4. Results

3.4.1. Exoelectrogenic community enrichments and current density production.

Table V-1 : Lag time before current increase, maximum current density Jmax (mA m^{-2}), maximum difference of potential between anode and cathode Umax (V), and maximum power density Pmax (mW m^{-2}) obtained after current stabilization over four weeks of culture.

Time	Lag time (h)	J_{max} (mA/m²)	U_{max} (V)	P_{max} (mW/m²)
Week 1	52h	159	0.29	49
Week 2	19h	208	0.42	76
Week 3	12h	225	0.43	90
Week 4	5h	247	0.46	110

To allow the growth of a hyperthermophilic exoelectrogenic biofilm (HEB) with a maximum of biodiversity and trophic relations, a MFC was filled with synthetic seawater supplemented with a mix of different carbon and energy sources (acetate, formate, pyruvate, yeast extract, peptone, glycogen, and starch). Current density production was measured using the constant load discharge (CLD) method with a fixed external resistance (700 Ω) in the circuit between anode and cathode. Once current stabilization was reached after a few days, the anode was replaced by a sterile one. Four enrichments were done during 4 weeks.

The current density production results are reported in Figure V-9 and Table V-1. Over the subcultures, current densities increased from 159 to 247 mA m^{-2}. This was correlated to an increase of electrical power density (P_{max} from 49 to 110 mW m^{-2}) while lag time before current production decreased from 52 h (wk1) to 5 h (wk4) (Table 1). These current density and maximum power density values are in good agreement with another study on hyperthermophilic MFCs operated at 80°C in similar carbon/energy-source conditions, which found current density ranging from 100 to 350 mA $m^{-2}$and maximum power density ranging from 37 to 165 mW m^{-2} (Fu et al., 2015b; Wrighton et al., 2008). The increase of maximum

current density coupled to the decrease of lag phase before current production over each subculture suggests a specialization of the community colonizing the electrode used as an electron acceptor. The increase in current was concomitant with a decrease in H_2 and CO_2 production down to 0.08%(v/v) for both in the MFC gas outlet (100 $mLmin^{-1}$), which is typical of fermentative metabolism occurring in the liquid media. In contrast, the abiotic, spent media and inoculum-killed controls produced a weak current (30–40 mA m^{-2}) during the first few hours which rapidly decreased to nearly 5–10 mA m^{-2} with no gas production, whereas the open-circuit control showed higher production of H_2 and CO_2 up to 0.2% (v/v) in the gas outlet (see Supplementary Figure V-10).

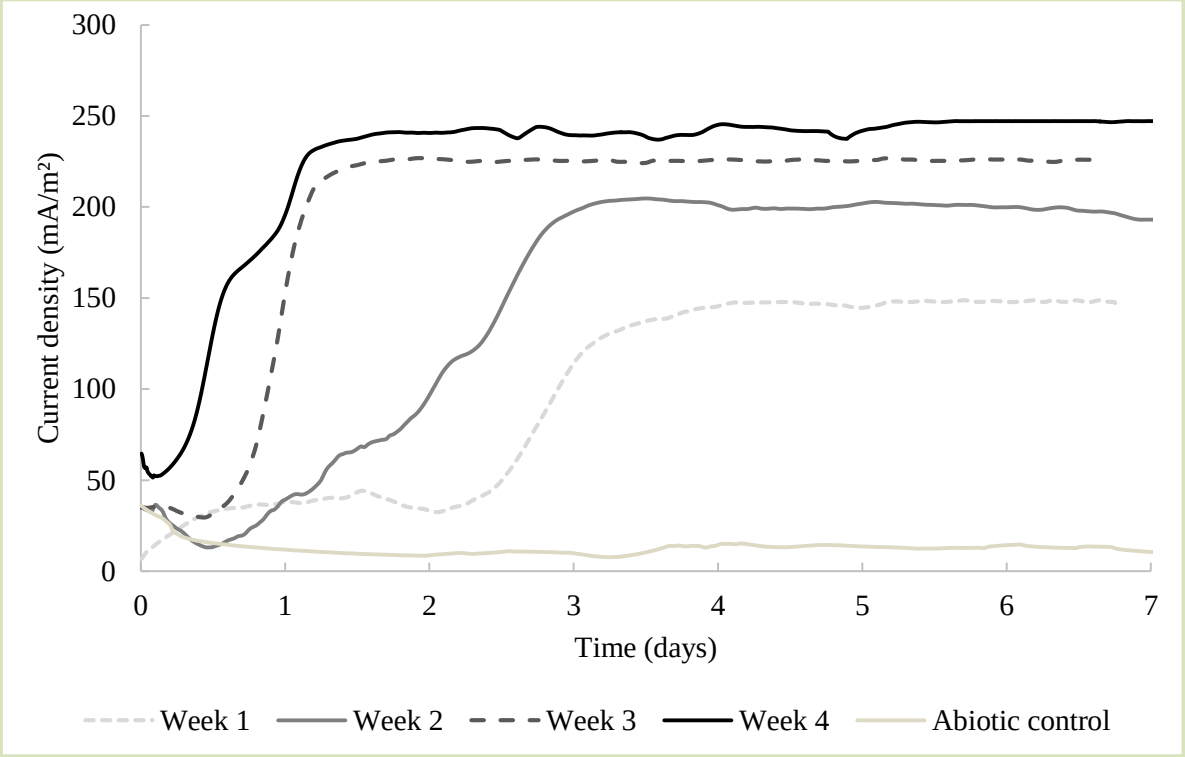
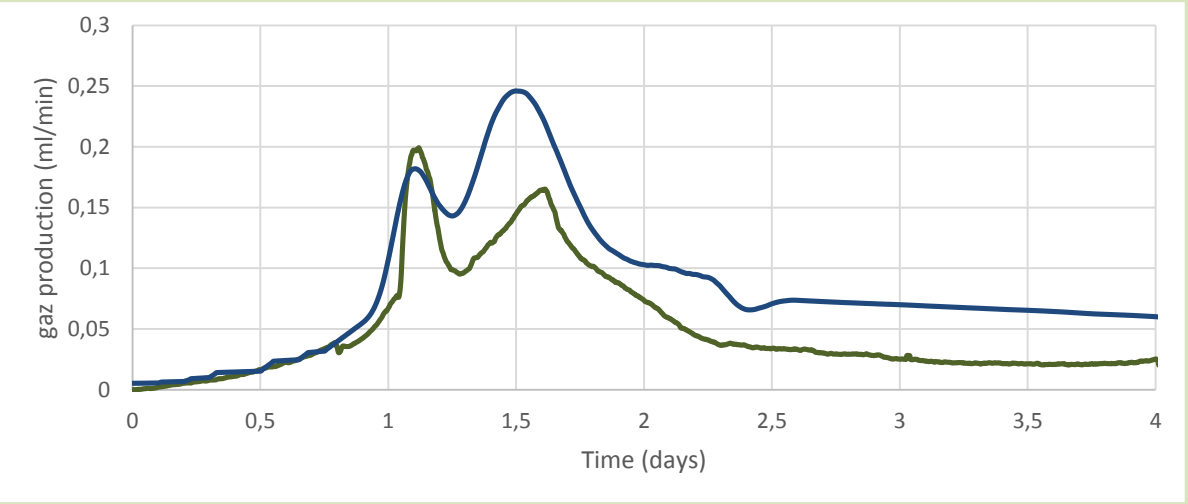


Figure V-9 : Current production plotted per week of culture for inoculated experiments (weeks 1, 2, 3 and 4) and abiotic control. Constant load discharge was used with a fixed external resistance set at 700 Ω.



Supplementary Figure V-10 : H_2 (green line) and CO2 (blue line) of the non-polarized control inoculated with chimney sample and with the mix of substrates.

To determine the potential of the oxidation and reduction reactions by the exoelectrogenic biofilm, cyclic voltammetry measurements were performed at the end of each subculture when current density had stabilized. Figure V-11 shows the increase in catalytic and capacitive currents after each subculture corresponding to a change in electrochemical properties of the electrode surface that may indicate the development of a HEB. The catalytic current was higher and more distinct than for abiotic controls, suggesting that the current was not caused by the complex medium. The week-4 voltammogram of the MFC anode showed two catalytic oxidation waves: (i) the first started at -0.5 V and increased sharply around 1.8 mA at a midpoint potential of about -0.360 V; (ii) the second started at -0.18 V at amidpoint potential of -0.014 V. These oxidation waves increased over the weeks of culture and correspond to the oxidation of different compounds that may be catalyzed by the electroactive biofilm. Similar midpoint potentials at -0.350 V *vs.* Ag/AgCl electrode have been observed in previous investigations of thermophilic exoelectrogenic enrichments on acetate (Shehab et al., 2017; Yilmazel et al., 2018). A pattern difference was observed in a previous study in MEC inoculated with hydrothermal chimney (Pillot *et al.*, 2018) showing less capacitive current and lower maximum current peaks at -0.300 V. This difference is probably due to the use of only acetate as electron donor, the method of enrichment used with electrode poised at higher potential than observed in this study, and the absence of renewal of the conductive support for exoelectrogenic community selection.

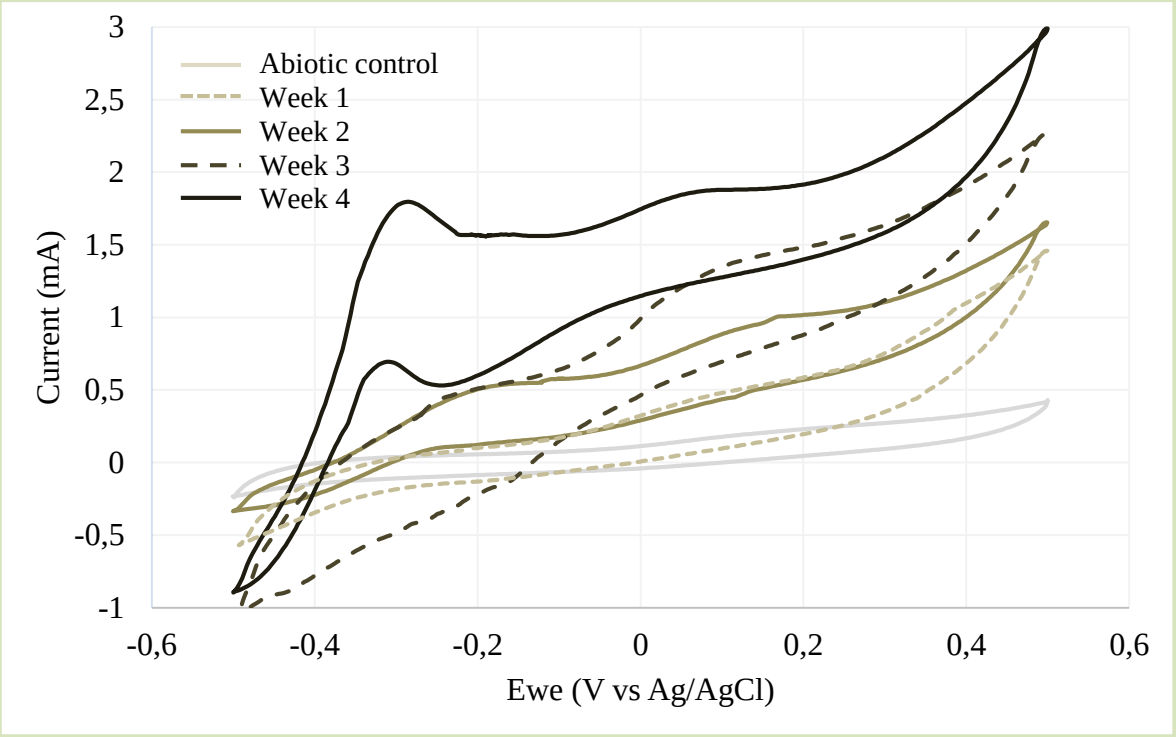


Figure V-11: Cyclic voltammetry analysis of the anode per week of culture at 20 mV s^{-1} ranged -0.5 to 0.5V. The experiment was performed in triplicate. The curve shows data from a representative experiment.

3.4.2. Evolution in microbial diversity during the first three weeks of enrichment

To identify the evolution of microbial diversity on the electrode and in liquid media over the first three weeks of enrichment, a 16SrRNA gene survey was performed by IlluminaMiSeq sequencing the hypervariable V4 region (Figure V-12) of the chimney sample and after each stabilization of current density (at about day 7 for each). During the first three weeks of enrichment, biodiversity became poorer with a loss of richness from 177 OTUs in the inoculum to 80 in week-3, correlated to a decrease in evenness index (from 0.695 to 0.299, respectively). This decrease of biodiversity and dominance of a few species can be explained by our selective enrichment conditions with high temperature, substrate specificity, anode electron acceptor and quick renewal of electrically conductive support.

Based on average abundance analysis, the taxonomic composition of the environmental sample (Figure V-12) was dominated by *Bacteria* (99.6% of microbial biodiversity), where *Proteobacteria* (77%) was the major phylum with 50% γ-*proteobacteria*, mainly represented by *Alteromonadales*, 11% α-*proteobacteria*, 7% ε-*proteobacteria*, 5% unclassified *proteobacteria*, 2% *δ-proteobacteria* and 2% *β-proteobacteria*. The remaining bacterial diversity was spread across the *Deinococcus-Thermus* (8%), *Aquificae* (6%) and *Bacteroidetes* (5%) phyla, and 4% shared in other phyla. The Archaeal diversity (0.4%) was composed of *Thermoproteales*, *Thermococcales* and *Archaeoglobales.*

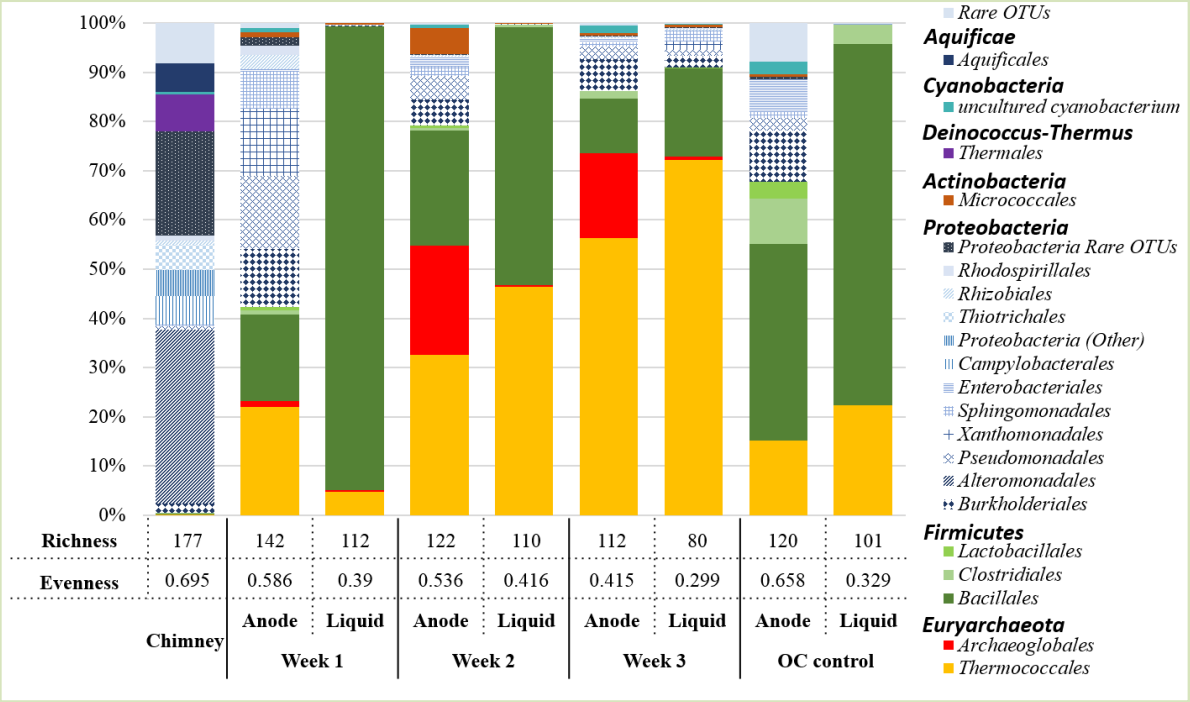


Figure V-12: Dominant taxonomic affiliation at order level and biodiversity indices of microbial communities from a crushed chimney sample, as plotted on the anode and liquid media over the weeks of culture and in the non-polarized electrode control. OTUs representing less than 1% of total sequences of the samples are pooled as 'Rare OTUs'. Biodiversity indexes of species richness and evenness represent the number of observed OTUs and Pielou's evenness (J) index, respectively.

The evolution of archaeal diversity on the successive enrichment cultures over the three weeks was dominated by the *Euryarchaeota* phyla (mainly the orders *Archaeoglobaceae* and *Thermococcaceae*), which rose from 0.4% in the initial sample to >70% in week-3, whether on the electrode or in liquid media. Interestingly, at genus level, dominant archaeal OTUs on the electrode were closely related to uncultured *Thermococcus* species (22%-Wk1, 32%-Wk2 and 56%-Wk3) and *Geoglobus* spp. (0.2%-Wk1, 22%-Wk2 and 18%-Wk3) affiliated to *Geoglobusahangari* (99% identity on ~300bp 16S rDNA fragments). Moreover, planktonic microbial diversity was mainly enriched in uncultured *Thermococcus* species (4.9%-Wk1, 46.5%-Wk2, and 72.2%-Wk3) rather than *Geoglobus* spp. (<0.7% during the three weeks).

Bacterial diversity over the first three weeks on the electrode and in liquid media was mainly composed of species belonging to the order *Bacillales* (representing up to 94% of biodiversity in liquid media during week-1). The remaining OTUs, mainly found on electrodes, were surprisingly distributed among the mainly mesophilic orders *Burkholderiales*, *Pseudomonadales*, *Xanthomonadales*, and *Sphingomonadales*, which were not expected in these hyperthermophilic conditions. However, most of these phylogenetic orders harbor some thermophilic or hyperthermophilic species (Sutrisno et al., 2004; Wagner and Wiegel, 2008). Note the gradual decrease in proportion of these bacteria on the electrode, which fell to less than 15% of cumulative total by week-3, indicating lower competitiveness in our conditions compared to *Thermococcus*, *Geoglobus* and *Bacillales* species.

In order to identify members of the community requiring the electrode as electron acceptor for their growth, a comparative enrichment without electron acceptor was performed in parallel with week-2 enrichment. We carried out an open-circuit control with week-1 final culture medium as inoculum and with the electrode as inert support without the possibility of electron exchange with the counter-electrode. This control enrichment showed the following major phyla (on the electrode and liquid media, respectively): *Proteobacteria* (21% and 0.18%), *Firmicutes* (52% and 77%) and *Euryarchaeota* (15% and 22%). Interestingly, based on average abundance analysis, microbial biodiversity was richer on the electrode than in the liquid media (see the richness and evenness indexes in Figure 3). The major members of the *Proteobacteria* phylum, *Burkholderiales* (10%), *Enterobacteriales* (7%) and *Sphingomonadales* (3%) orders, thus prefer to grow into biofilm than planktonic cells. At order level, *Bacillales* (40%), *Clostridiales* (9%) and *Lactobacillales* (3%) were the remaining major bacterial orders growing on the electrode. However, only the archaeal order *Thermococcales* (15%) was present in this enrichment control, whether on the electrode or in liquid media. No OTUs of the order *Archaeoglobales* were observed. Microbial diversity in the liquid media was mainly composed of *Bacillales* (73%), and *Thermococcales* (22%), which are known to be fermentative microorganisms.

3.4.3. Microscopic observation of exoelectrogenic biofilm

The HEB obtained during the second week was observed under a confocal microscope with DNA staining (i) using Syto9 as fluorescent nucleic acid stain and (ii) FISH probes specific to *Bacteria*, *Archaea*, *Thermococcales* and *Archeoglobales* on separate observations. Figure 4 presents the micrographs obtained on the Syto9 abiotic control (Figure V-13-A) with only reflectance from the carbon fibers (blue color) and the week-2 anode (Figure V-13-B) with total cell staining (green color) covering the anode's carbon fibers. A hyperthermophilic biofilm was observable on the electrode surface, with extracellular polymeric substances (EPS) most likely bridging the spaces between carbon fibers. The *Achaea*-specific FISH probe (Figure 4-C) revealed two morphologies of biofilm distribution, with a diffuse signal all over the carbon fibers and concentrated clusters distributed on the fiber surfaces. FISH probes specific to the main archaeal taxonomic orders found in 16S Barcoding analyses attributed the diffuse presence all over the carbon fibers to *Archeoglobales* (green color, Figure V-13-D) and concentrated clusters to *Thermococcales* (green color, Figure V-13-E). The *Bacteria*-specific FISH probe did not produce enough signal to visibly identify bacerial distribution on the electrode. However, some cells were visible on carbon fibers when the x63 (NA1, 4PLAN APO) objective was used. Note that the important *Bacillales* proportion found on the electrode (Figure V-13) during week-2 was skewed by the higher 16S gene copy number present in species belonging to *Bacillaceae* (10 copies on average; rrnDB, Stoddard et al, 2014) compared to *Archaea* (1 copy on average). On the other hand, microscopic observation of DAPI-stained filtrated liquid media (Figure V-13-F) showed the presence of long-chained bacilli cells and some irregularly shaped coccoid species, corresponding most probably to *Bacillus* sp. and *Thermococcus* sp., respectively.

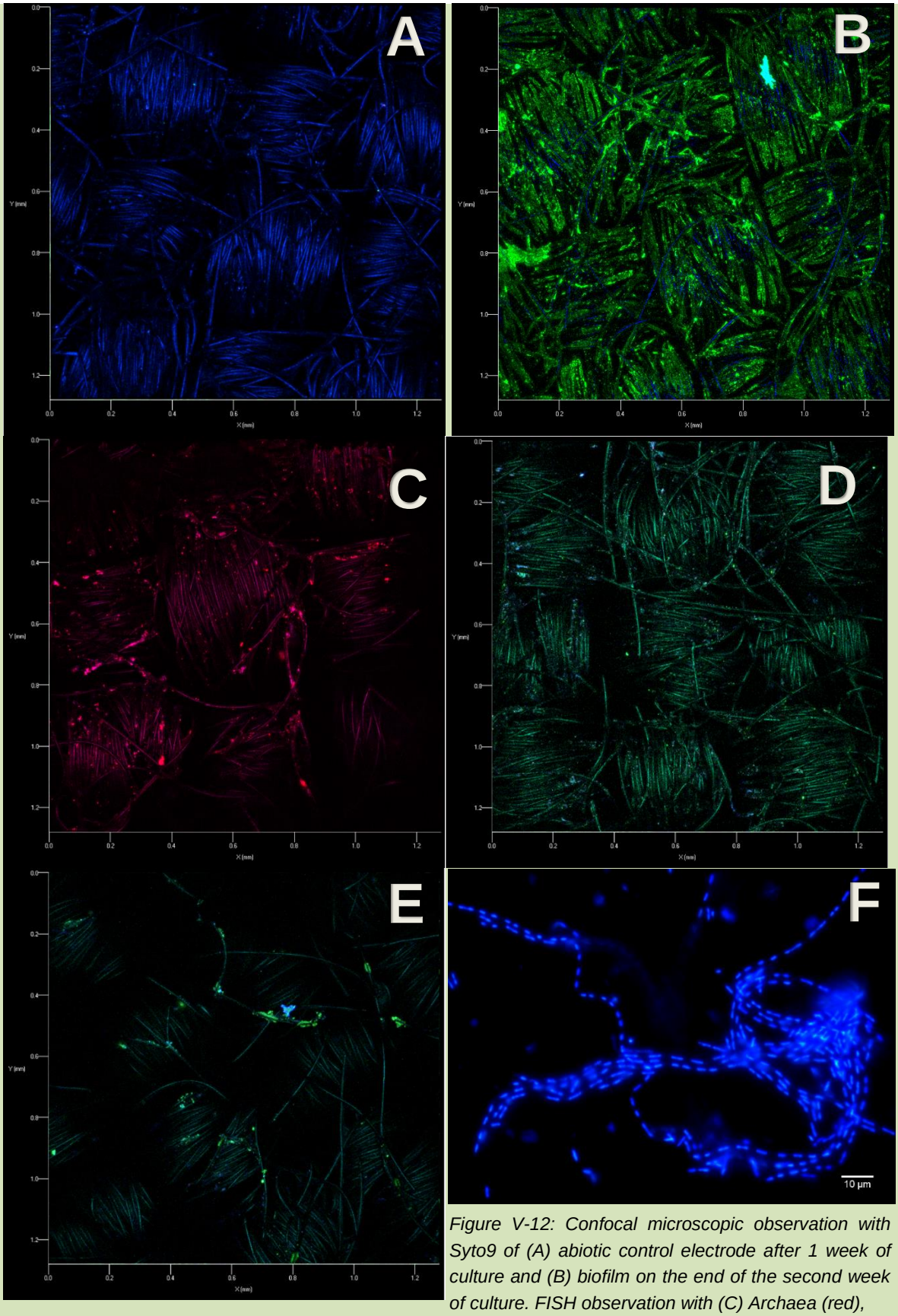


Figure V-12: Confocal microscopic observation with Syto9 of (A) abiotic control electrode after 1 week of culture and (B) biofilm on the end of the second week of culture. FISH observation with (C) Archaea (red), (D) Archeoglobales (green) and (E) Thermococcales (green) probes. Three-dimensional top projection of 1.2x1.2 mm patch of anode at 100× magnification. Epifluorescent observation of liquid media of the second week of culture (F) at 1000× magnification with DAPI.

3.4.4. Current density production with a single substrate

During the fourth week, current production was measured on each separate substrate in fresh media in order to identify the metabolic interactions and substrate specificities involved in the exoelectrogenic process. Figure V-14 reports current density and gas production for each substrate, highlighting the immediate current density production with 10 mM acetate (80 mA m^{-2}), 10 mM of pyruvate (108 mA m^{-2}) and a flow rate of 50 mL min^{-1} of H_2 (165 mA m^{-2}) compared to abiotic controls in the same conditions. Interestingly, there was a gradual increase of current with a mix of 0.5 g L^{-1} yeast extract and 0.5 g L^{-1} peptone (up to 83 mA m^{-2}), correlated with the weak production of CO_2, H_2 and acetate. This gradual increase suggests an indirect use of fermentation products by the on-electrode HEB. No current was obtained on formate and polysaccharides.

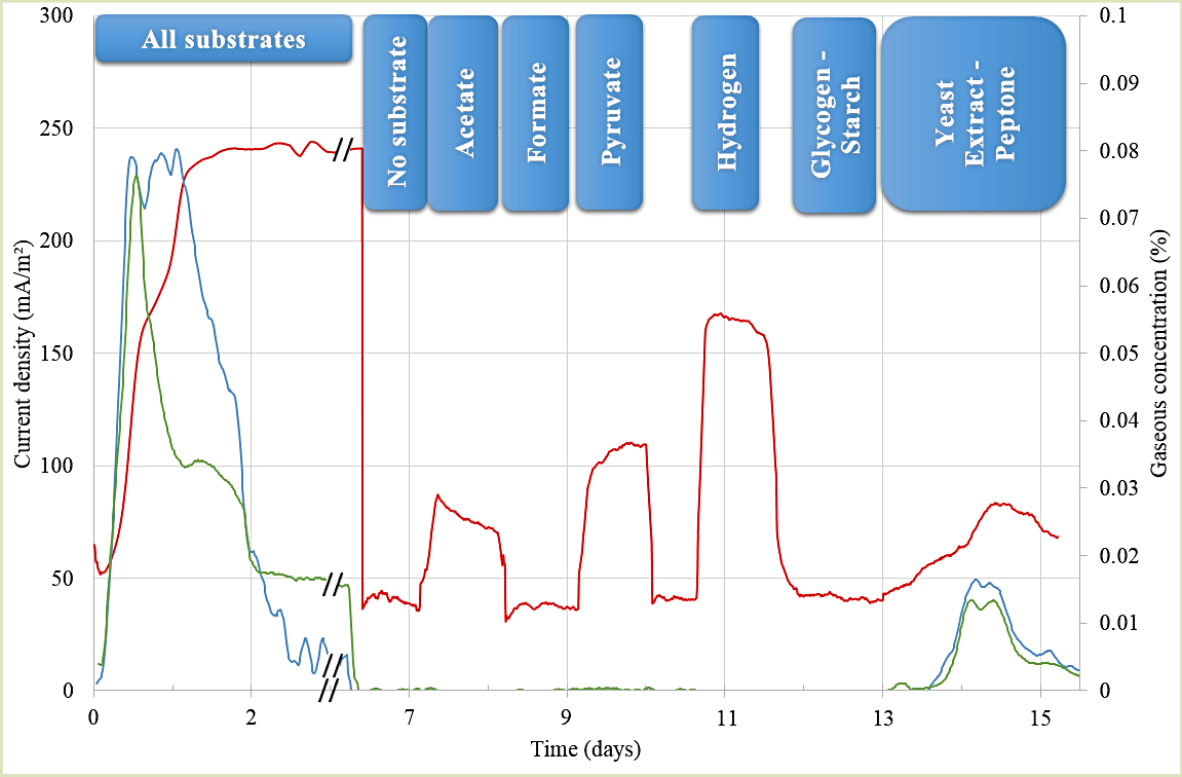


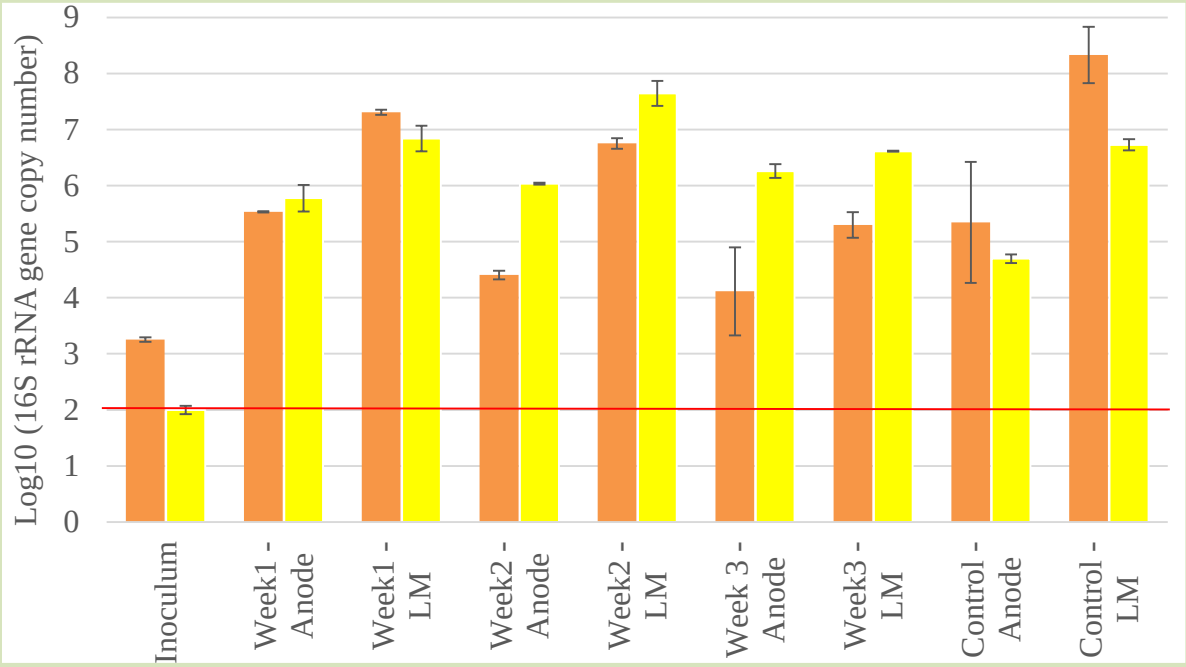
Figure V-14: Current density (red line), hydrogen (green line) and carbon dioxide (blue line) production over time by hyperthermophilic exoelectrogenic biofilm on the anode of a MFC at 80 °C under rich (from 0 to 7 days) and specific substrate conditions (from 7 to 15 days).

3.5. Discussion

3.5.1. Hyperthermophilic exoelectrogenic enrichments in MFC

Despite the discovery, more than 8 years ago, of the electrically conductive property of the chimney wall of hydrothermal vents (Nakamura et al., 2010), there has been relatively little investigation yet of microorganisms able to use this property for their metabolism, nor of their role in the trophic chain of the biosphere. We previously demonstrated the presence of hyperthermophilic exoelectrogenic communities from a hydrothermal vent using an enrichment method with acetate as sole energy source and electrode as electron acceptor in an MEC

(Pillot *et al.*, 2018). To gain further insight into hyperthermophilic exoelectrogenic diversity and its trophic interactions in the deep-sea hydrothermal ecosystem, a MFC was inoculated with chimney sample with a rich diversity of electron donors. Given the current production in the MFC inoculated with chimney sample (Figure V-9), the increase of capacitive and catalytic currents on cyclic voltammograms (Figure V-11), the microscopic observation of a biofilm on the electrode surface (Figure V-13) and the increase of bacterial and archaeal 16S rRNA gene copies on the electrode (see Supplementary Figure V-15), it could be concluded that a HEB was enriched in our system. The quick electrode change each week allowed to select the exoelectrogenic biodiversity colonizing the electrode and other tightly-related microorganisms (Figure V-12), increasing the current production and decreasing the lag time before current production. This selection phenomenon is commonly observed with the enrichment of exoelectrogenic communities from environmental samples (Dai et al., 2017; Xu et al., 2018).



Supplementary Figure V-15: qPCR quantification of bacterial (orange) and archaeal (yellow) 16S rDNA gene copies per g of inoculum, ml of liquid media or cm² of electrode. Red line correspond to the minimum threshold of detection. R^2= 0.994/0.990, Slope = -3.730/-3.924, y-int=48.719/49.654 respectively for bacterial and archaeal standard curve.

3.5.2. *Microbial composition of the biofilm community*

Thermococcales, Archaeoglobales and *Bacillales* are the three dominant orders retrieved on the electrode surface and in liquid media over each week of enrichment (Figure V-12). Interestingly, all three orders had already been retrieved as the main representatives of exoelectrogenic biofilm diversity in a previous study in more selective conditions, inoculated with sample from another hydrothermal field (Pillot et al., 2018). Thus, the fact that little more biodiversity was enriched in far more different substrate and electrode potential conditions seems to indicate that species of these three orders are potentially (i) the sole hyperthermophilic exoelectrogenic species in those environments, (ii) the sole in obligatory close relation with exoelectrogenic species, or (iii) the most competitive in such conditions.

Thermococcales are hyperthermophilic archaea known to mainly grow by fermentation of peptides or carbohydrates. The final fermentation products are mainly acetate, hydrogen and CO_2. They are recognized as ubiquitous to hydrothermal vents and easily come to dominate these environments in fermentative conditions (Bertoldo and Antranikian, 2006). Here, despite their colonization as clusters on the carbon fibers of the electrode (Figure V-13-E), we were unable to determine the exact role of *Thermococcales* in electric current production. However, some *Thermococcales* species, like strains of *Pyrococcusfuriosus,* have been shown to produce electric current in MFCs (Sekar et al., 2017) or to reduce insoluble iron oxide through EET (Slobodkin et al., 2001, 1999).

The *Archeoglobales* present all over the carbon fibers of the anode (Figure V-13-D) are mainly affiliated to *Geoglobus* spp. *Geoglobus* species are hyperthermophilic archaea known to grow lithoautotrophically on H_2 and CO_2 or heterotrophically on volatile fatty acids and peptides as electron donors and carbon source, and to obligatorily use soluble or insoluble Fe (III) as electron acceptor (Kashefi et al., 2002; Manzella et al., 2013). Recent studies have shown that *Geoglobus ahangari* has exoelectrogenic capacity on anodes when oxidizing acetate, whereas it did not produce current with H_2 (Yilmazel et al., 2018). Moreover, a *Geoglobus* species was found in the hyperthermophilic community on an MEC inoculated with hydrothermal chimney sample (Pillot et al., 2018). This is in good agreement with specific enrichment of *Geoglobus* spp. on the electrode over time and the absence of *Geoglobus* spp. enrichment in the open-circuit control. Indeed, these results were fully coherent with the fact that *Geoglobus* spp needs the electrode as electron acceptor.

The *Bacillales* enriched in our experiment, mainly in liquid media (Figure V-12, Figure V-13), were affiliated to *Bacillus* and *Geobacillus* species. *Bacillus* are Gram-positive sporulating rod-shaped bacteria frequently found in marine sediments or shallow hydrothermal vents. They are known to degrade a wide range of substrates, including peptide and polysaccharides. All *Bacillus* spp. grow aerobically but some have the ability to undergo fermentation or anaerobic respiration on nitrate. Most *Bacillus* spp. are mesophilic, with optimum temperature between 15 to 55°C, but former thermophilic *Bacillus* were reclassified as *Geobacillus* in 2001 and can grow from 55 to 80°C (Nazina et al., 2001). Moreover, microscopic observation of high amounts of bacilli chains in liquid media (Figure V-13-F), typical of *Bacillus spp.,* tends to confirm the enrichment of hyperthermophilic members of *Bacillales*. We suppose this strain can either perform fermentation or potentially use the electrode as alternative electron acceptor. Indeed, different species of *Bacillus* and *Geobacillus* have already been shown to produce electricity in MFCs, on polysaccharides (Choi et al., 2004), on glucose (Borah et al., 2013; Nimje et al., 2009), or on acetate (Wrighton et al., 2008). However, whatever the species, an electron shuttle had to be added or endogenously produced by the bacteria to generate some amount of current. In our study, as no current was observed on the control experiment on filtered spent media with sterile electrode, we can reject the hypothesis of mediated electron transfer in our experiments.

The biodiversity obtained in the open-circuit control inoculated with week-1 spent medium demonstrated that the connected electrode plays a specific role in microbial composition. Indeed, *Geoglobus* sp. was totally extinguished on the electrode and liquid media

yet was enriched on the connected electrode in week-2. This could be directly correlated with the fact that they require an electron acceptor for growth. *Thermococcales* and *Bacillales*, both fermentative microbes, were still equally represented on the electrode as in the liquid media of the open-circuit control. Finally, the conservation of more biodiversity (higher evenness index, Figure V-12) on solid support than in liquid media can be related to the protective role of biofilm colonizing conductive or inert supports (Costerton et al., 1995).

3.5.3. Trophic relation between fermentative and exoelectrogenic microorganisms

In order to identify the role of each electron donor in current production and in the trophic chain of the community, each one was tested separately on the mature biofilm of week-4 enrichment. These tests showed no current production on polysaccharides while most *Bacillales*, and a few *Thermococcus* sp., have the ability to hydrolyze starch and ferment glucose. This could be explained by the renewal of the liquid media, removing planktonic fermentatives such as *Bacillales* and *Thermococcus,* or by their lack of the enzymatic machinery to hydrolyze polysaccharides, as reported in some *Thermococus* sp. (Atomi et al., 2004; Jolivet et al., 2003).

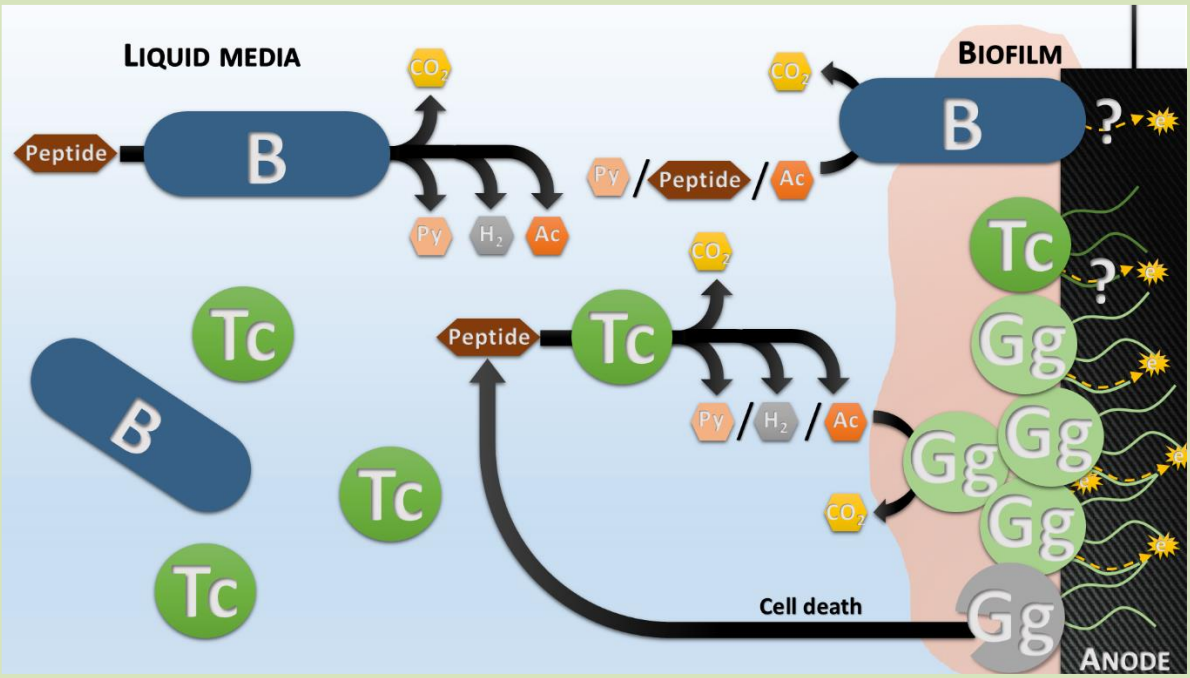


Figure V-16: Schematic representation of cross-feeding between fermentative and exoelectrogenic microbes on the surface of the conductive support. B: Bacillus/Geobacillus spp.; Tc: Thermococcales; Gg: Geoglobus spp.; Py: Pyruvate; Ac: Acetate.

However, we confirm the presence of direct respiratory metabolism on the electrode from acetate, pyruvate and H_2. *Geoglobus* spp., present on the electrode, would be the only known species able to produce current from these substrates. Indeed, *Geoglobus* spp. are known to metabolize these substrates and grow using iron oxide particles as electron acceptor (Manzella et al., 2013). However, a previous study found that *Geoglobus ahangari* was unable to produce current on H_2 (Yilmazel et al., 2018). Sequencing of the ~300-bp hypervariable region V4-V5 of the gene coding for 16S rRNA failed to precisely affiliate the OTUs obtained

with the species *Geoglobus ahangari*. Thus, we are potentially in the presence of several new exoelectrogenic species belonging to the *Geoglobus* genus. Furthermore, the presence of a microbial community in our experiment can allow microbial interactions, and thereby increase the range of metabolic capacity. However, this is the first time that direct biotic current production has been observed on H_2 in a hyperthermophilic MFC. Immediate current production in presence of a fermentation product such as pyruvate, acetate and hydrogen suggests a community already adapted to the direct oxidation of this substrate on the electrode. In contrast, we observed a gradual and slow increase of current production with a complex substrate such as peptone and yeast extract. This suggests that a first fermentation step is necessary in order to release small molecules readily oxidizable on the anode. This hypothesis is supported by the observation of higher production of CO_2 and hydrogen released in the open-circuit control when no final electrode acceptor was available (see Supplementary Figure V-10). These trophic relations were also observed in co-cultures of different species of *Thermococcus* - producing H_2 and CO_2 from fermentable compounds - with *G. ahangari* - consuming H_2 and CO_2 to produce fermentative compounds (unpublished data). Note that indirect current production in a thermophilic MFC was already observed from the autotrophic-community conversion of syngas (composed of H_2 and CO_2) to acetate which is then used as electron donor by exoelectrogenic biofilm to produce current (Hussain et al., 2011).

Taken together, these results support the hypothesis of trophic interactions between fermentative and exoelectrogenic microbes. In the environment, this syntrophic relationship would allow carbon cycling inside hydrothermal vent biofilms. Indeed, the surrounding organic compound released by living and dead organisms (substituted by peptone and yeast extract in our experiment) would be metabolized by fermentative microorganisms like *Thermococcus* spp. and *Bacillus* spp. (present as clusters in our biofilm in Figure V-13-E or freely dispersed in the seawater) producing hydrogen, carbon dioxide and organic acids. Indeed, some *Thermococcus* species can use microbial-origin extrapolymeric substances (dextran, pullulan, peptides, etc.) for fermentative growth (Legin et al., 1998). These fermentation products may then be used as electron donor (acetate, H_2) and carbon source (CO_2) for exoelectrogenic microorganisms, such as *Geoglobus* species (covering the carbon fibers in Figure V-13-D), which would breath on the conductive pyrite composing the chimney wall and contribute to the abiotic electric current previously observed (Yamamoto et al., 2017). Finally, these (autotrophic) exoelectrogens may potentially release organic compounds like EPS in the biofilm that can be later reused by fermentative microbes. This potential cross-feeding phenomenon could allow the survival, in oligotrophic and extremely unstable conditions, of these microbes grouped as biofilm on the hydrothermal chimney surface by concentrating and recycling the organic matter inside the biofilm.

3.6. Acknowledgments

This work received financial support from the CNRS national interdisciplinary research program (PEPS-ExoMod 2016). The authors thank Erwan Roussel (LM2E, IFREMER Brest) for helpful suggestions, Céline Rommevaux and Françoise Lesongeur for sampling during the MOMARSAT 2014 cruise, the MIM platform (MIO, France) for providing access to their confocal microscopy facility, and the GeT-PlaGe platform (GenoToul, France) for DNA

sequencing. The project leading to this publication has received funding from European FEDER program under project 1166-39417. The authors declare no conflict of interest.

4. CONCLUSION SUR LES COMMUNAUTES EXOELECTROGENES HYPERTHERMOPHILES DES SOURCES HYDROTHERMALES PROFONDES

Suite à ces deux études, nous avons mis en évidence la présence de microorganismes électrogènes au sein des sources hydrothermales mixtes et acides. Dans ces écosystèmes, ces communautés hétérotrophes contribuent très certainement aux cycles biogéochimiques électriques au sein des cheminées hydrothermales conductrices. Cette fonction pourrait avoir un rôle de recyclage d'énergie et de carbone dans les biofilms se développant sur les surfaces des cheminées. En effet, les microorganismes électrotrophes précédement décrits produisent de la matière organique à partir du flux d'électrons et de CO_2. Celle-ci est ensuite utilisée comme donneur d'électrons par des microorganismes hétérotrophes suivant deux voies métaboliques. D'une part, certains microorganismes, comme les *Thermococcales* et *Bacillales*, vont pouvoir réaliser une fermentation de ces composés organiques avec production d'acétate, d'hydrogène et de CO_2, piégés à l'intérieur du biofilm. D'autre part, des microorganismes hétérotrophes vont pouvoir oxyder les composés organiques produits par respiration, en transférant les électrons sur une molécule oxydée ou un support conducteur. Nous avons montré dans ces deux études que l'acétate, le pyruvate et l'H_2 étaient directement utilisable par les microorganismes pour respirer sur un support conducteur. C'est le cas notamment de *Geoglobus ahangari*.

Les électrons à haut potentiel relargués par ces électrogènes dans la structure conductrice des cheminées pourraient par la suite rejoindre le flux d'électrons à bas potentiel d'origine chimique, créant un potentiel mixte suffisament bas pour être réutilisé par les communautés électrotrophes précedement identifiées. Ces électroautotrophes pourraient alors fixer plus de CO_2 en matière organique et former un cycle d'électrons et de carbone au sein des biofilms.

L'utilisation du pyruvate par ces microorganismes électrogènes conforte notre théorie sur l'importance de cette molécule dans le développement de la biocénose dans ces écosystèmes. Etant la molécule centrale, avec l'Acétyl-CoA, de la majorité des métabolismes actuels, elle pourrait être la première molécule organique à l'origine de l'hétérotrophie dans ces écosystèmes extrêmes. En effet, les premières cellules electro-autotrophes auraient pu construire des réseaux métaboliques à partir de la production du pyruvate. Du point de vue proto-métabolisme, la voie de fixation du CO_2 en pyruvate aurait permis une évolution métabolique conduisant à la transformation du pyruvate en molécules organiques plus complexes. Au cours de l'évolution, les voies métaboliques se seraient complexifiées autour de ce composé, permettant son assimilation en d'autres molécules organiques, et sa transformation en une diversité plus importante de composés, menant aux fermentations connues de nos jours.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La compréhension des écosystèmes environnementaux est nécessaire pour comprendre et prédire son évolution face aux changements naturels ou anthropogéniques. Les sources hydrothermales profondes sont des environnements très particuliers, empreints de mystère dans la conscience collective, au même titre que les abysses. Elles constituent des oasis de vie au fond des océans, sous des pressions, des températures et des gradients de pH extrêmes. En absence de lumière et de matière organique, des microorganismes arrivent toutefois à se développer dans ces conditions extrêmes pour permettre le développement d'une biocénose complexe. De nombreuses études ont essayé d'identifier les premiers colonisateurs de ces environnements, et leurs métabolismes associés pour comprendre le système de production primaire de matière organique. La compréhension de ce processus pourrait permettre notamment de mieux appréhender les conditions d'émergence de la Vie en contexte hydrothermal. Jusqu'à présent, les hypothèses se sont basées sur la chimioautotrophie, permettant à certains microorganismes de se développer à partir de molécules réduites comme source d'énergie (H_2, H_2S, CH_4) et de CO_2 comme source de carbone.

Ces travaux de thèse ont permis de montrer l'existence d'un autre type trophique, l'électroautotrophie, permettant la croissance de microorganismes à partir d'un courant électrique, présent au sein des cheminées hydrothermales, et de CO_2. Ce nouveau type trophique ouvre de nouvelles perspectives tant dans les hypothèses d'origine de la Vie en contexte hydrothermal que dans les applications biotechnologiques d'électrosynthèse microbienne.

En effet, l'observation de ce type trophique dans nos expériences nous permet de poser de nouvelles hypothèses d'origine de la Vie basée sur ce courant électrique. Ces hypothèses présentent quelques avantages décisifs par rapport aux théories actuelles en contexte hydrothermal alcalin, tels que (i) l'établissement d'un gradient de proton par géoélectrochimie, (ii) l'augmentation des cinétiques réactionnelles menant aux synthèses prébiotiques par un flux constant d'électrons, ou (iii) l'augmentation de la surface réactionnelle à toute la surface conductrice des cheminées. L'identification des mécanismes impliqués (probablement liés aux hydrogénases et cytochromes membranaires), pourrait permettre d'étudier la phylogénie de ce mécanisme dans l'arbre du vivant et d'évaluer la vraisemblance de ce mécanisme chez LUCA. De plus, des approches en biologie synthétique pourraient permettre de reconstituer des systèmes proches des proto-cellules constituées :

- de membranes semi-perméables simples (micelles de molécules amphiphiles)
- d'inclusion de nanoparticules de FeS dans ces membranes pour conduire le flux d'électrons de la cheminée et permettre les réactions de réductions intracellulaires
- de système de mesure intracellulaire de la mise en place du gradient de proton transmembranaire

- de molécules inorganiques permettant les synthèses prébiotiques et polymérisations (CO_2, NO_3^-, FeS, H_2S, …)

Le suivi en conditions hydrothermales de l'évolution de ces systèmes pourrait permettre de définir si ce système est viable pour la synthèse de molécules organiques, telles que le pyruvate, pouvant mener par la suite à la synthèse de molécules plus complexes.

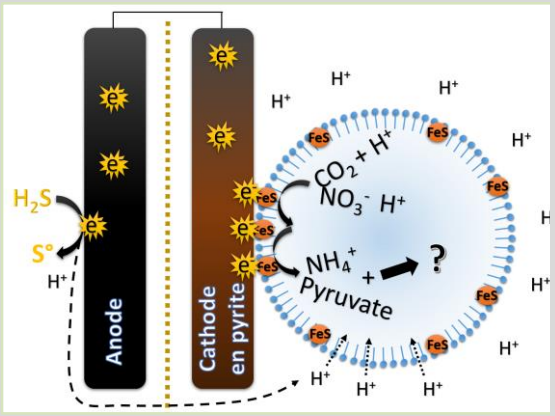


Figure VI-V-17 : Concept d'application de la biologie synthétique pour l'étude de l'électroautotrophie comme premier métabolisme pour l'émergence de la Vie

D'autre part, l'exploitation des métabolismes électrotrophes pourrait présenter des avantages non-négligeables en biotechnologie. En effet nous avons observé la production en grande quantité de pyruvate par les *Archaeoglobales* à partir d'électricité et de CO_2. Cette capacité pourrait être utilisée dans une pile à électrosynthèse microbienne, permettant une boucle vertueuse de fixation du CO_2 (gaz à effet de serre) sous la forme d'un composé présentant une certaine valeur ajoutée. En effet le pyruvate est très utilisé en agroalimentaire comme supplément alimentaire, comme antioxydant, mais aussi comme précurseur en industrie chimique, pharmaceutique et agrochimique. Actuellement la production de pyruvate se fait soit par pyrolyse de l'acide tartrique, très énergivore, soit par fermentation auxotrophique de glucose sur vitamines, très couteux en matière première. Le coût de production était estimé à 15-25€/kg en 2005 et les prédictions prévoyaient une augmentation exponentielle de la demande dans les années à venir (Biwer et al., 2005). Il est actuellement très difficile d'obtenir une vue globale de la situation et de l'intérêt économique du pyruvate de nos jours. Cependant, l'application de cette technologie pourrait permettre de diminuer très fortement les coûts de production, notamment par le couplage du système avec le traitement d'eau usée à une bioanode, diminuant considérablement l'apport énergétique nécessaire à l'électrosynthèse. De plus, le flux ionique créé dans le système pourrait être utilisé pour effectuer, sans coût additionnel, l'électrodialyse du pyruvate *in-situ*, étape de purification de la molécule pouvant constituer plus de 50% du coût de production en application

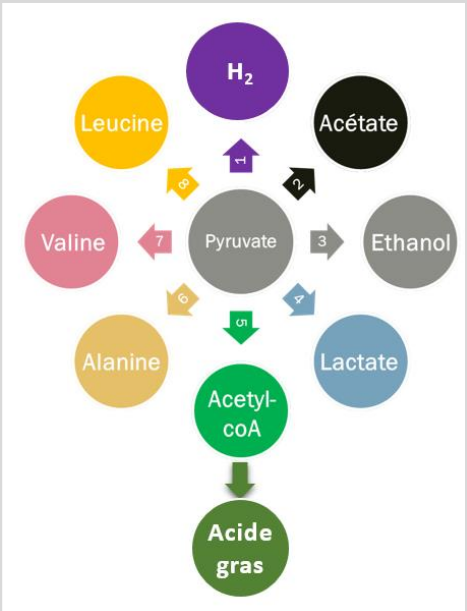


Figure VI-V-18: Intérêt du pyruvate comme molécule centrale du métabolisme pouvant être transformé par différentes réactions métaboliques microbiennes en molécules d'intêret. Les réactions 1, 2, 3 et 4 réfèrent à des fermentations, 5 à la lipogénèse, 6, 7 et 8 à la synthèse d'acides aminés.

conventionnelle. Ce pyruvate peut ensuite être transformé en différentes molécules, telles que l'H_2, présentant des intérêts en tant que biocarburant ou stockage d'électricité. D'autre part, d'autres molécules peuvent potentiellement être produites par d'autres électrotrophes des sources hydrothermales, telles que le formiate (forme très prometteuse de stockage d'H_2 comme biocarburant) ou d'autres molécules à haute valeur ajoutée.

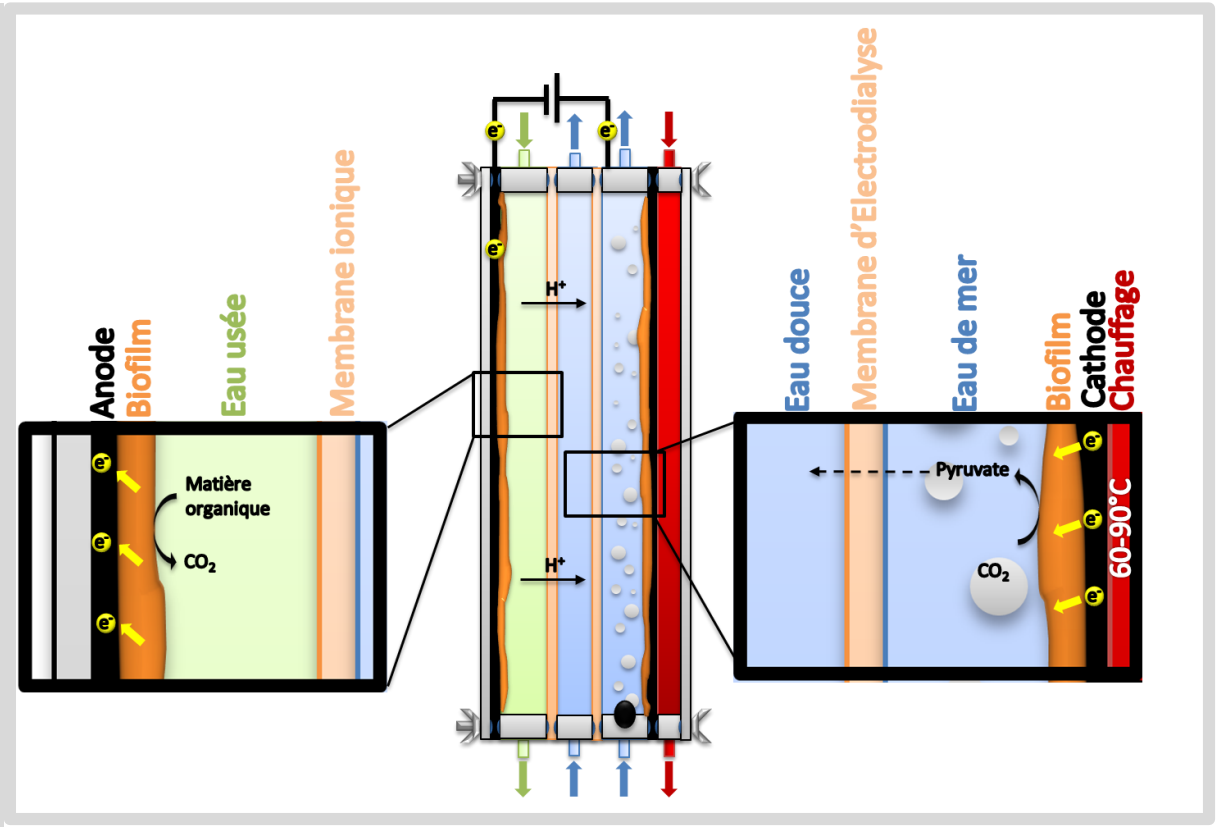


Figure VI-V-19: Prototype de système électrochimique microbien permettant la synthèse à haute température de pyruvate couplé au traitement d'eau usée par une bioanode et à l'électrodialyse in-situ du pyruvate par le flux ionique produit par le courant électrique.

Finalement l'identification de microorganismes électrogènes hyperthermophiles pourrait permettre d'augmenter les performances des MFC en augmentant les cinétiques réactionnelles à haute température et en inhibant toute contamination potentielle du système. Le chauffage du système, bien qu'énergivore au premier abord, peut être atteint par l'exploitation d'effluents industriels à haute température (systèmes de refroidissement, eau de chauffage etc…) qui nécessite beaucoup d'énergie à l'industriel pour être refroidi avant son rejet dans l'environnement.

Ainsi des études plus approfondies de communautés électrotrophes et électrogéniques des sources hydrothermales pourrait permettre par la suite de mieux comprendre ces écosystèmes extrêmes, de mieux appréhender les mécanismes d'émergence de la vie et d'identifier des microorganismes électroactifs présentant des métabolismes intéressants pour des applications biotechnologiques.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure I-1 : Système manuel, autonome ou hybride d'observation et d'analyse sous-marine de l'IFREMER. D'après Rigaud and Nicolas-Meunier (2015) 18

Figure I-2 : Schéma de formation des sources hydrothermales acides en contexte basaltique ou mixte (Modifié par E. Pasero d'après Gary Massoth/PMEL). 19

Figure I-3 : Cheminée hydrothermale acide riche en métaux et sulfure lui donnant ces couleurs caractéristiques (Crédit photo : jighinfo-terra.blogspot.com) 20

Figure I-4 : Cheminée alcaline de Lost City composée principalement de carbonate de calcium lui donnant cette couleur blanche (Crédit photo : University of Washington) 22

Figure I-5 : Fumeur blanc ou diffuseur (Crédit photo : oceanexplorer.noaa.gov) 23

Figure I-6 : "Flange" formé par l'accumulation de fluide hydrothermal sous une saillie rocheuse (Crédit photo : University of Washington) 24

Figure I-7 : Localisation des sources hydrothermales profondes sur le globe terrestre (D'après InterRidge Vents Database - 2011). 26

Figure I-8 : Micro-bathymétrie du Site Lucky Strike montrant les quatre champs hydrothermaux. (Crédit : IFREMER) 28

Figure I-9 : Evolution du nombre de publications par année sur la biodiversité (« biodiversity hydrothermal vents », bleu) et sur les nouvelles espèces isolées (« nov. sp. hydrothermal vents », rouge) des sources hydrothermales depuis la découverte des sources hydrothermales profondes en 1977 (d'après Google Scholar Juillet 2018) 29

Figure I-10 : Macrofaune se développant sur la surface des cheminées hydrothermales acides composée de vers tubicoles, de crabes, de crevettes et de bivalves (Crédit photo : Woods Hole Oceanographic Institution) 30

Figure I-11 : Tapis microbiens à la surface d'une cheminée hydrothermale (Crédit photo : Woods Hole Oceanographic Institution) 31

Figure I-12 : Les six voies de fixation autotrophique du carbone chez les procaryotes (Minic and Thongbam, 2011) 35

Figure I-13 : Energies cataboliques (en $kJ.kg^{-1}$de fluide mélangé) disponibles à partir des réactions d'oxydo-réduction clées de huit systèmes hydrothermaux à 3 différentes températures (modifié d'après Reveillaud et al., 2016). La valeur en haut de chaque histogramme indique le nombre de cellules maximales potentiellement produit (exprimé en log_{10} par kg de fluide hydrothermal). Le calcul suppose que l'oxydation aérobie des sulfures, du méthane et du fer nécessite 152 kJ/g de poids sec de biomasse et 38kJ/g pour les autres et que le poids sec moyen d'une cellule est de 3.10^{-13} g/Cellule (d'après McCollom, 2007) .. 38

Figure I-14 : Classification des microorganismes en fonction de leur température de croissance 39

Figure I-15 : Distribution des microorganismes et des métabolismes tout au long de la vie d'un fumeur acide (modifié d'après Li et al., 2017) 49

Figure I-16 : Distribution des microorganismes et des métabolismes dans les fumeurs alcalins (Brazelton et al., 2006) 51

Figure I-17 : Condition de la Terre primitive lors de l'émergence de la vie et ses synthèses prébiotiques supposées (Modifié d'après http://www.encyclopedie-environnement.org).....53

Figure I-18 : Schéma du courant électrique au sein des cheminées hydrothermales. (Nakamura et al., 2010).....61

Figure II-1 : Nombre de référence au terme « Microbial Fuel Cell », « Microbial Electrosynthesis » et « External Electron Transfer » par an dans la littérature scientifique depuis 1998 (d'après Google Scholar Juillet 2018).....66

Figure II-2 : Arbre phylogénétique des espèces microbiennes décrites comme électroactives dans la littérature. Pour références se reporter aux numéros dans Koch et Harnisch, 2016. (+) indique l'ajout de ces espèces décrites suite à la publication de l'article de référence. 68

Figure II-3 : Nanofilaments de Geobacter sulfureducens composé de pili de type IV électriquement conducteur. (Crédit photo : D. Lovley, G. Reguera, K. McCarthy).....69

Figure II-4 : Nanopodes électriquements conducteurs produits par Shewanella oneidensis (crédit photo : R. Bencheikh et B. Arey).....69

Figure II-5 : Schéma des différents types de mécanisme d'électroactivité décris. (Credit: The Scientist, "Live Wires" par Mohamed Y. El-Naggar et Steven E. Finkel) 70

Figure II-6 : Transfert d'électron extracellulaire via un médiateur produit par le métabolisme (modifié d'après Lovley, 2006).....71

Figure II-7 : Transfert d'électron extracellulaire via un médiateur endogène ou artificiel (modifié d'après Lovley, 2006) 71

Figure II-8 : Potentiel d'oxydoréduction dans les chaînes de transferts d'électrons catalysées par différentes bactéries et potentiel des médiateurs électroniques endogènes ou artificiels et complexes enzymatiques impliqués dans les transferts d'électrons extracellulaires (d'après (Kracke et al., 2015) 73

Figure II-9 : A) Micrographe à transmission électronique de l'association d'oxyde de fer (III) avec les pili de Geobacter sulfurreducens. B) Mécanisme de transfert d'électron extracellulaire à distance de Geobacter sulfurreducens. (d'après (Lovley, 2006) 74

Figure II-10 : Vue schématique de 3 mécanismes simplifiés de transport d'électrons à travers un nanofilament ; (a) transfert par délocalisation éléctronique à travers des résidus aromatiques. (b) tunnel cohérent à travers les états de pont [étiquetés 'b'] ou superéchange (c) sauts incohérents à travers des groupements rédox actifs reliés ou des groupes d'acides aminés actifs rédox inhérents (d'après Creasey et al., 2018).....75

Figure II-11 : Observation par microscopie électronique à balayage de S. oneidensis MR-1 montrant les nano-podes qui connectent des cellules bactériennes entre elles (d'après Gorby et al., 2006) 76

Figure II-12 : Observation des nano-podes de Shewanella oneidensis en microscopie par force atomique (AFM) (Barre d'échelle : 2 µm) et microscopie à fluorescence de cellule vivante (Barre d'échelle : 1 µm). (d'après Pirbadian et al., 2014). 77

Figure II-13 : Schéma du mécanisme de transfert électronique par contact direct chez (A) Geobacter sulfurreducens et (B) Shewanella oneidensis. Les flêches pointillées indiquent des flux d'électrons hypothétiques. OMC : Outer membrane cytochrome, MQ : Menaquinones, Q : Quinone, FL : Flavine, TMAO : trimethylamine N-oxyde, TMA : trimethoxyamphetamine (d'après Kracke et al., 2015).....78

Figure II-14 : Mécanismes proposés par Rabaey et Rozendal, (2010), pour le transfert électronique depuis les électrodes vers les microorganismes: a)Le transfert d'électrons direct; b) Le transfert d'électrons via la médiation de l'hydrogène; c) Le transfert d'électrons via un médiateur oxydé et réduit ; d) via la formation de blocks de constructions intermédiaires comme le formate.....79

Figure II-15 : Transfert d'électrons direct inter-espèce entre Geobacter metallireducens et Methanothrix harundinacea (modifié d'après Rotaru et al., 2014b) 80

Figure II-16 : Mécanismes de transferts d'électrons directs inter-espèces (DIET) incluant (a) le transfert d'électrons via des pili électriquement conducteurs (bleu), (b) le transfert d'électrons via un matériaux électriquement conducteur (violet), et (c) le transfert d'électrons entre des transporteurs d'électrons protéiques (rouge) associé à la surface membranaire externe. (d) Les transferts d'électrons inter-espèces médiés (MIET) quant à eux utilisent des médiateurs électroniques solubles comme l'H_2. (d'après Lovley, 2017) 81

Figure II-17 : Représentation schématique d'un système électrochimique microbien. Ce système est composé de deux électrodes [a) une anode et b) une cathode] recouverts d'un catalyseur chimique ou biologique, d'un circuit électrique externe [servant de c) source d'énergie ou d) de collecteur d'électricité] et d'un séparateur ionique [membrane e) anionique, f) cationique, g) bipolaire ou h) sans séparateur]. 83

Figure II-18 : Pile à électrosynthèse microbienne catalysant la fixation du CO_2 en molécule organique. La réaction anodique peut être catalysée par du platine ou par un biofilm exoélectrogénique pour diminuer l'apport énergétique nécessaire (d'après Jourdin, 2015). .88

Figure II-19 : Courbes intensité-potentiel de l'anode et de la cathode d'une MFC.....91

Figure II-20 : Courbe de polarisation d'une pile à combustible microbienne.....92

Figure II-21 : (a) Schéma du montage de la chronoampérométrie. (b) Exemple de chronoampérogramme 95

Figure II-22 : (a) Schéma du montage de la cyclovoltammétrie. (b) Exemple de cyclovoltamogramme.....96

Figure III-1 : Schéma du Système Electrochimique Microbien Hyperthermophile développé au laboratoire couplé à une plateforme de suivi de culture microbienne. 106

Figure IV-1 : Consumption, production, and microbial 16S genes quantification over time of the enrichment of Nitrate-reducing eletrotrophic community in Microbial Electrochemical System. 125

Figure IV-2 : PCA Analysis of nitrate, nitrite, organic measurements and evolution of qPCR quantifications of dominant phylogenetic orders as variables over the days of culture as samples. A) 4 groupes of samples were made according to their distribution along the two firsts principal components. B) Contribution to each variable in the building of the principal component. 127

Supplementary Figure IV-3 : matrix of correlation between the different variables of the PCA analysis 128

Figure IV-4 : Confocal observation and depth profile of biofilm stained with FISH probes specific to Bacteria (A, green), Euryarchaeota (B, red), Crenarchaeota (C, red), Thermococcales (D, green) and Archeoglobales (E, green) at x100. Blue signal correspond of the reflectance of carbon fiber. 129

Figure IV-5 : Dominant taxonomic affiliation at order level and biodiversity indices of microbial communities from a crushed chimney sample, as plotted on the working electrode (WE) and liquid media (LM) over the subcultures. OTUs representing less than 1% of total sequences of the samples are pooled as 'Rare OTUs'. 130

Figure IV-6 : Electrosynthesis pathway through the Wood-Ljungdahl carbon fixation pathway. Red dot lines represent the inhibition of those reaction in absence of electron acceptor such as Nitrate. 134

Figure IV-7 : Schematic representation of trophic chain model obtained from the monitoring of electrotrophic community enrichment. 136

Figure IV-8 : Réduction géoélectrochimique du CO_2 en CO par le courant électrique d'origine abiotique des cheminées hydrothermales. Les molécules de CO produites sont supposées pouvoir réagir entre elles et avec d'autres molécules réactives pour former des molécules organiques de plus en plus complexes (symbolisé ici par « CH_2ONS »). 141

Figure IV-9 : Schéma de l'hypothèse de proto-métabolisme par électrotrophie. La réaction 1 correspond à l'étape d'oxydation de l'H_2S du fluide hydrothermal conduisant à la production du courant électrique et la libération de protons. La réaction 2 correspond à la réduction du nitrate en consommant les protons et les électrons du courant électrique. Le confinement dans un espace délimité par les proto-membranes semi-perméables conduit à la déplétion progressive en proton de l'espace intracellulaire en cas de réduction du nitrate plus rapide que le transport de proton à travers la proto-membrane. Cette différence de proton conduirait à créer une force proton motrice (réaction 3) pouvant être à l'origine des proto-systèmes d'ATP synthase. 143

Figure IV-10 : Structure de la coenzyme A impliquée dans la production de l'Acétyl-coA ..145

Figure V-1 : Dominant taxonomic affiliation and biodiversity indices of microbial communities from Crushed Chimney, Flask enrichment on iron (III) oxide, Electrode and Liquid media from BES1 and BES2. OTUs representing lower than 0.5% of total sequences of the sample was grouped as Rares OTU. Biodiversity indexes of Richness and Evenness represent the number of observed OTU and the Pielou's J' evenness index respectively. 157

Figure V-2 : Current monitoring (A/m^2) of BES1 Enrichment inoculated with crushed hydrothermal chimney (blue line), BES2 Enrichment inoculated with flask subculture (green line) and abiotic control (orange line). Electrode potential was poised at -0.110V vs Ag/AgCl. Arrows represent the renewal of the liquid media. 158

Figure V-3 : Cyclic Voltammetries between -0,6V and +0,6V at 20mV/s of Working Electrode at initial time (dot lines) and final time (full line) in BES1 (blue line), BES2 (green line) and abiotic control (orange line). 159

Supplementary Figure V-4 : Quantification of 16S rRNA gene copies from Bacteria (orange) or Archaea (yellow) per gram of crushed chimney, per milliliter of liquid or per cm^2 of working electrode. The red line represents the minimum threshold of sensitivity of the qPCR method. Error bar represent the standard deviation obtained on triplicates. 160

Supplementary Figure V-5 : Phylogenetic tree of archaeal (A) and bacterial (B) 16S rRNA clones library from Flask enrichment and Electrode (WE) or liquid media (LM) of BES1 and BES2. Percentages at nodes are bootstrap values based on 500 replications. Scale bar indicated substitutions per site.....161

Figure V-6 : Schematic representation of the different experiments (Supplementary material and method) 170

Supplementary Figure V-7 : Polarization curve at the end of the first week.....171

Supplementary Figure V-8 : Rarefaction curves of 16S rDNA sequences for bacterial and archaeal diversities in the different samples. Curves were calculated on OTUs at 97% similarity. 172

Figure V-9 : Current production plotted per week of culture for inoculated experiments (weeks 1, 2, 3 and 4) and abiotic control. Constant load discharge was used with a fixed external resistance set at 700 Ω.....174

Supplementary Figure V-10 : H_2 (green line) and CO2 (blue line) of the non-polarized control inoculated with chimney sample and with the mix of substrates. 175

Figure V-11: Cyclic voltammetry analysis of the anode per week of culture at 20 mV s^{-1} ranged -0.5 to 0.5V. The experiment was performed in triplicate. The curve shows data from a representative experiment. 176

Figure V-12: Dominant taxonomic affiliation at order level and biodiversity indices of microbial communities from a crushed chimney sample, as plotted on the anode and liquid media over the weeks of culture and in the non-polarized electrode control. OTUs representing less than 1% of total sequences of the samples are pooled as 'Rare OTUs'. Biodiversity indexes of

species richness and evenness represent the number of observed OTUs and Pielou's evenness (J) index, respectively.....177

Figure V-13: Confocal microscopic observation with Syto9 of (A) abiotic control electrode after 1 week of culture and (B) biofilm on the end of the second week of culture. FISH observation with (C) Archaea (red), (D) Archeoglobales (green) and (E) Thermococcales (green) probes. Three-dimensional top projection of 1.2x1.2 mm patch of anode at 100× magnification. Epifluorescent observation of liquid media of the second week of culture (F) at 1000× magnification with DAPI.....179

Figure V-14: Current density (red line), hydrogen (green line) and carbon dioxide (blue line) production over time by hyperthermophilic exoelectrogenic biofilm on the anode of a MFC at 80 °C under rich (from 0 to 7 days) and specific substrate conditions (from 7 to 15 days). .180

Supplementary Figure V-15: qPCR quantification of bacterial (orange) and archaeal (yellow) 16S rDNA gene copies per g of inoculum, ml of liquid media or cm^2 of electrode. Red line correspond to the minimum threshold of detection. R^2= 0.994/0.990, Slope = -3.730/-3.924, y-int=48.719/49.654 respectively for bacterial and archaeal standard curve. 181

Figure V-16: Schematic representation of cross-feeding between fermentative and exoelectrogenic microbes on the surface of the conductive support. B: Bacillus/Geobacillus spp.; Tc: Thermococcales; Gg: Geoglobus spp.; Py: Pyruvate; Ac: Acetate. 183

Figure VI-1 : Concept d'application de la biologie synthétique pour l'étude de l'électroautotrophie comme premier métabolisme pour l'émergence de la Vie.....189

Figure VI-2 : Intérêt du pyruvate comme molécule centrale du métabolisme pouvant être transformé par différentes réactions métaboliques microbiennes en molécules d'intêret. Les réactions 1, 2, 3 et 4 réfèrent à des fermentations, 5 à la lipogénèse, 6, 7 et 8 à la synthèse d'acides aminés.....189

Figure VI-3 : Prototype de système électrochimique microbien permettant la synthèse à haute température de pyruvate couplé au traitement d'eau usée par une bioanode et à l'électrodialyse in-situ du pyruvate par le flux ionique produit par le courant électrique.....190

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abrevaya, X.C., Sacco, N., Mauas, P.J.D., and Cortón, E. (2011). Archaea-based microbial fuel cell operating at high ionic strength conditions. Extremophiles *15*, 633–642.

Alain, K., Zbinden, M., Bris, N.L., Lesongeur, F., Quérellou, J., Gaill, F., and Cambon-Bonavita, M.-A. (2004). Early steps in microbial colonization processes at deep-sea hydrothermal vents. Environ. Microbiol. *6*, 227–241.

Alain, K., Postec, A., Grinsard, E., Lesongeur, F., Prieur, D., and Godfroy, A. (2010). Thermodesulfatator atlanticus sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *60*, 33–38.

Alauzet, C., and Jumas-Bilak, E. (2014). The Phylum Deferribacteres and the Genus *Caldithrix*. In The Prokaryotes, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 595–611.

Albuquerque, L., and Costa, M.S. da (2014). The Family *Thermaceae*. In The Prokaryotes, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 955–987.

Allen, R.M., and Bennetto, H.P. (1993). Microbial fuel-cells. Appl. Biochem. Biotechnol. *39–40*, 27–40.

Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. *59*, 143–169.

Amend, J.P., and Shock, E.L. (2001). Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic *Archaea* and *Bacteria*. FEMS Microbiol. Rev. *25*, 175–243.

Aminot, A., and Kérouel, R. (2007). Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines (Ifremer).

Anderson, R.E., Sogin, M.L., and Baross, J.A. (2015). Biogeography and ecology of the rare and abundant microbial lineages in deep-sea hydrothermal vents. FEMS Microbiol. Ecol. *91*, 1–11.

Aryal, N., Tremblay, P.-L., Lizak, D.M., and Zhang, T. (2017). Performance of different Sporomusa species for the microbial electrosynthesis of acetate from carbon dioxide. Bioresour. Technol. *233*, 184–190.

Atomi, H., Fukui, T., Kanai, T., Morikawa, M., and Imanaka, T. (2004). Description of *Thermococcus kodakaraensis* sp. nov., a well studied hyperthermophilic archaeon previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1. Archaea *1*, 263–267.

Aubrey, A.D., Cleaves, H.J., and Bada, J.L. (2009). The role of submarine hydrothermal systems in the synthesis of amino acids. Orig. Life Evol. Biosphere J. Int. Soc. Study Orig. Life *39*, 91–108.

Aulenta, F., Reale, P., Canosa, A., Rossetti, S., Panero, S., and Majone, M. (2010). Characterization of an electro-active biocathode capable of dechlorinating trichloroethene and cis-dichloroethene to ethene. Biosens. Bioelectron. *25*, 1796–1802.

B

Babanova, S., Hubenova, Y., and Mitov, M. (2011). Influence of artificial mediators on yeast-based fuel cell performance. J. Biosci. Bioeng. *112*, 379–387.

Badalamenti, J.P., Krajmalnik-Brown, R., and Torres, C.I. (2013). Generation of high current densities by pure cultures of anode-respiring *Geoalkalibacter* spp. under alkaline and saline conditions in microbial electrochemical cells. MBio *4*, e00144-13.

Badalamenti, J.P., Summers, Z.M., Chan, C.H., Gralnick, J.A., and Bond, D.R. (2016). Isolation and genomic characterization of *Desulfuromonas soudanensis* WTL', a metal- and electrode-respiring bacterium from anoxic deep subsurface brine. Front. Microbiol. *7*.

Bae, S.S., Kim, T.W., Lee, H.S., Kwon, K.K., Kim, Y.J., Kim, M.-S., Lee, J.-H., and Kang, S.G. (2012). H2 production from CO, formate or starch using the hyperthermophilic archaeon, Thermococcusonnurineus. Biotechnol. Lett. *34*, 75–79.

Baross, J.A., and Hoffman, S.E. (1985). Submarine hydrothermal vents and associated gradient environments as sites for the origin and evolution of life. Orig. Life Evol. Biosph. *15*, 327–345.

Bates, S.T., Berg-Lyons, D., Caporaso, J.G., Walters, W.A., Knight, R., and Fierer, N. (2011). Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. ISME J. *5*, 908–917.

Bax, A., and Davis, D.G. (1985). MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. J. Magn. Reson. 1969 *65*, 355–360.

Beese-Vasbender, P.F., Grote, J.-P., Garrelfs, J., Stratmann, M., and Mayrhofer, K.J.J. (2015). Selective microbial electrosynthesis of methane by a pure culture of a marine lithoautotrophic archaeon. Bioelectrochemistry *102*, 50–55.

Bennetto, H.P., Stirling, J.L., Dew, M.E., and Tanaka, K. (1981). Rates of reduction of phenothiazine'redox' dyes by *E. coli*. Chem. Ind. 776–8.

Bennetto, H.P., Stirling, J.L., Tanaka, K., and Vega, C.A. (1983). Anodic reactions in microbial fuel cells. Biotechnol. Bioeng. *25*, 559–568.

Berg, I.A., Kockelkorn, D., Ramos-Vera, W.H., Say, R.F., Zarzycki, J., Hügler, M., Alber, B.E., and Fuchs, G. (2010). Autotrophic carbon fixation in archaea. Nat. Rev. Microbiol. *8*, 447–460.

Berk, R.S., and Canfield, J.H. (1964). Bioelectrochemical energy conversion. Appl. Microbiol. *12*, 10–12.

Bertoldo, C., and Antranikian, G. (2006). The Order *Thermococcales*. In The Prokaryotes, M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt, eds. (Springer New York), pp. 69–81.

Bhandari, V., and Gupta, R.S. (2014). The Phylum *Thermotogae*. In The Prokaryotes, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 989–1015.

Biwer, A.P., Zuber, P.T., Zelic, B., Gerharz, T., Bellmann, K.J., and Heinzle, E. (2005). Modeling and analysis of a new process for pyruvate production. Ind. Eng. Chem. Res. *44*, 3124–3133.

Blamey, J.M., and Adams, M.W.W. (1993). Purification and characterization of pyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol. *1161*, 19–27.

Blöchl, E., Keller, M., Wachtershäuser, G., and Stetter, K.O. (1992). Reactions depending on iron sulfide and linking geochemistry with biochemistry. Proc. Natl. Acad. Sci. *89*, 8117–8120.

Boileau, C., Auria, R., Davidson, S., Casalot, L., Christen, P., Liebgott, P.-P., and Combet-Blanc, Y. (2016). Hydrogen production by the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* part I: effects of sulfured nutriments, with thiosulfate as model, on hydrogen production and growth. Biotechnol. Biofuels *9*, 269.

Bonfio, C., Valer, L., Scintilla, S., Shah, S., Evans, D.J., Jin, L., Szostak, J.W., Sasselov, D.D., Sutherland, J.D., and Mansy, S.S. (2017). UV-light-driven prebiotic synthesis of iron–sulfur clusters. Nat. Chem. *9*, 1229–1234.

Borah, D., More, S., and Yadav, R.N.S. (2013). Construction of double chambered microbial fuel cell (MFC) using household

materials and *Bacillus megaterium* isolate from tea garden soil. J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci. *3*, 84–86.

Borole, A.P., O'Neill, H., Tsouris, C., and Cesar, S. (2008). A microbial fuel cell operating at low pH using the acidophile *Acidiphilium cryptum*. Biotechnol. Lett. *30*, 1367–1372.

Borrel, G., Adam, P.S., and Gribaldo, S. (2016). Methanogenesis and the Wood–Ljungdahl Pathway: An Ancient, Versatile, and Fragile Association. Genome Biol. Evol. *8*, 1706–1711.

Braakman, R., and Smith, E. (2014). Metabolic evolution of a deep-branching hyperthermophilic chemoautotrophic bacterium. PLOS ONE *9*, e87950.

Brazelton, W.J., Schrenk, M.O., Kelley, D.S., and Baross, J.A. (2006). Methane- and sulfur-metabolizing microbial communities dominate the Lost City hydrothermal field ecosystem. Appl. Environ. Microbiol. *72*, 6257–6270.

Brazelton, W.J., Ludwig, K.A., Sogin, M.L., Andreishcheva, E.N., Kelley, D.S., Shen, C.-C., Edwards, R.L., and Baross, J.A. (2010). *Archaea* and *Bacteria* with surprising microdiversity show shifts in dominance over 1,000-year time scales in hydrothermal chimneys. Proc. Natl. Acad. Sci. 200905369.

Brileya, K., and Reysenbach, A.-L. (2014). The Class *Archaeoglobi*. In The Prokaryotes, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 15–23.

Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D., and Noller, H.F. (1981). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. *148*, 107–127.

Budin, I., Bruckner, R.J., and Szostak, J.W. (2009). Formation of protocell-like vesicles in a thermal diffusion column. J. Am. Chem. Soc. *131*, 9628–9629.

Butler, C.S., Clauwaert, P., Green, S.J., Verstraete, W., and Nerenberg, R. (2010). Bioelectrochemical perchlorate reduction in a microbial fuel cell. Environ. Sci. Technol. *44*, 4685–4691.

Byrne, N. (2008). Etude de la diversité métabolique des micro-organismes des sources hydrothermales. Université de Bretagne Occidentale.

C

Cabello, P., Roldán, M.D., and Moreno-Vivián, C. (2004). Nitrate reduction and the nitrogen cycle in *Archaea*. Microbiology *150*, 3527–3546.

Cai, J., Zheng, P., and Mahmood, Q. (2015). Effect of cathode electron acceptors on simultaneous anaerobic sulfide and nitrate removal in microbial fuel cell. Water Sci. Technol. wst2015570.

Campbell, B.J., Engel, A.S., Porter, M.L., and Takai, K. (2006). The versatile *ε-proteobacteria*: key players in sulphidic habitats. Nat. Rev. Microbiol. *4*, 458–468.

Canstein, H. von, Ogawa, J., Shimizu, S., and Lloyd, J.R. (2008). Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer. Appl. Environ. Microbiol. *74*, 615–623.

Cao, H., Wang, Y., Lee, O.O., Zeng, X., Shao, Z., and Qian, P.-Y. (2014). Microbial sulfur cycle in two hydrothermal chimneys on the Southwest Indian Ridge. MBio *5*, e00980-13-e00980-13.

Cao, X., Huang, X., Liang, P., Xiao, K., Zhou, Y., Zhang, X., and Logan, B.E. (2009). A new method for water desalination using microbial desalination cells. Environ. Sci. Technol. *43*, 7148–7152.

Carbajosa, S., Malki, M., Caillard, R., Lopez, M.F., Palomares, F.J., Martín-Gago, J.A., Rodríguez, N., Amils, R., Fernández, V.M., and De Lacey, A.L. (2010). Electrochemical growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on a graphite electrode for obtaining a biocathode for direct electrocatalytic reduction of oxygen. Biosens. Bioelectron. *26*, 877–880.

Carmona-Martínez, A.A., Pierra, M., Trably, E., and Bernet, N. (2013). High current density via direct electron transfer by the halophilic anode respiring bacterium *Geoalkalibacter subterraneus*. Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP *15*, 19699–19707.

Cercado, B., Byrne, N., Bertrand, M., Pocaznoi, D., Rimboud, M., Achouak, W., and Bergel, A. (2013). Garden compost inoculum leads to microbial bioanodes with potential-independent characteristics. Bioresour. Technol. *134*, 276–284.

Cerqueira, T., Pinho, D., Froufe, H., Santos, R.S., Bettencourt, R., and Egas, C. (2017). Sediment microbial diversity of three deep-sea hydrothermal vents southwest of the Azores. Microb. Ecol. *74*, 332–349.

Charlou, J.L., Donval, J.P., Douville, E., Jean-Baptiste, P., Radford-Knoery, J., Fouquet, Y., Dapoigny, A., and Stievenard, M. (2000). Compared geochemical signatures and the evolution of Menez Gwen (37°50′N) and Lucky Strike (37°17′N) hydrothermal fluids, south of the Azores Triple Junction on the Mid-Atlantic Ridge. Chem. Geol. *171*, 49–75.

Chen, B.-Y., Hong, J., Ng, I.-S., Wang, Y.-M., Liu, S.-Q., Lin, B., and Ni, C. (2013). Deciphering simultaneous bioelectricity generation and reductive decolorization using mixed-culture microbial fuel cells in salty media. J. Taiwan Inst. Chem. Eng. *44*, 446–453.

Chen, S., Rotaru, A.-E., Shrestha, P.M., Malvankar, N.S., Liu, F., Fan, W., Nevin, K.P., and Lovley, D.R. (2014a). Promoting interspecies electron transfer with biochar. Sci. Rep. *4*.

Chen, S., Rotaru, A.-E., Liu, F., Philips, J., Woodard, T.L., Nevin, K.P., and Lovley, D.R. (2014b). Carbon cloth stimulates direct interspecies electron transfer in syntrophic co-cultures. Bioresour. Technol. *173*, 82–86.

Chen, X., Xia, X., Liang, P., Cao, X., Sun, H., and Huang, X. (2011). Stacked microbial desalination cells to enhance water desalination efficiency. Environ. Sci. Technol. *45*, 2465–2470.

Cheng, S., Xing, D., Call, D.F., and Logan, B.E. (2009). Direct biological conversion of electrical current into methane by electromethanogenesis. Environ. Sci. Technol. *43*, 3953–3958.

Chevaldonné, P., and Godfroy, A. (1997). Enumeration of microorganisms from deep-sea hydrothermal chimney samples. FEMS Microbiol. Lett. *146*, 211–216.

Childers, S.E., Ciufo, S., and Lovley, D.R. (2002). *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis. Nature *416*, 767–769.

Choi, Y.-J., Jung, E.-K., Park, H.-J., Paik, S.R., Jung, S.-H., and Kim, S.-H. (2004). Construction of microbial fuel cells using thermophilic microorganisms, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus thermoglucosidasius*. Bull. Korean Chem. Soc. *25*, 813–818.

Chou, C.-J., Shockley, K.R., Conners, S.B., Lewis, D.L., Comfort, D.A., Adams, M.W.W., and Kelly, R.M. (2007). Impact of substrate glycoside linkage and elemental sulfur on bioenergetics of and hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Appl. Environ. Microbiol. *73*, 6842–6853.

Cody, G.D., Boctor, N.Z., Brandes, J.A., Filley, T.R., Hazen, R.M., and Yoder, H.S. (2004). Assaying the catalytic potential of transition metal sulfides for abiotic carbon fixation. Geochim. Cosmochim. Acta *68*, 2185–2196.

Cohen, B. (1931). The bacteria culture as an electrical half-cell. J. Bacteriol. *21*, 18–19.

Corliss, J.B., and Ballard, R.D. (1977). Oasis of life in the cold abyss. Nat Geogr. Mag *152*, 440–453.

Cornish-Bowden, A., and Cárdenas, M.L. (2017). Life before LUCA. J. Theor. Biol. *434*, 68–74.

Corre, E., Reysenbach, A.-L., and Prieur, D. (2001). ε-Proteobacterial diversity from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. FEMS Microbiol. Lett. *205*, 329–335.

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., and Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial biofilms. Annu. Rev. Microbiol. 49: 711–745.

Coursolle, D., and Gralnick, J.A. (2010). Modularity of the Mtr respiratory pathway of *Shewanella oneidensis* strain MR-1. Mol. Microbiol. *77*, 995–1008.

Creasey, R.C.G., Mostert, A.B., Nguyen, T.A.H., Virdis, B., Freguia, S., and Laycock, B. (2018). Microbial nanowires - Electron transport and the role of synthetic analogues. Acta Biomater. *69*, 1–30.

Crisp, A., and Carell, T. (2018). *In vitro* evolution: Rethinking the tools of the RNA world.

D

Dai, K., Wen, J.-L., Zhang, F., Ma, X.-W., Cui, X.-Y., Zhang, Q., Zhao, T.-J., and Zeng, R.J. (2017). Electricity production and microbial characterization of thermophilic microbial fuel cells. Bioresour. Technol. *243*, 512–519.

Davis, J.B. (1963). Generation of electricity by microbial action. In Advances in Applied Microbiology, W.W. Umbreit, ed. (Academic Press), pp. 51–64.

Davis, J.B., and Yarbrough, H.F. (1962). Preliminary experiments on a microbial fuel cell. Science *137*, 615–616.

De Ronde, C.E.J., Channer, D.M. deR., Faure, K., Bray, C.J., and Spooner, E.T.C. (1997). Fluid chemistry of Archean seafloor hydrothermal vents: Implications for the composition of circa 3.2 Ga seawater. Geochim. Cosmochim. Acta *61*, 4025–4042.

Deamer, D., and Weber, A.L. (2010). Bioenergetics and life's origins. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *2*, a004929.

DelDuca, M.G., Friscoe, J.M., and Zurilla, R.W. (1963). Developments in industrial microbiology. Am. Inst. Biol. Sci. *4*, 81–84.

Desbruyères, D., Almeida, A., Biscoito, M., Comtet, T., Khripounoff, A., Le Bris, N., Sarradin, P.M., and Segonzac, M. (2000). A review of the distribution of hydrothermal vent communities along the northern Mid-Atlantic Ridge: dispersal vs. environmental controls. Hydrobiologia *440*, 201–216.

Desbruyères, D., Biscoito, M., Caprais, J.-C., Colaço, A., Comtet, T., Crassous, P., Fouquet, Y., Khripounoff, A., Le Bris, N., Olu, K., et al. (2001). Variations in deep-sea hydrothermal vent communities on the Mid-Atlantic Ridge near the Azores plateau. Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap. *48*, 1325–1346.

Dewan, A., Beyenal, H., and Lewandowski, Z. (2008). Scaling up microbial fuel cells. Environ. Sci. Technol. *42*, 7643–7648.

Dick, G.J., Anantharaman, K., Baker, B.J., Li, M., Reed, D.C., and Sheik, C.S. (2013). The microbiology of deep-sea hydrothermal vent plumes: ecological and biogeographic linkages to seafloor and water column habitats. Front. Microbiol. *4*.

Dodd, M.S., Papineau, D., Grenne, T., Slack, J.F., Rittner, M., Pirajno, F., O'Neil, J., and Little, C.T.S. (2017). Evidence for early life in Earth's oldest hydrothermal vent precipitates. Nature *543*, 60–64.

Dopson, M., Ni, G., and Sleutels, T.H. (2015). Possibilities for extremophilic microorganisms in microbial electrochemical systems. FEMS Microbiol. Rev. fuv044.

Dörr, M., Käßbohrer, J., Grunert, R., Kreisel, G., Brand, W.A., Werner, R.A., Geilmann, H., Apfel, C., Robl, C., and Weigand, W. (2003). A possible prebiotic formation of ammonia from dinitrogen on iron sulfide surfaces. Angew. Chem. Int. Ed. *42*, 1540–1543.

Doyle, L.E., and Marsili, E. (2015). Methods for enrichment of novel electrochemically-active microorganisms. Bioresour. Technol.

Du, Z., Li, H., and Gu, T. (2007). A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. Biotechnol. Adv. *25*, 464–482.

Ducluzeau, A.-L., van Lis, R., Duval, S., Schoepp-Cothenet, B., Russell, M.J., and Nitschke, W. (2009). Was nitric oxide the first deep electron sink? Trends Biochem. Sci. *34*, 9–15.

E

Einen, J., Thorseth, I.H., and Øvreås, L. (2008). Enumeration of *Archaea* and *Bacteria* in seafloor basalt using real-time quantitative PCR and fluorescence microscopy. FEMS Microbiol. Lett. *282*, 182–187.

Elling, F.J., Becker, K.W., Könneke, M., Schröder, J.M., Kellermann, M.Y., Thomm, M., and Hinrichs, K.-U. (2016). Respiratory quinones in *Archaea*: phylogenetic distribution and application as biomarkers in the marine environment. Environ. Microbiol. *18*, 692–707.

El-Naggar, M.Y., Wanger, G., Leung, K.M., Yuzvinsky, T.D., Southam, G., Yang, J., Lau, W.M., Nealson, K.H., and Gorby, Y.A. (2010). Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1. Proc. Natl. Acad. Sci. *107*, 18127–18131.

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.

Erable, B., Roncato, M.-A., Achouak, W., and Bergel, A. (2009). Sampling natural biofilms: A new route to build efficient microbial anodes. Environ. Sci. Technol. *43*, 3194–3199.

F

Fahrenbach, A.C., Giurgiu, C., Tam, C.P., Li, L., Hongo, Y., Aono, M., and Szostak, J.W. (2017). Common and potentially prebiotic origin for precursors of nucleotide synthesis and activation. J. Am. Chem. Soc. *139*, 8780–8783.

Farquhar, J., Bao, H., and Thiemens, M. (2000). Atmospheric influence of Earth's earliest sulfur cycle. Science *289*, 756–758.

Fedorovich, V., Knighton, M.C., Pagaling, E., Ward, F.B., Free, A., and Goryanin, I. (2009). Novel electrochemically active bacterium phylogenetically related to *Arcobacter butzleri*, isolated from a microbial fuel cell. Appl. Environ. Microbiol. *75*, 7326–7334.

Flores, G.E., Campbell, J.H., Kirshtein, J.D., Meneghin, J., Podar, M., Steinberg, J.I., Seewald, J.S., Tivey, M.K., Voytek, M.A., Yang, Z.K., et al. (2011a). Microbial community structure of hydrothermal deposits from geochemically different vent fields along the Mid-Atlantic Ridge. Environ. Microbiol. *13*, 2158–2171.

Flores, G.E., Campbell, J.H., Kirshtein, J.D., Meneghin, J., Podar, M., Steinberg, J.I., Seewald, J.S., Tivey, M.K., Voytek, M.A., Yang, Z.K., et al. (2011b). Microbial community structure of hydrothermal deposits from geochemically different vent fields along the Mid-Atlantic Ridge. Environ. Microbiol. *13*, 2158–2171.

Fouquet, Y. (1997). Where are the large hydrothermal sulphide deposits in the oceans? Philos. Trans. R. Soc. Lond. Math. Phys. Eng. Sci. *355*, 427–441.

Fouquet, Y., Auclair, G., Cambon, P., and Etoubleau, J. (1988). Geological setting and mineralogical and geochemical investigations on sulfide deposits near 13°N on the East Pacific Rise. Mar. Geol. *84*, 145–178.

Frank, K.L. (2013). Linking metabolic rates with the diversity and functional capacity of endolithic microbial communities within

hydrothermal vent structures. Doctoral dissertation. Harvard University.

Fu, Q., Kobayashi, H., Kawaguchi, H., Wakayama, T., Maeda, H., and Sato, K. (2013a). A thermophilic gram-negative nitrate-reducing bacterium, *Calditerrivibrio nitroreducens*, exhibiting electricity generation capability. Environ. Sci. Technol. *47*, 12583–12590.

Fu, Q., Kobayashi, H., Kuramochi, Y., Xu, J., Wakayama, T., Maeda, H., and Sato, K. (2013b). Bioelectrochemical analyses of a thermophilic biocathode catalyzing sustainable hydrogen production. Int. J. Hydrog. Energy *38*, 15638–15645.

Fu, Q., Kuramochi, Y., Fukushima, N., Maeda, H., Sato, K., and Kobayashi, H. (2015a). Bioelectrochemical analyses of the development of a thermophilic biocathode catalyzing electromethanogenesis. Environ. Sci. Technol. *49*, 1225–1232.

Fu, Q., Fukushima, N., Maeda, H., Sato, K., and Kobayashi, H. (2015b). Bioelectrochemical analysis of a hyperthermophilic microbial fuel cell generating electricity at temperatures above 80 °C. Biosci. Biotechnol. Biochem. *79*, 1200–1206.

G

García-Muñoz, J., Amils, R., Fernández, V.M., Lacey, D., L, A., and Malki, M. (2011). Electricity generation by microorganisms in the sediment-water interface of an extremeacidic microcosm. Int Microbiol 73–81.

Gaucher, E.A., Kratzer, J.T., and Randall, R.N. (2010). Deep phylogeny—How a tree can help characterize early Life on Earth. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *2*.

Gesteland, R., and Atkins, J. (1993). The RNA World (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Girguis, P.R., and Holden, J.F. (2012). On the potential for bioenergy and biofuels from hydrothermal vent microbes. Oceanography.

Godfroy, A. (2005). EXOMAR cruise, RV L'Atalante.

Gong, Y., Radachowsky, S.E., Wolf, M., Nielsen, M.E., Girguis, P.R., and Reimers, C.E. (2011). Benthic microbial fuel cell as direct power source for an acoustic modem and seawater oxygen/temperature sensor system. Environ. Sci. Technol. *45*, 5047–5053.

Gorby, Y.A., Yanina, S., McLean, J.S., Rosso, K.M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T.J., Chang, I.S., Kim, B.H., Kim, K.S., et al. (2006). Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. *103*, 11358–11363.

Gorlas, A., Marguet, E., Gill, S., Geslin, C., Guigner, J.-M., Guyot, F., and Forterre, P. (2015). Sulfur vesicles from *Thermococcales*: A possible role in sulfur detoxifying mechanisms. Biochimie *118*, 356–364.

Gorlas, A., Jacquemot, P., Guigner, J.-M., Gill, S., Forterre, P., and Guyot, F. (2018). Greigite nanocrystals produced by hyperthermophilic archaea of *Thermococcales* order. PloS One *13*, e0201549.

Grattieri, M., Suvira, M., Hasan, K., and Minteer, S.D. (2017). Halotolerant extremophile bacteria from the Great Salt Lake for recycling pollutants in microbial fuel cells. J. Power Sources *356*, 310–318.

Gregory, K.B., and Lovley, D.R. (2005). Remediation and recovery of uranium from contaminated subsurface environments with electrodes. Environ. Sci. Technol. *39*, 8943–8947.

Gregory, K.B., Bond, D.R., and Lovley, D.R. (2004). Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. Environ. Microbiol. *6*, 596–604.

Gupta, R.S. (2014). The Phylum *Aquificae*. In The Prokaryotes, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 417–445.

Guzman, J.J., Cooke, K.G., Gay, M.O., Radachowsky, S.E., Girguis, P.R., and Chiu, M.A. (2010). Benthic microbial fuel cells: long-term power sources for wireless marine sensor networks. pp. 76662M-76662M – 12.

H

Ha, P.T., Lee, T.K., Rittmann, B.E., Park, J., and Chang, I.S. (2012). Treatment of alcohol distillery wastewater using a bacteroidetes-dominant thermophilic microbial fuel cell. Environ. Sci. Technol. *46*, 3022–3030.

Ha, P.T., Lindemann, S.R., Shi, L., Dohnalkova, A.C., Fredrickson, J.K., Madigan, M.T., and Beyenal, H. (2017). Syntrophic anaerobic photosynthesis via direct interspecies electron transfer. Nat. Commun. *8*, 13924.

Harmsen, H., Prieur, D., and Jeanthon, C. (1997). Distribution of microorganisms in deep-sea hydrothermal vent chimneys investigated by whole-cell hybridization and enrichment culture of thermophilic subpopulations. Appl. Environ. Microbiol. *63*, 2876–2883.

He, Z., and Angenent, L.T. (2006). Application of bacterial biocathodes in microbial fuel cells. Electroanalysis *18*, 2009–2015.

Heberling, C., Lowell, R.P., Liu, L., and Fisk, M.R. (2010). Extent of the microbial biosphere in the oceanic crust. Geochem. Geophys. Geosystems *11*.

Heidelberg, J.F., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Gaidos, E.J., Nelson, W.C., Read, T.D., Eisen, J.A., Seshadri, R., Ward, N., Methe, B., et al. (2002). Genome sequence of the dissimilatory metal ion–reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. Nat. Biotechnol. *20*, 1118–1123.

ter Heijne, A., Hamelers, H.V.M., and Buisman, C.J.N. (2007). Microbial fuel cell operation with continuous biological ferrous iron oxidation of the catholyte. Environ. Sci. Technol. *41*, 4130–4134.

Henri, P.A., Rommevaux, C., Lesongeur, F., Emerson, D., Leleu, T., and Chavagnac, V. (2015). Iron-oxidizing bacteria found at slow-spreading ridge: a case study of Capelinhos hydrothermal vent (Lucky Strike, MAR 37°N). AGU Fall Meet. Abstr. *43*.

Hinks, J., Zhou, M., and Dolfing, J. (2017). Microbial electron transport in the deep subsurface. In Microbial Ecology of Extreme Environments, C. Chénard, and F.M. Lauro, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 81–102.

Hogarth, M.P. (1995). The development of the direct methanol fuel cell. Ph.D. University of Newcastle upon Tyne.

Holland, H.D. (2002). Volcanic gases, black smokers, and the great oxidation event. Geochim. Cosmochim. Acta *66*, 3811–3826.

Holmes, D.E., Shrestha, P.M., Walker, D.J.F., Dang, Y., Nevin, K.P., Woodard, T.L., and Lovley, D.R. (2017). Metatranscriptomic evidence for direct interspecies electron transfer between *Geobacter* and *Methanothrix* species in methanogenic rice paddy soils. Appl. Environ. Microbiol. AEM.00223-17.

Huang, D.-Y., Zhou, S.-G., Chen, Q., Zhao, B., Yuan, Y., and Zhuang, L. (2011a). Enhanced anaerobic degradation of organic pollutants in a soil microbial fuel cell. Chem. Eng. J. *172*, 647–653.

Huang, L., Regan, J.M., and Quan, X. (2011b). Electron transfer mechanisms, new applications, and performance of biocathode microbial fuel cells. Bioresour. Technol. *102*, 316–323.

Huber, C., and Wächtershäuser, G. (1997). Activated acetic acid by carbon fixation on (Fe,Ni)S under primordial conditions. Science *276*, 245–247.

Huber, C., and Wächtershäuser, G. (1998). Peptides by activation of amino acids with CO on (Ni,Fe)S surfaces: implications for the origin of Life. Science *281*, 670–672.

Huber, H., and Kreuter, L. (2014). The Phylum *Nanoarchaeota*. In The Prokaryotes, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 311–318.

Huber, H., and Stetter, K.O. (2006). *Desulfurococcales*. In The Prokaryotes, (Springer), pp. 52–68.

Huber, H., and Stetter, K.O. (2015). Desulfurococcales ord. nov. In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, (American Cancer Society), pp. 1–2.

Huber, J.A., Butterfield, D.A., and Baross, J.A. (2002). Temporal changes in archaeal diversity and chemistry in a mid-ocean ridge subseafloor habitat. Appl. Environ. Microbiol. *68*, 1585–1594.

Huber, J.A., Butterfield, D.A., and Baross, J.A. (2003). Bacterial diversity in a subseafloor habitat following a deep-sea volcanic eruption. FEMS Microbiol. Ecol. *43*, 393–409.

Huber, J.A., Cantin, H.V., Huse, S.M., Mark Welch, D.B., Sogin, M.L., and Butterfield, D.A. (2010). Isolated communities of *Epsilonproteobacteria* in hydrothermal vent fluids of the Mariana Arc seamounts: *Epsilonproteobacteria* in vents of the Mariana Arc. FEMS Microbiol. Ecol. no-no.

Hussain, A., Guiot, S.R., Mehta, P., Raghavan, V., and Tartakovsky, B. (2011). Electricity generation from carbon monoxide and syngas in a microbial fuel cell. Appl. Microbiol. Biotechnol. *90*, 827–836.

Hussain, A., Mehta, P., Raghavan, V., Wang, H., Guiot, S.R., and Tartakovsky, B. (2012). The performance of a thermophilic microbial fuel cell fed with synthesis gas. Enzyme Microb. Technol. *51*, 163–170.

I

Itoh, T., and Iino, T. (2013). Phylogeny and biological features of thermophiles. In Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology, (Springer, Dordrecht), pp. 249–270.

J

Jacobson, K.S., Drew, D.M., and He, Z. (2011). Use of a liter-scale microbial desalination cell as a platform to study bioelectrochemical desalination with salt solution or artificial seawater. Environ. Sci. Technol. *45*, 4652–4657.

Jaeschke, A., Jørgensen, S.L., Bernasconi, S.M., Pedersen, R.B., Thorseth, I.H., and Früh-Green, G.L. (2012). Microbial diversity of Loki's Castle black smokers at the Arctic Mid-Ocean Ridge. Geobiology *10*, 548–561.

von Jan, M., Lapidus, A., Glavina Del Rio, T., Copeland, A., Tice, H., Cheng, J.-F., Lucas, S., Chen, F., Nolan, M., Goodwin, L., et al. (2010). Complete genome sequence of Archaeoglobus profundus type strain (AV18T). Stand. Genomic Sci. *2*, 327–346.

Jannasch, H.W., and Mottl, M.J. (1985). Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents. Science *229*, 717–725.

Jayashree, C., Tamilarasan, K., Rajkumar, M., Arulazhagan, P., Yogalakshmi, K.N., Srikanth, M., and Banu, J.R. (2016). Treatment of seafood processing wastewater using upflow microbial fuel cell for power generation and identification of bacterial community in anodic biofilm. J. Environ. Manage. *180*, 351–358.

Jeremiasse, A.W., Hamelers, H.V.M., and Buisman, C.J.N. (2010). Microbial electrolysis cell with a microbial biocathode. Bioelectrochemistry *78*, 39–43.

Ji, F., Zhou, H., and Yang, Q. (2008). The abiotic formation of hydrocarbons from dissolved CO_2 under hydrothermal conditions with cobalt-bearing magnetite. Orig. Life Evol. Biospheres *38*, 117–125.

Jolivet, E., L'Haridon, S., Corre, E., Forterre, P., and Prieur, D. (2003). *Thermococcus*

gammatolerans sp. nov., a hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *53*, 847–851.

Jong, B.C., Kim, B.H., Chang, I.S., Liew, P.W.Y., Choo, Y.F., and Kang, G.S. (2006). Enrichment, performance, and microbial diversity of a thermophilic mediatorless microbial fuel cell. Environ. Sci. Technol. *40*, 6449–6454.

Jourdin, L. (2015). Microbial electrosynthesis from carbon dioxide: performance enhancement and elucidation of mechanisms. Doctoral dissertation. The University of Queensland.

Jourdin, L., Grieger, T., Monetti, J., Flexer, V., Freguia, S., Lu, Y., Chen, J., Romano, M., Wallace, G.G., and Keller, J. (2015). High acetic acid production rate obtained by microbial electrosynthesis from carbon dioxide. Environ. Sci. Technol. *49*, 13566–13574.

K

Karato, S.-I., and Wang, D. (2013). Electrical conductivity of minerals and rocks. In Physics and Chemistry of the Deep Earth, (Wiley-Blackwell), pp. 145–182.

Kashefi, K., Holmes, D.E., Reysenbach, A.-L., and Lovley, D.R. (2002). Use of Fe(III) as an electron acceptor to recover previously uncultured hyperthermophiles: Isolation and characterization of *Geothermobacterium ferrireducens* gen. nov., sp. nov. Appl. Environ. Microbiol. *68*, 1735–1742.

Kato, S., Hashimoto, K., and Watanabe, K. (2012). Microbial interspecies electron transfer via electric currents through conductive minerals. Proc. Natl. Acad. Sci. *109*, 10042–10046.

Kelley, D.S., Baross, J.A., and Delaney, J.R. (2002). Volcanoes, fluids, and life at mid-ocean ridge spreading centers. Annu. Rev. Earth Planet. Sci. *30*, 385–491.

Kelley, D.S., Karson, J.A., Früh-Green, G.L., Yoerger, D.R., Shank, T.M., Butterfield, D.A., Hayes, J.M., Schrenk, M.O., Olson, E.J., Proskurowski, G., et al. (2005). A serpentinite-hosted ecosystem: the Lost City hydrothermal field. Science *307*, 1428–1434.

Kempe, S., and Degens, E.T. (1985). An early soda ocean? Chem. Geol. *53*, 95–108.

Ki, D., Popat, S.C., and Torres, C.I. (2016). Reduced overpotentials in microbial electrolysis cells through improved design, operation, and electrochemical characterization. Chem. Eng. J. *287*, 181–188.

Kim, Y., and Logan, B.E. (2011). Series assembly of microbial desalination cells containing stacked electrodialysis cells for partial or complete seawater desalination. Environ. Sci. Technol. *45*, 5840–5845.

Kim, B.-C., Postier, B.L., Didonato, R.J., Chaudhuri, S.K., Nevin, K.P., and Lovley, D.R. (2008). Insights into genes involved in electricity generation in *Geobacter sulfurreducens* via whole genome microarray analysis of the OmcF-deficient mutant. Bioelectrochemistry Amst. Neth. *73*, 70–75.

Kim, N.J., Choe, Y.J., Jeong, S.H., and Kim, S.H. (2000). Development of microbial fuel cells using *Proteus vulgaris*. Bull. Korean Chem. Soc. *21*, 44–48.

Kitadai, N., Kameya, M., and Fujishima, K. (2017). Origin of the teductive TriCarboxylic Acid (rTCA) cycle-type CO<sub>2</<ub> fixation: A perspective. Life *7*, 39.

Kitadai, N., Nakamura, R., Yamamoto, M., Takai, K., Li, Y., Yamaguchi, A., Gilbert, A., Ueno, Y., Yoshida, N., and Oono, Y. (2018). Geoelectrochemical CO production: Implications for the autotrophic origin of life. Sci. Adv. *4*, eaao7265.

Knauth, L.P., and Lowe, D.R. (2003). High Archean climatic temperature inferred from oxygen isotope geochemistry of cherts in the 3.5 Ga Swaziland Supergroup, South Africa. GSA Bull. *115*, 566–580.

Koch, C., and Harnisch, F. (2016). Is there a specific ecological niche for electroactive microorganisms? ChemElectroChem *3*, 1282–1295.

Konikoff, J.J., and Reynolds, L.W. (1963). Results of some experiments in biochemical electricity (General electric co philadelphia pa missile and space div).

Konn, C., Charlou, J.L., Holm, N.G., and Mousis, O. (2015). The production of methane, hydrogen, and organic compounds in ultramafic-hosted hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. Astrobiology *15*, 381–399.

Kracke, F., Vassilev, I., and Krömer, J.O. (2015). Microbial electron transport and energy conservation – the foundation for optimizing bioelectrochemical systems. Front. Microbiol. *6*, 575.

Kristall, B., Kelley, D.S., Hannington, M.D., and Delaney, J.R. (2006). Growth history of a diffusely venting sulfide structure from the Juan de Fuca Ridge: A petrological and geochemical study. Geochem. Geophys. Geosyst *7*.

Kristjánsson, J.K., and Hreggvidsson, G.O. (1995). Ecology and habitats of extremophiles. World J. Microbiol. Biotechnol. *11*, 17–25.

Kumar, A., Hsu, L.H.-H., Kavanagh, P., Barrière, F., Lens, P.N.L., Lapinsonnière, L., V, J.H.L., Schröder, U., Jiang, X., and Leech, D. (2017). The ins and outs of microorganism–electrode electron transfer reactions. Nat. Rev. Chem. *1*, 0024.

Kuntke, P., Śmiech, K.M., Bruning, H., Zeeman, G., Saakes, M., Sleutels, T.H.J.A., Hamelers, H.V.M., and Buisman, C.J.N. (2012). Ammonium recovery and energy production from urine by a microbial fuel cell. Water Res. *46*, 2627–2636.

L

Lane, N. (2017). Proton gradients at the origin of life. BioEssays *39*, 1600217.

Langmuir, C., Humphris, S., Fornari, D., Van Dover, C., Von Damm, K., Tivey, M.K., Colodner, D., Charlou, J.-L., Desonie, D., Wilson, C., et al. (1997). Hydrothermal vents near a mantle hot spot: the Lucky Strike vent field at 37°N on the Mid-Atlantic Ridge. Earth Planet. Sci. Lett. *148*, 69–91.

Leang, C., Qian, X., Mester, T., and Lovley, D.R. (2010). Alignment of the c-type cytochrome OmcS along pili of *Geobacter sulfurreducens*. Appl. Environ. Microbiol. *76*, 4080–4084.

Lee, H.S., Kang, S.G., Bae, S.S., Lim, J.K., Cho, Y., Kim, Y.J., Jeon, J.H., Cha, S.-S., Kwon, K.K., Kim, H.-T., et al. (2008). The complete genome sequence of *Thermococcus onnurineus* NA1 reveals a mixed heterotrophic and carboxydotrophic metabolism. J. Bacteriol. *190*, 7491–7499.

Legin, E., Copinet, A., and Duchiron, F. (1998). Production of thermostable amylolytic enzymes by *Thermococcus hydrothermalis*. Biotechnol. Lett. *20*, 363–367.

Leleu, T., Chavagnac, V., Cannat, M., Ceuleneer, G., Castillo, A., and Menjot, L. (2015). Fluid geochemistry of the Capelinhos vent site. A key to understand the Lucky Strike hydrothermal vent field (37°N, MAR). AGU Fall Meet. Abstr. *43*.

Levar, C.E., Rollefson, J.B., and Bond, D.R. (2012). Energetic and molecular constraints on the mechanism of environmental Fe(III) reduction by *Geobacter*. In Microbial Metal Respiration: From Geochemistry to Potential Applications, J. Gescher, and A. Kappler, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 29–48.

Li, W.-W., and Sheng, G.-P. (2012). Microbial fuel cells in power generation and extended applications. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. *128*, 165–197.

Li, J., Zhou, H., Fang, J., Sun, Y., and Dasgupta, S. (2014). Microbial distribution in different spatial positions within the walls of a black sulfide hydrothermal chimney. Mar. Ecol. Prog. Ser. *508*, 67–85.

Li, J., Cui, J., Yang, Q., Cui, G., Wei, B., Wu, Z., Wang, Y., and Zhou, H. (2017). Oxidative weathering and microbial diversity of an inactive seafloor hydrothermal sulfide chimney. Front. Microbiol. *8*.

Li, Y., Zhang, B., Cheng, M., Li, Y., Hao, L., and Guo, H. (2016). Spontaneous arsenic (III) oxidation with bioelectricity generation in single-chamber microbial fuel cells. J. Hazard. Mater. *306*, 8–12.

Liu, F., Rotaru, A.-E., Shrestha, P.M., Malvankar, N.S., Nevin, K.P., and Lovley, D.R. (2012). Promoting direct interspecies electron transfer with activated carbon. Energy Environ. Sci. *5*, 8982–8989.

Liu, F., Rotaru, A.-E., Shrestha, P.M., Malvankar, N.S., Nevin, K.P., and Lovley, D.R. (2015). Magnetite compensates for the lack of a pilin-associated c-type cytochrome in extracellular electron exchange. Environ. Microbiol. *17*, 648–655.

Liu, M., Yuan, Y., Zhang, L., Zhuang, L., Zhou, S., and Ni, J. (2010). Bioelectricity generation by a Gram-positive *Corynebacterium* sp. strain MFC03 under alkaline condition in microbial fuel cells. Bioresour. Technol. *101*, 1807–1811.

Liu, X., Tremblay, P.-L., Malvankar, N.S., Nevin, K.P., Lovley, D.R., and Vargas, M. (2014). A *Geobacter sulfurreducens* strain expressing *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili localizes OmcS on pili but is deficient in Fe(III) oxide reduction and current production. Appl. Environ. Microbiol. *80*, 1219–1224.

Liu, Y., Wan, J., Han, S., Zhang, S., and Luo, G. (2016). Selective conversion of carbon monoxide to hydrogen by anaerobic mixed culture. Bioresour. Technol. *202*, 1–7.

Logan, B.E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W., and Rabaey, K. (2006). Microbial fuel cells : Methodology and technology. Environ. Sci. Technol. *40*, 5181–5192.

Logan, B.E., Call, D., Cheng, S., Hamelers, H.V.M., Sleutels, T.H.J.A., Jeremiasse, A.W., and Rozendal, R.A. (2008). Microbial electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter. Environ. Sci. Technol. *42*, 8630–8640.

Lojou, E., Durand, M.C., Dolla, A., and Bianco, P. (2002). Hydrogenase activity control at *Desulfovibrio vulgaris* cell-coated carbon electrodes: biochemical and chemical factors influencing the mediated bioelectrocatalysis. Electroanalysis *14*, 913–922.

Longnecker, K., and Reysenbach, A.-L. (2001). Expansion of the geographic distribution of a novel lineage of *ε-Proteobacteria* to a hydrothermal vent site on the Southern East Pacific Rise. FEMS Microbiol. Ecol. *35*, 287–293.

López-García, P., Philippe, H., Gail, F., and Moreira, D. (2003). Autochthonous eukaryotic diversity in hydrothermal sediment and experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. Proc. Natl. Acad. Sci. *100*, 697–702.

Lovley, D.R. (2006). Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. Nat. Rev. Microbiol. *4*, 497–508.

Lovley, D.R. (2011a). Reach out and touch someone: potential impact of DIET (direct interspecies energy transfer) on anaerobic biogeochemistry, bioremediation, and bioenergy. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. *10*, 101–105.

Lovley, D.R. (2011b). Powering microbes with electricity: direct electron transfer from electrodes to microbes. Environ. Microbiol. Rep. *3*, 27–35.

Lovley, D.R. (2012a). Electromicrobiology. Annu. Rev. Microbiol. *66*, 391–409.

Lovley, D.R. (2012b). Long-range electron transport to Fe(III) oxide via pili with metallic-like conductivity. Biochem. Soc. Trans. *40*, 1186–1190.

Lovley, D.R. (2017). Syntrophy goes electric: Direct interspecies electron transfer. Annu. Rev. Microbiol. *71*, 643–664.

Lovley, D.R., and Malvankar, N.S. (2015). Seeing is believing: novel imaging techniques help clarify microbial nanowire structure and function. Environ. Microbiol. *17*, 2209–2215.

Lovley, D.R., and Phillips, E.J.P. (1988). Novel Mode of Microbial Energy Metabolism: Organic Carbon Oxidation Coupled to Dissimilatory Reduction of Iron or Manganese. Appl. Environ. Microbiol. *54*, 1472.

Lovley, D.R., Kashefi, K., Vargas, M., Tor, J.M., and Blunt-Harris, E.L. (2000). Reduction of humic substances and Fe(III) by hyperthermophilic microorganisms. Chem. Geol. *169*, 289–298.

Lower, B.H., Hochella, M.F., and Lower, S.K. (2005). Putative mineral-specific proteins synthesized by a metal reducing bacterium. Am. J. Sci. *305*, 687–710.

Luo, H., Teng, W., Liu, G., Zhang, R., and Lu, Y. (2017). Sulfate reduction and microbial community of autotrophic biocathode in response to acidity. Process Biochem. *54*, 120–127.

Lusk, B.G., Khan, Q.F., Parameswaran, P., Hameed, A., Ali, N., Rittmann, B.E., and Torres, C.I. (2015). Characterization of Electrical Current-Generation Capabilities from Thermophilic Bacterium Thermoanaerobacter pseudethanolicus Using Xylose, Glucose, Cellobiose, or Acetate with Fixed Anode Potentials. Environ. Sci. Technol. *49*, 14725–14731.

M

Ma, C., Zhuang, L., Zhou, S.G., Yang, G.Q., Yuan, Y., and Xu, R.X. (2012). Alkaline extracellular reduction: isolation and characterization of an alkaliphilic and halotolerant bacterium, *Bacillus pseudofirmus* MC02. J. Appl. Microbiol. *112*, 883–891.

Makita, H., Tanaka, E., Mitsunobu, S., Miyazaki, M., Nunoura, T., Uematsu, K., Takaki, Y., Nishi, S., Shimamura, S., and Takai, K. (2017). *Mariprofundus micogutta* sp. nov., a novel iron-oxidizing zetaproteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal field at the Bayonnaise knoll of the Izu-Ogasawara arc, and a description of *Mariprofundales* ord. nov. and *Zetaproteobacteria* classis nov. Arch. Microbiol. *199*, 335–346.

Malki, M., Lacey, A.L.D., Rodríguez, N., Amils, R., and Fernandez, V.M. (2008). Preferential use of an anode as an electron acceptor by an acidophilic bacterium in the presence of oxygen. Appl Env. Microbiol *74*, 4472–4476.

Malvankar, N.S., Vargas, M., Nevin, K.P., Franks, A.E., Leang, C., Kim, B.-C., Inoue, K., Mester, T., Covalla, S.F., Johnson, J.P., et al. (2011). Tunable metallic-like conductivity in microbial nanowire networks. Nat. Nanotechnol. *6*, 573–579.

Malvankar, N.S., Tuominen, M.T., and Lovley, D.R. (2012a). Lack of cytochrome involvement in long-range electron transport through conductive biofilms and nanowires of *Geobacter sulfurreducens*. Energy Environ. Sci. *5*, 8651.

Malvankar, N.S., Lau, J., Nevin, K.P., Franks, A.E., Tuominen, M.T., and Lovley, D.R. (2012b). Electrical conductivity in a mixed-species biofilm. Appl. Environ. Microbiol. *78*, 5967–5971.

Malvankar, N.S., Yalcin, S.E., Tuominen, M.T., and Lovley, D.R. (2014). Visualization of charge propagation along individual pili proteins using ambient electrostatic force microscopy. Nat. Nanotechnol. *9*, 1012–1017.

Mansy, S.S. (2010). Membrane transport in primitive cells. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. a002188.

Manzella, M.P., Reguera, G., and Kashefi, K. (2013). Extracellular electron transfer to Fe(III) oxides by the hyperthermophilic Archaeon *Geoglobus ahangari* via a direct

contact mechanism. Appl. Environ. Microbiol. *79*, 4694–4700.

Marguet, E., Gaudin, M., Gauliard, E., Fourquaux, I., Plouy, S. le B. du, Matsui, I., and Forterre, P. (2013). Membrane vesicles, nanopods and/or nanotubes produced by hyperthermophilic archaea of the genus *Thermococcus*. Biochem. Soc. Trans. *41*, 436–442.

Marone, A., Carmona-Martínez, A.A., Sire, Y., Meudec, E., Steyer, J.P., Bernet, N., and Trably, E. (2016). Bioelectrochemical treatment of table olive brine processing wastewater for biogas production and phenolic compounds removal. Water Res. *100*, 316–325.

Marshall, C.W., and May, H.D. (2009). Electrochemical evidence of direct electrode reduction by a thermophilic Gram-positive bacterium, *Thermincola ferriacetica*. Energy Environ. Sci. *2*, 699.

Marshall, C.W., Ross, D.E., Fichot, E.B., Norman, R.S., and May, H.D. (2012). Electrosynthesis of commodity chemicals by an autotrophic microbial community. Appl. Environ. Microbiol. *78*, 8412–8420.

Marsili, E., Baron, D.B., Shikhare, I.D., Coursolle, D., Gralnick, J.A., and Bond, D.R. (2008). *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. *105*, 3968–3973.

Martin, W., and Russell, M.J. (2007). On the origin of biochemistry at an alkaline hydrothermal vent. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. *362*, 1887–1926.

Martin, W., Baross, J., Kelley, D., and Russell, M.J. (2008). Hydrothermal vents and the origin of life. Nat. Rev. Microbiol. *6*, 805–814.

Mathis, B.J., Marshall, C.W., Milliken, C.E., Makkar, R.S., Creager, S.E., and May, H.D. (2007). Electricity generation by thermophilic microorganisms from marine sediment. Appl. Microbiol. Biotechnol. *78*, 147–155.

McCliment, E.A., Voglesonger, K.M., O'Day, P.A., Dunn, E.E., Holloway, J.R., and Cary, S.C. (2005). Colonization of nascent, deep-sea hydrothermal vents by a novel Archaeal and Nanoarchaeal assemblage. Environ. Microbiol. *8*, 114–125.

McCollom, T.M. (2007). Geochemical constraints on sources of metabolic energy for chemolithoautotrophy in ultramafic-hosted deep-sea hydrothermal systems. Astrobiology *7*, 933–950.

McCollom, T.M., and Seewald, J.S. (2003). Experimental constraints on the hydrothermal reactivity of organic acids and acid anions: I. Formic acid and formate. Geochim. Cosmochim. Acta *67*, 3625–3644.

Mehta, T., Childers, S.E., and Lovley, D. (2002). *Geobacter sulfurreducens* requires pili in order to reduce Fe (III) oxide. In American Society of Microbiology 102nd General Meeting, Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 410.

Michotey, V., Guasco, S., Boeuf, D., Morezzi, N., Durieux, B., Charpy, L., and Bonin, P. (2012). Spatio-temporal diversity of free-living and particle-attached prokaryotes in the tropical lagoon of Ahe atoll (Tuamotu Archipelago) and its surrounding oceanic waters. Mar. Pollut. Bull. *65*, 525–537.

Minic, Z., and Thongbam, P.D. (2011). The biological deep sea hydrothermal vent as a model to study carbon dioxide capturing enzymes. Mar. Drugs *9*, 719–738.

Miroshnichenko, M.L., and Bonch-Osmolovskaya, E.A. (2006). Recent developments in the thermophilic microbiology of deep-sea hydrothermal vents. Extremophiles *10*, 85–96.

Mocali, S., Galeffi, C., Perrin, E., Florio, A., Migliore, M., Canganella, F., Bianconi, G., Mattia, E.D., Dell'Abate, M.T., Fani, R., et al. (2012). Alteration of bacterial communities and organic matter in microbial fuel cells (MFCs) supplied with soil and organic fertilizer. Appl. Microbiol. Biotechnol. *97*, 1299–1315.

Modin, O., Fukushi, K., Rabaey, K., Rozendal, R.A., and Yamamoto, K. (2011). Redistribution of wastewater alkalinity with a microbial fuel cell to support nitrification of reject water. Water Res. *45*, 2691–2699.

Monnin, C., Chavagnac, V., Boulart, C., Ménez, B., Gérard, M., Gérard, E., Pisapia, C., Quéméneur, M., Erauso, G., Postec, A., et al. (2014). Fluid chemistry of the low temperature hyperalkaline hydrothermal system of Prony Bay (New Caledonia). Biogeosciences *11*, 5687–5706.

Monzon, O., Yang, Y., Li, Q., and Alvarez, P.J.J. (2016). Quorum sensing autoinducers enhance biofilm formation and power production in a hypersaline microbial fuel cell. Biochem. Eng. J. *109*, 222–227.

Monzon, O., Yang, Y., Kim, J., Heldenbrand, A., Li, Q., and Alvarez, P.J.J. (2017). Microbial fuel cell fed by Barnett Shale produced water: Power production by hypersaline autochthonous bacteria and coupling to a desalination unit. Biochem. Eng. J. *117*, 87–91.

Morozov, S.V., Vignais, P.M., Cournac, L., Zorin, N.A., Karyakina, E.E., Karyakin, A.A., and Cosnier, S. (2002). Bioelectrocatalytic hydrogen production by hydrogenase electrodes. Int. J. Hydrog. Energy *27*, 1501–1505.

Moscoviz, R., Toledo-Alarcón, J., Trably, E., and Bernet, N. (2016). Electro-fermentation: How to drive fermentation using electrochemical systems. Trends Biotechnol. *34*, 856–865.

Moyer, C.L., Dobbs, F.C., and Karl, D.M. (1994). Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. Appl. Environ. Microbiol. *60*, 871–879.

Moyer, C.L., Dobbs, F.C., and Karl, D.M. (1995). Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. Appl. Environ. Microbiol. *61*, 1555–1562.

Moyer, C.L., Tiedje, J.M., Dobbs, F.C., and Karl, D.M. (1998). Diversity of deep-sea hydrothermal vent *Archaea* from Loihi Seamount, Hawaii. Deep-Sea Res. Part II *1–3*, 303–317.

N

Nakagawa, S., and Takai, K. (2008). Deep-sea vent chemoautotrophs: diversity, biochemistry and ecological significance. FEMS Microbiol. Ecol. *65*, 1–14.

Nakamura, R., Takashima, T., Kato, S., Takai, K., Yamamoto, M., and Hashimoto, K. (2010). Electrical current generation across a black smoker chimney. Angew. Chem. Int. Ed. *49*, 7692–7694.

Naraghi, Z.G., Yaghmaei, S., Mardanpour, M.M., and Hasany, M. (2015). Produced water treatment with simultaneous bioenergy production using novel bioelectrochemical systems. Electrochimica Acta *180*, 535–544.

Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltaraus, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., Ivanova, A.E., Lysenko, A.M., Petrunyaka, V.V., Osipov, G.A., Belyaev, S.S., et al. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus, Bacillus thermocatenulatus, Bacillus thermoleovorans, Bacillus kaustophilus, Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus, G. th.* . Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *51*, 433–446.

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°N). Environ. Microbiol. *5*, 492–502.

Nercessian, O., Parot, S., Délia, M.-L., Bergel, A., and Achouak, W. (2012). Harvesting electricity with *Geobacter bremensis* isolated from compost. PLoS ONE *7*, e34216.

Nevin, K.P., Richter, H., Covalla, S.F., Johnson, J.P., Woodard, T.L., Orloff, A.L., Jia, H., Zhang, M., and Lovley, D.R. (2008). Power output and columbic efficiencies from biofilms of *Geobacter sulfurreducens* comparable to mixed community microbial fuel cells. Environ. Microbiol. *10*, 2505–2514.

Nevin, K.P., Kim, B.-C., Glaven, R.H., Johnson, J.P., Woodard, T.L., Methé, B.A., DiDonato, R.J., Jr, Covalla, S.F., Franks, A.E., Liu, A., et al. (2009). Anode biofilm transcriptomics reveals outer surface components essential for high density current production in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. PLoS ONE *4*, e5628.

Nevin, K.P., Hensley, S.A., Franks, A.E., Summers, Z.M., Ou, J., Woodard, T.L., Snoeyenbos-West, O.L., and Lovley, D.R. (2011). Electrosynthesis of organic compounds from carbon dioxide is catalyzed by a diversity of acetogenic microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. *77*, 2882–2886.

Newman, D.K., and Kolter, R. (2000). A role for excreted quinones in extracellular electron transfer. Nature *405*, 94–97.

Nielsen, M.E., Reimers, C.E., and Stecher, H.A. (2007). Enhanced power from chambered benthic microbial fuel cells. Environ. Sci. Technol. *41*, 7895–7900.

Nielsen, M.E., Reimers, C.E., White, H.K., Sharma, S., and Girguis, P.R. (2008). Sustainable energy from deep ocean cold seeps. Energy Environ. Sci. *1*, 584.

Niessen, J., Schröder, U., and Scholz, F. (2004a). Exploiting complex carbohydrates for microbial electricity generation – a bacterial fuel cell operating on starch. Electrochem. Commun. *6*, 955–958.

Niessen, J., Schröder, U., Rosenbaum, M., and Scholz, F. (2004b). Fluorinated polyanilines as superior materials for electrocatalytic anodes in bacterial fuel cells. Electrochem. Commun. *6*, 571–575.

Nimje, V.R., Chen, C.-Y., Chen, C.-C., Jean, J.-S., Reddy, A.S., Fan, C.-W., Pan, K.-Y., Liu, H.-T., and Chen, J.-L. (2009). Stable and high energy generation by a strain of *Bacillus subtilis* in a microbial fuel cell. J. Power Sources *190*, 258–263.

Nitschke, W., and Russell, M.J. (2013). Beating the acetyl coenzyme A-pathway to the origin of life. Phil Trans R Soc B *368*, 20120258.

O

Oger, P., Sokolova, T.G., Kozhevnikova, D.A., Chernyh, N.A., Bartlett, D.H., Bonch-Osmolovskaya, E.A., and Lebedinsky, A.V. (2011). Complete Genome Sequence of the Hyperthermophilic Archaeon Thermococcus sp. Strain AM4, Capable of Organotrophic Growth and Growth at the Expense of Hydrogenogenic or Sulfidogenic Oxidation of Carbon Monoxide. J. Bacteriol. *193*, 7019–7020.

Oon, Y.-S., Ong, S.-A., Ho, L.-N., Wong, Y.-S., Oon, Y.-L., Lehl, H.K., and Thung, W.-E. (2016). Long-term operation of double chambered microbial fuel cell for bio-electro denitrification. Bioprocess Biosyst. Eng. 1–8.

Oren, A. (2014a). The Family *Methanocaldococcaceae*. In The Prokaryotes, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 201–208.

Oren, A. (2014b). The Family *Methanococcaceae*. In The Prokaryotes, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 215–224.

Oren, A. (2014c). The Family *Methanopyraceae*. In The Prokaryotes, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 247–252.

P

Pagé, A., Margaret, T.K., Debra, S.S., and Reysenbach, A. (2008). Temporal and spatial archaeal colonization of hydrothermal vent deposits. Environ. Microbiol. *10*, 874–884.

Parameswaran, P., Bry, T., Popat, S.C., Lusk, B.G., Rittmann, B.E., and Torres, C.I. (2013). Kinetic, electrochemical, and microscopic characterization of the thermophilic, anode-respiring bacterium *Thermincola ferriacetica*. Environ. Sci. Technol. *47*, 4934–4940.

Park, D.H., and Zeikus, J.G. (2000). Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore. Appl Env. Microbiol *66*, 1292–1297.

Pasek, M.A., Harnmeijer, J.P., Buick, R., Gull, M., and Atlas, Z. (2013). Evidence for reactive reduced phosphorus species in the early Archean ocean. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 10089–10094.

Pham, T.H., Boon, N., Aelterman, P., Clauwaert, P., Schamphelaire, L.D., Vanhaecke, L., Maeyer, K.D., Höfte, M., Verstraete, W., and Rabaey, K. (2007). Metabolites produced by *Pseudomonas* sp. enable a Gram-positive bacterium to achieve extracellular electron transfer. Appl. Microbiol. Biotechnol. *77*, 1119–1129.

Pillot, G., Frouin, E., Pasero, E., Godfroy, A., Combet-Blanc, Y., Davidson, S., and Liebgott, P.-P. (2018). Specific enrichment of hyperthermophilic electroactive *Archaea* from deep-sea hydrothermal vent on electrically conductive support. Bioresour. Technol. *259*, 304–311.

Pinti, D.L. (2005). The origin and evolution of the oceans. In Lectures in Astrobiology, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 83–112.

Pirbadian, S., and El-Naggar, M.Y. (2012). Multistep hopping and extracellular charge transfer in microbial redox chains. Phys. Chem. Chem. Phys. *14*, 13802.

Pirbadian, S., Barchinger, S.E., Leung, K.M., Byun, H.S., Jangir, Y., Bouhenni, R.A., Reed, S.B., Romine, M.F., Saffarini, D.A., Shi, L., et al. (2014). *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. Proc. Natl. Acad. Sci. *111*, 12883–12888.

Poli, A., Finore, I., Romano, I., Gioiello, A., Lama, L., and Nicolaus, B. (2017). Microbial Diversity in Extreme Marine Habitats and Their Biomolecules. Microorganisms *5*, 25.

Polizzi, N.F., Skourtis, S.S., and Beratan, D.N. (2012). Physical constraints on charge transport through bacterial nanowires. Faraday Discuss *155*, 43–61.

Ponnamperuma, C., Shimoyama, A., and Friebele, E. (1982). Clay and the origin of life. Orig. Life *12*, 9–40.

Portail, M., Olu, K., Dubois, S.F., Escobar-Briones, E., Gelinas, Y., Menot, L., and Sarrazin, J. (2016). Food-web complexity in Guaymas Basin hydrothermal vents and cold seeps. PLOS ONE *11*, e0162263.

Post, J.W., Veerman, J., Hamelers, H.V.M., Euverink, G.J.W., Metz, S.J., Nymeijer, K., and Buisman, C.J.N. (2007). Salinity-gradient power: Evaluation of pressure-retarded osmosis and reverse electrodialysis. J. Membr. Sci. *288*, 218–230.

Potter, M.C. (1911). Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. *84*, 260–276.

Prasad, D., Arun, S., Murugesan, M., Padmanaban, S., Satyanarayanan, R.S., Berchmans, S., and Yegnaraman, V. (2007). Direct electron transfer with yeast cells and construction of a mediatorless microbial fuel cell. Biosens. Bioelectron. *22*, 2604–2610.

R

Rabaey, K., and Rozendal, R.A. (2010). Microbial electrosynthesis — Revisiting the electrical route for microbial production. Nat. Rev. Microbiol. *8*, 706–716.

Rabaey, K., and Verstraete, W. (2005). Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. Trends Biotechnol. *23*, 291–298.

Rabaey, K., Boon, N., Siciliano, S.D., Verhaege, M., and Verstraete, W. (2004). Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. Appl. Environ. Microbiol. *70*, 5373–5382.

Rabaey, K., Boon, N., Höfte, M., and Verstraete, W. (2005). Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells. Environ. Sci. Technol. *39*, 3401–3408.

Rabaey, K., Bützer, S., Brown, S., Keller, J., and Rozendal, R.A. (2010). High current generation coupled to caustic production using a lamellar bioelectrochemical system. Environ. Sci. Technol. *44*, 4315–4321.

Rago, L., Monpart, N., Cortés, P., Baeza, J.A., and Guisasola, A. (2015). Performance of microbial electrolysis cells with bioanodes grown at different external resistances. Water Sci. Technol. wst2015418.

Rawson, F.J., Gross, A.J., Garrett, D.J., Downard, A.J., and Baronian, K.H.R. (2012). Mediated electrochemical detection of electron transfer from the outer surface of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. Electrochem. Commun. *15*, 85–87.

Reguera, G., McCarthy, K.D., Mehta, T., Nicoll, J.S., Tuominen, M.T., and Lovley, D.R. (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. Nature *435*, 1098–1101.

Reimers, C.E., Girguis, P., Stecher, H.A., Tender, L.M., Ryckelynck, N., and Whaling, P. (2006). Microbial fuel cell energy from an ocean cold seep. Geobiology *4*, 123–136.

Reveillaud, J., Reddington, E., McDermott, J., Algar, C., Meyer, J.L., Sylva, S., Seewald, J., German, C.R., and Huber, J.A. (2016). Subseafloor microbial communities in hydrogen-rich vent fluids from hydrothermal systems along the Mid-Cayman Rise: Subseafloor microbes at Mid-Cayman Rise. Environ. Microbiol. *18*, 1970–1987.

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

Richter, H., Nevin, K.P., Jia, H., Lowy, D.A., Lovley, D.R., and Tender, L.M. (2009). Cyclic voltammetry of biofilms of wild type and mutant *Geobacter sulfurreducens* on fuel cell anodes indicates possible roles of OmcB, OmcZ, type IV pili, and protons in extracellular electron transfer. Energy Environ. Sci. *2*, 506.

Richter, K., Schicklberger, M., and Gescher, J. (2012). Dissimilatory reduction of extracellular electron acceptors in anaerobic respiration. Appl. Environ. Microbiol. *78*, 913–921.

Rigaud, V., and Nicolas-Meunier, B. (2015). From manned to autonomous and hybrid underwater systems. A review of existing operational systems, development trends and IFREMER/DCNS cooperative projects. p.

Rohrback, G.H., Scott, W.R., and Canfield, J.H. (1962). Proceedings of the 16th Annual Power Sources Conference. 18–21.

Rosenbaum, M., Aulenta, F., Villano, M., and Angenent, L.T. (2011). Cathodes as electron donors for microbial metabolism: Which extracellular electron transfer mechanisms are involved? Bioresour. Technol. *102*, 324–333.

Rotaru, A.-E., Shrestha, P.M., Liu, F., Shrestha, M., Shrestha, D., Embree, M., Zengler, K., Wardman, C., Nevin, K.P., and Lovley, D.R. (2014a). A new model for electron flow during anaerobic digestion: direct interspecies electron transfer to Methanosaeta for the reduction of carbon dioxide to methane. Energy Env. Sci *7*, 408–415.

Rotaru, A.-E., Shrestha, P.M., Liu, F., Markovaite, B., Chen, S., Nevin, K.P., and

Lovley, D.R. (2014b). Direct interspecies electron transfer between *Geobacter metallireducens* and *Methanosarcina barkeri*. Appl. Environ. Microbiol. *80*, 4599–4605.

Rousseau, R., Dominguez-Benetton, X., Délia, M.-L., and Bergel, A. (2013). Microbial bioanodes with high salinity tolerance for microbial fuel cells and microbial electrolysis cells. Electrochem. Commun. *33*, 1–4.

Rozendal, R.A., Hamelers, H.V.M., Euverink, G.J.W., Metz, S.J., and Buisman, C.J.N. (2006). Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis. Int. J. Hydrog. Energy *31*, 1632–1640.

Rozendal, R.A., Hamelers, H.V.M., Molenkamp, R.J., and Buisman, C.J.N. (2007). Performance of single chamber biocatalyzed electrolysis with different types of ion exchange membranes. Water Res. *41*, 1984–1994.

Rozendal, R.A., Leone, E., Keller, J., and Rabaey, K. (2009). Efficient hydrogen peroxide generation from organic matter in a bioelectrochemical system. Electrochem. Commun. *11*, 1752–1755.

Rusch, A., and Amend, J.P. (2004). Order-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for (hyper)thermophilic *Archaea* and *Bacteria*. Extremophiles *8*, 357–366.

Rushdi, A.I., and Simoneit, B.R. (2001). Lipid formation by aqueous Fischer-Tropsch-type synthesis over a temperature range of 100 to 400 degrees C. Orig. Life Evol. Biosphere J. Int. Soc. Study Orig. Life *31*, 103–118.

Russell, M. (2016). Why and how Life is driven into being at ancient submarine alkaline springs. p.

Russell, M.J. (2007). The alkaline solution to the emergence of Life: Energy, entropy and early evolution. Acta Biotheor. *55*, 133–179.

Russell, M.J. (2011). Origin of Life. In Encyclopedia of Geobiology, J. Reitner, and V. Thiel, eds. (Springer Netherlands), pp. 701–716.

Russell, M., and Russell, M.J. (2018). Green rust: The simple organizing 'Seed' of all Life? Life *8*, 35.

Russell, M.J., and Hall, A.J. (1997). The emergence of life from iron monosulphide bubbles at a submarine hydrothermal redox and pH front. J. Geol. Soc. *154*, 377–402.

Russell, M.J., and Nitschke, W. (2017). Methane: Fuel or exhaust at the emergence of Life? Astrobiology *17*, 1053–1066.

Russell, M.J., Barge, L.M., Bhartia, R., Bocanegra, D., Bracher, P.J., Branscomb, E., Kidd, R., McGlynn, S., Meier, D.H., Nitschke, W., et al. (2014). The drive to life on wet and icy worlds. Astrobiology *14*, 308–343.

S

Saeed, H.M., Husseini, G.A., Yousef, S., Saif, J., Al-Asheh, S., Abu Fara, A., Azzam, S., Khawaga, R., and Aidan, A. (2015). Microbial desalination cell technology: A review and a case study. Desalination *359*, 1–13.

Sarradin, P.-M., and Cannat, M. (2014). MOMARSAT2014 cruise,Pourquoi pas ? R/V.

Schaetzle, O., Barrière, F., and Baronian, K. (2008). Bacteria and yeasts as catalysts in microbial fuel cells : electron transfer from micro-organisms to electrodes for green electricity. Energy Environ. Sci. *1*, 607–620.

Schleucher, J., Schwendinger, M., Sattler, M., Schmidt, P., Schedletzky, O., Glaser, S.J., Sørensen, O.W., and Griesinger, C. (1994). A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients. J. Biomol. NMR *4*, 301–306.

Schoonen, M., Smirnov, A., and Cohn, C. (2004). A perspective on the role of minerals in prebiotic synthesis. AMBIO J. Hum. Environ. *33*, 539–551.

Schrenk, M.O., Kelley, D.S., Delaney, J.R., and Baross, J.A. (2003). Incidence and Diversity of Microorganisms within the Walls of an Active Deep-Sea Sulfide Chimney. Appl. Environ. Microbiol. *69*, 3580–3592.

Schrenk, M.O., Kelley, D.S., Bolton, S.A., and Baross, J.A. (2004). Low archaeal diversity linked to subseafloor geochemical processes at the Lost City Hydrothermal Field, Mid-Atlantic Ridge. Environ. Microbiol. *6*, 1086–1095.

Schrenk, M.O., Brazelton, W.J., and Lang, S.Q. (2013). Serpentinization, carbon, and deep life. Rev. Mineral. Geochem. *75*, 575–606.

Schröder, U. (2007). Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. Phys. Chem. Chem. Phys. *9*, 2619–2629.

Schröder, U., Harnisch, F., and Angenent, L.T. (2015). Microbial electrochemistry and technology: terminology and classification. Energy Env. Sci *8*, 513–519.

Schut, G.J., Lipscomb, G.L., Han, Y., Notey, J.S., Kelly, R.M., and Adams, M.M.W. (2014). The Order Thermococcales and the Family Thermococcaceae. In The Prokaryotes, E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, and F. Thompson, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 363–383.

Seelam, J.S., Pant, D., Patil, S.A., and Kapadnis, B.P. (2015). Biological electricity production from wastes and wastewaters. In Microbial Factories, V.C. Kalia, ed. (Springer India), pp. 155–183.

Segré, D., Ben-Eli, D., Deamer, D.W., and Lancet, D. (2001). The Lipid World. Orig. Life Evol. Biosph. *31*, 119–145.

Sekar, N., Wu, C.-H., Adams, M.W.W., and Ramasamy, R.P. (2017). Electricity generation by *Pyrococcus furiosus* in microbial fuel cells operated at 90°C. Biotechnol. Bioeng. *114*, 1419–1427.

Sengodon, P., and Hays, D.B. (2012). Microbial Fuel Cells.

Seravalli, J., and Ragsdale, S.W. (2000). Channeling of carbon monoxide during anaerobic carbon dioxide fixation. Biochemistry *39*, 1274–1277.

Shehab, N.A., Ortiz-Medina, J.F., Katuri, K.P., Hari, A.R., Amy, G., Logan, B.E., and Saikaly, P.E. (2017). Enrichment of extremophilic exoelectrogens in microbial electrolysis cells using Red Sea brine pools as inocula. Bioresour. Technol. *239*, 82–86.

Shi, L., Squier, T.C., Zachara, J.M., and Fredrickson, J.K. (2007). Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multihaem c-type cytochromes. Mol. Microbiol. *65*, 12–20.

Shi, L., Dong, H., Reguera, G., Beyenal, H., Lu, A., Liu, J., Yu, H.-Q., and Fredrickson, J.K. (2016). Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals. Nat. Rev. Microbiol. *14*, 651–662.

Shrestha, P.M., and Rotaru, A.-E. (2014). Plugging in or going wireless: strategies for interspecies electron transfer. Front. Microbiol. *5*, 237.

Shrestha, N., Chilkoor, G., Vemuri, B., Rathinam, N., Sani, R.K., and Gadhamshetty, V. (2018). Extremophiles for microbial-electrochemistry applications: A critical review. Bioresour. Technol. *255*, 318–330.

Shukla, A.K., Suresh, P., Sheela, B., and Rajendran, A. (2004). Biological fuel cells and their applications. Curr. Sci. *87*, 455–468.

Singireddy, S., Gordon, A.D., Smirnov, A., Vance, M.A., Schoonen, M.A.A., Szilagyi, R.K., and Strongin, D.R. (2012). Reduction of nitrite and nitrate to ammonium on pyrite. Orig. Life Evol. Biosphere J. Int. Soc. Study Orig. Life *42*, 275–294.

Sleep, N.H. (2010). The Hadean-Archaean Environment. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *2*.

Sleutels, T.H.J.A., Ter Heijne, A., Buisman, C.J.N., and Hamelers, H.V.M. (2012). Bioelectrochemical systems: An outlook for

practical applications. ChemSusChem *5*, 1012–1019.

Slobodkin, A., Campbell, B., Cary, S.C., Bonch-Osmolovskaya, E., and Jeanthon, C. (2001). Evidence for the presence of thermophilic Fe(III)-reducing microorganisms in deep-sea hydrothermal vents at 13°N (East Pacific Rise). FEMS Microbiol. Ecol. *36*, 235–243.

Slobodkin, A.I., Jeanthon, C., L'Haridon, S., Nazina, T., Miroshnichenko, M., and Bonch-Osmolovskaya, E. (1999). Dissimilatory reduction of Fe(III) by thermophilic *Bacteria* and *Archaea* in deep subsurface petroleum reservoirs of Western Siberia. Curr. Microbiol. *39*, 99–102.

Smith, J.A., Aklujkar, M., Risso, C., Leang, C., Giloteaux, L., and Holmes, D.E. (2015). Mechanisms Involved in Fe(III) Respiration by the Hyperthermophilic Archaeon *Ferroglobus placidus*. Appl. Environ. Microbiol. *81*, 2735–2744.

Sokolova, T.G., Jeanthon, C., Kostrikina, N.A., Chernyh, N.A., Lebedinsky, A.V., Stackebrandt, E., and Bonch-Osmolovskaya, E.A. (2004). The first evidence of anaerobic CO oxidation coupled with H_2 production by a hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. Extremophiles *8*, 317–323.

Sophia, A.C., and Bhalambaal, V.M. (2015). Utilization of coconut shell carbon in the anode compartment of microbial desalination cell (MDC) for enhanced desalination and bio-electricity production. J. Environ. Chem. Eng.

Stanulla, R., Stanulla, C., Bogason, E., Pohl, T., and Merkel, B. (2017). Structural, geochemical, and mineralogical investigation of active hydrothermal fluid discharges at Strýtan hydrothermal chimney, Akureyri Bay, Eyjafjörður region, Iceland. Geotherm. Energy *5*, 8.

Steinbusch, K.J.J., Hamelers, H.V.M., Plugge, C.M., and Buisman, C.J.N. (2011). Biological formation of caproate and caprylate from acetate: fuel and chemical production from low grade biomass. Energy Env. Sci *4*, 216–224.

Stoddard, S.F., Smith, B.J., Hein, R., Roller, B.R.K., and Schmidt, T.M. (2015). rrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. Nucleic Acids Res. *43*, D593-598.

Summers, Z.M., Fogarty, H.E., Leang, C., Franks, A.E., Malvankar, N.S., and Lovley, D.R. (2010). Direct exchange of electrons within aggregates of an evolved syntrophic coculture of anaerobic bacteria. Science *330*, 1413–1415.

Sun, J., Li, W., Li, Y., Hu, Y., and Zhang, Y. (2013). Redox mediator enhanced simultaneous decolorization of azo dye and bioelectricity generation in air-cathode microbial fuel cell. Bioresour. Technol. *142*, 407–414.

Sutherland, J.D. (2017). Opinion: Studies on the origin of life — the end of the beginning. Nat. Rev. Chem. *1*, 0012.

Sutrisno, A., Ueda, M., Abe, Y., Nakazawa, M., and Miyatake, K. (2004). A chitinase with high activity toward partially N-acetylated chitosan from a new, moderately thermophilic, chitin-degrading bacterium, *Ralstonia* sp. A-471. Appl. Microbiol. Biotechnol. *63*, 398–406.

Suzuki, S., Karube, I., Matsunaga, T., Kuriyama, S., Suzuki, N., Shirogami, T., and Takamura, T. (1980). Biochemical energy conversion using immobilized whole cells of *Clostridium butyricum*. Biochimie *62*, 353–358.

Suzuki, Y., Inagaki, F., Takai, K., Nealson, K.H., and Horikoshi, K. (2004). Microbial diversity in inactive chimney structures from deep-sea hydrothermal systems. Microb. Ecol. *47*, 186–196.

Sydow, A., Krieg, T., Mayer, F., Schrader, J., and Holtmann, D. (2014). Electroactive bacteria—molecular mechanisms and genetic tools. Appl. Microbiol. Biotechnol. *98*, 8481–8495.

Sylvan, J.B., Toner, B.M., and Edwards, K.J. (2012). Life and death of deep-sea vents: Bacterial diversity and ecosystem succession on inactive hydrothermal sulfides. MBio *3*, e00279-11.

T

Takai, K., and Horikoshi, K. (1999). Genetic diversity of *Archaea* in deep-sea hydrothermal vent environments. Genetics *152*, 1285–1297.

Takai, K., and Nakamura, K. (2011). Archaeal diversity and community development in deep-sea hydrothermal vents. Curr. Opin. Microbiol. *14*, 282–291.

Takai, K., Komatsu, T., Inagaki, F., and Horikoshi, K. (2001). Distribution of *Archaea* in a black smoker chimney structure. Appl. Environ. Microbiol. *67*, 3618–3629.

Takai, K., Gamo, T., Tsunogai, U., Nakayama, N., Hirayama, H., Nealson, K.H., and Horikoshi, K. (2004). Geochemical and microbiological evidence for a hydrogen-based, hyperthermophilic subsurface lithoautotrophic microbial ecosystem (HyperSLiME) beneath an active deep-sea hydrothermal field. Extremophiles *8*, 269–282.

Takai, K., Nakagawa, S., Reysenbach, A.-L., and Hoek, J. (2006). Microbial ecology of Mid-Ocean ridges and back-arc basins. In Back-Arc Spreading Systems: Geological, Biological, Chemical, and Physical Interactions, D.M. Christie, C.R. Fisher, S.-M. Lee, and S. Givens, eds. (American Geophysical Union), pp. 185–213.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol. Biol. Evol. *30*, 2725–2729.

Taran, O. (2017). Electron transfer between electrically conductive minerals and quinones. Front. Chem. *5*.

Tatsumi, H., Takagi, K., Fujita, M., Kano, K., and Ikeda, T. (1999). Electrochemical study of reversible hydrogenase reaction of *Desulfovibrio vulgaris* cells with methyl viologen as an electron carrier. Anal. Chem. *71*, 1753–1759.

Taylor, C.D., Wirsen, C.O., and Gaill, F. (1999). Rapid microbial production of filamentous sulfur mats at hydrothermal vents. Appl. Environ. Microbiol. *65*, 2253–2255.

Teerikorpi, P. (2009). Emergence and evolution of Life. In The Evolving Universe and the Origin of Life, (Springer, New York, NY), pp. 411–432.

Teira, E., Reinthaler, T., Pernthaler, A., Pernthaler, J., and Herndl, G.J. (2004). Combining Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescence In Situ Hybridization and Microautoradiography To Detect Substrate Utilization by Bacteria and Archaea in the Deep Ocean. Appl. Environ. Microbiol. *70*, 4411–4414.

Thrash, J.C., and Coates, J.D. (2008). Review: direct and indirect electrical stimulation of microbial metabolism. Environ. Sci. Technol. *42*, 3921–3931.

Thurston, C.F., BENNETTO, H.P., DELANEY, G.M., MASON, J.R., ROLLER, S.D., and STIRLING, J.L. (1985). Glucose metabolism in a microbial fuel cell. Stoichiometry of product formation in a thionine-mediated *Proteus vulgaris* fuel cell and its relation to coulombic yields. Microbiology *131*, 1393–1401.

Tivey, M.K. (2007). Generation of seafloor hydrothermal vent fluids and associated mineral deposits. Oceanography *20*, 50–65.

U

Utter, M., and Keech, D. (1963). Pyruvate carboxylase. I. Nature of the reaction. J. Biol. Chem. *238*, 2603–2608.

Uzarraga, R., Auria, R., Davidson, S., Navarro, D., and Combet-Blanc, Y. (2011). New cultural approaches for microaerophilic hyperthermophiles. Curr. Microbiol. *62*, 346–350.

V

Van Eerten-Jansen, M.C.A.A., Ter Heijne, A., Grootscholten, T.I.M., Steinbusch, K.J.J., Sleutels, T.H.J.A., Hamelers, H.V.M., and Buisman, C.J.N. (2013). Bioelectrochemical production of caproate and caprylate from acetate by mixed cultures. ACS Sustain. Chem. Eng. *1*, 513–518.

Vandecandelaere, I., Nercessian, O., Segaert, E., Achouak, W., Mollica, A., Faimali, M., De Vos, P., and Vandamme, P. (2008a). *Alteromonas genovensis* sp. nov., isolated from a marine electroactive biofilm and emended description of *Alteromonas macleodii*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *58*, 2589–2596.

Vandecandelaere, I., Nercessian, O., Segaert, E., Achouak, W., Faimali, M., and Vandamme, P. (2008b). *Ruegeria scottomollicae* sp. nov., isolated from a marine electroactive biofilm. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *58*, 2726–2733.

Vandecandelaere, I., Nercessian, O., Segaert, E., Achouak, W., Mollica, A., Faimali, M., and Vandamme, P. (2009). *Nautella italica* gen. nov., sp. nov., isolated from a marine electroactive biofilm. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *59*, 811–817.

Vargas, M., Malvankar, N.S., Tremblay, P.-L., Leang, C., Smith, J.A., Patel, P., Synoeyenbos-West, O., Nevin, K.P., and Lovley, D.R. (2013). Aromatic amino acids required for pili conductivity and long-range extracellular electron transport in *Geobacter sulfurreducens*. MBio *4*, e00105-13.

Varma, S.J., Muchowska, K.B., Chatelain, P., and Moran, J. (2018). Native iron reduces CO_2 to intermediates and end-products of the acetyl-CoA pathway. Nat. Ecol. Evol. *2*, 1019–1024.

Vetriani, C., Voordeckers, J.W., Crespo-Medina, M., O'Brien, C.E., Giovannelli, D., and Lutz, R.A. (2014). Deep-sea hydrothermal vent *Epsilonproteobacteria* encode a conserved and widespread nitrate reduction pathway (Nap). ISME J. *8*, 1510–1521.

Vorholt, J.A., Hafenbradl, D., Stetter, K.O., and Thauer, R.K. (1997). Pathways of autotrophic CO_2 fixation and of dissimilatory nitrate reduction to N_2O in *Ferroglobus placidus*. Arch. Microbiol. *167*, 19–23.

W

Wächtershäuser, G. (1998). Origin of life in an iron-sulfur world. In The Molecular Origins of Life: Assembling Pieces of the Puzzle, (Cambridge: A. Brack), pp. 206–216.

Wagner, I.D., and Wiegel, J. (2008). Diversity of thermophilic anaerobes. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1125*, 1–43.

Wagner, R.C., Regan, J.M., Oh, S.-E., Zuo, Y., and Logan, B.E. (2009). Hydrogen and methane production from swine wastewater using microbial electrolysis cells. Water Res. *43*, 1480–1488.

Wahid, P.A., and Kamalam, N.V. (1993). Reductive dissolution of crystalline and amorphous Fe(III) oxides by microorganisms in submerged soil. Biol. Fertil. Soils *15*, 144–148.

Wang, H., and Ren, Z.J. (2013). A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. Biotechnol. Adv. *31*, 1796–1807.

Wegener, G., Krukenberg, V., Riedel, D., Tegetmeyer, H.E., and Boetius, A. (2015). Intercellular wiring enables electron transfer between methanotrophic archaea and bacteria. Nature *526*, 587–590.

Weiss, M.C., Sousa, F.L., Mrnjavac, N., Neukirchen, S., Roettger, M., Nelson-Sathi, S., and Martin, W.F. (2016). The physiology and habitat of the last universal common ancestor. Nat. Microbiol. *1*, 16116.

Westall, F., Hickman-Lewis, K., Hinman, N., Gautret, P., Campbell, K. a., Bréhéret, J. g., Foucher, F., Hubert, A., Sorieul, S., Dass, A.

v., et al. (2018). A hydrothermal-sedimentary context for the origin of Life. Astrobiology.

White, H.K., Reimers, C.E., Cordes, E.E., Dilly, G.F., and Girguis, P.R. (2009). Quantitative population dynamics of microbial communities in plankton-fed microbial fuel cells. ISME J. *3*, 635–646.

White, L.M., Mielke, R.E., Russell, M.J., Stucky, G.D., and Kanik, I. (2011). Investigating the role of iron sulfides in the hydrothermal vent model for the emergence of Life. p. 1087.

Wirth, R. (2017). Colonization of black smokers by hyperthermophilic microorganisms. Trends Microbiol. *25*, 92–99.

Wirth, R., Luckner, M., and Wanner, G. (2018). Validation of a hypothesis: Colonization of black smokers by hyperthermophilic microorganisms. Front. Microbiol. *9*, 524.

Wong, M.L., Charnay, B.D., Gao, P., Yung, Y.L., and Russell, M.J. (2017). Nitrogen oxides in early Earth's atmosphere as electron acceptors for Life's emergence. Astrobiology *17*, 975–983.

Wrighton, K.C., Agbo, P., Warnecke, F., Weber, K.A., Brodie, E.L., DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Andersen, G.L., and Coates, J.D. (2008). A novel ecological role of the *Firmicutes* identified in thermophilic microbial fuel cells. ISME J. *2*, 1146–1156.

Wrighton, K.C., Thrash, J.C., Melnyk, R.A., Bigi, J.P., Byrne-Bailey, K.G., Remis, J.P., Schichnes, D., Auer, M., Chang, C.J., and Coates, J.D. (2011). Evidence for Direct Electron Transfer by a Gram-Positive Bacterium Isolated from a Microbial Fuel Cell. Appl. Environ. Microbiol. *77*, 7633–7639.

Wu, Y., Liu, T., Li, X., and Li, F. (2014). Exogenous electron shuttle-mediated extracellular electron transfer of *Shewanella putrefaciens* 200: Electrochemical parameters and thermodynamics. Environ. Sci. Technol. *48*, 9306–9314.

X

Xiang, Y., Liu, G., Zhang, R., Lu, Y., and Luo, H. (2017). High-efficient acetate production from carbon dioxide using a bioanode microbial electrosynthesis system with bipolar membrane. Bioresour. Technol.

Xu, F., Mou, Z., Geng, J., Zhang, X., and Li, C. (2016). Azo dye decolorization by a halotolerant exoelectrogenic decolorizer isolated from marine sediment. Chemosphere *158*, 30–36.

Xu, F., Cao, F., Kong, Q., Zhou, L., Yuan, Q., Zhu, Y., Wang, Q., Du, Y., and Wang, Z. (2018). Electricity production and evolution of microbial community in the constructed wetland-microbial fuel cell. Chem. Eng. J. *339*, 479–486.

Y

Yamaguchi, A., Yamamoto, M., Takai, K., Ishii, T., Hashimoto, K., and Nakamura, R. (2014). Electrochemical CO_2 reduction by Ni-containing iron sulfides: how is CO_2 electrochemically reduced at bisulfide-bearing deep-sea hydrothermal precipitates? Electrochimica Acta *141*, 311–318.

Yamamoto, M., Nakamura, R., Oguri, K., Kawagucci, S., Suzuki, K., Hashimoto, K., and Takai, K. (2013). Generation of electricity and illumination by an environmental fuel cell in deep-sea hydrothermal vents. Angew. Chem. Int. Ed. *52*, 10758–10761.

Yamamoto, M., Nakamura, R., Kasaya, T., Kumagai, H., Suzuki, K., and Takai, K. (2017). Spontaneous and widespread electricity generation in natural deep-sea hydrothermal fields. Angew. Chem. Int. Ed. *56*, 5725–5728.

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

ahangari. Bioelectrochemistry *119*, 142–149.

Z

Zeng, X., Zhang, Z., Li, X., Jebbar, M., Alain, K., and Shao, Z. (2015). *Caloranaerobacter ferrireducens* sp. nov., an anaerobic, thermophilic, iron (III)-reducing bacterium isolated from deep-sea hydrothermal sulfide deposits. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *65*, 1714–1718.

Zhang, L., Kang, M., Xu, J., Xu, J., Shuai, Y., Zhou, X., Yang, Z., and Ma, K. (2016). Bacterial and archaeal communities in the deep-sea sediments of inactive hydrothermal vents in the Southwest India Ridge. Sci. Rep. *6*.

Zhang, T., Zhang, L., Su, W., Gao, P., Li, D., He, X., and Zhang, Y. (2011). The direct electrocatalysis of phenazine-1-carboxylic acid excreted by *Pseudomonas alcaliphila* under alkaline condition in microbial fuel cells. Bioresour. Technol. *102*, 7099–7102.

Zhou, S., Tang, J., Qin, D., Lu, Q., and Yang, G. (2014). *Ureibacillus defluvii* sp. nov., isolated from a thermophilic microbial fuel cell. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *64*, 1617–1621.

Abstract

Deep-Sea Hydrothermal vents (DSHV) are geochemical structures housing an extreme ecosystem (T°C and pH) rich in micro- and macro-organisms developing from a complex food web. A recent study has shown the presence of an abiotic electric current through the conductive walls of the DSHV, by the oxidation of H2S of the hydrothermal fluid coupled with the O2 reduction of the seawater to the outside. This current could then be used as a source of energy by so-called "electroactive" microorganisms.

It is in this context that we have developed a Microbial Electrochemical System (MES) for the enrichment of hyperthermophilic electroactive microbes. DSHV samples were used as inoculum in our MES, filled with anoxic mineral medium regulated at 80 ° C, mimicking the environmental conditions. Two types of experiments were carried out. The first experiment was aimed at enriching "electrotrophic" microorganisms, able to use an electrode as a source of energy (cathode polarized at -0.6V vs ESH) and CO2 as a carbon source with the addition of different electron acceptors (Nitrate, Sulfate, O2 ...). The second was intended to enrich so-called "exoelectrogenic" microorganisms capable of using an electrode as an electron acceptor while producing electric current. For this, the working electrode of the SEM was configured as anode and various organic electron donors (fatty acids, peptides, polysaccharides) were tested. A multidisciplinary approach (bioprocess, microbial biochemistry, electrochemistry, molecular ecology, qPCR, and microscopy) was used to study the evolution and interactions of different taxonomic groups over time.

The results showed the growth of electroactive biofilms (EAB) on both cathode and anode. The enrichment of electrotrophic EABs correlated with the consumption of electric current and coupled with the reduction of electron acceptors tested, led to the production of organic molecules. The microorganisms developing under these conditions were mainly Archaeoglobales and Thermococcales irrespective of the electron acceptor. Other species, more specific of the electron acceptor used, have been enriched, such as Desulfurococcales and Thermales on nitrate or Pseudomonadales and Bacillales on oxygen. Nitrate growth monitoring revealed the succession of different populations over time, with different metabolisms. Three phases could thus be highlighted: (i) The first was characterized by autotrophic growth coupled with the total reduction of the electron acceptor; (ii) the second consisted of a step of electrosynthesis of pyruvate in large quantity; (iii) this pyruvate was then converted to H2 and acetate by electro-fermentation. The experiment on exoelectrogens has shown the production of electric current from acetate, pyruvate and H2 by Archaeoglobales and a trophic relationship with Thermococcales degrading peptides acetate and H2 used by Archaeoglobales.

To conclude, this study has allowed to highlight the presence of hyperthermophilic electroactive microorganisms, to better understand their involvement in biogeochemical cycles as well as in their trophic relationships. These results have also opened the consideration on the hypothetical role of electroactivity in the origin of life. On the other hand, the electroactive capacity of these extremophilic microorganisms in the production of organic molecules from electric current presents interesting potentialities in biotechnology.

Keywords

Deep-sea Hydrothermal Vent, Microbial Ecology, Electroactive Biofilm, Microbial Fuel Cell, Microbial Electrosynthesis



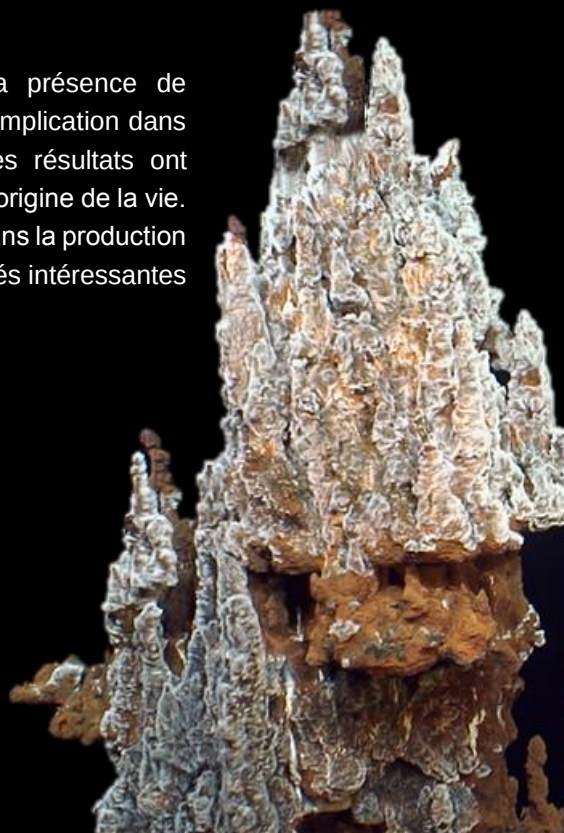
Résumé

Les cheminées hydrothermales (CH) sont des édifices géochimiques abritant un écosystème extrême (T°C et pH) riche en micro- et macro-organismes se développant à partir d'un réseau trophique complexe. Une étude récente a montré la présence d'un courant électrique abiotique à travers les parois conductrices des CH, par l'oxydation d'H_2S du fluide hydrothermal couplé à la réduction d'O_2 de l'eau de mer à l'extérieur. Ce courant pourrait alors être utilisé comme source d'énergie par des microorganismes dit « électroactifs ».

C'est dans ce contexte que nous avons développé un Système Electrochimique Microbien (SEM) permettant l'enrichissement d'électroactifs hyperthermophiles. Des échantillons de CH ont servi d'inoculum dans notre SEM, rempli d'un milieu minéral anoxique régulé à 80°C, mimant ainsi les conditions environnementales. Deux types d'expériences ont été réalisés. La première expérience visait à enrichir des microorganismes « électrotrophes », capables d'utiliser une électrode comme source d'énergie (cathode polarisée à -0.6V vs ESH) et du CO_2 comme source de carbone avec l'ajout de différents accepteurs d'électrons (Nitrate, Sulfate, O_2 …). La deuxième avait pour but d'enrichir des microorganismes dits « exoélectrogènes » capables d'utiliser une électrode comme accepteur d'électrons tout en produisant du courant électrique. Pour cela, l'électrode de travail du SEM fût configurée en anode et différents donneurs d'électrons organiques (acides gras, peptides, polysaccharides) furent testés. Une approche pluridisciplinaire (bioprocédé, biochimie microbienne, électrochimie, écologie moléculaire, qPCR, microscopie) a été utilisée pour permettre d'étudier l'évolution et les interactions de différents groupes taxonomiques au cours du temps.

Les résultats ont montré la croissance de biofilms électroactifs (BEA) autant sur cathode que sur anode. L'enrichissement des BEA électrotrophes était corrélé à la consommation de courant électrique couplée à la réduction des accepteurs d'électrons testés conduisant à la production de molécules organiques. Les microorganismes se développant dans ces conditions étaient principalement des *Archaeoglobales* et des *Thermococcales* quel que soit l'accepteur d'électrons. D'autres espèces, plus spécifiques de l'accepteur utilisé, ont été enrichies telles que des *Desulfurococcales* et *Thermales* sur nitrate ou des *Pseudomonadales* et *Bacillales* sur oxygène. Un suivi de croissance sur nitrate a permis de mettre en évidence la succession de différentes populations au cours du temps, avec des métabolismes différents. Trois phases ont pu ainsi être mises en évidence : (i) La première était caractérisée par la croissance d'autotrophes couplée à la réduction totale de l'accepteur d'électrons ; (ii) la deuxième a consisté en une étape d'électrosynthèse de pyruvate en grande quantité ; (iii) ce pyruvate a été ensuite transformé en H_2 et acétate par électro-fermentation. L'expérience sur les exoélectrogènes a montré quant à elle la production de courant électrique à partir d'acétate, de pyruvate et d'H_2 par des *Archaeoglobales* et une relation trophique avec les *Thermococcales* dégradant les peptides en acétate et H_2 utilisable par les *Archaeoglobales*.

Pour conclure, cette étude a permis de mettre en évidence la présence de microorganismes électroactifs hyperthermophiles, de mieux comprendre leur implication dans les cycles biogéochimiques ainsi que dans leurs relations trophiques. Ces résultats ont également ouvert la réflexion sur le rôle hypothétique de l'électroactivité dans l'origine de la vie. D'autre part la capacité électroactive de ces microorganismes extrêmophiles, dans la production de molécules organiques à partir de courant électrique présente des potentialités intéressantes en biotechnologie.



Mots-clés

Source hydrothermale profonde, Ecologie microbienne, Biofilm électro-actif, Pile à combustible microbienne, Electrosynthèse microbienne