



HAL
open science

A la recherche des biosignatures d'archées hyperthermophiles

Chloé Truong

► **To cite this version:**

Chloé Truong. A la recherche des biosignatures d'archées hyperthermophiles. Minéralogie. Muséum national d'Histoire Natuelle de Paris, 2023. Français. NNT: . tel-04718002

HAL Id: tel-04718002

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-04718002v1>

Submitted on 2 Oct 2024

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0
International License



MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme – ED 227

Année 2023

N°attribué par la bibliothèque

|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DU MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Spécialité : Géomicrobiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Chloé Truong

Le 13/11/2023

A la recherche des biosignatures d'archées hyperthermophiles

Sous la direction de : Monsieur François Guyot, Professeur

Sous la direction de : Madame Aurore Gorlas, Maîtresse de conférences

Sous la direction de : Monsieur Sylvain Bernard, Directeur de recherche

JURY :

Mme Johanna Marin-Carbonne	Associate Professor, Université de Lausanne (1015)	Présidente
Mme Julie Cosmidis	Associate Professor, University of Oxford (OX1)	Rapportrice
Mme Aude Picard	Assistant Research Professor, University of Nevada (NV 89)	Rapportrice
Mme Anaïs Cario	Chargée de recherches, Université de Bordeaux et Bordeaux INP (033)	Examinatrice
M. Gaël Erauso	Professeur, Aix-Marseille Universités (013)	Examinateur
M. François Guyot	Professeur, Muséum national d'histoire naturelle, Paris (075)	Directeur
Mme Aurore Gorlas	Maîtresse de conférences, Université Paris-Saclay (091)	Directrice
M. Sylvain Bernard	Directeur de Recherche, Muséum national d'histoire naturelle, Paris (075)	Directeur

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Julie Cosmidis, Aude Picard, Johanna Marin-Carbonne, Anaïs Cario et Gaël Erauso d'avoir accepté de faire partie de mon jury, et pour les discussions enrichissantes que j'ai pu avoir avec vous.

Merci à François Guyot, mon directeur de thèse. Il y a énormément de choses pour lesquelles j'aimerais te remercier, la plus importante étant de m'avoir formée, puis soutenue et entraînée aux concours afin que je puisse réaliser cette thèse – ces fameux concours, une étape compliquée mais formatrice. Merci de m'avoir donné une chance, d'avoir cru en moi et d'avoir toujours pris du temps, entre tes dizaines de réunion (par jour) et tes différents projets, pour me transmettre ton savoir, répondre à mes questions et me faire évoluer de la meilleure façon possible.

Merci à Aurore Gorlas, ma co-directrice de thèse, pour tout ce que tu m'as appris avec une patience et une pédagogie inégalables. Mes expériences n'auraient pas fière allure sans tous les allers-retours que tu as fait entre Orsay et Paris pour me former. Merci de m'avoir soutenue et entraînée pour les concours, d'avoir toujours été disponible alors même que ce n'était pas évident pour toi, entre l'arrivée de la petite Lucie, les cours, le travail au labo et toutes les copies à corriger. Merci surtout d'être aussi attentionnée et à l'écoute, scientifiquement et humainement.

Merci à Sylvain Bernard, mon co-directeur de thèse. Merci pour ton franc-parler, ta capacité – que dis-je, ton don – à faire apparaître les lignes directrices dans des idées brouillonnes et à toujours réussir à recadrer ce qui s'éparpille. Merci pour ton soutien sans lequel je n'aurais pas pu réaliser cette thèse. Merci en particulier pour les semaines au synchrotron, qui, bien loin d'être une corvée, ont été de beaux moments de science, et ont aussi permis de belles discussions, des restos (salvateurs) et des parties de pétanques-parking plutôt créatives.

Merci à toutes les personnes avec lesquelles j'ai pu travailler et qui m'ont beaucoup appris. Merci à Guillaume Morin et Pierre Le Pape, qui m'ont énormément aidé au début de cette thèse et pour la publication de mon premier article. Merci à Imène Estève et à Sylvain Pont de m'avoir formée à utiliser le MEB. Merci à Jean-Christophe de m'avoir soutenue depuis le début, avant même que je ne commence cette thèse, et pour ton aide récurrente. Merci aussi de m'avoir montré l'utilisation du GC-TCD (et Marceau, mais ce sera pour après) et surtout d'avoir réglé les nombreux problèmes de fuite. Merci à Corentin d'avoir tenté de m'apprendre à traiter des données STXM en python, pour les longues discussions même si elles ne se finissent pas toujours bien, et merci aux autres collègues du synchrotron avec lesquels j'ai passé de super moments : Sylvain (Laforêt), Julien A., Pierre B., Van, Cécile (merci pour les viennoiseries et les fruits de bon matin), Valentine C. et Olivier S. Merci à Erwan Roussel de nous avoir accueillis à Brest et de nous avoir passé de super échantillons de cheminées. Merci à Bérénice Piquet de m'avoir appris à réaliser des lames ultramicrotomes, toujours avec bonne humeur. Merci à Jean-Michel Guigner d'avoir volé à mon secours chaque fois que j'avais des difficultés avec le MET.

Je remercie également Fériel Skouri-Panet, Véronique Barriel, Pierre Sans-Jofre et Purificación López-García, qui m'ont apporté tous les conseils et l'écoute nécessaire au bon avancement de cette thèse lors de mes comités de suivi. Et je remercie plus particulièrement Adrienne Kish, pour les nombreux échanges scientifiques que nous avons eus depuis le M2.

Merci à tous les potes du labo, vraie fratrie de famille nombreuse, tellement vivante, drôle et, il faut l'admettre, un brin caractérielle (vous êtes super). Ces trois années auraient été bien fades

sans vous. Merci à Isis pour à peu près tout (et à Yama, on ne l'oublie pas, à Titi et à Olivier, belles boucles d'oreille monsieur), à Laurane la patronne pour ses anecdotes et sa personnalité qui illumineraient même les journées d'un caillou, à Virgile, épéiste invaincu de la Dune du Pilat, pour les découvertes musicales, le partage permanent de conneries et les super moments à Chinon, à Marceau pour les grosses soirées et pour avoir été un adversaire ok aux fléchettes (malheureusement pas au niveau, tu manques un peu d'entraînement), à Jean, partenaire inséparable du portrait astral et des jeux tellement faciles que c'est pour les bébés, à Laure, passion commune pour le maître Donny Benét, à Julien qui manque beaucoup trop depuis qu'il est aux Etats Unis, à Sam qui manque beaucoup aussi, à Tommy et à sa main verte pour avoir fait de notre bureau une superbe jungle, à Marine pour les incroyables gâteaux que tu nous fais à chaque anniversaire, à Arnaud pour tous les conseils que tu m'as donnés et les discussions au MEB et au MET, à Valentine la voyageuse et à Louna (bravo le concours !) qui prennent bientôt la relève.

Merci évidemment aussi à toutes les autres personnes du labo : Yuanyuan, Brigitte, Laurent, Denis, Maximilien, Smaïl, Béatrice, Emmanuel, Mathieu R., Violaine, Jean, François, Mathieu G., Jérôme et Roger que ce soit pour les discussions quotidiennes, les repas partagés, les jeux du midi ou les moments privilégiés lors des pots et des apéros.

Merci à tous les potes de Marseille, Tasha, Antho, Flo, Rémy, Gaët, Léa, Mathieu, Pascal, Ludo, que j'ai hâte de retrouver après ces années à Paris. Merci pour les beaux moments de musique (la Giga Turbo Mixtape est sur l'ordi du synchrotron). Merci aussi à Eva et à Théo pour être venus me voir sur Paris.

Merci à mon chat Nemo qui pourra bien évidemment lire ces lignes car il est doté d'une grande intelligence.

Merci à Donny Benét, The Don.

Un merci tout particulier à ma famille, à ma mère et à mon père qui m'ont soutenue et encouragée, dans les moments de joie comme dans les moments de doute. Vous m'avez toujours épaulée quels que soient mes choix et je ne vous en remercierai jamais assez. Merci à Jo et à Laura, à Arthur et à Rose pour ces moments en famille qui comptent beaucoup pour moi. J'ai aussi une grosse pensée pour mon grand-père qui nous a quittés en novembre 2020, au tout début de cette thèse, et qui, je l'espère, aurait été fier du chemin parcouru.

Et surtout un grand merci à Jerem pour m'avoir toujours encouragée, pour avoir toujours été là malgré la distance. Merci et bravo pour ton sang-froid quand je laisse exploser le trop plein d'émotions. Tu m'as soutenue et supportée quoi qu'il arrive, dans l'euphorie comme dans les baisses de morale, malgré les coups de pression et de rush, et les – trop nombreuses – crises existentielles. La thèse n'est jamais un long fleuve tranquille, mais tout a été bien plus facile grâce à toi.

Résumé

Au niveau des dorsales océaniques, véritables chaînes de montagnes sous-marines, se trouvent des structures semblables à de hautes cheminées d'où s'échappe un panache noir. Baptisées « fumeurs noirs », ces cheminées hydrothermales expulsent de l'eau chaude (~ 400°C) riche en métaux. C'est à partir de ces environnements extrêmes que les organismes les plus hyperthermophiles connus, capables de vivre à plus de 100°C, ont été isolés : les archées hyperthermophiles. Mais à ce jour, aucune observation *in situ* de ces organismes n'a pu être réalisée. On ne sait pas à quel point les fumeurs noirs ont été colonisés. La vie prolifère-t-elle à l'intérieur même des cheminées ?

L'objectif de cette thèse a été de déterminer si les cheminées des fumeurs noirs hébergent une vie hyperthermophile. Pour ce faire, j'ai adopté une approche pluridisciplinaire dans le but d'identifier des biosignatures minérales à rechercher dans les cheminées modernes, i.e. des phases minérales particulières dont la production résulte de l'activité des microorganismes.

Dans un premier temps, j'ai mené une approche expérimentale au laboratoire. Des archées hyperthermophiles (*Thermococcus kodakarensis* souche KOD1) ont été cultivées dans un milieu qui simule les environnements hydrothermaux, i.e. enrichi en soufre et en fer ferreux, à 85°C et en absence d'O₂. L'activité métabolique des archées produit des sulfures et du soufre colloïdal. Cela mène à la formation de sulfures de fer dans une dynamique soufre-fer-phosphore qui permet la libération de phosphates biodisponibles. En particulier, l'activité des Thermococcales conduit à la formation de sphérules de pyrite d'environ 1 µm de diamètre, composées de nanodomains cristallins anisotropes de 15 x 10 nm² et contenant des composés organiques cellulaires.

Afin de confirmer que ces sphérules de pyrite peuvent servir de biosignatures, des expériences de synthèse de pyrite ont été conduites en absence de vie mais en présence de différents composés organiques et de soufre colloïdal. Des sphérules de pyrite similaires se forment uniquement en présence de lysats cellulaires de KOD1. Ce témoin particulier reproduit d'ailleurs en tous points la configuration étudiée pour la formation de sphérules biologiques, à savoir un assemblage de composés organiques identiques et la présence de soufre colloïdal. Ces composants apparaissent indispensables à la formation de sphérules de pyrite, qui pourraient donc attester de la présence d'archées hyperthermophiles.

A la lumière de ces résultats expérimentaux, j'ai caractérisé la minéralogie d'échantillons naturels de cheminées issues du site hydrothermal TAG (Trans Atlantique Geo-Traversal Active Mound). Des pyrites ont été identifiées dans différentes portions de la cheminée. Contrairement aux pyrites massives et cubiques des portions internes chaudes, certaines pyrites se présentent sous la forme de sphérules dans les parties externes de plus basse température. Ces sphérules, bien que thermiquement plus matures que les sphérules produites en laboratoire, présentent une microtexture complexe et contiennent des composés organiques. Ces pyrites pourraient donc être considérées comme des biosignatures indiquant la présence d'archées dans ces portions de la cheminée, sous réserve de l'absence d'un éventuel transport des réactifs.

Identifier ces biosignatures dans des échantillons plus anciens permettrait de discuter de l'évolution de ces écosystèmes au cours des temps géologiques. Pour ce faire, il conviendra de déterminer expérimentalement comment ces biosignatures changent – en termes de morphologie, de structure, de texture et de composition chimique – au cours des processus de fossilisation au sens large, i.e. au cours d'une histoire géologique.

Abstract

At the level of oceanic ridges - veritable submarine mountain ranges - we find structures resembling tall termite mounds from which a black plume escapes. Known as "black smokers", these hydrothermal vents expel hot, undiluted, metal-rich water ($\sim 400^{\circ}\text{C}$). Most hyperthermophilic organisms known capable of living at over 100°C – hyperthermophilic archaea – have been isolated from these extreme environments. But to date, no in situ observations of these organisms have been made. We do not know to what extent the black smokers have been colonized. Does life proliferate inside chimneys?

The aim of this thesis was to determine whether black smoker chimneys harbor hyperthermophilic life. To this end, I have adopted a multidisciplinary approach with the aim of identifying the mineral biosignatures to be sought in modern chimneys, i.e. specific mineral phases whose production results from the activity of microorganisms.

Firstly, I conducted an experimental study. Hyperthermophilic archaea (*Thermococcus kodakarensis* strain KOD1) were grown in a mineralizing medium simulating hydrothermal environment, i.e. enriched in sulfur and ferrous iron, at 85°C and in the absence of O_2 . The metabolic activity of the archaea produces sulfides and colloidal sulfur. This leads to the formation of iron sulfides in a sulfur-iron-phosphorus dynamic that enables the release of bioavailable phosphates. In particular, the activity of *Thermococcales* leads to the formation of pyrite spherules around $1\ \mu\text{m}$ in diameter, composed of anisotropic crystalline nanodomains measuring $15 \times 10\ \text{nm}^2$ and containing cellular organic compounds.

To confirm that these pyrite spherules can serve as biosignatures, pyrite synthesis experiments were carried out in the absence of life but in the presence of various organic compounds and colloidal sulfur. Similar pyrite spherules form only in the presence of KOD1 cell lysates. This particular control reproduces in every aspect the configuration studied for the formation of biogenic spherules, namely an assembly of identical organic compounds and the presence of colloidal sulfur. These components appear to be essential for the formation of pyrite spherules, which could therefore attest to the presence of hyperthermophilic archaea.

In the light of these experimental results, I have characterized the mineralogy of natural chimney samples from the TAG (Trans Atlantique Geo-Travel Active Mound) hydrothermal site. Pyrites were identified in various parts of the chimney. In contrast to the massive, cubic pyrites of the hot inner parts, some pyrites appear as spherules in the lower-temperature outer parts. These spherules, although thermally more mature than the spherules produced in the laboratory, have a complex microtexture and contain organic compounds. These pyrites could therefore be considered as biosignatures indicating the presence of archaea in these parts of the chimney, assuming absence of complex organic matter transport.

The identification of these biosignatures in older samples would enable us to discuss the evolution of these ecosystems over geological time. To do this, it will be necessary to determine experimentally how these biosignatures evolve - in terms of morphology, structure, texture and chemical composition - during fossilization processes in the broadest sense, i.e. over the course of geological history.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction générale	1
Références	7
Chapitre I. Etat de l'art	9
I. Les cheminées hydrothermales riches en soufre : les fumeurs noirs	9
1. Contexte géologique et formation des fumeurs noirs	9
2. Impact biogéochimique des fumeurs noirs	13
3. Diversité des communautés microbiennes des sites hydrothermaux	16
II. Biosignatures et biominéraux	20
1. Les biosignatures	20
2. La biominéralisation chez les procaryotes	25
3. Biominéralisation de sulfures de fer	30
III. Enjeux et stratégie	37
1. Enjeux	37
2. Stratégie	38
Références	39
Chapitre II. Matériels et méthodes	55
I. Matériels, dispositifs et protocoles expérimentaux	55
1. Souche modèle : <i>Thermococcus kodakarensis</i> (KOD1)	55
2. Boîte à gants	56
3. Fioles de verre et bombes réactionnelles en titane	57
4. Protocole de cultures en conditions optimales de croissance	57
5. Protocole de cultures en conditions de minéralisation	58
II. Suivis de croissance et analyses biologiques	60
1. Comptage cellulaire	60
2. ATP-métrie	60
3. Dosage d'acétate par chromatographie en phase liquide	62
4. Chromatographie en phase gazeuse	63
III. Analyses sur les cultures en conditions de minéralisation	67
1. Diffraction de rayons X et affinement Rietveld	67
2. Microscopie électronique	69

3. Spectroscopie et microscopie d'absorption des rayons X	73
Références	77
Chapitre III. Caractérisation du métabolisme de <i>T. kodakarensis</i>	81
I. Enjeux et stratégie	81
1. Enjeux	81
2. Stratégie	82
II. Résultats	83
1. Mesures de l'activité cellulaire	83
2. Identification et quantification des produits métaboliques	85
III. Discussion et implications des résultats	90
1. Production d'ATP extracellulaire : lyse cellulaire ou véritable rôle fonctionnel ?	90
2. Produits gazeux, production d'acétate et voies métaboliques	91
Références	95
Chapitre IV. Production de minéraux en présence de <i>T. kodakarensis</i>	97
I. Enjeux et stratégie	97
1. Enjeux	97
2. Stratégie	98
II. Article publié dans <i>Frontiers in Microbiology</i>	99
III. Discussion et implications des résultats	114
1. Dynamique soufre-fer-phosphore : une stratégie écologique ?	114
2. Mécanisme de formation des sphérules de pyrite	116
3. Les sphérules de pyrite, des biosignatures ?	118
Références	119
Chapitre V. Recherche de biosignatures dans des échantillons naturels	123
I. Enjeux et stratégie	123
1. Enjeux	123
2. Stratégie	124
II. Article soumis dans <i>European Journal of Mineralogy</i>	126
III. Discussion et implications des résultats	152
1. Variations texturales influencées par le gradient de température	152
2. A la recherche de traces de vie dans le mur de la cheminée	153
Références complémentaires	155

Chapitre VI. Synthèses abiotiques de pyrites	157
I. Enjeux et stratégie	157
1. Enjeux	157
2. Stratégie	158
II. Article en préparation pour <i>Geochemical Perspectives Letters</i>	159
III. Discussion et implications des résultats	167
1. Sur l'utilisation des sphérules de pyrite en tant que biosignatures	167
2. Formation de sulfures de fer : qu'en est-il de la greigite ?	168
Références	170
Chapitre VII. Conclusions et perspectives	173
I. Conclusions	173
1. Le soufre élémentaire : effet stimulant sur la croissance et détoxification du H ₂	173
2. Processus de formation des sphérules de pyrite	173
3. Les sphérules de pyrite : des biosignatures ?	174
4. Des sphérules de pyrite dans les cheminées hydrothermales	175
II. Perspectives	177
1. Sur les cultures de microorganismes hydrothermaux en conditions non minéralisantes	177
2. Sur la production de minéraux en présence de Thermococcales	181
3. Sur l'utilisation des sphérules de pyrite en tant que biosignature	184
4. Fossilisation expérimentale et échantillons naturels	187
Références	197
Bibliographie	201
Liste des figures	231
Liste des tableaux	235
Publication en co-autrice	237

Introduction

« Pouvait-on être sûr de ce qui gît ou non [...] dans les abysses aveugles et insondables des eaux les plus profondes de la Terre ? »¹

H. P. Lovecraft, *Les montagnes hallucinées* (1936)

À l'aube du XIX^e siècle, les fonds océaniques se dessinent comme un univers froid, inaccessible et impropre à la vie : « *les abîmes les plus profonds des mers, de même que les sommets de nos montagnes les plus élevées, sont éternellement glacés, même sous l'Équateur* » (Péron, 1804). L'analogie avec les montagnes continentales trouve une résonance particulière chez Matthew-Fontaine Maury, le père de l'océanographie, qui imagine en 1850 l'existence d'un plateau culminant dans l'abîme de l'océan Atlantique (Maury, 1855 ; Péton, 2018). L'exploration des abysses repose alors sur des relevés topographiques. C'est sous l'impulsion de Mary Tharp et de Bruce Heezen que les premières cartes du plancher océanique sont tracées à partir de 1950 et contribuent à faire connaître l'existence de ces chaînes de montagnes sous-marines : les dorsales médio-océaniques (Heezen et al., 1959 ; Barton, 2002) (Fig 1).

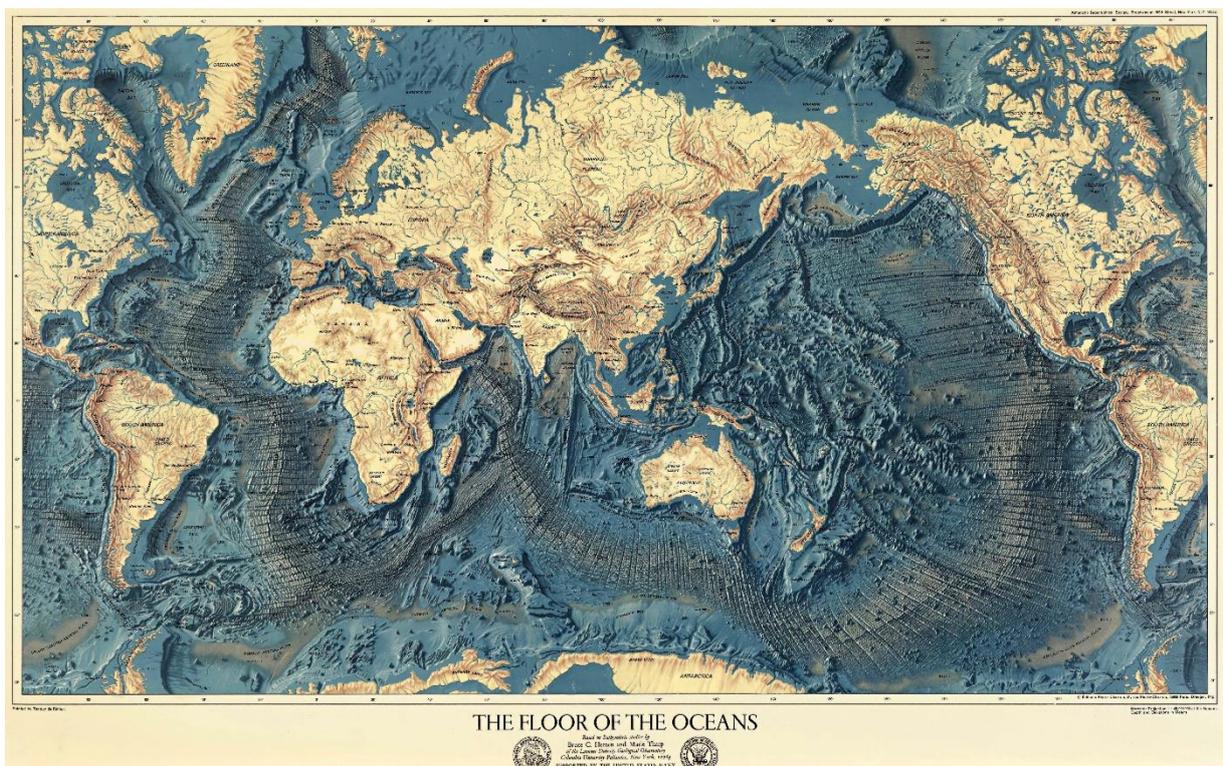


Figure 1 | Carte du plancher océanique par Tanguy de Rémur, d'après les études bathymétriques réalisées par Mary Tharp et Bruce Heezen dans les années 1950. Projection Mercator. (US Navy, Office of Naval Research).

¹ « Could one be sure of what might or might not linger [...] in the lightless and unplumbed abysses of earth's deepest waters? » (traduction personnelle).

A partir de cette révélation topographique, Harry Hammond Hess développe une hypothèse dans les années 1960 : la croûte océanique est créée au niveau des dorsales et recyclée au niveau des fosses océaniques (Hess, 1962). Reprenant les travaux de Hess, Robert Dietz baptise ce phénomène « expansion des fonds océaniques » (*sea floor spreading*). Ce recyclage continu entraîne un effet de tapis roulant qui affecte aussi les continents, la « dérive des continents ». C'est ainsi que la théorie de la tectonique des plaques, paradigme actuel des sciences de la Terre, voit le jour.

L'exploration des fonds marins progresse ensuite de façon notable dans les années 1970 avec la mise au point de petits submersibles capables d'aller, à cette époque, jusqu'à 3000 mètres de profondeur. Facilement manœuvrables, équipés d'un système vidéo et de bras mécaniques pour rapporter des échantillons, ces instruments sont au centre des nouvelles campagnes océanographiques et permettent de visiter ces abysses que « *L'homme ne verra jamais [...]* » (Maury, 1855)². Au cours des missions réalisées avec l'Alvin et le Cyana de 1972 à 1974, une équipe franco-américaine met en évidence la présence de dépôts métalliques sulfureux et de « lave en coussins » à 2700 mètres de profondeur sur la dorsale médio-Atlantique (Scott et al., 1974 ; Rona, 1980) (Fig 2A, B, C et D). Peter Rona et collaborateurs évoquent alors l'hypothèse d'une activité hydrothermale dans cette zone.

C'est en 1977, au niveau de la dorsale des Galapagos dans le Pacifique, que des preuves photographiques rapportent la présence de structures semblables à de hautes termitières percées de fissures d'où s'échappe un panache noir : les cheminées hydrothermales (Corliss et al., 1979 ; Spiess et al., 1980) (Fig 2E et F). Baptisées « fumeurs noirs », ces cheminées émettent un fluide constitué d'eau chaude (~ 400°C) riche en métaux et coïncident avec une faune endémique insoupçonnée. Des communautés animales, denses et diversifiées, peuplent les zones autour des cheminées (Fig 2G et H).

Dès leur découverte, ces écosystèmes attisent la curiosité de l'ensemble de la communauté scientifique, toutes disciplines confondues. Les géosciences se penchent sur le rôle fondamental de ces environnements dans l'échange de chaleur et de flux entre l'eau de mer et les roches océaniques (Edmond et al., 1979 ; Stein and Stein, 1994 ; Elderfield et Schultz, 1996 ; Wheat et al., 2000). La quantification des rejets des cheminées démontre un impact non négligeable sur les cycles biogéochimiques dans l'océan (Elderfield et Schultz, 1996). A cela s'ajoutent des motivations d'ordres économique et commercial, ce qui conduit à la réalisation d'inventaires des sites hydrothermaux océaniques dans une perspective d'exploitation (Hannington et al., 2011 ; Beaulieu et al., 2015).

En particulier, la fascination exercée par ces environnements s'étend à la question des origines du vivant. Peu de temps après leur découverte, les fumeurs noirs cristallisent les hypothèses et les controverses sur l'émergence de la vie et son évolution primitive (Baross et Hoffman, 1985 ; Wächtershäuser, 1990 ; Russell et al., 1994 ; Huber et Wächtershäuser, 1997). Il est aisé d'imaginer des milieux aussi extrêmes comme le théâtre de réactions chimiques et thermodynamiques ayant façonné le vivant.

² « Man can never see — he can only touch the bottom of the deep sea, and then only with the plummet. »

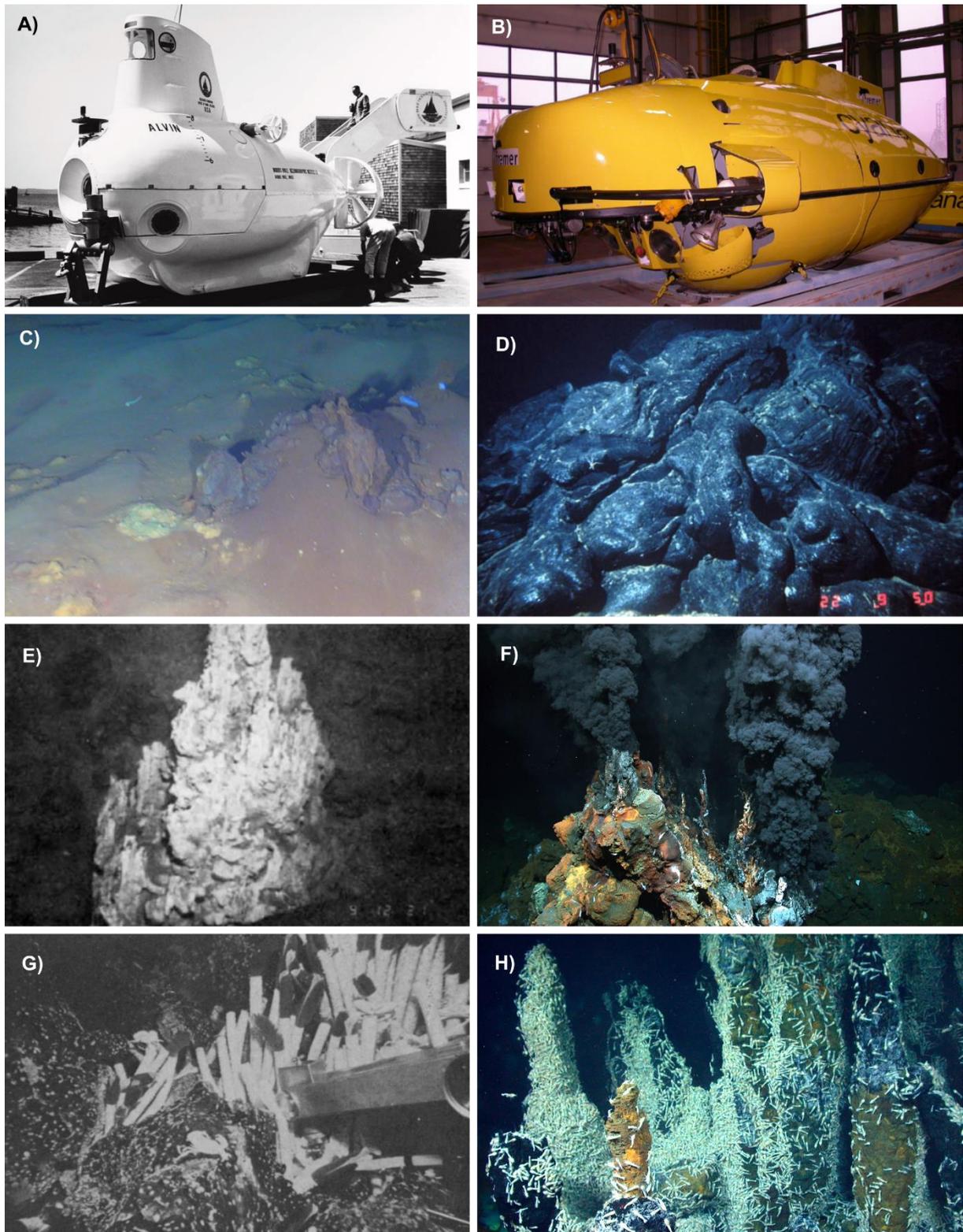


Figure 2 | A) Le submersible Alvin à Woods Hole, crédits US Navy. **B)** Le submersible Cyana à la Cité de la Mer, Cherbourg, crédits A. Bonfiglio, Genavir, Ifremer. **C)** Exemple de lave en coussin océanique. (Submarine Ring of Fire 2002 Exploration, NOAA-OE). **D)** Dépôts de sulfures massifs sur le site TAG, dorsale médio-Atlantique (photo prise par le HyBIS RUV, B. Murton, National Oceanography Center). **E)** Photo d'une cheminée hydrothermale découverte sur le site TAG (Rona et al., 1986). **F)** Photo récente d'une cheminée hydrothermale (MARUM Center for Marine Environmental Sciences, Université de Bremen). **G)** Photo d'une cheminée hydrothermale sur la ride des Galapagos, colonisée par un groupe de vers tubicoles *Riftia pachyptila* (Corliss et al., 1979). **H)** Photo de crevettes du genre *Rimicaris* colonisant des cheminées hydrothermales (Chris German/WHOIS/NSF/NASA/ROV).

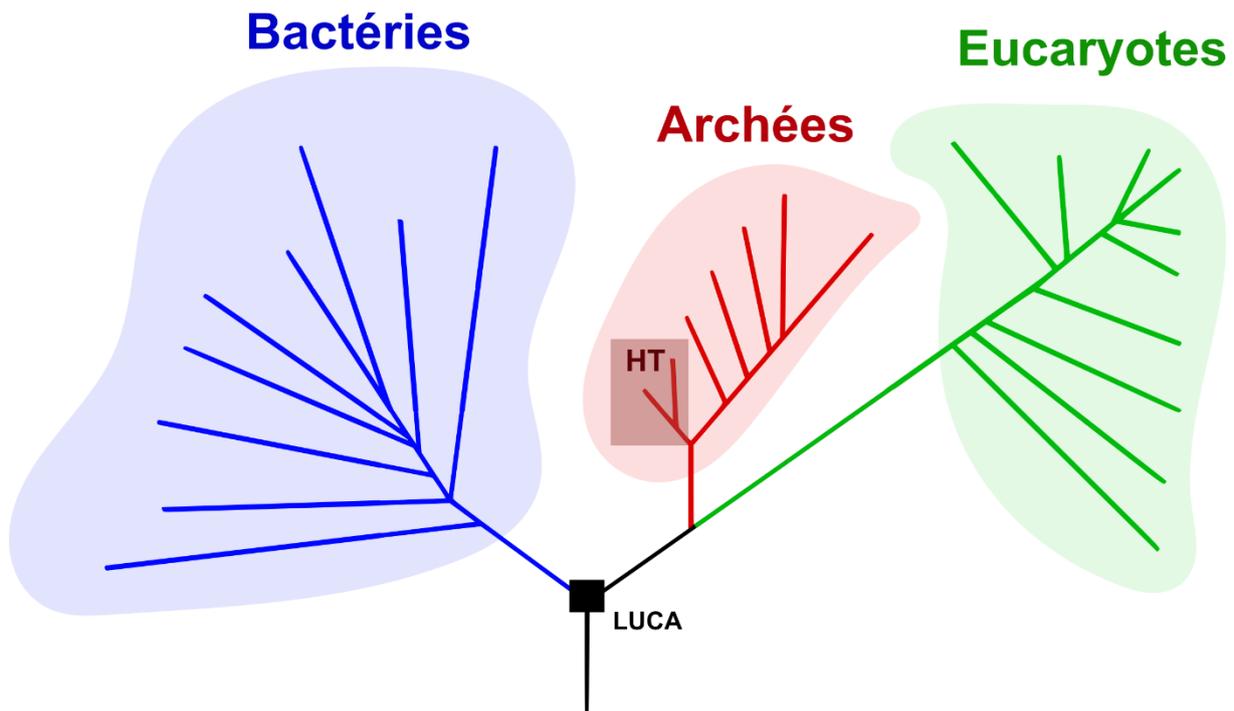


Figure 3 | Arbre phylogénétique universel simplifié, montrant les trois domaines du vivant : les bactéries (bleu), les archées (rouge) et les eucaryotes (vert). Au sein des archées, les branches encadrées représentent le phylum des crénarchées, à l'époque contenant des souches exclusivement (hyper)thermophiles (HT). Adapté d'après Woese et al., 1990.

Ces oasis dans les abîmes océaniques s'accompagnent d'une autre découverte qui repousse la conception des frontières de la vie et alimente le débat sur son évolution primitive. Des microorganismes isolés à partir d'environnements hydrothermaux – terrestres et océaniques – présentent la remarquable capacité de se développer à une température de plus de 100°C : les archées hyperthermophiles (Stetter, 1982). Anciennement considérées comme issues de bactéries extrémophiles, c'est à la lumière des travaux de Carl Woese que les archées apparaissent comme un domaine du vivant à part entière, avec les bactéries et les eucaryotes (Woese et al., 1990) (Fig 3). Et c'est au niveau des cheminées hydrothermales des grands fonds océaniques, perçus un siècle plus tôt comme un milieu éternellement inerte et froid, que l'archée la plus hyperthermophile connue (113°C), *Pyrolobus fumarii*, est isolée (Blöchl et al., 1997).

En grande partie grâce aux travaux de Karl Stetter, ces microorganismes se retrouvent au centre de questionnements sur les origines du vivant, au même titre que les fumeurs noirs. Les hyperthermophiles auraient été les premiers à diverger du dernier ancêtre commun universel (LUCA), ils en seraient donc ses plus proches parents parmi les êtres vivants actuels (Woese et al., 1990 ; Stetter, 1992) (Fig 3). L'implication évidente est que la vie aurait pu évoluer pour la première fois dans des conditions hyperthermophiles, en particulier dans des environnements de type fumeurs noirs (Weiss et al., 2016). Cependant, les données et interprétations de Woese et Stetter ne font pas l'unanimité et l'origine hyperthermophile du vivant reste encore aujourd'hui débattue (e.g. Lazcano and Miller 1996 ; Arrhenius et al. 1999 ; Brochier et Philippe, 2002 ; Di Giulio 2003 ; Weiss et al., 2016). Cette controverse reste largement dominée par des considérations phylogénétiques, essentielles mais à elles seules insuffisantes. Des questions aussi fondamentales que l'origine de la vie et son apparition dans des conditions hyperthermophiles nécessitent des connaissances et des perspectives issues d'un ensemble de disciplines, de la chimie à la climatologie, en passant par la génétique et la géologie.

Au centre de toutes les attentions sur la question des origines, ces organismes demeurent pourtant un mystère lorsqu'il s'agit de les étudier dans les fumeurs noirs actuels. La colonisation des hyperthermophiles dans le corps de la cheminée, leur rôle dans la formation des structures hydrothermales ou encore leurs stratégies écologiques de survie en milieu naturel sont autant de sujets débattus au sein de la communauté scientifique. Leurs adaptations à des facteurs tels que la température ou la pression sont pour l'instant étudiées de façon culture-dépendante en laboratoire dans des conditions dites « optimales de croissance », bien éloignées de celles des systèmes hydrothermaux naturels, caractérisés par leurs fortes concentrations en métaux tels que le fer, le zinc ou le cuivre (Sander et Kochinsky, 2011 ; Findlay et al., 2015). A ce jour, les archées hyperthermophiles n'ont même jamais été directement observées dans les cheminées hydrothermales. Malgré les développements technologiques des dernières années, ces environnements extrêmes et fluctuants représentent toujours un défi pour leur étude *in situ*.

Une approche interdisciplinaire, mêlant minéralogie, géochimie et microbiologie, consiste à rechercher les traces de ces organismes, c'est-à-dire à en identifier les biosignatures. Elles peuvent se présenter sous la forme de minéraux ou d'assemblages minéralogiques qui résultent de l'activité des microorganismes. Ce phénomène, appelé biominéralisation, conduit à la formation de biominéraux qui se distinguent de leurs équivalents abiotiques de par leur morphologie, leur structure cristallographique ou encore leur composition chimique et isotopique. Les biosignatures n'échappent malheureusement pas au sensationnalisme et aux controverses. Les définir est une tâche complexe qui nécessite d'écarter toute possibilité de contamination ou de formation abiotique. Pour écarter ces hypothèses, il est essentiel d'avoir une compréhension systématique des processus menant aux biosignatures et du contexte environnemental dans lequel elles se forment.

Ce travail de thèse a pour objectif d'étudier les processus de formation de minéraux hydrothermaux en présence d'archées hyperthermophiles et en conditions abiotiques, dans le but de définir des biosignatures. Leur implication majeure serait de pouvoir localiser les hyperthermophiles dans le corps des fumeurs noirs et d'appréhender leurs interactions avec ces environnements extrêmes. Y a-t-il, ou non, de la vie à l'intérieur même des cheminées ? Dans une perspective plus lointaine, ces traces tangibles pourraient être confrontées aux différents scénarios phylogénétiques sur l'origine hyperthermophile du vivant.

Cette étude présente les résultats d'une démarche double, à la fois expérimentale et naturaliste, dont l'objectif est d'identifier et de traquer des biosignatures d'archées hyperthermophiles. Des expériences simulant les conditions typiques de fumeurs noirs ont été menées en laboratoire afin d'appréhender l'interaction des archées avec les minéraux et par extension les processus de formation des biominéraux. En parallèle, des analyses sur des échantillons de fumeurs noirs actuels ont été réalisées afin de guider la recherche expérimentale.

Sept chapitres composent ce document. Le Chapitre 1 dresse un état de l'art de nos connaissances sur (1) les cheminées hydrothermales, de leur formation à leurs communautés microbiennes en passant par leur impact géochimique à l'échelle de la Terre, et sur (2) les biosignatures. L'accent est mis sur les controverses inhérentes à cette dernière notion et sur la démarche adoptée pour tenter de limiter l'ambiguïté de ces traces. Les phénomènes de biominéralisation ainsi que les possibles biosignatures présentes dans les cheminées y sont inventoriées. Ce chapitre détaille également les enjeux de cette thèse et la stratégie adoptée pour y répondre.

Le Chapitre 2 présente les techniques utiles à cette étude, empruntées à un ensemble de disciplines. Il est question de méthodes associées aux champs de la microbiologie, de la minéralogie, de la cristallographie ou encore de la chimie analytique, qui ont permis la production des échantillons et leur caractérisation multi-échelle.

Le Chapitre 3 se consacre au métabolisme des archées étudiées afin de mieux contraindre les conditions de production des biosignatures. En fonction des sources d'énergie présentes dans le milieu, la souche utilisée au cours de ce travail présente des métabolismes différents qu'il est essentiel de caractériser. Une attention particulière est portée sur l'analyse de leurs produits métaboliques en phase gazeuse.

Le Chapitre 4 porte sur l'interaction entre les hyperthermophiles et le milieu hydrothermal simulé, riche en fer et en soufre. Les expériences, réalisées à différentes durées, permettent d'expliquer la séquence et les processus de formation des minéraux en présence des archées. Ces biominéraux sont caractérisés jusqu'à l'échelle du nanomètre, en se basant sur des critères morphologiques, cristallographiques et chimiques.

Le Chapitre 5 détaille les analyses effectuées sur des échantillons naturels de fumeurs noirs dans le but d'y rechercher les biosignatures, à la lumière des expériences décrites ci-avant. Les minéraux ciblés sont analysés selon le même protocole que précédemment. En plus de leur caractère biotique ou abiotique, il est question de déterminer s'il y a pu avoir des contaminations (transport de matière), notamment *in situ*, sur ces minéraux.

Le Chapitre 6 explore la possibilité de produire des minéraux abiotiques dans des conditions semblables et avec des caractéristiques similaires à celles des biosignatures, c'est-à-dire des équivalents abiotiques. Ce panel d'équivalents abiotiques est caractérisé selon les mêmes critères et avec la même méthodologie que les biosignatures afin de déterminer s'ils peuvent être discriminés.

Enfin, le Chapitre 7 retrace les conclusions apportées par ce travail de thèse sur la recherche de biosignatures d'hyperthermophiles dans les cheminées hydrothermales. Il expose également la multitude de pistes encore inexplorées qui seront à réaliser dans des travaux futurs.

Références

- Arrhenius G., J.L. Bada, G.F. Joyce, A. Lazcano, S. Miller, L.E. Orgel. (1999), Origin and ancestor: separate environments. *Science* 283, 792.
- Baross J. A. et Hoffman S. E. (1985), Submarine hydrothermal vents and associated gradient environments as sites for the origin and evolution of life. *Origins Life Evol. B* 15, 327–345.
- Barton C., (2002), Marie Tharp, oceanographic cartographer, and her contributions to the revolution in the Earth sciences. Geological Society, London, Special Publications 192, 215 – 228.
- Beaulieu S. E., Baker E. T., German C. R. (2015), Where are the undiscovered hydrothermal vents on oceanic spreading ridges? *Deep-Sea Research II* 121, 202–212.
- Blöchl E., Rachel R., Burggraf S., Hafenbradl D., Jannasch H. W., Stetter K. O. (1997), *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C. *Extremophiles* 1, 14–21.
- Brochier C. et Philippe H. (2002), A non-hyperthermophilic ancestor for Bacteria. *Nature brief communications* 417, 214.
- Corliss J. B., Dymond J., Gordon L. I., Edmond J. M., von Herzen R. P., Ballard R. D., Green K., Williams D., Bainbridge A., Crane K., van Andel T. H. (1979). Submarine Thermal Springs on the Galápagos Rift. *Science* 203,1073-1083.
- Di Giulio M. (2003), The ancestor of the Bacteria domain was a hyperthermophile. *J. Theor. Biol.* 224, 277–283.
- Edmond J., Measures C. McDuff, Chan L., Collier R., Grant B. (1979), Ridge crest hydrothermal activity and the balances of the major and minor element in the ocean: the Galapagos data, *Earth and Planetary Science Letters* 46, 1-18.
- Elderfield H. et Schultz A. (1996), Mid-ocean ridge hydrothermal fluxes and the chemical composition of the ocean, *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 24,191–224.
- Findlay A. J., Gartman A., Shaw T. J., Luther G. W. (2015), Trace metal concentration and partitioning in the first 1.5m of hydrothermal vent plumes along the Mid-Atlantic Ridge: TAG, Snakepit, and Rainbow. *Chemical Geology* 412, 117-131.
- Hannington M., Jamieson J., Monecke T., Petersen S., Beaulieu S. (2011), The abundance of seafloor massive sulfide deposits, *Geology* 39 (12), 1155–1158.
- Heezen B., Tharp M., Ewing M., (1959), *The Floors of the Oceans: I. The North Atlantic*, Volume 65 de Geological Society of America Special Paper, 122 p.
- Hess H. H., (1962). *History of Ocean Basins*, Geological Society of America, Petrologic Studies, eds. E. J. Engel, Harold L. James, B. F. Leonard.
- Huber C., Wächtershäuser G. (1997), Activated acetic acid by carbon fixation on (Fe, Ni)S under primordial conditions. *Science* 276, 245–247.
- Lazcano A. et S.L. Miller. (1996). The origin and early evolution of life: prebiotic chemistry, the pre-RNA world, and time. *Cell* 85, 793–798.
- Maury M.-F. (1855), *The Physical Geography of the Sea*, New York, Harper & Brothers.

- Péron F. (1804), Précis d'un mémoire lu à l'Institut national, sur la température de la mer soit à sa surface, soit à diverses profondeurs. *Annales du Muséum national d'histoire naturelle* 5, 123–148.
- Péton L. (2018). Penser les profondeurs marines au XIXe siècle : un abîme terrestre et anthropomorphique. *Cahiers François Viète, série III*, 4, 93-111.
- Rona P. A. (1980). TAG Hydrothermal Field: Mid-Atlantic Ridge crest at latitude 26°N, *Journal of the Geological Society* 137, 385-402.
- Rona P. A., Klinkhamert G., Nelsen T. A., Trefry J. H., Elderfield H. (1986), Black smokers, massive sulphides and vent biota at the Mid-Atlantic Ridge, *Nature* 321, 33-37.
- Russell M. J., Daniel R. M., Hall A. J., Sherringham J. A. (1994), A hydrothermally precipitated catalytic iron sulphide membrane as a first step toward life. *Journal of Molecular Evolution* 39, 231–243.
- Sander S. G. et Kochinsky A. (2011), Metal flux from hydrothermal vents increased by organic complexation. *Nature Geoscience* 4, 145–150.
- Scott R. B., Rona P. A., Mc Gregor B. A. and Scott M. R. (1974), The TAG Hydrothermal Field, *Nature* 251, 301-302.
- Spiess F. N., Macdonald K. C., Atwater T., Ballard R., Carranza A., Cordoba D., Cox C., Diaz Garcia V. M., Francheteau J., Guerrero J., Hawkins J., Haymon R., Hessler R., Juteau T., Kastner M., Larson R., Luyendyk B., Macdougall J. D., Miller S., Normark W., Orcutt J., Rangin C. (1980), East Pacific Rise: Hot Springs and Geophysical Experiments, *Science* 207 (4438), 1421-1433.
- Stein C. et Stein S. (1994), Constraints on hydrothermal Heat-Flux through the oceanic lithosphere from global heat-flow. *Journal of Geophysical Research* 99, 3081–3095.
- Stetter K. O. (1982), Ultrathin mycelia-forming organisms from submarine volcanic areas having an optimum growth temperature of 105 °C. *Nature* 300, 258-260.
- Stetter K. (1992), Life at the upper temperature border. In *Frontiers of Life*, ed. J.Trân Thanh Van, K.Trân Thanh Van, J.C.Mounolou, J.Schneider and C.McKay, pp. 195–219 (Gif-sur-Yvette: Editions Frontières).
- Wächtershäuser G. (1990), Evolution of the first metabolic cycles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 200–204.
- Wheat C., Jannasch W., Plant, J., Moyer C, Sansone F., McMurtry G. (2000), Continuous sampling of hydrothermal fluids from Loihi Sea mount after the 1996 event, *Journal of Geophysical Research* 105, 19353–19367.
- Woese C., Kandler O. Wheelis M. (1990), Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archae, Bacteria, and Eukarya. *Proc. Natl Sci. USA*, 87, 4576–4579.

Chapitre I.

État de l'art

I. Les cheminées hydrothermales riches en soufre : les fumeurs noirs

1. Contexte géologique et formation des fumeurs noirs

Les systèmes hydrothermaux océaniques profonds sont, pour la plupart, liés à une activité tectonique d'extension, déclenchée par la convection mantellique (Seyfried et Mottl, 1995). Les zones hydrothermales les plus étudiées sont localisées le long des dorsales médio-océaniques (MOR pour *Mid-Oceanic Ridges*, Fig 1), au niveau des zones de divergence de plaques où se forment les fonds marins basaltiques : l'eau de mer percole à travers la croûte basaltique nouvellement formée, chauffe au contact de la chambre magmatique en s'appauvrissant en composés oxydés (O_2 , SO_4^{2-} , NO_3^-) et en se chargeant en espèces minérales dissoutes (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Si^+ , Zn^{2+}) et en gaz (CO_2 , H_2S , H_2 , CH_4), puis ressort au niveau du fond océanique (Fig 2A). Les cheminées hydrothermales peuvent également se trouver au niveau des bassins d'arrière-arc et des arcs insulaires où a lieu la subduction d'une plaque océanique sous une plaque continentale, i.e. le long des marges de plaques convergentes (Christie et Fisher, 2006). Il existe aussi des points chauds volcaniques intraplaques, bien plus minoritaires, qui ne sont pas directement associés aux marges des plaques tectoniques mais plutôt aux panaches mantelliques (Seyfried et Mottl, 1995).

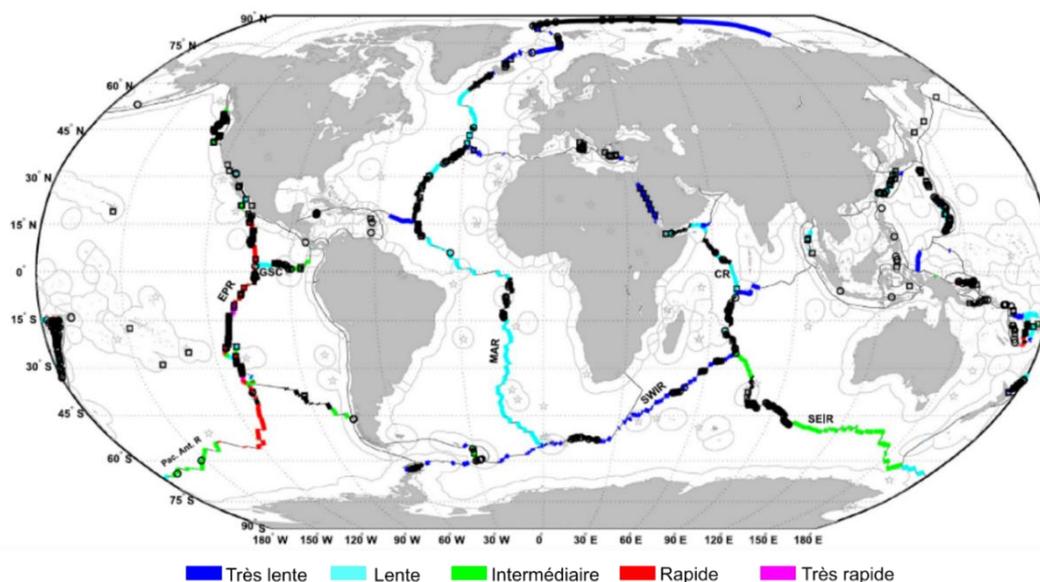


Figure 1 | Distribution des sites hydrothermaux connus (points noirs) le long des MOR et dans toutes les configurations tectoniques, i.e. extension, convergence, points chauds intraplaques (carrés vides). Les couleurs indiquent la vitesse d'expansion des dorsales : très lente (< 20 mm/an), lente (20-55 mm/an), intermédiaire (55-80 mm/an), rapide (80-140 mm/an), ou très rapide (4140 mm/an). CR = crête de Carlsberg ; EPR = dorsale est-Pacifique ; GSC = dorsale des Galapagos ; MAR = dorsale médio-Atlantique ; Pac. Ant. R. = dorsale Antarctique ; SEIR = dorsale sud-est indienne ; SWIR = dorsale sud-ouest indienne. D'après Beaulieu et al., 2015.

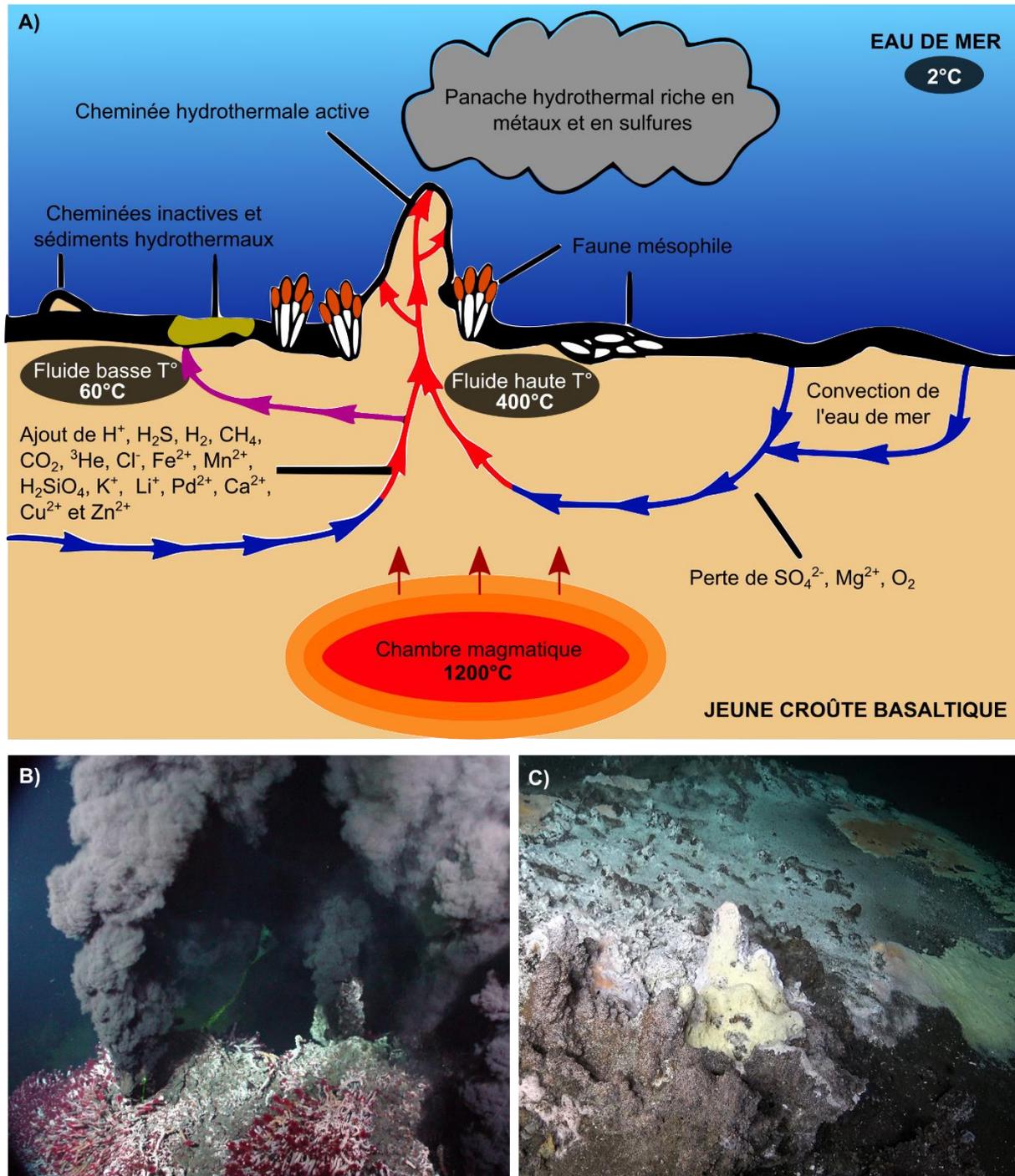


Figure 2 | A) Schéma de la circulation hydrothermale le long d'une MOR. N.B. le schéma n'est pas à l'échelle. Adapté d'après Flores, 2011. **B)** Photo d'un champ de cheminées actives rejetant un panache noir, colonisées par des Pogonophora (NOAA). **C)** Photo de sédiments hydrothermaux et de cheminées inactives recouverts de tapis microbiens, en blanc sur la photo (Schmidt Ocean Institute).

Au niveau des MOR, les sites hydrothermaux sont constitués d'une série de cheminées actives (Fig 2B), associées à des sédiments qui recouvrent plus ou moins partiellement d'anciennes cheminées devenues inactives (Fig 2C). Le site actif reçoit un fluide acide ($\text{pH} \sim 3$) de haute température ($\sim 400^\circ\text{C}$) qui provient de la voie d'écoulement principale (Fig 2A). Chargé de minéraux dissous, ce fluide est à l'origine d'une composition minéralogique dominée par les sulfures, associés à quelques sulfates, oxydes, hydroxydes et silicates (Rona et al. 1986 ; Rona et al. 1993). Les panaches qui sortent des cheminées des cheminées actives sont composés de sulfures de fer, en particulier de pyrites (FeS_2) nanoparticulaires inférieures à $0.2\mu\text{m}$ (Rona et al. 1986 ; Yücel et al., 2011 ; Gartman et al. 2014), et de métaux tels que le fer, le cuivre, le zinc, le plomb ou encore le cobalt, eux aussi majoritairement sous forme de nanoparticules (Findlay et al., 2015).

Certaines cheminées deviennent inactives à la suite d'un changement dans les voies souterraines d'écoulement. Le champ de sédiment environnant peut néanmoins continuer à recevoir des décharges de fluides à plus basse température – autour de 60°C . Les sulfures des anciennes cheminées sont donc soumis à une altération oxydative à basse température, au cours de laquelle la fraction réduite du soufre est convertie en SO_4^{2-} soluble et les métaux, principalement le Fe, sont convertis en oxyhydroxydes insolubles (Juniper et Tebo, 1995). Les sédiments, alimentés en sulfures par les fluides de basse température, sont à terme dominés par des phases incorporant leurs produits d'oxydation tels que des oxydes de fer amorphes, des silicates et des dépôts de minéraux riches en manganèse et en fer (Thompson et al. 1985 ; Lalou et al. 1986 ; Thompson et al. 1988 ; Rona et al. 1993 ; Becker et Von Herzen, 1996).

Bien que chaque site hydrothermal – répertorié ou inféré – soit classifié comme étant « actif » ou « inactif » (Beaulieu et Szafranski, 2018), il est important de garder à l'esprit que ces deux configurations forment un seul et même site. Ces environnements s'inscrivent dans un continuum : ils naissent avec les événements actifs et évoluent vers des champs d'événements en déclin selon la diminution du flux hydrothermal (Van Dover, 2019).

Haymon (1983) définit deux stades de croissance des fumeurs noirs. Le stade I constitue la phase naissante des cheminées et est dominé par les sulfates, typiquement l'anhydrite (CaSO_4). L'anhydrite précipite lorsque le fluide hydrothermal riche en soufre rencontre l'eau de mer, oxygène et à une température proche de 2°C , construisant les parois initiales de la cheminée vers le haut et vers l'extérieur à l'interface entre le fluide et l'eau de mer (Fig 3). Le stade II commence lorsque les parois d'anhydrite limitent significativement les interactions entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer. C'est alors la chalcopryrite (CuFeS_2) et la pyrite qui précipitent en équilibre avec le fluide hydrothermal pur qui refroidit (moins brutalement que durant le stade I). Ces minéraux participent à la construction interne de la cheminée (e.g. Rona et al. 1986, Thompson et al. 1988 ; Feely et al. 1994 ; Ludford et al., 1996). Au même stade, la cheminée continue de croître vers le haut via la précipitation d'anhydrite. Une partie du fluide pénètre la paroi d'anhydrite, poreuse, ce qui conduit au remplacement de l'anhydrite par des sulfures (e.g. Spiess et al., 1980 ; Lafitte et al., 1984 ; Rona et al., 1986 ; Langmuir et al., 1997 ; Rouxel et al., 2004 ; Grant et al., 2018) (Fig 3). Lorsque les cheminées cessent d'être actives, l'anhydrite se transforme en gypse et/ou se dissout, ce qui conduit à l'effondrement de la structure (Haymon, 1983).

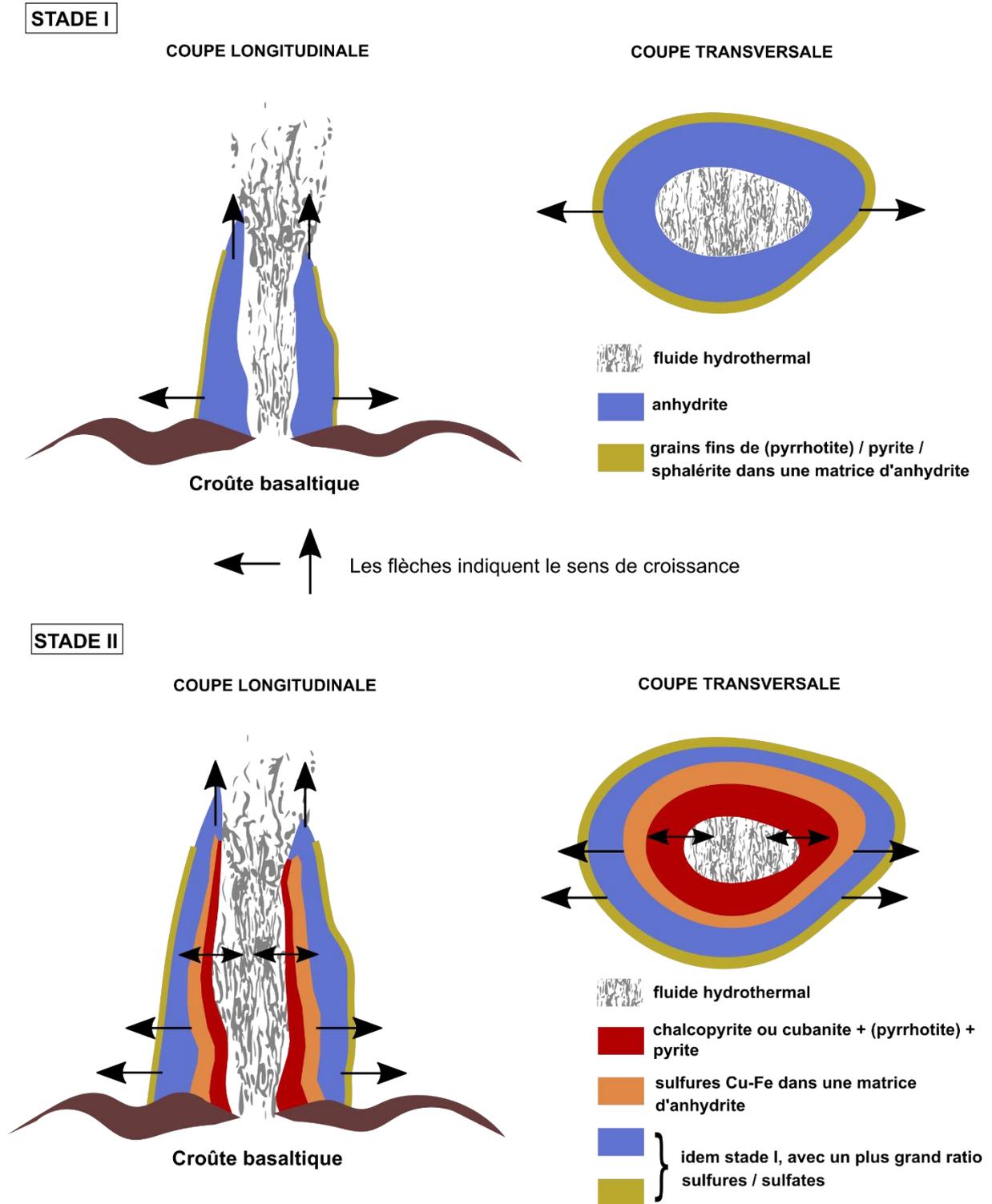


Figure 3 | Schéma expliquant la croissance d'une cheminée hydrothermale de type fumeur noir. Au **stade I**, la construction commence par l'accrétion vers le haut et vers l'extérieur de parois d'anhydrite (bleu), formées au contact de l'eau de mer. La couche extérieure présente des excroissances de pyrrhotite ou de pyrite et de sphalérite (en vert). Au **stade II**, les parois d'anhydrite protègent les fluides hydrothermaux du mélange et permet aux sulfures Cu-Fe de précipiter dans le conduit central (rouge). L'anhydrite est peu à peu remplacée par les sulfures (orange). Le rapport sulfure/sulfate de la cheminée externe augmente à mesure que les grains de sulfures se développent au détriment de l'anhydrite (bleu et vert). Adapté d'après Haymon et al., 1983.

Ainsi la formation et la croissance des cheminées est-elle médiée par l'interaction entre le fluide réducteur et l'eau de mer oxydante. La pyrite et la chalcopryrite sont les phases minérales prédominantes dans la partie la plus interne (la plus chaude) de la cheminée, au contact direct du fluide, tandis que l'anhydrite compose la majeure partie des parties médianes et plus froides de la paroi, en association avec des sulfures de fer et de zinc tels que la pyrite, la marcassite (FeS_2) et la sphalérite. Il s'agit de structures temporaires qui s'altèrent et s'effondrent lorsqu'un changement survient dans les voies souterraines d'écoulement.

2. Impact biogéochimique des fumeurs noirs

Les fumeurs noirs exercent un rôle fondamental dans les cycles biogéochimiques actuels (e.g. Elderfield et Schultz, 1996). Que ce soit au niveau des flux de chaleur ou des flux de matière, ces environnements sont des zones d'échange primordiales entre la lithosphère et les sphères extérieures (hydrosphère et atmosphère) (e.g. Edmond et al., 1979 ; Stein et Stein, 1994 ; Wheat et al., 2000 ; Judd et Hovland, 2009).

Les systèmes hydrothermaux du plancher océanique représentent un élément essentiel de l'activité géologique de la Terre. Les estimations géophysiques indiquent que plus de la moitié du dégagement total de chaleur, associé à la solidification du magma et au refroidissement des roches magmatiques, se situe au niveau des MOR (McLennan, 2008). De la même façon, une grande partie de cette chaleur provient de ces zones et a des répercussions sur les océans (Lowell et Germanovich, 2004). La chaleur magmatique, transportée depuis le manteau sous les centres d'expansion océanique (au niveau des MOR), est advectée vers l'océan par des fluides dérivés de l'eau qui s'échappent des cheminées (Lowell et al., 2008). Le flux diffus au niveau des systèmes hydrothermaux des MOR peut représenter jusqu'à 90 % du flux de chaleur convectif océanique (Rona, 1984 ; Morton et Sleep, 1985 ; Scott, 1997).

Étant donné que les cheminées hydrothermales sont apparues très tôt dans l'histoire de la Terre (Fig 4), elles ont certainement eu un impact sur l'évolution de la composition actuelle des océans (Judd et Hovland, 2009). Les panaches provenant des cheminées s'élèvent de 100 à 500 m au-dessus du fond marin avant d'atteindre un niveau de flottabilité neutre (Kadko et al., 1995). Ils s'étendent ensuite latéralement sur des centaines de mètres et transportent des concentrations élevées d'éléments dissous (Kadko et al., 1995). Les fluides sont chargés en gaz, principalement en CO_2 , mais aussi en H_2S , H_2 , CH_4 , SO_2 et N_2 (Dando et al., 2000). Et par rapport à l'eau de mer environnante, les panaches sont enrichies jusqu'à un facteur 10^7 en Fe, Cu, Mn, S, Zn, Ca, Si et en nombreuses autres espèces (Baker et al., 1995).

Les cheminées de haute température émettent en particulier des quantités remarquables de minéraux de fer et de soufre, avec une libération de fer estimée à un ordre de 50 Gg par an, ce qui contribue au pool de fer dissous (dFe) dans l'océan (Raiswell et Canfield, 2011 ; Emerson, 2016). Ce fer se trouve sous la forme de nano et microparticules de sulfures de fer (Yücel et al., 2011 ; Gartman et al., 2014) et de fines particules de fer liées à la matière organique (Toner et al., 2009 ; Bennett et al., 2011 ; Wu et al., 2011).

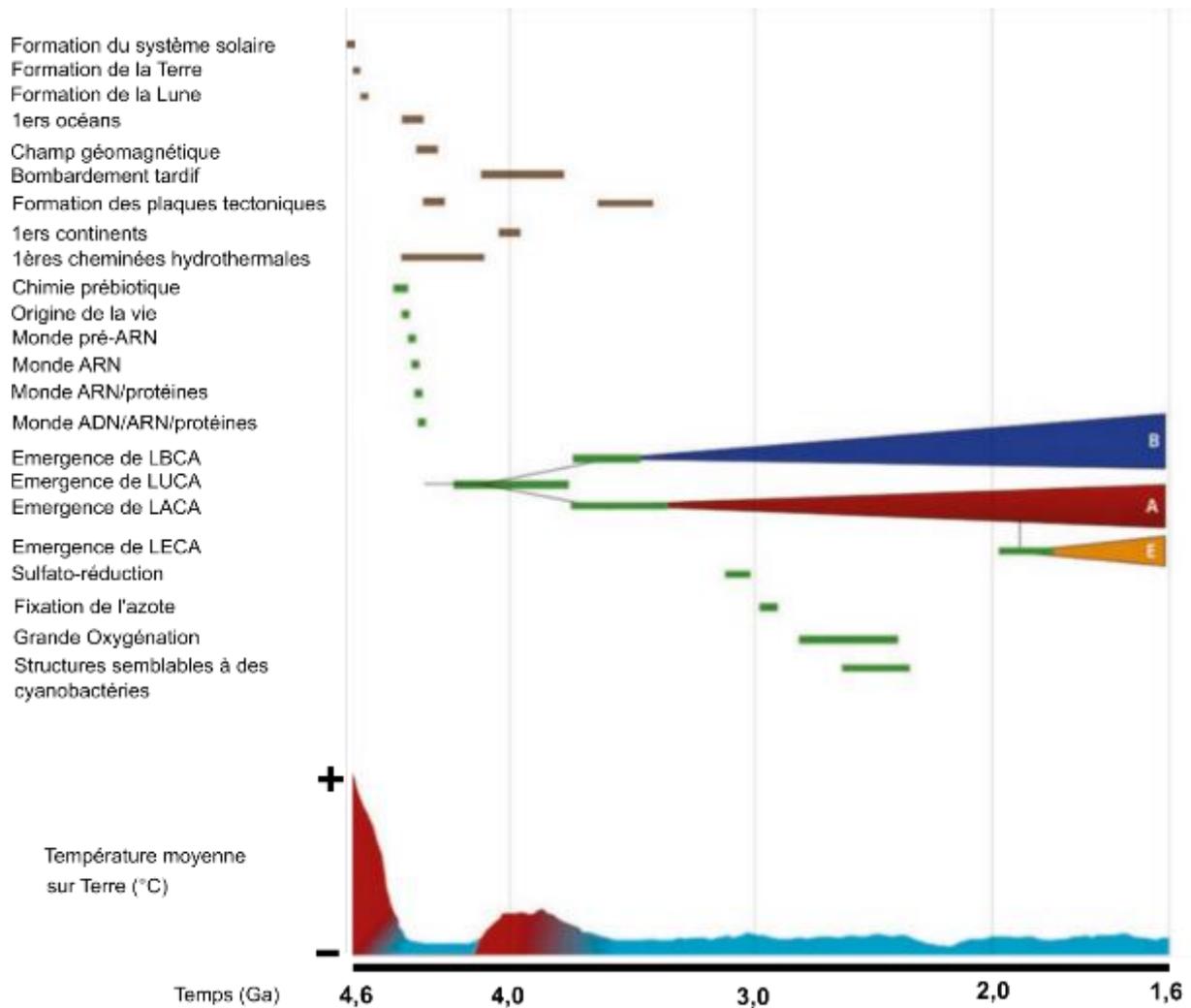


Figure 4 | Chronologie des débuts de l'évolution de la vie sur Terre. Les barres représentent une estimation du temps de chaque processus. Les domaines archéen (A), bactérien (B) et eucaryen (E) ont évolué au fil du temps et se sont diversifiés. La courbe de la température moyenne de la Terre (en bas) n'est donnée qu'à titre illustratif et montre une température supérieure durant la Terre primitive. Adapté d'après Morales et Delay (2020).

Dès leur découverte en 1977, les fumeurs noirs sont reconnus comme propices à l'apparition de la vie (Corliss et al., 1981 ; Baross et Hoffman, 1985). En raison de leur fort potentiel d'oxydoréduction, de l'abondance de matière organique et de la présence de certains minéraux, ce sont des lieux où se déroule une chimie très particulière, dont une chimie impliquant l'oxydo-réduction des composés organiques.

Günter Wächterhäuser propose un modèle selon lequel des sulfures métalliques couplés aux conditions hydrothermales seraient impliqués dans les processus prébiotiques : le « Iron-sulfur world » (Wächtershäuser, 1988 ; Wächtershäuser, 1990 ; Wächtershäuser, 1992). La précipitation de pyrite serait à même de fournir l'énergie nécessaire à la réduction de CO_2 et participerait à la formation de composés organiques réduits (Wächterhäuser, 1990 ; Huber et Wächtershäuser, 1997). Une fois produits, ces composés organiques pourraient être accumulés sur les surfaces des sulfures métalliques catalysant les réactions organiques jusqu'à former des molécules plus complexes (Wächtershäuser, 1992). Des calculs thermodynamiques ont également montré que les conditions hydrothermales sont favorables à la formation d'acides aminés (Amend 1998).

Le scénario de Wächtershäuser est cohérent avec les conditions environnementales des fumeurs noirs où le H₂S, le CO₂ et le CO sont abondants. Cependant, il s'avère que le système réducteur FeS/H₂S ne réduit pas le CO₂ en acides aminés, purines ou pyrimidines (Keefe et al. 1995). Les fumeurs noirs ne semblent pas synthétiser des composés organiques plus complexes que des hydrocarbures simples tels que le méthane (CH₄) et l'éthane (C₂H₆) (McCollom et al. 2010). En réalité, le consensus actuel s'accorde sur le fait que les cheminées hydrothermales jouent un rôle important dans la destruction des composés organiques plutôt que dans leur production spontanée, ce qui leur confère un intérêt particulier dans le cycle géochimique du carbone (Cleaves, 2012).

Certains auteurs proposent également que les interactions entre acides nucléiques et acides aminés nécessaires aux débuts du vivant n'ont pu avoir lieu qu'au sein de protocellules, dotées d'une membrane composée de lipides ou de protéines (e.g Szostak et al. 2001 ; Koonin 2014 ; Ghosh et al. 2021). La capacité à se scinder et à fusionner des protocellules aurait permis l'exploration de nouvelles voies métaboliques et le transfert horizontal de gènes. Ces systèmes autocatalytiques, soumis à une pression de sélection, auraient alors rapidement évolué. Or, des températures modérément élevées (40-90°C) permettent la nucléation, la croissance et la réplication de protocellules (Jordan et al., 2019 ; Köksal et al., 2020). Il s'avère également que des vésicules amphiphiles simples à chaîne unique sont stables en conditions hydrothermales (Mansy et Szostak, 2008). Les cellules de convection à proximité ou à l'intérieur des cheminées hydrothermales pourraient alors soumettre les protocellules à d'importantes fluctuations thermiques ce qui permettrait l'amplification des molécules d'ADN (Krishnan et al., 2002 ; Braun et al., 2003 ; Mansy et Szostak, 2008).

Tandis que de nombreuses études se penchent sur l'impact des fumeurs sur la géochimie du carbone et leur potentiel rôle dans les débuts du vivant, beaucoup moins s'intéressent à l'impact potentiel de la vie sur la géochimie des fumeurs noirs. Il est pourtant indéniable que la vie influence son environnement et peut même modifier jusqu'à la chimie entière de la surface terrestre. L'exemple le plus célèbre est celui de la Grande Oxygénation (GOE pour *Great Oxydation Event*) pour laquelle la photosynthèse cyanobactérienne est généralement considérée comme la principale source d'oxygène (e.g. Cloud, 1972 ; Walker, 1977 ; Kasting, 2013).

Il est donc légitime de se demander comment la vie pourrait influencer la géochimie des fumeurs noirs, un environnement impliqué dans des cycles géochimiques majeurs à l'échelle de la Terre. Comprendre comment le biote utilise les composés chimiques des fluides hydrothermaux et quel impact il peut avoir sur leur composition est donc d'un intérêt considérable. Par exemple, Crowell et al. (2008) montrent que le H₂S est éliminé des événements hydrothermaux par une combinaison de précipitation de pyrite et d'activité biologique.

Néanmoins, la possibilité d'une vie à l'intérieur même des cheminées reste débattue, les gradients géochimiques brutaux imposés par les fluides hydrothermaux étant considérés comme incompatibles avec le vivant. De ce fait, la possible influence des communautés microbiennes sur les flux géochimiques n'est pour le moment que peu discutée. Il est donc essentiel d'avoir plus d'informations sur l'impact que peut avoir la vie dans les cheminées hydrothermales.

3. Diversité des communautés microbiennes des sites hydrothermaux

Les sites hydrothermaux offrent un large éventail de niches écologiques pour les communautés microbiennes (Fig 5). Les écosystèmes hydrothermaux reposent principalement sur la production primaire chimioautotrophe assurée par des microorganismes chimiosynthétiques et entretenue par le déséquilibre chimique entre l'eau de mer oxygène et les fluides hydrothermaux réduits. Par le biais de réactions d'oxydoréduction (redox) les microorganismes utilisent l'énergie fournie par les oxydants de l'eau de mer (O_2 , SO_4^{2-} , NO_3^- , CO_2) et les agents réducteurs des fluides hydrothermaux (H_2 , H_2S , HS^- , $S(0)$, $S_2O_3^{2-}$, Fe^{2+}) pour fixer le CO_2 dans le matériel cellulaire (Flores, 2011 ; Flores et Reysenbach, 2011). Ce carbone organique est ensuite utilisé comme source d'énergie pour le reste de la communauté, c'est-à-dire la macrofaune et les microorganismes hétérotrophes.

Ces organismes opportunistes colonisent tous les environnements, i.e. depuis les sédiments et les structures inactives des zones les plus froides jusqu'aux cheminées actives, en passant par la macrofaune et le panache hydrothermal (Fig 2A, Fig 5). Chacune de ces niches présente des conditions à la fois distinctes, en température et en composition chimique, et variables, en fonction de l'apport des fluides hydrothermaux. Tandis que la colonisation microbienne est évidente dans certaines configurations – site inactif, macrofaune –, elle demeure plus difficile à établir et surtout à localiser spatialement dans d'autres cas – structure active, panache hydrothermal.

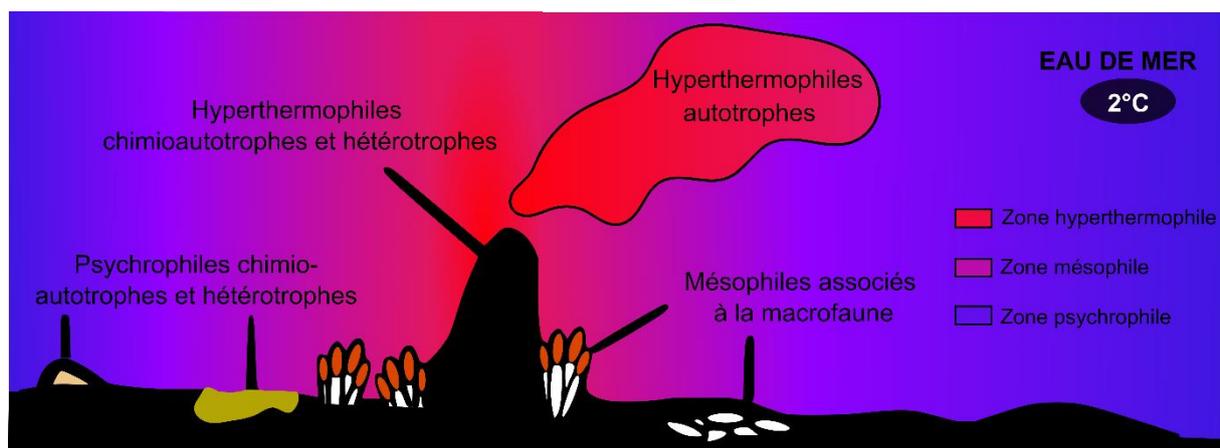


Figure 5 | Habitats et communautés microbiennes influencés par les fluides hydrothermaux. Adapté d'après Flores, 2011.

2.1. Communautés microbiennes psychrophiles et mésophiles

Dans les zones les plus froides, les colonies microbiennes sont bien visibles et se présentent sous la forme de tapis microbiens recouvrant les anciennes cheminées et les sédiments (Fig 2C). Dominée par l'eau de mer oxygène d'une température de $2^\circ C$, la zone éloignée des cheminées actives héberge des bactéries psychrophiles ($< 15^\circ C$) capables d'oxyder le fer et le soufre (Edwards, 2004 ; Edwards et al., 2005). Bien que l'oxydation se produise aussi de manière abiotique au contact de l'eau de mer, ces bactéries participent activement à l'altération des sulfures et favorisent la dissolution des minéraux sulfurés natifs (Edwards, 2003a ; Edwards, 2004). Il s'agit de chimiolithoautotrophes obligatoires qui tirent leur énergie métabolique de l'oxydation du fer des phases sulfurées, telles que la pyrite, et des basaltes, qui contiennent environ 10% de FeO (Edwards et al., 2003b). Profitant des fortes teneurs en carbone organique issu de cette production primaire, des bactéries hétérotrophes peuvent alors proliférer (Li et al., 2017).

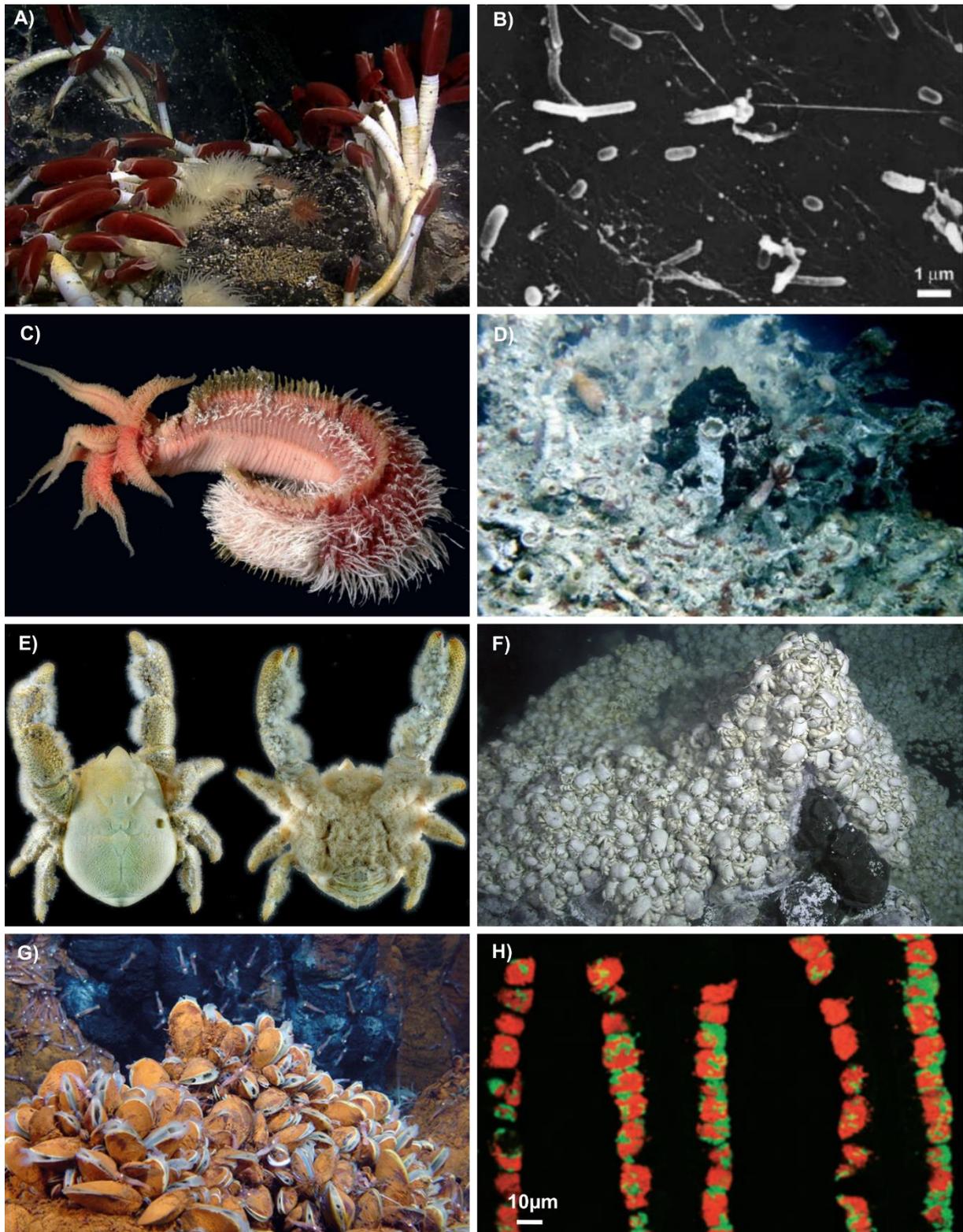


Figure 6 | A) *Riftia pachyptila* (Van Dover et al., 2018). **B)** Bactéries prélevées sur un tube de *Riftia pachyptila* et observées en microscopie électronique à balayage (López-García et al., 2002). **C)** *Alvinella pompejana* recouvert de bactéries épibiontes (filaments blancs) et **D)** habitant des tubes minéralisés qui recouvrent les parois d'un fumeur noir (Le Bris et Gaill, 2007). **E)** *Kiwa tyleri* arborant des soies ventrales interprétées comme des « fermes microbiennes » (Thatje et al., 2015). **F)** Population de *Kiwa tyleri* amassé autour d'un fumeur noir (Thatje et al., 2015). **G)** *Bathymodiolus azoricus*, Lucky Strike Field, Mid-Atlantic Ridge (IFREMER). **H)** Coupes de branchies de spécimens de *Bathymodiolus* hybridées avec des sondes fluorescentes spécifiques du symbiote méthanotrophe (en vert) et du symbiote thiotrophe (en rouge) (Duperron et al., 2006).

La macrofaune mésophile qui peuple les zones autour des cheminées hydrothermales actives héberge des populations microbiennes. Ces microorganismes se développent donc selon la même gamme de température que la macrofaune, comprise entre 15°C et 40°C, et présentent, pour la plupart, des métabolismes chimiautotrophes aérobies à microaérophiles (Fig 5). Ils permettent l'oxydation de différents composés impliqués dans des processus de détoxification et assurent la production primaire essentielle à la macrofaune hétérotrophe.

Dans certains cas, il s'agit d'une colonisation de surface avec une simple relation commensale. Par exemple, diverses communautés microbiennes – dominées par des bactéries oxydatives du soufre – colonisent les surfaces extérieures du tube chitineux de *Riftia pachyptila*, un ver tubulaire géant (Fig 6A et B) (López-García et al., 2002). Les relations hôtes-microorganismes symbiotiques sont majoritaires, avec une distinction entre les ectosymbioses et les endosymbioses. Dans les relations ectosymbiotiques, les microorganismes sont situés à l'extérieur des tissus de l'hôte. Elles sont généralement hypothétiques. On peut citer l'exemple du ver polychète *Alvinella pompejana*, qui vit dans des tubes à l'extérieur des fumeurs noirs où la température environne les 70°C (Van Dover, 2000) (Fig 6C et D). *Alvinella* héberge diverses communautés microbiennes sur ses surfaces dorsales, notamment des bactéries microaérophiles oxydant le H₂S. Bien que la nature de cette relation ne soit pas encore claire, il est possible que ces bactéries détoxifient le H₂S (Le Bris et Gaill, 2007 ; Flores, 2011). Un autre exemple d'ectoymbiose concerne les étonnants « crabes yétis », des galathées qui présentent une forte pilosité, en particulier l'espèce *Kima tyleri*. Cette espèce réside dans l'environnement proche des cheminées – quelques mètres – car leur distribution est physiologiquement limitée par les eaux environnantes et froides de l'Océan Austral (Thatje et al., 2015) (Fig 6E et F). Leur pilosité consiste en des soies ventrales très denses, colonisées par des bactéries chimiosynthétiques, constituant donc des « fermes microbiennes » qui font office de garde-manger (Thatje et al., 2015).

Enfin, il existe des relations endosymbiotiques comme celles entretenues entre les moules abyssales du genre *Bathymodiulus* avec des bactéries thiotrophes (oxydation du soufre) et méthanotrophes (oxydation du méthane) (Fiala-Médioni et al., 2002) (Fig 6G). Les symbiotes sont logés dans des vacuoles à l'intérieur de cellules épithéliales branchiales appelées bactériocytes, et permettent à l'animal d'exploiter simultanément l'énergie de ces deux types de réducteurs (Fig 6H).

2.2. Communautés microbiennes du site actif : panache et structure de la cheminée

Les zones les plus exposées au fluide hydrothermal, comme le panache lui-même, abritent aussi des microorganismes. Elles sont dominées par des espèces thermophiles (40°C à 80°C) et des hyperthermophiles (> 80°C) anaérobies ou microaérobies, capables de faire face aux conditions extrêmes imposées par le fluide et d'en tirer parti.

Les panaches ont été relativement bien étudiés. Des études dans les années 1980-1990 suggéraient déjà qu'il s'agissait de zones de forte productivité avec une biomasse élevée (e.g. Winn et al., 1986 ; Naganuma et al., 1989 ; Juniper et al., 1998). Les sources potentielles de microorganismes dans les panaches peuvent être divisées en trois grandes catégories : (1) les communautés benthiques autour des cheminées, (2) les communautés pélagiques de la colonne d'eau, ou (3) les communautés à l'intérieur du panache. Ces communautés microbiennes sont certainement dynamiques dans le temps et dans l'espace car l'environnement géochimique du panache évolue, comprenant différents degrés d'oxydation et de dilution (Dick et al., 2013). Il s'agit majoritairement de microorganismes présents sous forme libre ou attachés à des particules. Ils sont

aussi autotrophes en majorité, capables d'oxyder les composés soufrés, le méthane, l'ammoniac ou le fer, comme en attestent des études transcriptomiques (e.g. Baker et al., 2012 ; Lesniewski et al., 2012 ; Anantharaman et al., 2013). Il été montré que la population des panaches est bien distincte de celle de la colonne d'eau environnante, avec une concentration cellulaire élevée de l'ordre de 1×10^7 cellules/mL (Lam et al., 2004 ; Lam et al., 2008 ; Dick et Thebo, 2010 ; Dick et al., 2013).

Les portions intermédiaires et extérieures des cheminées se caractérisent par une forte porosité et perméabilité, et par des gradients fluctuants d'oxygénation et de température qui varient subitement en quelques minutes (Baross et Deming, 1985 ; Tivey et al. 2002 ; Schrenk et al., 2003 ; Lin et al., 2016). Ces fluctuations brutales de température et d'oxygénation ne fournissent pas des conditions optimales pour que la vie y prolifère. Les organismes sont généralement adaptés à des conditions bien particulières, par exemple en gamme de température ou d'oxygénation. En outre, ces fluctuations sont liées à la difficulté d'étudier les microorganismes *in situ* et contribuent aux interrogations qui subsistent sur la possible/probable colonisation des fumeurs noirs par le vivant.

L'utilisation combinée d'analyses moléculaires et de méthodes de culture en milieu enrichi suggérerait la présence de microorganismes reposant sur une grande variété de métabolismes chimioautotrophes, hétérotrophes et mixotrophes. Ils pourraient être anaérobies stricts, anaérobies facultatifs, microaérophiles et aérobies obligatoires (Jannasch, 1995 ; Karl, 1995 ; Takai et al., 2006, Flores et al., 2011). Néanmoins, les zones les plus chaudes des cheminées sont généralement appauvries en dioxygène et en nitrates, ce qui limite les métabolismes aérobies (Lilley et al., 1993). Ces études reposent en particulier sur l'échantillonnage de morceaux de cheminées selon le gradient de température, qui sont ensuite incubés dans un milieu enrichi et permettent d'isoler des souches d'intérêt. Des archées vivraient donc à l'intérieur des fumeurs noirs, avec une nette prédominance de Thermococcales, parfois associées à des Archaeoglobales, des Desulfurococcales, des Methanopyrales ou des Methanococcales (e.g. Takai et al., 2001 ; Nercessian et al., 2003 ; Schrenk et al., 2003). Ces archées reposeraient sur des métabolismes strictement anaérobies. Elles seraient alors hétérotrophes, capables de réduction du soufre/sulfate, ou autotrophes et notamment méthanogènes. La colonisation de la cheminée par une telle communauté hyperthermophile restant à prouver, leur importance écologique et géochimique demeure inconnue.

Bien qu'indispensables, ces deux méthodes d'incubation et d'analyses moléculaires ne suffisent pas à prouver leur présence durable au sein de la cheminée. L'incubation de morceaux de cheminées dans un milieu riche n'est pas équivalente à une observation *in situ* (Fortunato et al., 2021). Il n'est pas non plus possible de déterminer quelles zones sont peuplées ou non et de déterminer les températures des zones qui seraient habitées. Il en va de même pour les analyses moléculaires. Le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S a été détecté dans toute l'épaisseur d'une cheminée, de même que certains lipides archéens et bactériens (Schrenk et al., 2003 ; Blumenberg, 2007). Une étude a même révélé la présence d'une diversité substantielle d'ADN ribosomique microbien (ADNr) dans une eau de fumeur noir à plus de 300°C. Cela dépasse de loin la température maximale de croissance pour *Pyrolobus fumarii* (113°C), pourtant la plus hyperthermophile connue à ce jour (Blöchl et al., 1997 ; Takai et al., 1999).

Deux questions principales se posent. Les parois des cheminées hébergent-elles le vivant ? Si oui, quelle épaisseur de la cheminée est-elle concernée ? Les réponses à ces questions sont indispensables pour déterminer l'impact que peut avoir le vivant sur ces systèmes non négligeables à l'échelle de la Terre.

II. Biosignatures et biominéraux

1. Les biosignatures

1.1. Les biomorphes : de fausses pistes dans l'identification de cellules

Comment faire pour déterminer si la vie colonise bel et bien l'intérieur des cheminées hydrothermales ? Comment localiser des microorganismes dans de tels environnements ? L'observation, dans des roches, de structures semblables à des cellules n'est pas toujours univoque.

Une controverse célèbre illustre ce problème : la controverse des « microfossiles » de l'Apex datés de 3.46Ga (Pilbara, Australie) (Awramik et al., 1983 ; Schopf et Packer, 1987). Ces microstructures carbonées et filamenteuses ont été initialement identifiées comme des fossiles de cyanobactéries (Schopf, 1993). Peu d'analyses complémentaires sont menées pour vérifier leur nature biologique, à l'exception d'analyse isotopiques équivoques (Ueno et al., 2001). Cette découverte devient donc celle des plus anciennes traces de vie jamais trouvées.

La controverse naît des années après, lorsque Brasier et al. (2002), révèlent la présence d'autres filaments identifiés comme des phases minérales typiques d'un milieu hydrothermal. Les microstructures de l'Apex se sont donc formées en conditions hydrothermales. Schopf et al. (2002) réalisent de la spectroscopie Raman et démontrent la présence de kérogène, ce qui confirmerait l'origine biologique des filaments. Cette technique n'est toutefois pas suffisante pour attester de manière univoque le caractère biologique des matériaux carbonés (Pasteris et Wopenka, 2003). Tandis que Brasier et ses collaborateurs multiplient des observations pétrographiques et géologiques qui renforcent l'hypothèse abiotique (Brasier et al., 2004, 2005, 2006), Schopf et ses collègues continuent de se baser sur la spectroscopie Raman et la microscopie confocale à balayage laser pour affirmer le caractère biologique des filaments (Schopf, 2006 ; Schopf et al., 2007 ; Schopf et Kudryavtsev, 2009).

Des contaminants carbonés et des artéfacts abiotiques qui ressemblent à des microfossiles sont ensuite observés dans les cherts de l'Apex, complexifiant encore le débat (e.g. Pinti et al., 2009 ; Marshall et Olcott, 2013). Récemment, des techniques d'imagerie à haute résolution spatiale permettent à Brasier et ses collaborateurs de démontrer que les microstructures consistent en des feuillettes de phyllosilicates disposés autour de la limite des cristaux, ce qui les fait ressembler à des filaments carbonés (Brasier et al., 2015 ; Wacey et al., 2016 ; 2019). Le consensus général s'accorde désormais à dire que ces microstructures ne sont pas des microfossiles.

En effet, des biomorphes, i.e. des structures abiotiques semblables à des cellules, peuvent se former dans une grande diversité de milieu. On peut citer le cas des biomorphes formés expérimentalement dans des milieux alcalins riches en silice par Garcia-Ruiz et al. (2002, 2003, 2009) (Fig 7A et B). Des microstructures avec des niveaux élevés de complexité peuvent se former par des processus d'auto-assemblage (e.g. McCauley et Roy, 1974 ; Gower et Tirrell, 1998 ; Knoll et Steinbock, 2018) (Fig 7C à F). Bien que les arguments morphologiques soient encore utilisés par certains auteurs (e.g. Dodd et al., 2017 ; Kremer et Kaźmierczak, 2017 ; Rouillard et al., 2020 ; Coutant et al., 2022), il est désormais plus consensuel de considérer que les morphologies sont équivoques.

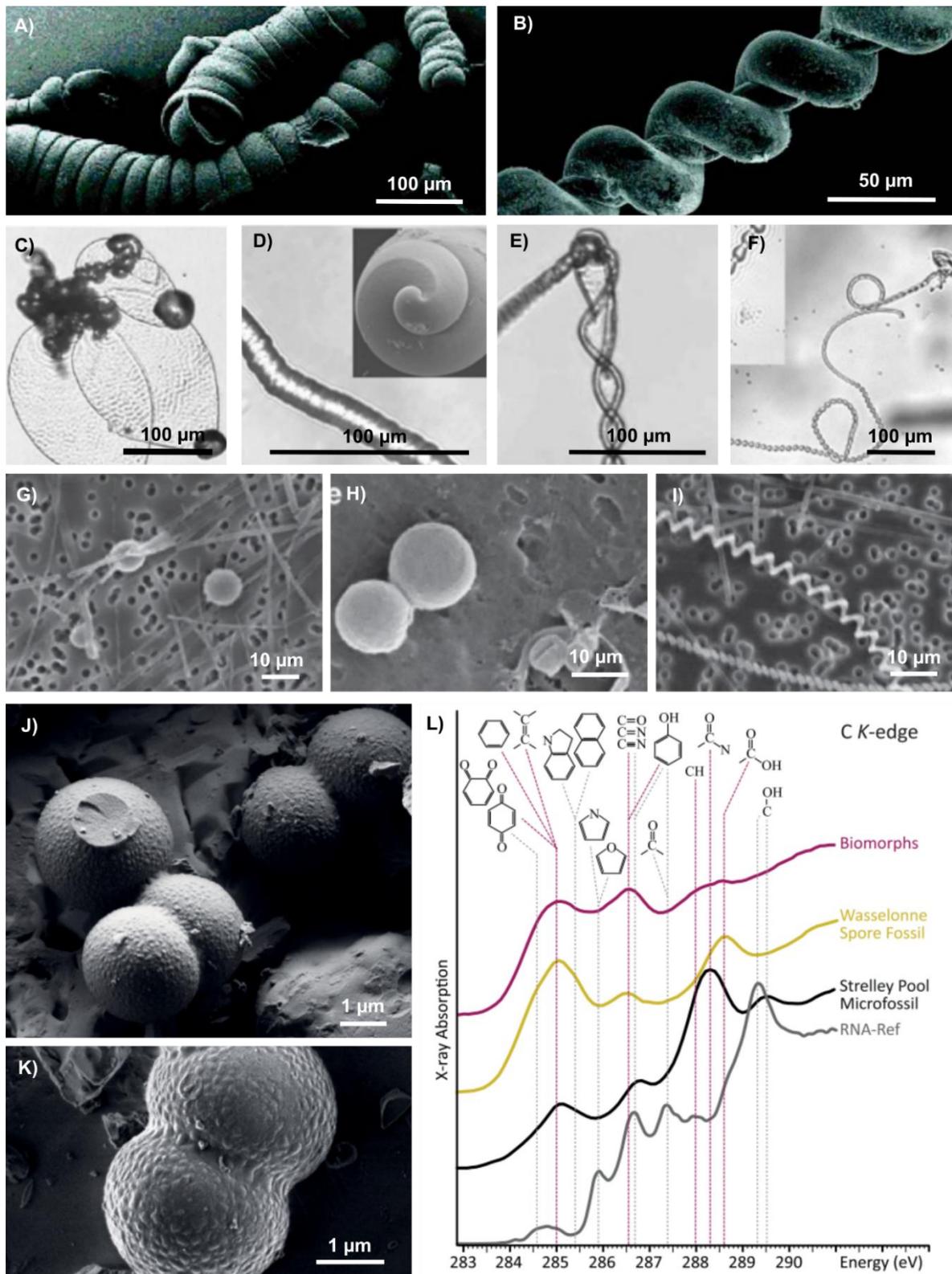


Figure 7 | A) et B) Images MEB de biomorphes inorganiques à base de silice-witherite (Garcia Ruiz et al., 2002). **C) – F)** Formes répandues de biomorphes inorganiques à base de baryum (Knoll et Steinbock, 2018). **G) – I)** Images MEB de différents morphotypes de biomorphes organiques, formés en présence de soufre élémentaire, d'extrait de levure et/ou de peptone (Cosmidis et Templeton, 2016). **J) et K)** Images MEB de biomorphes organiques formés en présence de quartz, d'ARN et d'H₂O à 200°C, 15 bars (Criouet et al., 2021). **L)** Analyses XANES au seuil du carbone des biomorphes organiques et de la référence d'ARN, comparées aux spectres de microfossiles organique de Wasselonne (Bernard et al., 2009) et de Strelley Pool (Alléon et al., 2018) (Criouet et al., 2021).

Toutefois, c'est surtout l'association étroite entre une morphologie complexe et la présence de composés organiques qui entraîne la définition de microstructures comme étant biogéniques (e.g. McLoughlin et Grosch, 2015 ; Neveu, 2018). Il existe pourtant des cas de biomorphes organiques (Fox et Yuyama, 1963 ; Folsome et al., 1975 ; Cosmidis et Templeton, 2016 ; McMahan et Cosmidis, 2022), dont certains remplissent tous les critères couramment utilisés pour identifier des microfossiles organiques dans les roches anciennes (Criouet et al., 2021).

Il existe par exemple des biomorphes carbone-soufre, qui consistent en des objets micrométriques sphériques ou tubulaires (Cosmidis et al., 2016) (Fig 7G à I). Ces biomorphes se forment spontanément via des gradients chimiques complexes, à température ambiante, dans des solutions aqueuses riches en H₂S qui va s'oxyder en présence de molécules organiques dissoutes, y compris des molécules organiques simples telles que la glycine (Cosmidis et Templeton, 2016 ; Cosmidis et al., 2019).

En conditions hydrothermales, des biomorphes organiques peuvent également se former. Criouet et al. (2021) ont constaté la formation de sphères organiques dans un mélange d'ARN, de quartz et d'H₂O à 200°C, en anoxie stricte pendant une vingtaine de jours. Ces sphères, d'un diamètre compris entre 0.5 à 5µm, sont souvent reliées entre elles et semblables à des cellules en cours de division (Criouet et al., 2021) (Fig 7J et K). Qui plus est, leur composition analysée par structure d'absorption des rayons X au seuil du carbone (XANES au seuil du carbone) ressemble davantage à la composition de bactéries ayant subies une dégradation thermique qu'à celle de l'ARN d'origine (Criouet et al., 2021) (Fig 7L).

Par conséquent, la recherche directe de cellules dans les cheminées hydrothermales peut s'avérer problématique. Quelle autre piste avons-nous ?

1.2. Les biosignatures minérales

Identifier des biosignatures, i.e. des traces/preuves univoques de vie, pourraient permettre d'attester de la colonisation de microorganismes dans les parois de la cheminée sans pour autant avoir à observer directement les cellules.

Certaines phases minérales pourraient être utilisées comme biosignatures, quand bien même aucune phase minérale ne constitue, de manière intrinsèque, une biosignature. En effet, il n'existe aucune phase minérale qui ne soit produite que par le vivant (Weiner et Dove, 2003). Ceci dit, les organismes peuvent y imprimer des caractéristiques spécifiques, comme la morphologie, la composition chimique ou la structure cristallographique. L'identification d'une biosignature reposera alors sur l'un ou l'autre de ces critères, indépendamment ou collectivement (Fig 8), même si aucun de ces critères ne permet d'identifier une phase minérale comme d'origine biologique de façon certaine.

Malgré la grande diversité de microorganismes connus et l'ubiquité des biominéraux, il en existe peu qui regroupent une texture, une morphologie et une composition (organique, chimique et/ou isotopique) suffisamment caractéristiques pour que l'on puisse les distinguer de leurs pendants abiotiques. Qui plus est, la chimie de l'environnement peut venir perturber les caractéristiques initiales du biominéral. Pour que la signature soit vraisemblable, les mécanismes de formation et la pertinence biologique de la précipitation doivent être bien documentés.

Ces précautions sont d'autant plus importantes qu'il existe des « biomorphes » ressemblant non pas à des cellules, mais à des structures biominérales comme les coquilles (Fig 9A à D). Ces structures sont à l'origine d'une autre des controverses les plus célèbres sur les traces de vie anciennes : les faux fossiles d'*Eozoön*, supposés foraminifères du Précambrien (revues dans O'Brien, 1970 ; Gould, 1980 ; Dolan, 2022). Cette controverse a commencé en 1858, avec la découverte de structures laminées dans des calcaires des Laurentides (Québec, Canada), interprétées comme des fossiles de foraminifères (Logan, 1864). Cette interprétation a fait l'objet d'un vif débat au XIX^{ème} siècle, opposant ceux qui attribuaient une origine biologique à de telles structures minérales (e.g. Carpenter, 1865 ; Dawson, 1865 ; Dawson, 1879), à ceux qui leur attribuaient une origine abiotique (e.g. King et Rowney, 1866 ; Carter, 1874 ; Mobius, 1878).

La controverse a duré une trentaine d'années, d'une part car les détails organiques de la structure étaient indiscernables, et d'autre part car les structures minérales étaient curieusement régulières. Les partisans de l'*Eozoön* ne parvenaient donc pas à présenter de preuve irréfutable de biogénicité, tout comme les partisans de l'origine abiotique ne parvenaient pas à établir une séquence minéralogique qui en expliquerait la forme particulière. Dans les années 1890, Johnston-Lavis et Gregory ont mis en évidence la présence de structures similaires à celles d'*Eozoön* dans des roches ignées, i.e. éjectées lors d'éruptions volcaniques (Johnston-Lavis et Gregory, 1894), ce qui a mis fin à la controverse, soldée par un consensus autour de l'hypothèse abiotique (Anon, 1895).

La définition d'une biosignature relève donc d'un problème conceptuel. Elle ne peut reposer uniquement sur des critères de biogénicité et nécessite de s'intéresser aux processus abiotiques autant qu'aux processus biologiques.

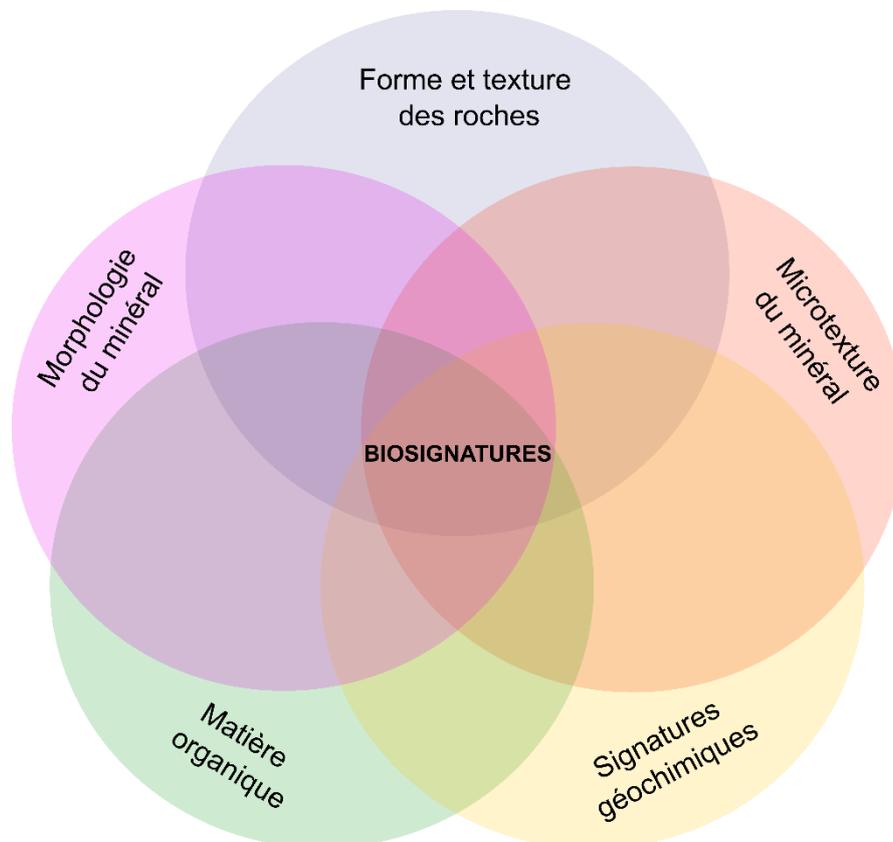


Figure 8 | Une biosignature peut être constituée d'un critère ou d'un ensemble de critères, ici forme et texture des roches (bleu), morphologie globale du minéral (rose), présence de matière organique (vert), signatures géochimiques (jaune) et microtexture des minéraux (orange).

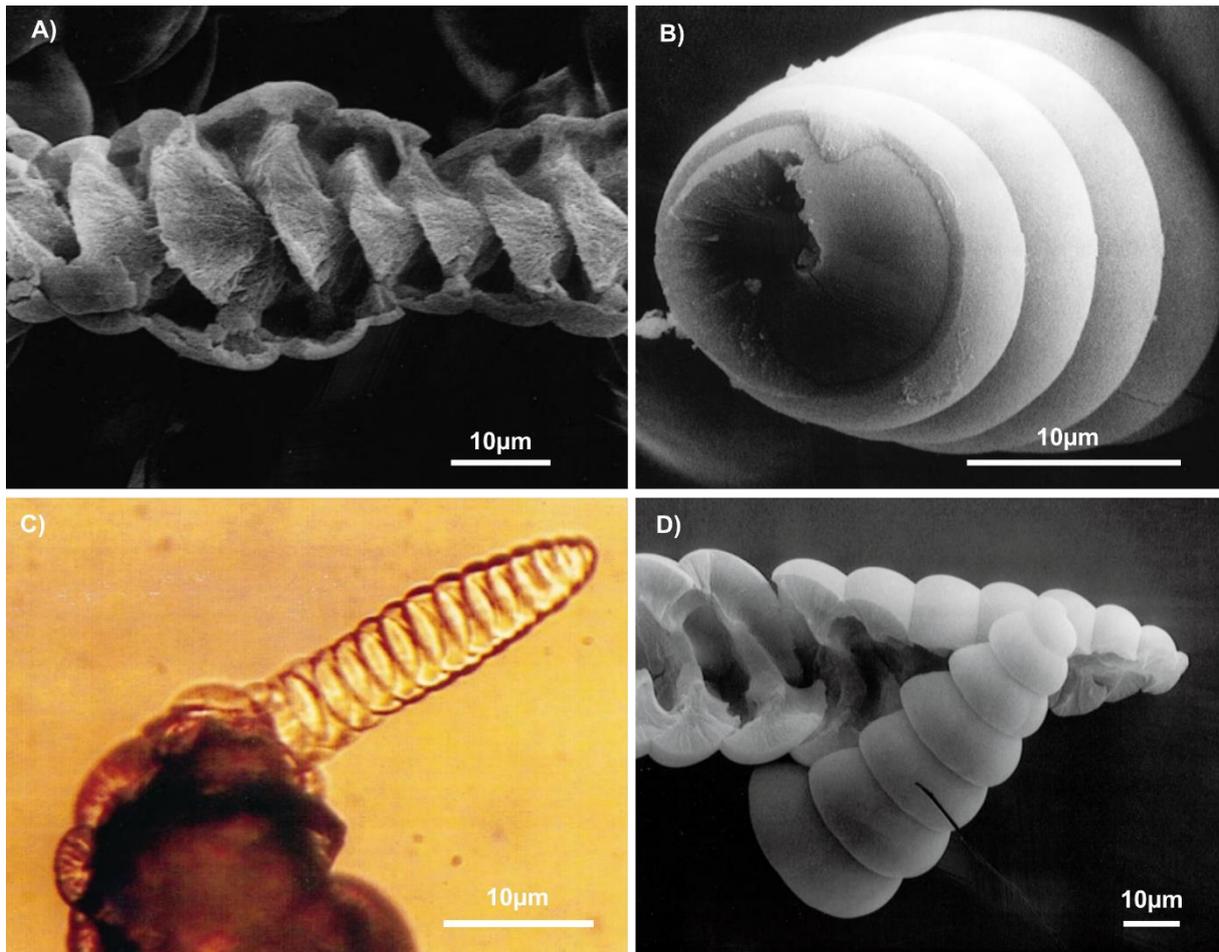


Figure 9 | A) – C) Particules hélicoïdales de carbonate de calcium formées abiotiquement et ressemblant à des coquilles de foraminifères (Gower et al., 1998).

1.3. Les biosignatures : un problème conceptuel

Au fil des années, de nombreux auteurs ont mis en évidence la nature équivoque des principaux critères utilisés pour discuter de la biogénicité des traces de vie supposées dans les roches (e.g. Javaux 2019 ; Bernard et al. 2021 ; McMahon et al., 2021). Le terme "dubiofossile" a même été introduit pour décrire les microstructures archéennes dont l'origine biologique est difficile à déterminer (Awramik et Grey, 2005 ; Sugitani et al., 2007). Un dubiofossile peut donc être soit biologique (microfossile), soit abiotique (biomorphe).

En réalité, l'approche consistant à comparer uniquement une liste de critères entre un objet d'origine biologique connu et un échantillon ne peut jamais suffire à déterminer le caractère biologique. Il n'existe aucun critère univoque de biogénicité d'un minéral. Comme l'expliquent Benzerara et Menguy (2009), il est également indispensable de prendre en compte les processus de formation du minéral ainsi que le contexte environnemental dans lequel il s'est formé, d'une part car les caractéristiques et les processus sont relatifs à l'environnement, et d'autre part car il est indispensable de tester si celui-ci fournit des conditions propices à la vie ou non. Mais dans le cas de la recherche de biosignatures dans des environnements où les conditions propices à la vie sont mal connues, i.e. ici les cheminées hydrothermales, les conditions environnementales ne sont pas nécessairement plus contraignantes qu'une liste de critères.

Il est nécessaire de comprendre les processus abiotiques au même titre que les processus biologiques pour explorer la probabilité que les objets étudiés soient, vraisemblablement, produits par le vivant ou par le non vivant. La conformité d'une biosignature ne dépend donc pas seulement du fait qu'elle ait été produite par la vie, mais aussi du fait que des processus abiotiques ne puissent pas la produire. Il est alors nécessaire de réaliser systématiquement des contrôles abiotiques afin de comprendre ce qui est indispensable à la formation de l'objet, ce qui ne l'est pas, et dans quelle mesure les objets biologiques et abiotiques peuvent se ressembler. Ainsi, plutôt que de cocher une liste de critères en leur attribuant un caractère biologique ou abiotique, il convient de dresser un portrait probabiliste de l'objet.

Awramik et Grey (2005) proposent d'introduire des termes modérateurs aux arguments de biogénicité, à savoir « suggestif », « permissif », persuasif » et « irréfutable », que l'on peut lier à une appréciation probabiliste. Un argument irréfutable ne permet qu'une seule interprétation. Un argument persuasif admet une autre interprétation, mais moins probable. Un argument présomptif admet plusieurs autres interprétations, mais moins probables. Un argument permissif admet plusieurs interprétations équiprobables. Un argument n'est que suggestif lorsque d'autres interprétations sont plus probables. Ainsi, multiplier les arguments apparaît souvent comme une démonstration de robustesse, mais rassembler plusieurs arguments suggestifs, permissifs ou même persuasifs ne leur donne pas pour autant un caractère irréfutable.

Par définition, une biosignature fournit une preuve irréfutable de biogénicité. Or, il n'y a pas de critère irréfutable sur lequel s'appuyer pour discuter de la biogénicité de structures minérales ou organiques. Les biosignatures n'existent donc pas en tant que telles, mais une approche serait de rechercher des traces de vie en se laissant guider par la question suivante : étant donnés les processus de formation et les différentes caractéristiques observées, est-il plus vraisemblable que cet objet ait été formé par le vivant ou par des processus abiotiques ?

En aparté, car ceci n'est pas le sujet de cette thèse, nous pouvons soulever que dans le cadre de la recherche sur les premières traces de vie ou dans un cadre exobiologique, leur identification pourrait être, selon les prérequis actuels, fondamentalement insoluble. En effet, si la vie n'est pas le résultat d'une grande transition de phase entre vivant et non vivant mais émergerait plutôt à partir d'une complexité inorganique puis organique croissante, la question – autant philosophique que scientifique – serait plutôt de savoir à quelle étape doit être placé le curseur de la vie (Mathis et al., 2017 ; Hems, 2019 ; McMahon et al., 2021).

2. La biominéralisation chez les procaryotes

Les caractéristiques d'un minéral permettent donc d'en faire une cible potentielle pour la recherche de biosignatures ; il faudra ensuite chercher à en comprendre les processus de formation. La notion de biominéralisation regroupe l'ensemble des processus par lesquels les organismes vivants forment des minéraux, ces derniers étant qualifiés de biominéraux. Les microorganismes peuvent être impliqués dans la formation d'un grand nombre de minéraux, tels que des carbonates, des phosphates, des silicates, des oxydes, des hydroxydes, des sulfates ou encore des sulfures (Lowenstam, 1981 ; Weiner et Dove, 2003). La biominéralisation se divise en deux grandes catégories : la biominéralisation contrôlée (BCM) (Fig 10A) et la biominéralisation induite (BIM) (Fig 10B) (Lowenstam et Weiner, 1989 ; Frankel et Bazylinsky, 2003 ; Bazylinsky et Frankel, 2003). On peut également mentionner le cas de l'abiominéralisation (ABIM), que nous définirons comme un processus de formation minérale par l'intermédiaire de matière organique d'origine abiotique.

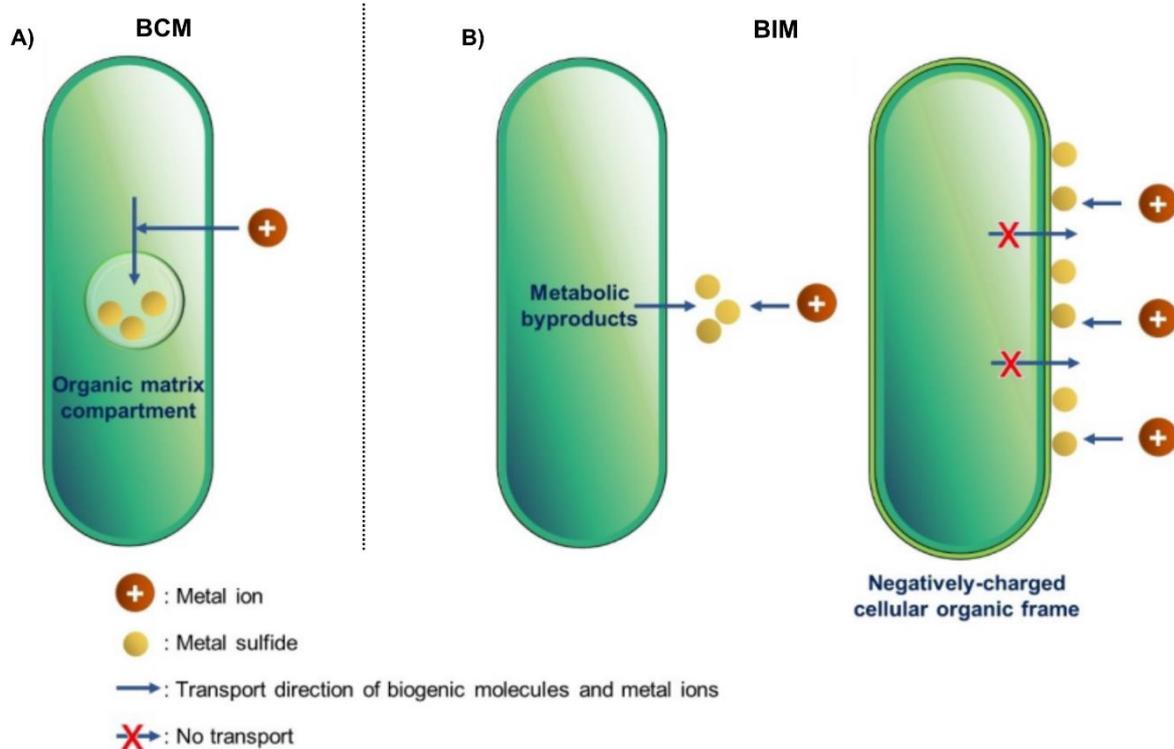


Figure 10 | Représentation schématique des deux formes de biominéralisation. **A)** BCM qui implique des compartiments cellulaires pour la précipitation contrôlée de biominéraux. **B)** BIM réalisée soit par des sous-produits métaboliques réagissant avec les composés de l'environnement, soit lors de réactions entre le substrat cellulaire et les ions métalliques présents dans l'environnement. D'après Park et Faivre, 2021.

2.1. La biominéralisation contrôlée (BCM)

La BCM se définit par la formation, majoritairement intracellulaire chez les procaryotes, de minéraux dont les caractéristiques cristallographiques sont contrôlées par l'organisme. Le microorganisme a un contrôle sur la nucléation, la composition, la morphologie et l'emplacement final du biominéral. Les minéraux issus de BCM sont généralement bien ordonnés sur le plan structural, avec une faible distribution de taille et peuvent présenter des caractéristiques cristallines spécifiques à la souche (revue dans Bazylinski et Frankel, 2003). L'exemple le plus caractéristique de BCM est la formation de magnétosomes par les bactéries magnétotactiques², découvertes en 1975 par Richard Blakemore, qui leur permet de s'orienter selon le champ magnétique (Blakemore, 1975 ; 1982) (Fig 11A et B).

Le magnétosome bactérien consiste en un cristal intracellulaire à domaine magnétique unique, constitué d'un minéral de fer magnétique enveloppé d'une membrane (Balkwill et al., 1980). La membrane du magnétosome comprend une vésicule dans laquelle le magnétosome se nucléarise et se développe par la suite (Gorby et al., 1988 ; Bazylinski et Frankel, 2003).

² Le terme "bactéries magnétotactiques" n'a aucune signification taxonomique et doit être interprété comme un ensemble hétérogène de bactéries qui possèdent le caractère de la magnétotaxie (Bazylinski 1995).

Il existe deux types de bactéries magnétotactiques en fonction de leurs magnétosomes : les types oxyde de fer qui minéralisent des cristaux de magnétite (Fe_3O_4) et les types sulfure de fer qui minéralisent des cristaux de greigite (Fe_3S_4) (e.g. Frankel et al., 1979 ; Mann et al., 1990 ; Heywood et al., 1990 ; Bazylinski et Frankel, 2000a ; Posfai et al., 2013). La synthèse du magnétosome est un processus complexe qui implique un certain nombre d'étapes telles que l'absorption du fer par la cellule, la formation de la vésicule du magnétosome, le transport du fer dans la vésicule du magnétosome et la biominéralisation contrôlée de la magnétite ou de la greigite à l'intérieur de la vésicule du magnétosome (Bazylinsky et Frankel, 2003).

Ces biominéraux présentent des propriétés spécifiques qui permettraient de les distinguer des magnétites/greigites abiotiques (Thomas-Keprta et al., 2000, 2001, 2002). Il a donc été suggéré que ces magnétosomes seraient des biosignatures effectives dans l'enregistrement géologique. A partir des propriétés des magnétosomes, des critères de biogénicité ont été appliqués à des cristaux de magnétite dans la météorite martienne ALH84001 : 25% s'avèrent correspondre aux magnétosomes bactériens (Thomas-Keprta et al. 2000 ; 2001 ; 2002). Tandis que certains y voient une preuve de vie sur Mars, d'autres y voient plutôt la preuve que ces critères ne sont pas suffisamment robustes pour distinguer les cristaux de magnétite produits de manière biotique et abiotique (Buseck et al., 2001).

2.2. La biominéralisation induite (BIM)

La BIM, deuxième grande catégorie de biominéralisation, se définit par l'interaction entre les ions présents dans l'environnement et les produits métaboliques de l'organisme. Il s'agit d'une conséquence incontrôlée de l'activité métabolique qui peut entraîner la dissolution et/ou la précipitation de minéraux. Le métabolisme microbien peut influencer sur l'état d'oxydoréduction des ions aqueux, sur la composition des solutions environnantes en modifiant le pH, par exemple à travers la production d'agents complexants organiques ou inorganiques, ou encore sur l'état de sursaturation du milieu (revue dans Frankel et Bazylinsky, 2003).

Les minéraux formés en tant que sous-produits métaboliques sont généralement nanocristallins en raison de leur précipitation rapide à partir de solutions qui, localement, sont sursaturées. Ils sont souvent caractérisés par une large distribution de taille et l'absence de morphologies cristallines spécifiques. En outre, l'absence de contrôle sur la formation des minéraux peut se traduire par une faible spécificité minérale et/ou l'inclusion d'impuretés dans le réseau cristallin (Frankel et Bazylinsky, 2003). Dans ce cas, le minéral n'a pas de fonctionnalité propre pour l'organisme, ou du moins pas de fonction évidente ; là est certainement la plus grande différence entre les biominéraux issus de BIM et ceux issus de BCM.

Il existe cependant des cas de dépôts intracellulaires de minéraux qui floutent la frontière entre BIM et BCM, ce que Frankel et Bazylinsky (2003) nomment « BIM intracellulaire », et ce que d'autres auteurs proposent de renommer « biominéralisation forcée » (Ehrlich et al., 2021). Cette BIM intracellulaire induit la séquestration de métaux et métalloïdes dissous dans les minéraux.

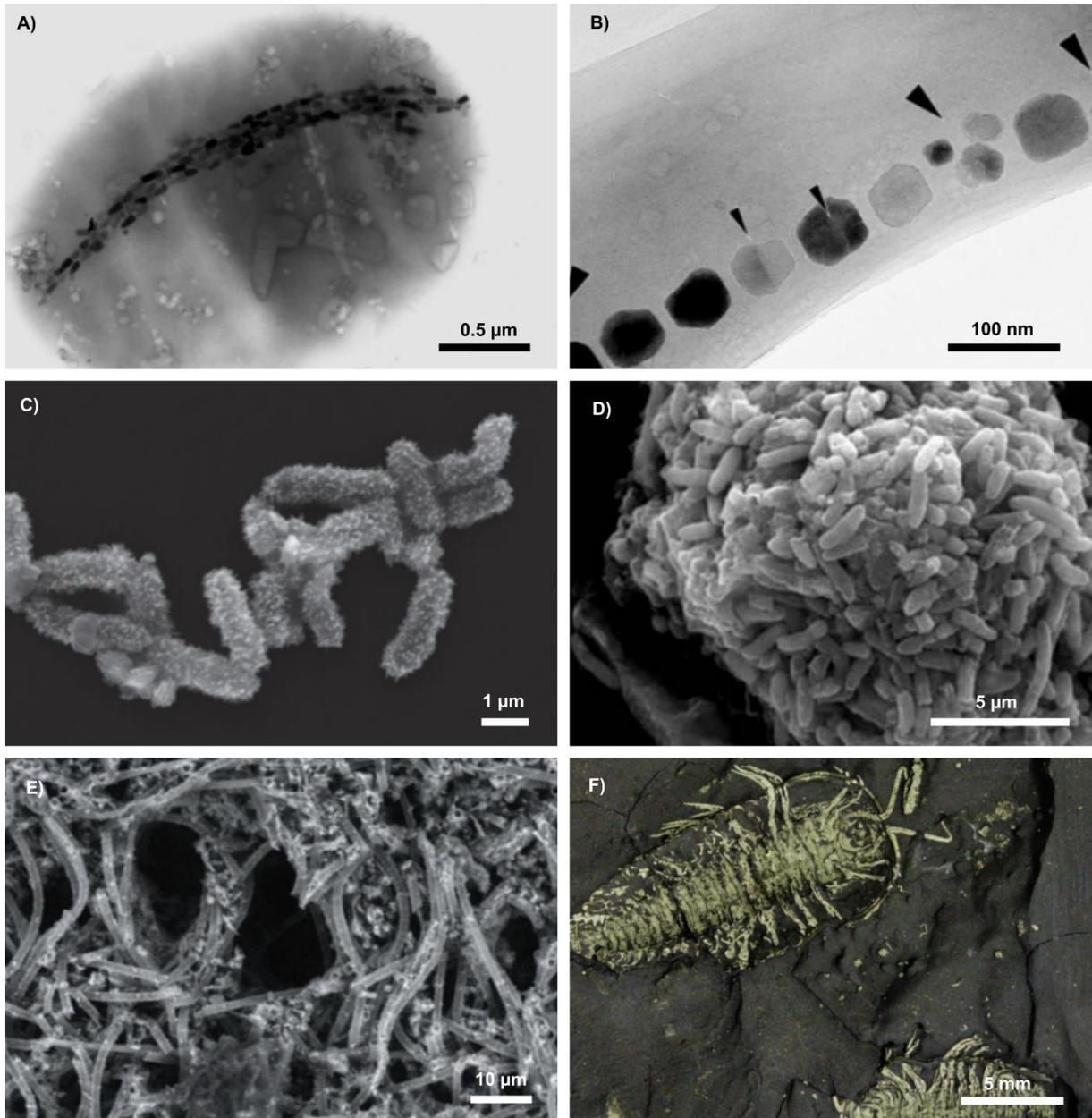


Figure 11 | A) Observation TEM d'une bactérie magnétotactique prélevée dans l'estuaire de la rivière Pettaquamscutt USA (Devouard et al. 1998). **B)** Observation MET des magnétosomes de magnétite de *Magnetospirillum magnetotacticum* (Bazylinski, 2003). **C)** Images MEB de cellules BoFeN1 encroûtées après incubation dans du fer pendant 1 mois (Picard et al., 2016b). **D)** Images MEB de cellules BoFeN1 encroûtées après incubation dans du fer pendant 3 jours (Miot et al., 2014). **E)** Images MEB de cyanobactéries filamenteuses silicifiées, retrouvées dans un stromatolite du Parc National de Yellowstone (Pepe-Ranney et al., 2012). **F)** Vue ventrale de trilobites *Triarthrus eatoni* pyritisés (Farrell et al., 2011).

Par exemple, de nombreuses bactéries possèdent des protéines de stockage du fer connues sous le nom de bactérioferritines (Chasteen et Harrison 1999). Ces protéines intracellulaires contiennent des centres ferroxidases qui catalysent l'oxydation du Fe^{2+} et la nucléation d'un phosphate ferrique amorphe. Le minéral se forme dans une vésicule organique, i.e. l'enveloppe protéique, ce qui suggère une stratégie de stockage du phosphate sous forme minérale, bien que l'organisme ne semble pas contrôler sa composition ou sa cristallinité (Frankel et Bazylinsky, 2003).

Outre la précipitation, la complexation des métaux par des ligands organiques peut favoriser la dissolution d'autres phases insolubles (e.g. Pokrovsky et al., 2009 ; Oelkers et Schott, 1998 ; Welch et Ullman, 1993). Contrairement à la BCM qui produit des biominéraux avec des morphologies reconnaissables, ceux issus de la précipitation spontanée propre à la BIM peuvent présenter des caractéristiques similaires à leurs pendants abiotiques (Frankel et Bazylinsky, 2003).

Les surfaces cellulaires et les polymères dérivés des cellules peuvent également favoriser la nucléation de minéraux et conduire à un encroûtement de tout ou partie de la cellule et/ou conserver les caractéristiques morphologiques de l'organisme (e.g. Miot et al., 2014 ; Kish et al., 2016 ; Picard et al., 2016a ; Picard et al., 2016b ; Gorlas et al., 2022) (Fig 11C à F). De fait, il est connu que les substances polymériques extracellulaires (EPS) ou les parois cellulaires forment des sites d'adsorption favorables à la nucléation de minéraux (Ferris et al., 1987 ; Beveridge, 1989). En plus de la biominéralisation exercée par les organismes vivants, les matrices organiques et les composés hérités de ces organismes peuvent conserver des propriétés minéralisatrices après leur libération dans le milieu (Défarge et al., 2011).

2.3. L'abiominéralisation (ABIM)

Nous proposons le terme abiominéralisation pour désigner les processus de formation minérale qui impliquent des structures et/ou des composés organiques abiotiques. En effet, des composés organiques d'origine abiotiques peuvent eux aussi former des sites d'adsorption favorables à la nucléation de minéraux, en particulier dans des environnements tels que les fumeurs noirs où le lien entre surfaces minérales et matière organique est au cœur d'hypothèses en chimie prébiotique (e.g. Huber et Wächterhauser, 1997 ; Mielke et al., 2011 ; White et al., 2015).

L'interaction peut aussi se faire dans l'autre sens, i.e. les minéraux peuvent altérer chimiquement des composés organiques simples. Il peut y avoir des changements dans la composition des molécules organiques lors de la précipitation des sulfures de fer (Huber et Wächterhauser, 1997). Picard et al., 2021 ont également montré que la précipitation de sulfure de fer peut induire la polymérisation de peptides et d'acides aminés ou peut induire la formation d'oses acides en présence d'hexose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$). Bien que les cheminées hydrothermales ne semblent synthétiser que des hydrocarbures simples comme le méthane (CH_4) (McCollom et al., 2010), la mention de l'abiominéralisation est essentielle afin d'introduire l'importance des substrats abiotiques dans la nucléation hétérogène, l'arrêt ou encore le confinement de la croissance des cristaux (Défarge, 2011).

La formation des minéraux et leurs interactions avec la matière organique sont généralement le résultat d'un ensemble de processus, d'un continuum entre BCM, BIM et ABIM dont les frontières ne peuvent être parfaitement définies. La question n'est donc pas de classer les processus mais de les identifier.

Cette partie sert aussi à illustrer le fait que même si des minéraux contiennent de la matière organique, ils ne peuvent être considérés comme des biosignatures vraisemblables tant que l'origine biologique de leurs composants organiques et leurs mécanismes de formation n'ont pas été démontrés sans équivoque. La question est donc toute simple : pouvons-nous différencier ces minéraux les uns des autres, i.e pouvons-nous différencier les biominéraux des abiominéraux ?

3. Biominéralisation de sulfures de fer

Les sulfures métalliques sont les phases dominantes des fumeurs noirs, en particulier les sulfures de fer. Tandis que de nombreux travaux ont été menés pour comprendre la cinétique et les processus de formation de la pyrite en conditions abiotiques, l'impact des microorganismes dans la précipitation et/ou la dissolution des sulfures de fer hydrothermaux demeure énigmatique (e.g. Benning et al., 2000 ; Rickard et Luther, 2007 ; Rickard, 2012a ; Gartman et al., 2014 ; Matamoros-Veloz et al., 2018). Il est généralement considéré que les sulfures de fer des cheminées hydrothermales sont abiotiques, alors qu'il est possible que la vie ait joué un rôle dans leur précipitation (e.g. Rickard, 1969 ; Gorlas et al., 2018 ; 2022 ; Thiel et al., 2019 ; Duverger, 2020).

3.1 Production de sulfures de fer dans les sédiments de basse température

L'étude du rôle des microorganismes dans la formation des sulfures de fer a surtout été menée en contexte sédimentaire de basse température (< 100°C). De fait, les sulfures de fer de basse température représentent l'écrasante majorité des sulfures de fer à la surface de la Terre et sont, en grande partie, attribuables à l'activité des procaryotes sulfato-réducteurs (SRP) (Trudinger et al., 1985 ; Rickard, 2012b ; Rickard et al., 2017). Les SRP participent à la précipitation de sulfures de fer à travers des processus de biominéralisation induite. En conditions de surface, le soufre et le fer se trouvent dans leur état oxydé, c'est-à-dire sous forme de sulfates (SO_4^{2-}) ou de fer ferrique (Fe^{3+}). Le fer ferrique peut être réduit grâce à de nombreux composés réducteurs d'origine abiotique ou biotique, tels que les composés humiques, les sulfures ou via le métabolisme d'organismes ferriréducteurs (e.g. Jiang et Kappler, 2008 ; Mortimer et al., 2011 ; Esther et al., 2015).

A l'inverse, il n'existe pas de processus capables de réduire les sulfates dans les environnements de basse température, à l'exception de la voie métabolique des SRP (Duverger, 2021). Brièvement, il s'agit d'une voie hétérotrophe qui tire son énergie de l'oxydation de la matière organique. La chaîne respiratoire va transporter les électrons générés par l'oxydation d'un composé organique jusqu'à un composé soufré accepteur d'électrons, les sulfates, qui sont réduits en sulfures (Duverger, 2021). La présence de SRP peut être corrélée à l'enrichissement en sulfures de fer dans certaines zones sédimentaires (e.g. Fortin et al., 1994 ; Labrenz et Banfield, 2004), bien que leur abondance ne soit pas nécessairement liée aux grands gisements de sulfures métalliques. (Picard et al., 2016a).

Des études expérimentales conduites en laboratoire ont montré que les SRP sont impliquées dans la précipitation de sulfures de fer mais rarement de pyrite (Picard et al., 2016a). Dans la majorité des cas, il s'agit de monosulfures de fer proches de la mackinawite, souvent amorphes ou peu cristallisés, qui précipitent rapidement en présence des SRP.

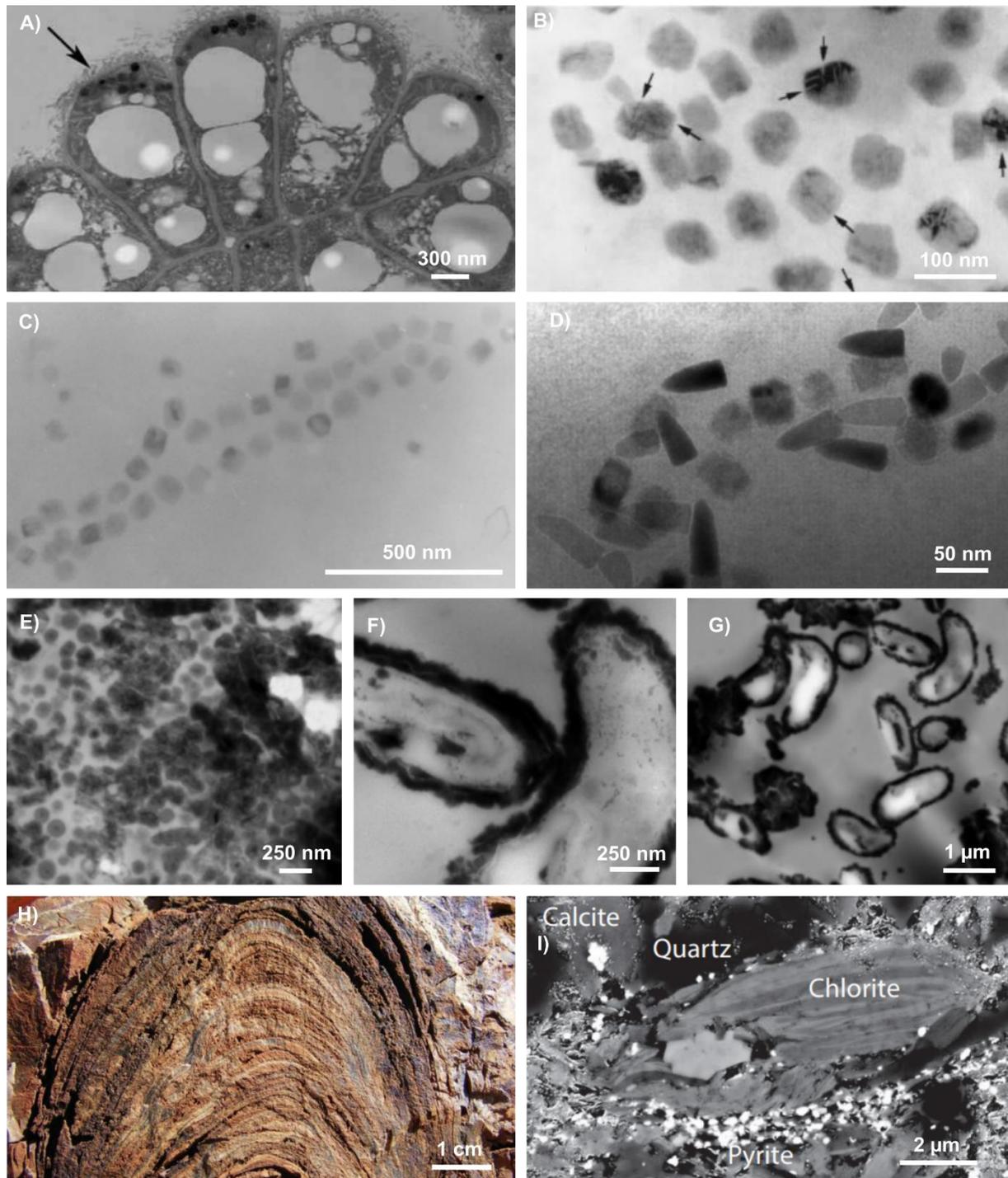


Figure 12 | A) Image TEM de *Candidatus Magnetoglobus multicellularis* montrant les magnétosomes (flèches noires) (Abreu et al., 2008). **B)** Image MET de magnétosomes de greigite cubo-octahédriques. Les flèches noires indiquent des défauts structuraux dans les cristaux (Posfai et al., 1998). **C)** Image MET de magnétosomes en forme de prismes rectangulaires (Bazylinsky et al., 1995). **D)** Image TEM de magnétosomes de magnétite en forme de pointes de flèches et de greigite cubo-octahédriques avec des bordures irrégulières (Lefèvre et al., 2011). **E) - G)** Images TEM de SRB encroûtées dans des sulfures de fer (Picard et al., 2018). **H)** Stromatolite de la formation de Tumbiana en vue longitudinale (Coffey et al., 2013). **I)** Nanopyrites contenues dans les laminations d'un stromatolite de Tumbiana (Marin-Carbone et al., 2018).

Les monosulfures de fer peuvent être associés à de la greigite lorsque les expériences se prolongent pendant plusieurs semaines à plusieurs mois (e.g. Rickard, 1969 ; Watson et al., 2000 ; Gramp et al., 2009 ; Zhou et al., 2014 ; Picard et al., 2018 ; Duverger et al., 2020). Quant à la formation de pyrite, le sulfure de fer le plus stable, elle n'est observée expérimentalement que dans de rares cas, alors même qu'il s'agit de la phase la plus répandue dans les environnements naturels (Rickard, 1969 ; Donald et Southam, 1999 ; Thiel et al., 2019 ; Duverger et al., 2020).

Comme mentionné en partie 2.1, il existe également la formation de greigite intracellulaire médiée par BCM. Les bactéries magnétotactiques productrices de greigite sont des sulfato-réductrices appartenant à l'embranchement des Deltaproteobacteria, parmi lesquelles figure le cas – très – particulier de l'organisme procaryote multicellulaire *Magnetoglobus multicellularis* (Abreu et al., 2007 ; Lefevre et Bazylinsky, 2013) (Fig 12A).

Les magnétosomes de greigite se présentent sous la forme de cubo-octaèdres (Fig 12B) ou de prismes rectangulaires (Fig 12C) avec des bords irréguliers et sont souvent associés à des magnétosomes de magnétite aux formes plus définies et spécifiques (Fig 12D) (Bazylinsky et al., 1995 ; Posfai et al., 1998b ; Park et Faivre, 2022). La distribution de taille des magnétosomes de greigite indique que leur croissance n'est pas aussi strictement contrôlée que celle des cristaux de magnétite (Arato et al., 2005). La pyrrhotite et la pyrite ont été proposées comme phases possibles pour les magnétosomes, mais il s'agissait d'identifications non univoques de la structure cristalline par diffraction électronique (Farina et al., 1990 ; Mann et al., 1990).

D'après les analyses d'échantillons environnementaux réalisées par Posfai et al. (1998a), les données de diffraction suggèrent plutôt la présence de greigite, de mackinawite non magnétique (FeS tétragonal) et potentiellement de monosulfure de fer cubique. L'irrégularité des surfaces, les failles d'empilement et les tensions de réseau trouvées sur les magnétosomes de greigite laissent penser qu'elles proviennent des restes structurels de la mackinawite ; la mackinawite serait donc un précurseur de la greigite, phase finale des magnétosomes (Posfai et al., 1998b).

Toutefois, il est peu probable que ces magnétosomes se retrouvent en grandes quantités dans les minéraux de sulfure de fer des environnements sédimentaires (Posfai et Dunin-Borkowski, 2006 ; Rickard, 2012b). La majeure partie de ces minéraux de sulfure de fer sédimentaires seraient donc d'autres minéraux, majoritairement formés par BIM sous l'influence de produits métaboliques microbiens et/ou des structures cellulaires, qui présentent rarement des morphologies ou des compositions spécifiques (Frankel et Bazylinski, 2003 ; Posfai et Dunin-Borkowski, 2006).

Lorsqu'ils nucléent sur les substrats cellulaires, les biominéraux peuvent incruster tout ou partie de la cellule, conservant ainsi leur morphologie et leurs composés carbonés (e.g. Picard et al., 2018) (Fig12E-G). Ils peuvent aussi avoir une composition isotopique distincte de leurs pendants abiotiques. Pour cela, il est nécessaire de connaître la composition du réservoir de sulfates afin de le comparer aux sulfures produits. Cette approche a par exemple permis de mettre en évidence des traces de sulfato-réduction microbienne grâce à l'étude de nanopyrites contenues dans des stromatolites de la formation de Tumbiana en Australie (Marin-Carbonne et al., 2018) (Fig 12I).

3.2. Biominéralisation dans les fumeurs noirs : qu'en est-il des hyperthermophiles ?

Le rôle des microorganismes dans la formation des sulfures hydrothermaux est vu comme négligeable (Rouxel et al., 2004). Mais une chose est certaine, si des microorganismes sont présent, ils interagissent avec leur environnement minéral en favorisant la dissolution et/ou la précipitation des minéraux. Les interactions peuvent impliquer des cas de BIM avec l'utilisation directe de métaux traces (e.g. Fe, Ni, Co, Zn) dans la production énergétique, ou peuvent être plus passives, comme lorsque de fines particules de fer se lient à la matière organique microbienne (Toner et al., 2009 ; Bennett et al., 2011 ; Wu et al., 2011 ; Holden et al., 2012).

Par exemple, des bactéries ferro-oxydantes telles que la souche mésophile *Mariprofundus ferrooxydans* participent à l'oxydation du Fe(II) dans les zones autour des cheminées < 100°C pour former des oxyhydroxydes de Fe(III) en forme de structures filamenteuses semblables à des tiges (e.g. Emerson et al., 2007 ; Emerson et al., 2010 ; Holden et al., 2012 ; Chan et al., 2016) (Fig13A à D). L'association de ces bactéries et des minéraux forment des tapis microbiens minéralisés qui tapissent les surfaces extérieures des cheminées actives (Emerson et al., 2010 ; Chan et al., 2016). Ces tapis microbiens semblent avoir une structure fonctionnelle liée à l'oxydation chimioautotrophe du Fe car leur architecture varie en fonction du gradient d'oxydation (Chan et al., 2016).

Ces tapis d'oxyhydroxydes de Fe(III) peuvent servir de substrat pour des souches hyperthermophiles ferriréductrices colonisant l'extérieur de la cheminée (Ver Eecke et al., 2009 ; Lin et al., 2014 ; Kashyap et al., 2018). Parmi ces souches, on trouve des archées hyperthermophiles capables de réduire la ferrydrite en magnétite sans aucun intermédiaire (Lin et al. 2014). La caractérisation à l'échelle nanométrique de ces magnétites qui mesurent entre 30 et 100nm révèle des cristaux hexagonaux en forme de plaquettes, une morphologie assez unique considérée comme une biosignature d'(hyper)thermophiles pour certains (Li, 2012 ; Kashyap et al., 2018) (Fig13E à G).

Néanmoins, des magnétites arborant cette morphologie se sont formées lors d'expériences abiotiques menées à 450°C dans un système komatiite³-H₂O-CO₂ (Hao et Li, 2015). La morphologie et les caractéristiques cristallographique ne sont donc pas suffisantes, par contre, l'association de ce morphotype de magnétites et de tapis microbiens minéralisés en oxyhydroxydes, présentant une architecture qu'il est possible de corréliser avec les conditions environnementales, constituerait un indice assez robuste quant à leur biogénicité.

Comme dit plus haut, certaines études ont supposé la présence de vie dans les portions intermédiaires des cheminées (80°C et 150°C). Ces portions seraient colonisées par des procaryotes hyperthermophiles avec un métabolisme lié à la réduction du soufre et/ou des sulfates, en particulier des archées telles que les Thermococcales (Takai et al., 2001 ; Prieur et al., 2004). Des gènes liés à la sulfato-réduction bactérienne ont également été détectés dans les parois externes de cheminées type diffuseur, i.e. caractérisées par un fluide de plus basse température qui circule dans des voies d'écoulement secondaire (Kormas et al., 2006).

³ La komatiite est une roche magmatique à olivine et pyroxène très riche en magnésium. Elle a la particularité d'être quasi exclusive à l'Archéen.

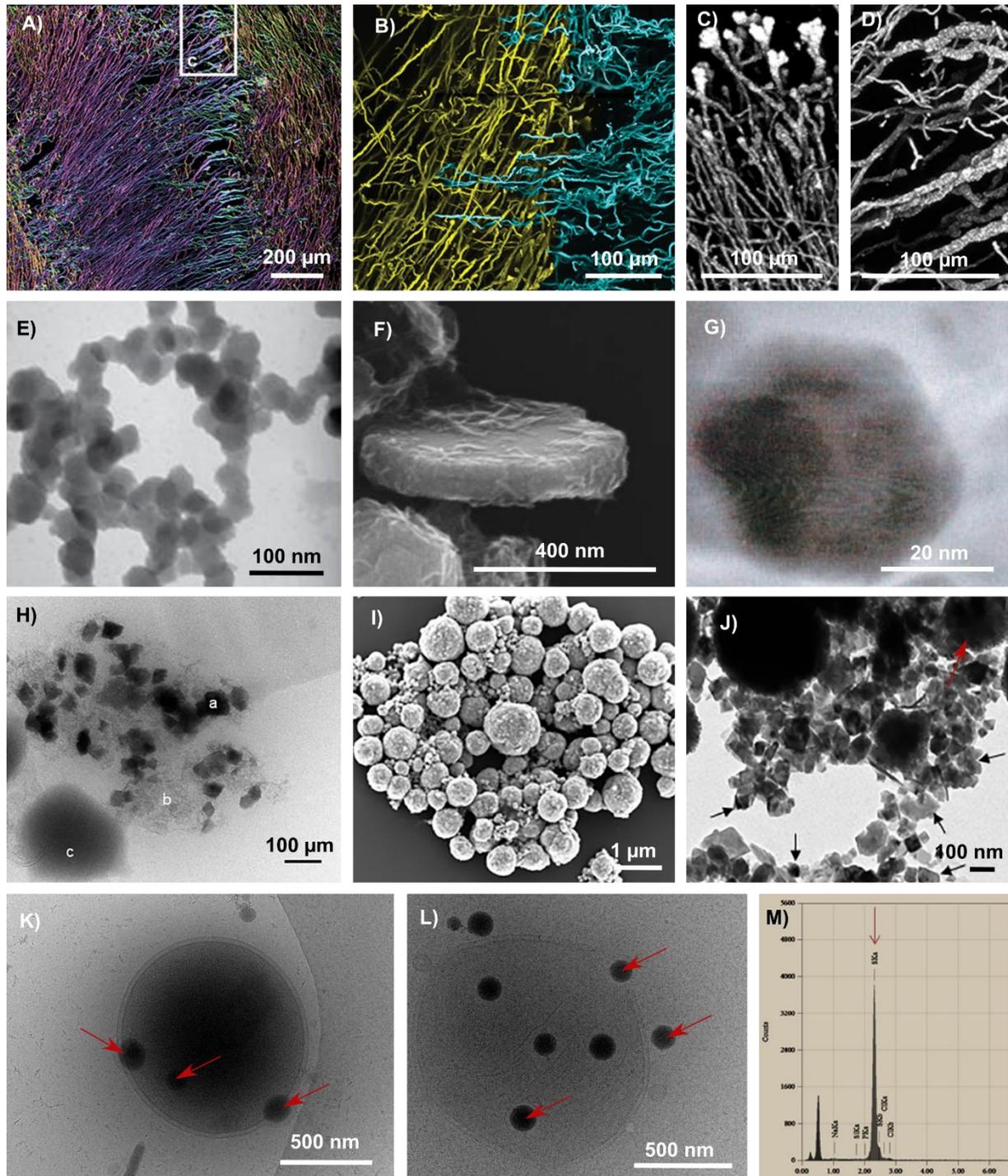


Figure 13 | A-D) Observation au microscope confocal d'un tapis microbien en « caillebotis » de bactéries ferroxydantes minéralisée (Chan et al., 2016). **A)** Les changements de direction des tiges définissent les limites du caillebotis. **B)** Interface entre deux directions de tiges : horizontale (bleu) et verticale (jaune). **C)** et **D)** Observation des filaments minéralisés. **E)** Image MET de magnétites hexagonales produites dans une culture d'archées hyperthermophiles *Pyrodictium delaneyi* (Kashyap et al., 2018). **F)** Image MEB d'une magnétite hexagonale produite dans une culture de bactérie thermophile (Li, 2012). **G)** Magnétite hexagonale observée dans la météorite martienne ALH84001 (Thomas-Keprta, 2000). **H)-J)** Observation MET et MEB de Thermococcales incubées avec du Fe^{2+} . **H)** Image MET de (a) greigites dispersées dans (b) une matrice organique riche en phosphates de fer amorphes à proximité de (c) une vésicule de soufre (Gorlas et al., 2018). **I)** Image MEB de cellules et vésicules minéralisées en pyrite. **J)** Nanocristaux de greigite (flèches noires) et vésicules contenant de la pyrite (flèche rouge) (Gorlas et al., 2018). **K-M)** Images MET de Thermococcales produisant des vésicules de soufre et spectre EDXS associé.

Les compositions isotopiques des sulfures de fer des cheminées ne semblent pas indiquer que le vivant ait joué un quelconque rôle dans leur formation (Rouxel et al., 2004). Pourtant, des études expérimentales conduites par Gorlas et al. (2018) suggèrent que des hyperthermophiles de l'ordre des Thermococcales peuvent contribuer à la formation de sulfures de fer. En soumettant les cellules à un milieu avec une forte concentration en Fe(II) dissous, soluté majeur dans le fluide hydrothermal (Taylor et Konhauser, 2011), il apparaît que les Thermococcales participent à la production rapide de pyrite et de greigite. Les débris cellulaires, chargés de phosphates de fer amorphes, fournissent des substrats pour la nucléation des cristaux de greigite, tandis que les pyrites semblent précipiter à l'intérieur d'anciennes cellules ou vésicules (Fig 13H à J).

Les Thermococcales sont des hétérotrophes anaérobies qui réalisent de la fermentation assistée par le soufre élémentaire. Lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu riche en soufre élémentaire, elles produisent des vésicules contenant du soufre qui ont été interprétées comme des outils de détoxification (Gorlas et al., 2015) (Fig 13K à M). En effet, leur métabolisme réducteur de soufre élémentaire implique une enzyme NAD(P)H sulfur-oxydoréductase (NSR) (e.g. Kobori et al., 2010) qui peut conduire à l'accumulation de soufre dans le cytoplasme suite à une exposition à de fortes concentrations en soufre élémentaire. Cela a par exemple été démontré chez *Pyrococcus furiosus* à partir d'une concentration > 6.4g/L (Schut et al., 2007).

La production de vésicules de soufre permettrait donc de transporter à l'extérieur de la cellule le soufre en excès dans le cytoplasme. Ces vésicules pourraient participer à la production de pyrite en présence de Fe²⁺. Dans ce cas, le réactif d'intérêt dans la formation de la pyrite ne serait pas les sulfures – bien que du H₂S soit produit lors de la fermentation assistée par le soufre (e.g. Schut et al., 2013) – mais le soufre détoxifié par les vésicules, peut-être sous forme de polysulfures ou de soufre colloïdal.

3.3. Séquestration de matière organique par les sulfures de fer

Les matrices minérales peuvent piéger la matière organique (e.g. Keil et Mayer, 2014 ; Hemingway et al., 2019). C'est aussi le cas des sulfures de fer (Berner, 1982 ; Berner et Raiswell, 1983) et les pyrites framboïdales en sont l'illustration emblématique. De fait, les pyrites framboïdales sont souvent associées à des milieux riches en matière organique (e.g. Schallreuter, 1984 ; Bernard et al., 2010 ; Farrell et al., 2011 ; Vietti et al., 2015). Elles se présentent sous la forme d'agrégats sphériques composés de microcristaux euhédriques (Fig 14A à C). Cette texture particulière leur a valu d'être initialement interprétées comme des microorganismes ou des colonies bactériennes fossilisés (e.g. Schneiderhöhn, 1923 ; Bergh, 1928 ; Love, 1957 ; Massad, 1974). Jusqu'à la première synthèse abiotique de framboïdes réalisée par Berner (1969), les pyrites framboïdales étaient considérées comme des biominéraux.

On sait maintenant qu'il ne s'agit pas de biominéraux, ni même d'abiominéraux, car la matière organique ne semble pas nécessaire à leur formation (Ohfuji et Rickard, 2005). Toutefois, on ne sait pas quelle influence peut avoir la matière organique sur leur formation, ou comment celle-ci se retrouve séquestrée à l'intérieur. Etant donnée leur corrélation avec l'activité microbienne dans les sédiments anoxiques, il n'est pas incohérent de penser qu'elles puissent en enregistrer les traces. Des biofilms bactériens ont par exemple été retrouvés dans des framboïdes (McLean et al., 2008 ; Wacey et al., 2015) (Fig 16D et E).

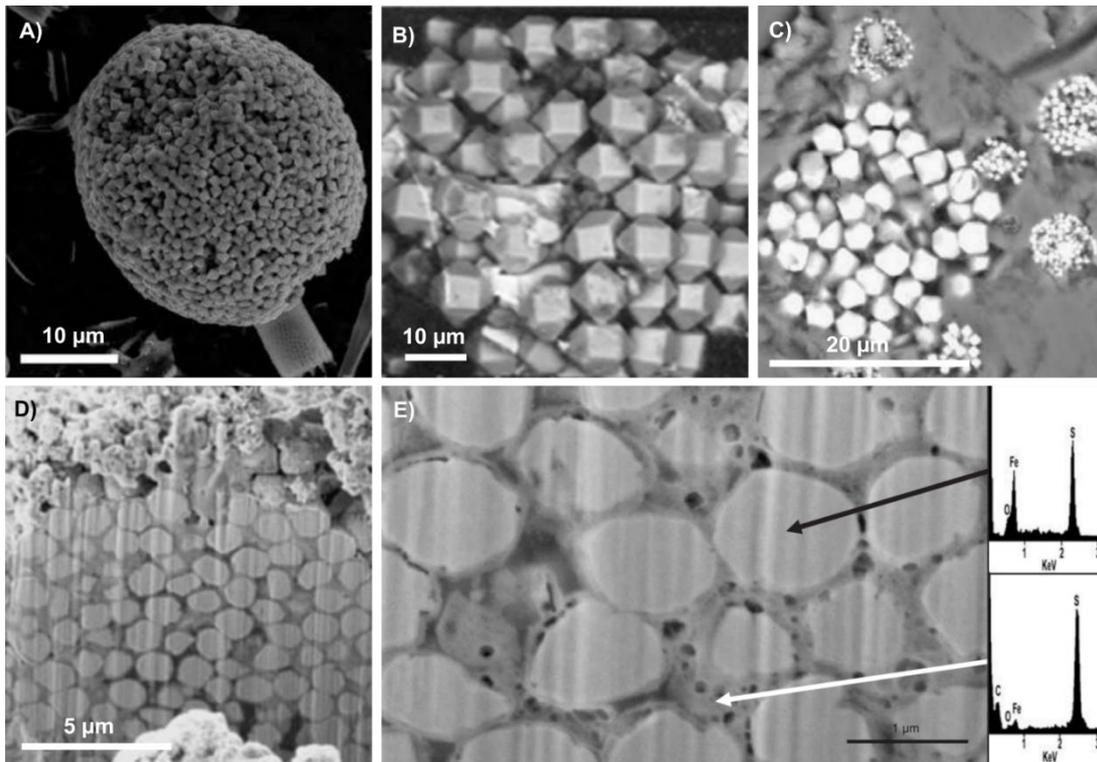


Figure 14 | A) Pyrite framboïdale trouvée dans les sédiments récents du lac Pavin (Busigny et al., 2016). **B)** Microcristaux équi-granulaires disposés en réseau à l'intérieur d'une pyrite framboïdale. Vallée du Nil, sédiments du Maastrichtien supérieur (Soliman et Gorse, 2012). **C)** Amas de framboïdes provenant de sédiments du bassin de Nanpanjiang, Chine, sédiments du Trias inférieur (Tian et al., 2014). **D)** et **E)** Images MEB d'une matrice de carbone piégée entre les microcristaux d'une pyrite framboïdale et **E)** spectres EDXS associés (McLean et al., 2008).

Les phénomènes de biominéralisation peuvent évidemment aussi entraîner la séquestration de matière organique dans des sulfures de fer. Nous avons vu que les SRP interagissent avec le Fe(II) présents dans les sédiments et participent à la précipitation de mackinawite et de greigite (e.g. Rickard et al., 2012b ; Picard et al., 2016a ; Picard et al., 2018). Les SRP peuvent alors se retrouver incrustés dans les minéraux et en influencer la morphologie globale, ce qui suggère des interactions entre la matière organique microbienne et ces sulfures de fer (Picard et al., 2018). Les surfaces cellulaires, qu'il s'agisse de cellules vivantes ou mortes, sont chargées négativement et vont se lier directement avec le Fe^{2+} (Ferris et al., 1987 ; Beveridge, 1989). Il s'agit d'un mécanisme d'association des cations aux groupes fonctionnels du carbone relativement connu qui précède la précipitation de minéraux (e.g. Ferris et al., 1987 ; Beveridge, 1989 ; Chan et al., 2011). La réaction avec les sulfures va ensuite induire la précipitation de sulfures de fer à la surface des cellules. Il existe aussi des interactions qui ne sont pas seulement électrostatiques, comme la formation de liaisons chimiques entre les groupements amines des molécules organiques et les atomes de fer de la mackinawite (Bebić et Schoonen, 2000 ; Plekan et al., 2007 ; Mateo-Martí et al., 2008). Picard et al. (2019) ont d'ailleurs démontré une dominance de matériel protéique sur les sulfures de fer.

Des expériences de précipitation de sulfures de fer en présence de divers composés organiques montrent que la séquestration de composés organiques simples (acides aminés, tryptone ou extraits de levure) est faible comparée à la séquestration de cellules entières (Nabeh et al., 2022). Ainsi la présence de cellules et/ou la structure et l'architecture cellulaires semblent-elles avoir un rôle dans l'augmentation de la quantité de carbone organique séquestré (Nabeh et al., 2022). Par conséquent, outre les caractéristiques morphologiques et texturales des sulfures de fer, la nature et la quantité de carbone organique séquestré pourrait apporter une information primordiale quant à sa biogénicité.

III. Enjeux et stratégie

1. Enjeux

Les portions intermédiaires et extérieures des fumeurs noirs se caractérisent par des gradients fluctuants de pression, d'oxygénation et de température qui peuvent varier subitement, en quelques minutes (Tivey et al. 2002). Des études ont rapporté la présence du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S dans toute l'épaisseur de la cheminée (Schrenk et al., 2003) ainsi que la présence de lipides archéens et bactériens (Blumenberg, 2007). Néanmoins, la colonisation à l'intérieur de la cheminée, la localisation selon le gradient de température et le rôle de ces microorganismes dans la précipitation de minéraux hydrothermaux sont autant de sujets largement méconnus et débattus au sein de la communauté scientifique.

La question de la présence de vie dans les cheminées reste ouverte. Il n'est pas simple d'identifier les microorganismes hyperthermophiles *in situ*. Les adaptations à des facteurs tels que la température ou la pression ne sont donc pour l'instant étudiées que de façon culture-dépendante en laboratoire dans des conditions dites « optimales de croissance ». Ces conditions sont bien éloignées de celles des systèmes hydrothermaux naturels, caractérisés par de fortes concentrations en métaux tels que le fer, le zinc ou le cuivre (Sander et al., 2011 ; Findlay et al., 2015). Qui plus est, l'influence de l'activité cellulaire sur la dissolution et/ou la précipitation de minéraux hydrothermaux n'est pas totalement comprise (e.g. Holden et Adams, 2003 ; Templeton et al., 2009 ; Houghton et Seyfried, 2010), en particulier concernant la formation de la pyrite, un minéral largement connu pour se former en conditions abiotiques (e.g. Yuan et al., 2020).

Certains pensent qu'une part non négligeable des pyrites hydrothermales précipitent du fait de la sulfato-réduction microbienne (Jannasch, 1995), tandis que d'autres suggèrent une contribution faible, voire nulle, de l'activité microbienne dans la formation des pyrites (Rouxel et al., 2004). Du fait de l'abondance des sulfures abiotiques provenant du fluide hydrothermal, l'impact de la biosphère de haute température a longtemps été jugé négligeable.

Il est donc essentiel d'envisager une autre approche afin de pouvoir, avant tout, confirmer que des microorganismes hyperthermophiles colonisent bien les fumeurs noirs. Cela permettra d'apporter des données supplémentaires quant au rôle des microorganismes dans les cheminées hydrothermales. Une piste est d'identifier des biosignatures minérales. Une approche expérimentale, complémentaire d'une caractérisation d'échantillons naturels, pourra permettre de tester si la formation de pyrite biogénique est plausible ou non en conditions hydrothermales. S'il y a formation de pyrite biogénique, il est indispensable de tester si ces minéraux peuvent être discriminés de leurs équivalents abiotiques afin d'ouvrir la voie à la définition de biosignatures minérales de microorganismes hydrothermaux.

Ces biosignatures pourraient permettre de localiser les microorganismes hyperthermophiles dans l'épaisseur de la cheminée pour mieux comprendre leurs interactions avec ces systèmes naturels aux conditions extrêmes et fluctuantes.

2. Stratégie

L'objectif de cette thèse est d'identifier des biosignatures minérales de microorganismes hyperthermophiles, avec toute la complexité qu'implique la notion de biosignature. Une attention particulière est portée sur l'idée que la conformité d'une biosignature ne dépend pas seulement du fait qu'elle ait été produite par le vivant, mais aussi du fait que les processus abiotiques ne puissent pas la produire.

Dans un premier temps, j'ai finement caractérisé le métabolisme de la souche d'archée hyperthermophile choisie pour cette étude (*Thermococcus kodakarensis* KOD1) afin de mieux contraindre les conditions de production des biosignatures minérales. En effet, cette souche présente des métabolismes différents en fonction des sources d'énergie présentes dans le milieu. Afin d'exprimer différentes voies métaboliques, les cellules ont été cultivées dans trois milieux de cultures contenant trois accepteurs d'électrons différents à température optimale de croissance (85°C). Des suivis de croissance ont été réalisés en couplant différentes méthodes de suivi de l'activité cellulaire : comptage cellulaire, mesure de l'ATP, chromatographie en phase gazeuse (GC-TCD) et chromatographie en phase liquide (HPLC).

Dans un second temps, j'ai simulé les conditions typiques des fumeurs noirs afin de documenter les interactions entre les archées et un milieu minéralisant, et de tester la formation de biominéraux. Le milieu hydrothermal simulé consiste en un milieu riche en soufre et en fer. Les cellules y ont été placées pour incubation pendant différentes durées à 85°C afin d'étudier la séquence de production des phases minérales en présence des archées. J'ai caractérisé la morphologie et la cristallographie des minéraux formés au cours des expériences à différentes échelles en combinant des techniques de pointe de la minéralogie : diffraction de rayons X, microscopie électronique à balayage et à transmission et spectroscopie d'absorption des rayons X (soufre et carbone).

En parallèle, j'ai mené des expériences de production de pyrites abiotiques en présence de soufre colloïdal, de fer ferreux et de différents composés organiques tels que des cellules mortes (souche KOD1), des membranes cellulaires uniquement (souche KOD1), de l'extrait de levures ou encore du carbone graphitique, ainsi qu'en absence de composés organiques. Ce panel d'équivalents abiotiques a ensuite été caractérisé avec la même méthodologie que les pyrites produites en présence de cellules vivantes.

Enfin, j'ai étudié des échantillons naturels de fumeurs noirs fournis par l'IFREMER, issus du site hydrothermal TAG (campagne Bicose 2, IFREMER), en cherchant spécifiquement les biosignatures identifiées au cours du travail expérimental mené dans le cadre de cette thèse. J'ai étudié des profils de cheminée de façon à comparer la portion interne au contact direct du fluide hydrothermal, la portion intermédiaire, et la portion externe directement au contact de l'eau de mer. J'ai employé les mêmes techniques de caractérisation que celles utilisées pour les produits expérimentaux, ce qui m'a permis de discuter de la présence de vie au sein des cheminées des fumeurs noirs.

Il sera ensuite essentiel, lors de travaux futurs, de réaliser des mesures isotopiques – en particulier du soufre – sur les sphérules de pyrites formées en présence de cellules vivantes et sur leurs équivalents abiotiques. Cette technique pourrait être un outil puissant pour mettre en évidence l'implication biologique dans ces minéraux. Des expériences d'altération seront également indispensables pour comprendre ce que deviennent ces objets une fois soumis à de forts épisodes de température.

Références

- Abreu F., Martins J.L., Silveira T.S., Keim C.N., de Barros H.G.P.L., Filho F.J.G., Lins U. (2007), 'Candidatus Magnetoglobus multicellularis', a multicellular, magnetotactic prokaryote from a hypersaline environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1318–1322.
- Abreu F., Silva K. T., Farina M., Keim C. N., Lins U. (2008), Greigite magnetosome membrane ultrastructure in 'Candidatus Magnetoglobus multicellularis'. *International Microbiology*, 11(2), 75-80.
- Anantharaman K., Breier J.A. Sheik C. S., Dick G.J. (2013), Evidence for hydrogen oxidation and metabolic plasticity in widespread deep-sea sulfur-oxidizing bacteria. *PNAS USA* 110, 330–335.
- Anon (1895), Eozoon: Requiescat in Pace. *Natural Sciences* 6, 75-76.
- Arató B., Szányi Z., Flies C., Schüler D., Frankel R.B., Buseck P.R., Pósfai M. (2005), Crystal-size and shape distributions of magnetite from uncultured magnetotactic bacteria as a potential biomarker. *American Mineralogist* 90, 1233-1241.
- Awramik S.M., Schopf J.W., Walter M.R (1983), Filamentous Fossil Bacteria from the Archean of Western Australia, eds B. Nagy, R. Weber, J.C. Guerrero, M. Schidlowski, *Developments in Precambrian Geology*, Elsevier 7, 249-266.
- Awramik S. M. et Grey K. (2005), Stromatolites: biogenicity, biosignatures, and bioconfusion. In *Astrobiology and Planetary Missions SPIE 5906*, pp. 227-235.
- Baker E. T., German C. R., Elderfield H. (1995), Hydrothermal plumes over spreading-center axes: Global distributions and geological inferences. *Geophysical Monograph–American Geophysical Union* 91, 47-47.
- Baker B.J., Lesniewski R.A., Dick G.J. (2012), Genome-enabled transcriptomics reveals archaeal populations that drive nitrification in a deep-sea hydrothermal plume. *ISME Journal* 6, 2269–2279.
- Balkwill D.L., Maratea D., Blakemore R.P. (1980), Ultrastructure of a magnetic spirillum. *Journal of Bacteriology* 141, 1399-1408.
- Baross J. A. et Deming J. W. (1985), *Bulletin of the Biological Society of Washington* 6, 355-371.
- Bazyliniski D. (1995), Structure and function of the bacterial magnetosome. *ASM News* 61, 337-343.
- Bazyliniski D., Frankel R., Heywood B.R., Mann S., King J.W., Donaghay P.L., Hanson A.K. (1995), Controlled biomineralization of magnetite (Fe₃O₄) and greigite (Fe₃S₄) in a magnetotactic bacterium. *Applied Environmental Microbiology* 61, 3232-3239.
- Bazyliniski D. et Frankel R. (2000a) Magnetic iron oxide and iron sulfide minerals within organisms. In: *Biomineralization: From Biology to Biotechnology and Medical Application*. Bäuerlein E (ed) Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 25-46.
- Bazyliniski D. et Frankel R. (2003), Biologically Controlled Mineralization in Prokaryotes. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 54 (1), 217–247.
- Beaulieu S. E., Baker E. T., German C. R. (2015), Where are the undiscovered hydrothermal vents on oceanic spreading ridges? *Deep-Sea Research II* 121, 202–212.
- Beaulieu S. E. et Szafranski K. (2018), InterRidge Global Database of Active Submarine Hydrothermal Vent Fields, Version 3.4. World Wide Web Electronic Publication.

- Bebié J. et Schoonen M.A.A. (2000), Pyrite surface interaction with selected organic aqueous species under anoxic conditions. *Geochemical Transactions* 1, 47,
- Becker K. and von Herzen, R.P. (1996). Pre-drilling observations of conductive heat flow at the TAG active mound using ALVIN. In: Humphris, S.E., Herzig, P.M., Miller, D.J. (Eds.), *Proc. ODP Init. Repts.*, 158. College Station, TX (Ocean Drilling Program), 23–29.
- Bennett S. A., Hansman R. L., Sessions A. L., Nakamura K.-I., Edwards K. J. (2011), Tracing iron-fueled microbial carbon production within the hydrothermal plume at the Loihi seamount. *Geochimica Cosmochimica Acta* 75, 5526–5539.
- Benning L., Wilkin R., Barnes H. (2000), Reaction pathways in the Fe–S system below 100°C. *Chemical Geology*, 167, 25–51.
- Benzerara K. et Menguy N. (2009), Looking for traces of life in minerals. *Comptes Rendus Palevol* 8(7), 617–628.
- Bergh S. V. (1928), Fossilifierade svavelbakterier uti alunskiffern på Kinnekulle. *Geologiska Föreningen i Stockholm Förhandlingar* 50(3), 413–418.
- Bernard S., Benzerara K., Beyssac O., Brown G. E. (2010), Multiscale characterization of pyritized plant tissues in blueschist facies metamorphic rocks. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74(17), 5054–5068.
- Bernard S., Jacquemot P., Criouet I., Viennet J. C., Jaber M. (2021), Experimental fossilization of the RNA World in the presence of clay minerals. *Goldschmidt 2021*, 4-9 July.
- Berner R.A. (1982), Burial of organic carbon and pyrite sulfur in the modern ocean: its geochemical and environmental significance. *American Journal of Science* 282, 451–473.
- Berner R.A. et Raiswell R. (1983), Burial of organic carbon and pyrite sulfur in sediments over Phanerozoic time: a new theory. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 47, 855–862.
- Beveridge T. J. (1989), Role of Cellular Design in Bacterial Metal Accumulation and Mineralization. *Annual Review of Microbiology*, 43(1), 147–171.
- Blakemore R.P. (1975), Magnetotactic bacteria. *Science* 190, 377–379.
- Blakemore R.P. (1982), Magnetotactic bacteria. *Annual Review of Microbiology* 36, 217–238.
- Blöch E., Rachel R., Burggraf S., Hafenbradl D., Jannasch H., Setter K., (1997), *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. Nov., represents a novel group of archaea, extending the upper limit for life at 113°C. *Extremophiles* 1, 14–21.
- Blumenberg M., Seifert R., Petersen S., Michaelis W. (2007), Biosignatures present in a hydrothermal massive sulfide from the Mid-Atlantic Ridge, *Geobiology* 5, 435–450.
- Brasier M. D., Green O. R., Jephcoat A. P., Kleppe A. K., Van Kranendonk M. J., Lindsay J. F., Steele A., Grassineau N. V. (2002). Questioning the evidence for Earth's oldest fossils. *Nature* 416, 76–81.
- Brasier M., Green O., Lindsay J. et al. (2004), Earth's Oldest (~ 3.5 Ga) Fossils and the 'Early Eden Hypothesis': Questioning the Evidence. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 34, 257–269.
- Brasier M., Green O., Lindsay J., McLoughlin N., Steele A., Stoakes C. (2005). Critical testing of Earth's oldest putative fossil assemblage from the ~3.5Ga Apex chert, Chinaman Creek, Western Australia. *Precambrian Research* 140, 55–102.
- Brasier M., McLoughlin N., Green O., Wacey D. (2006). A fresh look at the fossil evidence for early Archaean cellular life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361, 887–902.

- Brasier M., Antcliffe J., Saunders M., Wacey D. (2015), Changing the picture of Earth's earliest fossils (3.5–1.9 Ga) with new approaches and new discoveries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 4859-4864.
- Braun D., Goddard N.L., Libchaber A. (2003), Exponential DNA replication by laminar convection. *Physical Review Letters* 91, 158103.
- Buseck P.R., Dunin-Borkowski R.E., Devouard B., Frankel R., McCartney M.R., Midgley P.A., Pósfai M., Weyland M. (2001), Magnetite morphology and life on Mars. *PNAS USA* 98, 13490-13495.
- Busigny V., Jézéquel D., Cosmidis J., Viollier E., Benzerara K., Planavsky N. J., Albéric P., Lebeau O., Sarazin, G., Michard G. (2016), The Iron Wheel in Lac Pavin : Interaction with Phosphorus Cycle. In Sime-Ngando, T., Boivin, P., Chapron, E., Jezequel, D. et Meybeck, M., éditeurs : *Lake Pavin*, pages 205–220. Springer International Publishing, Cham.
- Carpenter W.B. (1865), Additional note on the structure and affinities of *Eozoon canadense*. *The Quarterly journal of the Geological Society of London* 21, 59-66.
- Carter H.F. (1874), On the structure called *Eozoon canadense* in the Laurentian limestone of Canada. *The Annals and magazine of natural history* 4(13), 189-193.
- Chan C.S., Fakra S.C., Emerson D., Fleming E.J., Edwards K.J. (2011), Lithotrophic iron-oxidizing bacteria produce organic stalks to control mineral growth: implications for biosignature formation. *ISME Journal* 5, 717–727.
- Chan C.S., McAllister S.M., Leavitt A.H., Glazer B.T., Krepski S.T., Emerson D. (2016), The architecture of iron microbial mats reflects the adaptation of chemolithotrophic iron oxidation in freshwater and marine environments. *Frontiers in Microbiology* 7, 796.
- Chasteen N.D. et Harrison P.M. (1999), Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *Journal of Structural Biology* 126, 182-194.
- Christie D. M. and Fisher C. R., (2006). Geological, biological, chemical, and physical interactions in back-arc spreading systems – an introduction. In Christie, D. M., et al. (eds.), *Back-Arc Spreading Centers: Geological, Biological, Chemical, and Physical Interactions*. Washington, DC: American Geophysical Union, 1–4.
- Cleaves H.J. (2012), Prebiotic Chemistry: What We Know, What We Don't. *Evolution: Education and Outreach* 5, 342–360.
- Cloud P. (1972), Working model of primitive Earth. *American Journal of Science*, 272 (6), 537.
- Coffey J.M., Flannery D.T., Walter M.R., George S.C. Sedimentology, stratigraphy and geochemistry of a stromatolite biofacies in the 2.72 Ga Tumbiana Formation, Fortescue Group, Western Australia. *Precambrian Research* 236, 282–296.
- Corliss J.B., Baross J.A., Hoffman S.E. (1981), An hypothesis concerning the relationship between submarine hot springs and the origin of life on Earth: *Oceanologica Acta*, Supplement, 59-69.
- Cosmidis J. et Templeton A. (2016), Self-assembly of biomorphic carbon/sulfur microstructures in sulfidic environments. *Nature Communications* 7, 12812.
- Cosmidis J., Nims C.W., Diercks D., Templeton A.S. (2019), Formation and stabilization of elemental sulfur through organomineralization. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 247, 59–82.

- Coutant M., Lepot K., Fadel A., Addad A., Richard E., Troadec D., Javaux E. J. (2022), Distinguishing cellular from abiotic spheroidal microstructures in the ca. 3.4 Ga Strelley Pool Formation. *Geobiology*, 20(5), 599-622.
- Criouet I., Viennet J.-C., Jacquemot P., Jaber M., Bernard S. (2021), Abiotic formation of organic biomorphs under diagenetic conditions. *Geochemical Perspectives Letters* 16, 40 - 46.
- Crowell B.W., Lowell R.P., Von Damm K.L. (2008), A model for the production of sulfur floc and “snowblower” events at mid-ocean ridges. *Geochemistry Geophysics Geosystems* 9, Q10T02.
- Dando P.R., Aliani S., Arab H., Bianchi C.N., Brehmer M., Cocito S., Fowlers S.W., Gundersen J., Hooper L.E., Kölbl R., Kuevere J., Linke P., Makropoulos K.C., Meloni R., Miquel J.-C., Morri C., Müller S., Robinson C., Schlesner H., Sieverts S., Störr R., Stüben D., Thormm M., Varnavas S.P., Ziebiss W. (2000), Hydrothermal studies in the aegean sea, *Physics and Chemistry of the Earth, Part B: Hydrology, Oceans and Atmosphere* 25 (1), 1-8.
- Dawson J.W. (1865), On the structure of certain organic remains in the Laurentian limestones of Canada. *The Quarterly journal of the Geological Society of London* 21, 51-59.
- Dawson J.W. (1879), Mobius on Eozoon Canadense; *Canadian Naturalist* 9, 105-112.
- Défarage C. (2011), Organomineralization. Reitner, J., & Thiel, V. (eds.). *Encyclopedia of Geobiology*, Springer Verlag, 697-701.
- Devouard B., Pósfai M., Hua X., Bazylinski D.A., Frankel R.B., Buseck P.R. (1998), Magnetite from magnetotactic bacteria: size distributions and twinning. *American Mineralogist* 83, 1387-1398.
- Dick G.J. et Tebo B.M. (2010), Microbial diversity and biogeochemistry of the Guaymas Basin deep sea hydrothermal plume. *Environmental Microbiology* 12, 1334–1347.
- Dick G.J., Anantharaman K., Baker B.J., Li M., Reed D.C., Sheik C.S. (2013), The microbiology of deep-sea hydrothermal vent plumes: ecological and biogeographic linkages to seafloor and water column habitats. *Frontiers in Microbiology* 4, 124.
- Dodd M., Papineau D., Grenne T. et al. (2017), Evidence for early life in Earth’s oldest hydrothermal vent precipitates. *Nature* 543, 60–64.
- Dolan J. R. (2022), The saga of the false fossil foram Eozoon. *European Journal of Protistology*, 125955.
- Donald R. et Southam G. (1999), Low temperature anaerobic bacterial diagenesis of ferrous monosulfide to pyrite. *Geochimica Cosmochimica Acta* 63, 2019–2023.
- Duperron S., Bergin C., Zielinski F., Blazejak A., Pernthaler A., McKiness Z.P. DeChaine E., Cavanaugh C.M., Dubilier N. (2006). A dual symbiosis shared by two mussel species: *Bathymodiolus azoricus* and *Bathymodiolus puteoserpentis* (Bivalvia: Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology* 8(8), 1441–1447.
- Duverger A., Berg J. S., Busigny V., Guyot F., Bernard S., Miot J. (2020), Mechanisms of Pyrite Formation Promoted by Sulfate-Reducing Bacteria in Pure Culture. *Frontiers in Earth Science* 8, 588310.
- Duverger (2021), Biominéralisation et diagenèse des sulfures de fer produits par les bactéries sulfato-réductrices : approches expérimentales. Thèse, 275p.
- Edmond J., Measures C. McDuff, Chan L., Collier R., Grant B. (1979), Ridge crest hydrothermal activity and the balances of the major and minor element in the ocean: the Galapagos data, *Earth and Planetary Science Letters* 46, 1-18.

- Edwards K. J., Rogers D. R., Wirsén C. O., McCollom T. M., (2003a). Isolation and characterization of novel psychrophilic, neutrophilic, Fe-oxidizing, chemolithoautotrophic α - and γ -Proteobacteria from the deep sea. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2906–2913.
- Edwards K. J., McCollom T. M., Konishi H., Buseck, P. R., (2003b). Seafloor bioalteration of sulfide minerals: results from in situ incubation studies. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67, 2843–2856.
- Edwards K. J., (2004). Formation and degradation of seafloor hydrothermal sulfide deposits. In Amend, J. P., et al. (eds.), *Sulfur Biogeochemistry: Past and Present*. Boulder, CO: The Geological Society of America, 83–96.
- Edwards K. J., Bach W., McCollom T. M., (2005). Geomicrobiology in oceanography: microbe-mineral interactions at and below the seafloor. *Trends in Microbiology* 13, 449–456.
- Ehrlich H., Bailey E., Wysokowski M., Jesionowski T. (2021), Forced Biomineralization: A Review. *Biomimetics* 6(3), 46.
- Elderfield H. and Schultz A. (1996), Mid-ocean ridge hydrothermal fluxes and the chemical composition of the ocean, *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 24,191–224.
- Emerson D., Rentz J. A., Lilburn T. G., Davis R. E., Aldrich H., Chan C., Moyer C. L. (2007), A novel lineage of proteobacteria involved in formation of marine Fe-oxidizing microbial mat communities. *PloS one*, 2(8), e667.
- Emerson D., Fleming E. J., McBeth J. M. (2010), Iron-oxidizing bacteria: an environmental and genomic perspective. *Annual review of microbiology*, 64, 561-583.
- Emerson D. (2016), The irony of iron–biogenic iron oxides as an iron source to the ocean. *Frontiers in microbiology*, 6, 1502.
- Esther J., Sukla L.B., Pradhan N. et al. (2015), Fe (III) reduction strategies of dissimilatory iron reducing bacteria. *Korean Journal of Chemical Engineering* 32, 1–14.
- Farina M., Esquivel D., de Barros H. (1990), Magnetic iron-sulphur crystals from a magnetotactic microorganism. *Nature* 343, 256–258.
- Farrell U.C., Briggs D.E.G., Gaines R.R. (2011), Paleocology of the Olenid Trilobite *Triarthrus*: New evidence from Beecher’s trilobite bed and site of pyritization. *PALAIOS* 26 (11), 730–742.
- Feely R., Massoth G., Trefry J., Baker E., Paulson A., Lebon G. (1994), Composition and sedimentation of hydrothermal plume particles from north Cleft segment, Juan de Fuca Ridge. *Journal of Geophysical Research* 99, 4985–5006.
- Ferris F., Fyfe W., Beveridge T. (1987), Bacteria as nucleation sites for authigenic minerals in a metal-contaminated lake sediment. *Chemical Geology*, 63(3-4), 225–232.
- Fiala-Médioni A., McKiness Z.P., Dando P., Boulegue J., Mariotti A., Alayse-Danet A.M. et al. (2002), Ultrastructural, biochemical, and immunological characterization of two populations of the mytilid mussel *Bathymodiolus azoricus* from the Mid-Atlantic Ridge: evidence for a dual symbiosis. *Marine Biology* 141, 1035–1043.
- Findlay A., Gartman A., Shaw T., Luther G. (2015), Trace metal concentration and partitioning in the first 1.5m of hydrothermal vent plumes along the Mid-Atlantic Ridge: TAG, Snakepit, and Rainbow, *Chemical Geology* 412, 117-131.

- Flores G.E (2011), Microbial Ecology of Active Marine Hydrothermal Vents Deposits: The Influence of Geologic Setting on Microbial Communities. Dissertations and Theses. Paper 250.
- Flores G.E. et Reysenbach (2011), Hydrothermal Environments, Marine. In: Reitner, J., Thiel, V. (eds) Encyclopedia of Geobiology. Encyclopedia of Earth Sciences Series. Springer, Dordrecht.
- Flores G., Campbell J., Kirshtein J., Meneghin J., Seewald J., Tivey M., Voytek M., Yang Z., Reysenbach A-L. (2011), Microbial community structure of hydrothermal deposits from geochemically different vent fields along the Mid-Atlantic Ridge, *Environmental Microbiology* 13(8), 2158–2171.
- Folsome C. E., Allen R. D., Ichinose N. K. (1975), Organic microstructures as products of Miller-Urey electrical discharges. *Precambrian Research*, 2(3), 263-275.
- Fortin D., Southam G., Beveridge, T. J. (1994), Nickel sulfide, iron-nickel sulfide and iron sulfide precipitation by a newly isolated *Desulfotomaculum* species and its relation to nickel resistance. *FEMS Microbiology Ecology* 14, 121–132.
- Fortunato C., Butterfield D.A., Larson B., Lawrence-Slavas N., Algar C.K., Zeigler Allen L., Holden J.F. (2021), Seafloor Incubation Experiment with Deep-Sea Hydrothermal Vent Fluid Reveals Effect of Pressure and Lag Time on Autotrophic Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 87 (9), e00078-21.
- Fox S. W. et Yuyama S. (1963), Abiotic production of primitive protein and formed microparticles. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 108(2), 487-494.
- Frankel R., Blakemore R.P., Wolfe R.S. (1979), Magnetite in freshwater magnetotactic bacteria. *Science* 203, 1355-1356.
- Frankel R. et Bazyliniski D. (2003), Biologically Induced Mineralization by Bacteria, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 54 (1), 95–114.
- Garcia-Ruiz J. M., Carnerup A., Christy A.G., Welham N.J., Hyde S.T. (2002), Morphology: an ambiguous indicator of biogenicity. *Astrobiology* 2, 353–369.
- Garcia-Ruiz J. M., Hyde S.T., Carnerup A., Christy A.G., Van Kranendonk M., Welham N.J. (2003), Self-assembled silica-carbonate structures and detection of ancient microfossils. *Science* 302, 1194–1197.
- García-Ruiz J. M., Melero-García E., Hyde S. T. (2009), Morphogenesis of self-assembled nanocrystalline materials of barium carbonate and silica. *Science*, 323(5912), 362-365.
- Gartman A., Findlay A. J., Luther G.W. (2014), Nanoparticulate pyrite and other nanoparticles are a widespread component of hydrothermal vent black smoker emissions, *Chemical Geology* 366, 32-41.
- Ghosh B., Bose R., Tang D. (2021), Can coacervation unify disparate hypotheses in the origin of cellular life? *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 52, 101415.
- Gorby Y.A., Beveridge T.J., Blakemore R.P. (1988), Characterization of the bacterial magnetosome membrane. *Journal of Bacteriology* 170, 834-841.
- Gorlas A., Marguet E., Gill S., Geslin C., Guigner J.-M., Guyot F., Forterre P. (2015), Sulfur vesicles from Thermococcales: A possible role in sulfur detoxifying mechanisms. *Biochimie*, 118, 356-364.
- Gorlas A., Jacquemot P., Guigner J.M., Gill S., Forterre P., Guyot F. (2018), Greigite nanocrystals produced by hyperthermophilic archaea of Thermococcales order. *PLoS One* 13: e0201549.

- Gorlas A., Mariotte T., Morey L., Truong C., Bernard S., Guigner J.-M., Oberto J., Baudin F., Landrot G., Baya C., Le Pape P., Morin G., Forterre P., Guyot F. (2022), Precipitation of greigite and pyrite induced by Thermococcales: an advantage to live in Fe- and S-rich environments? *Environmental Microbiology*.
- Gould S.J. (1980), *The Panda's Thumb: More Reflections on Natural History*. Norton & Company, New York, 343.
- Gower L. A. et Tirrell D. A. (1998), Calcium carbonate films and helices grown in solutions of poly (aspartate). *Journal of Crystal Growth*, 191(1-2), 153-160.
- Gramp J. P., Wang H. M., Bigham J. M., Jones F. S., Tuovinen O. H. (2009), Biogenic synthesis and reduction of Fe(III)-hydroxysulfates. *Geomicrobiology Journal* 26, 275–280.
- Grant H. L.J., Hannington M. D., Petersen S., Frische M., Fuchs S. H. (2018), Constraints on the behavior of trace elements in the actively-forming TAG deposit, Mid-Atlantic Ridge, based on LA-ICP-MS analyses of pyrite. *Chemical Geology* 498, 45-71.
- Hao X. et Li Y. (2015), Hexagonal plate-like magnetite nanocrystals produced in komatiite–H₂O–CO₂ reaction system at 450°C. *International Journal of Astrobiology*, 14(4).
- Haymon R. M (1983), Growth history of hydrothermal black smoker chimneys, *Nature* 301 (24), 695-698.
- Heams T. (2019), *Infravies. Le vivant sans frontières*. Editions du seuil.
- Hemingway J.D., Rothman D.H., Grant K.E., et al. (2019), Mineral protection regulates long-term global preservation of natural organic carbon. *Nature* 570, 228–231.
- Heywood B.R., Bazylinski D., Garratt-Reed A.J., Mann S., Frankel R. (1990), Controlled biosynthesis of greigite (Fe₃S₄) in magnetotactic bacteria. *Naturwiss* 77, 536-538.
- Holden J. F. et Adams M. W. (2003), Microbe–metal interactions in marine hydrothermal environments. *Current opinion in chemical biology*, 7(2), 160-165.
- Holden J.F., Breier J.A., Rogers K.L., Schulte M.D., Toner B.M. (2012), Biogeochemical processes at hydrothermal vents: microbes and minerals, bioenergetics, and carbon fluxes. *Oceanography* 25: 196–208.
- Houghton J. et Seyfried Jr. (2010), An experimental and theoretical approach to determining linkages between geochemical variability and microbial diversity in sea floor hydrothermal chimneys. *Geobiology* 8, 457–470.
- Huber C. et Wächtershäuser G. (1997), Activated acetic acid by carbon fixation on (Fe, Ni)S under primordial conditions. *Science* 276, 245–247.
- Jannasch H. W. (1995), Microbial Interactions with Hydrothermal Fluids. Dans Humphris, S. E., et al. (eds.), *Seafloor Hydrothermal Systems: Physical, Chemical, Biological, and Geological Interactions*. Washington, DC: American Geophysical Union, 273-296.
- Javaux E.J. (2019), Challenges in evidencing the earliest traces of life. *Nature* 572, 451–460.
- Jiang J. et Kappler A. (2008), Kinetics of Microbial and Chemical Reduction of Humic Substances : Implications for Electron Shuttling. *Environmental Science & Technology*, 42(10), 3563–3569.
- Johnston-Lavis H.J. et Gregory, J.W. (1894), Eozoonal structure of the ejected blocks of Monte Somma. *Royal Dublin Society* 5, 259-286.
- Jordan S. F., Ramm H., Zheludev I. N., Hartley A. M., Maréchal A., Lane N. (2019), Promotion of protocell self-assembly from mixed amphiphiles at the origin of life. *Nature ecology & evolution*, 3(12), 1705-1714.

- Judd A. et Hoyland M. (2009), *Seabed Fluid Flow: The Impact On Geology, Biology and The Marine Environment*. Cambridge University Press, New York.
- Juniper S.K. et Fouquet Y. (1988), Filamentous iron-silica deposits from modern and ancient hydrothermal sites. *The Canadian Mineralogist* 26, 859–869.
- Juniper S. K. et Tebo B. M. (1995), Microbe-metal interactions and mineral deposition at hydrothermal vents. in “The microbiology of deep-sea hydrothermal vents”, D. Karl, ed. CRC, Boca Raton, 219–253.
- Juniper S.K., Bird D.F., Summit M., Vong M.P., Baker E. T. (1998), Bacterial and viral abundances in hydrothermal event plumes over northern Gorda Ridge, *Deep Sea Research Part II Topical Studies in Oceanography* 45, 2739–2749.
- Kadko D.C., Rosenberg N.D., Lupton J.E., Collier R.W., Lilley M. D. (1995), Chemical-reaction rates and entrainment within the Endeavor Ridge hydrothermal plume. *Earth Planetary Science Letter* 99, 315–335.
- Karl D. M., (1995). *The Microbiology of Deep-Sea Hydrothermal Vents*. New York: CRC Press.
- Kashyap S., Sklute E.C., Dyar M.D., Holden, J.F. (2018), Reduction and morphological transformation of synthetic nanophase iron oxide minerals by hyperthermophilic archaea. *Frontiers in Microbiology* 9, 1550.
- Kasting J. F. (2013), What caused the rise of atmospheric O₂? *Chemical Geology* 362, 13-25.
- Keefe A.D., Newton G.L., Miller S.L. (1995), A possible prebiotic synthesis of pantetheine, a precursor to coenzyme A. *Nature* 373, 683–685
- Keil R.G. et Mayer L.M. (2014), Mineral matrices and organic matter. In: *Treatise on Geochemistry*, 2nd edition, edited by HD Holland and KK Turekian, Elsevier, 337–359.
- King W. et Rowney T. H. (1866), On Eozoon Canadense. *Proceedings of the Royal Irish Academy (1836-1869)* 10, 506-551.
- Kish A., Miot J., Lombard C., Guigner J-M., Bernard S., Zirah S., Guyot F. (2016), Preservation of archaeal surface layer structure during mineralization, *Scientific Report* 6, 26152.
- Knoll P. et Steinbock O. (2018), Inorganic Reactions Self-organize Life-like Microstructures Far from Equilibrium. *Chemical Reaction Engineering, Special Issue: Nonlinear Dynamics* 58(6-7), 682-692.
- Kobori H., Ogino M., Orita I., Nakamura S., Imanaka T., Fukui T. (2010), Characterization of NADH oxidase/NADPH polysulfide oxidoreductase and its unexpected participation in oxygen sensitivity in an anaerobic hyperthermophilic archaeon, *Journal of Bacteriology* 192(19), 5192–5202.
- Köksal E.S., Liese S., Xue L., Ryskulov R., Viitala L., Carlson A., Gözen I. (2020), Rapid Growth and Fusion of Protocells in Surface-Adhered Membrane Networks. *Nano Micro Small* 16(38), 2002529.
- Koonin E.V. (2014), The origins of cellular life. *Antonie van Leeuwenhoek* 106, 27–41.
- Kormas K. A., Tivey M. K., Von Damm K., Teske A. (2006), Bacterial and archaeal phylotypes associated with distinct mineralogical layers of a white smoker spire from a deep-sea hydrothermal vent site (9° N, East Pacific Rise). *Environmental Microbiology*, 8(5), 909-920.
- Kremer B. et Kaźmierczak J. (2017), Cellularly preserved microbial fossils from ~ 3.4 Ga deposits of South Africa: A testimony of early appearance of oxygenic life?. *Precambrian Research*, 295, 117-129.
- Krishnan M., Ugaz V.M., Burns M.A. (2002), PCR in a Rayleigh–Bernard convection cell. *Science* 298, 793.

- Labrenz M. et Banfield J. F. (2004), Sulfate-reducing bacteria-dominated biofilms that precipitate ZnS in a subsurface circumneutral-pH mine drainage system. *Microbiology Ecology* 47, 205–217.
- Lafitte M., Maury R., Perseil E. A. (1984), Analyse Minéralogique de Cheminées à Sulfures de la Dorsale Est Pacifique (13 °N), *Mineralium Deposita* 19, 274-282.
- Lalou C., Thompson G., Rona P. A., Bricchet E., Jehanno C. (1986), Chronology of selected hydrothermal Mn oxide deposits from the transatlantic geotraverse “TAG” area, Mid-Atlantic Ridge 26°N. *Geochimica and Cosmochimica Acta* 50(8), 1737–1743.
- Lam P., Cowen J.P., Jones R.D. (2004), Autotrophic ammonia oxidation in a deep-sea hydrothermal plume. *FEMS Microbiology Ecology* 47, 191–206.
- Lam P., Cowen J.P., Popp B.N., Jones R.D. (2008), Microbial ammonia oxidation and enhanced nitrogen cycling in the Endeavour hydrothermal plume. *Geochimica Cosmochimica Acta* 72, 2268–2286.
- Langmuir C., Humphris S., Fornari D., VanDover C., VonDamm K., Tivey, M., Colodner D., Charlou J.-L., Desonie D., Wilson C., Fouquet Y., Klinkhammer G., Bougault H. (1997), Hydrothermal vents near a mantle hot spot: the Lucky Strike vent field at 37 degrees N on the Mid-Atlantic Ridge. *Earth Planet Science Letter* 148, 69–91.
- Le Bris N. et Gaill F. (2007), How does the annelid *Alvinella pompejana* deal with an extreme hydrothermal environment? *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 6, 197–221.
- Lefevre C.T. et Bazylinski D.A. (2013), Ecology, diversity, and evolution of magnetotactic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77.
- Lesniewski R.A., Jain S., Anantharaman K., Schloss P.D., Dick G. J. (2012), The metatranscriptome of a deep-sea hydrothermal plume is dominated by water column methanotrophs and lithotrophs. *ISME Journal* 6, 2257–2268.
- Li J., Cui J., Yang Q., Cui G., Wei B., Wu Z., et al. (2017). Oxidative weathering and microbial diversity of an inactive seafloor hydrothermal sulfide chimney. *Frontiers in Microbiology* 8, 1–21.
- Li Y.-L. (2012), Hexagonal platelet-like magnetite as a biosignature of thermophilic iron-reducing bacteria and its applications to the exploration of the modern deep, hot biosphere and the emergence of iron-reducing bacteria in early precambrian oceans. *Astrobiology* 12.
- Lilley M., Butterfield D., Olson E. et al. (1993), Anomalous CH₄ and NH₄⁺ concentrations at an unsedimented mid-ocean-ridge hydrothermal system. *Nature* 364, 45–47.
- Lin T., Breves E., Dyar, M.D., Ver Eecke H.C., Jamieson J.W., Holden J.F. (2014), Magnetite formation from ferrihydrite by hyperthermophilic archaea from Endeavour segment, Juan de Fuca ridge hydrothermal vent chimneys. *Geobiology* 12, 200–211.
- Lin T., Ver Eecke H., Breves E., Dyar M., Jamieson J., Hannington M., Dahle H., Bishop J., Lane M., Butterfield D., Kelley D., Lilley M., Baross J., Holden J. (2016), Linkages between mineralogy, fluid chemistry, and microbial communities within hydrothermal chimneys from the Endeavour segment, Juan de Fuca ridge. *Geochemistry Geophysics Geosystems* 17, 300–323.
- Logan W.E. (1864), On organic remains in the Laurentian Rocks of Canada. *American Journal of Science* 37, 272-273.
- López-García P., Gaill F., Moreira D. (2002), Wide bacterial diversity associated with tubes of the vent worm *Riftia pachyptila*. *Environmental Microbiology* 4, 204–215.

- Love L.G. (1957), Micro-organisms and the Presence of Syngenetic Pyrite. *The Quarterly Journal of the Geological Society of London* 113, 429 – 440.
- Lowell R. P. et L. N. Germanovich (2004), Seafloor hydrothermal processes: Results from scale analysis and single-pass models, in *Mid-Ocean Ridges: Hydrothermal Interactions Between the Lithosphere and Oceans*, Geophysical Monograph Series (148), edited by C. R. German, J. Lin, and L. M. Parson, pp. 219–244.
- Lowell R.P., Seewald J.S., Metaxas A. Perfit M.R. (2008), Modeling hydrothermal processes at ocean spreading centers: Magma to microbe—An overview. In *Magma to Microbe: Modeling Hydrothermal Processes at Ocean Spreading Centers* (178) [Geophysical Monograph Series].
- Lowenstam H.A. (1981), Minerals formed by organisms *Science*, 211 (4487), 1126-1131.
- Lowenstam H. A. et Weiner S. (1989). *On Biomineralization*. Oxford: Oxford University Press.
- Ludford E., Palmer M., German C., Klinkhammer, G. (1996), The geochemistry of Atlantic hydrothermal particles. *Geophysical Research Letter* 23, 3503–3506.
- Luther G.W. (1991), Pyrite synthesis via polysulfide compounds. *Geochimica Cosmochimica Acta* 55, 2839–2849.
- Mann S., Sparks N.H.C., Frankel R., Bazylinski D., Jannasch H.W. (1990), Biomineralization of ferromagnetic greigite (Fe₃S₄) and iron pyrite (FeS₂) in a magnetotactic bacterium. *Nature* 343, 258–261.
- Mansy S.S. et Szostak J.W. (2008), Thermostability of model protocell membranes. *PNAS* 105 (36), 13351-13355.
- Marin-Carbonne J., Remusat L., Sforza M. C., Thomazo C., Cartigny P. Philippot P. (2018), Sulfur isotope's signal of nanopyrites enclosed in 2.7 Ga stromatolitic organic remains reveal microbial sulfate reduction. *Geobiology*, 16(2), 121–138.
- Marshall C.P. et Olcott Marshall A. (2013), Raman hyperspectral imaging of microfossils: potential pitfalls *Astrobiology* 13, 920-931.
- Matamoros-Veloz A., Cespedes O., Johnson B.R.G., Stawski T.M., Terranova U., de Leeuw N.H., Benning L.G. (2018), A highly reactive precursor in the iron sulfide system. *Nature Communication* 9, 3125.
- Mateo-Martí E., Briones C., Rogero C., Gomez-Navarro C., Methivier C., Pradier C.M., Martin-Gago J.A. (2008), Nucleic acid interactions with pyrite surfaces. *Chemical Physics* 352, 11-18.
- Mathis C., Bhattacharya T., Walker S. I. (2017), The Emergence of Life as a First Order Phase Transition. *Astrobiology* 17, 266.
- McCauley J. W. et Roy R. (1974), Controlled nucleation and crystal growth of various CaCO₃ phases by the silica gel technique. *American Mineralogist: Journal of Earth and Planetary Materials*, 59(9-10), 947-963.
- 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., Lollar B.S., Lacrampe-Couloume G., Seewald J.S. (2010), The influence of carbon source on abiotic organic synthesis and carbon isotope fractionation under hydrothermal conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74(9), 2717-2740.
- McLean L. C. W., Tyliczszak T., Gilbert P., Zhou D., Pray T. J., Onstott T. C., Southam G. (2008), Blackwell Publishing Ltd A high-resolution chemical and structural study of framboidal pyrite formed within a low-temperature bacterial biofilm. *Geobiology* 6, 471–480.

- McLennan (2008), The supply of heat to mid-ocean ridges by crystallization and cooling of mantle melts. In *Magma to Microbe: Modeling Hydrothermal Processes at Ocean Spreading Centers* (178), eds Lowell, Robert P.; Seewald, Jeffrey S.; Metaxas, Anna; Perfit, Michael R. [Geophysical Monograph Series].
- McLoughlin N. et Grosch E.G. (2015), A hierarchical system for evaluating the biogenicity of metavolcanic- and ultramafic-hosted microalteration textures in the search for extraterrestrial life. *Astrobiology* 15, 901–921.
- McMahon S., Ivarsson M., Wacey D., Saunders M., Belivanova V., Muirhead D., Frost D. A. (2021), Dubiofossils from a Mars-analogue subsurface palaeoenvironment: The limits of biogenicity criteria. *Geobiology*, 19(5), 473-488.
- McMahon S. et Cosmidis J. (2022), False biosignatures on Mars: anticipating ambiguity. *Journal of the Geological Society* 179, jgs2021-050.
- Mielke R.E., Robinson K.J., White L.M., et al. (2011), Iron-sulfide bearing chimneys as potential catalytic energy traps at life's emergence. *Astrobiology* 11, 933–950.
- Miot J., Recham N., Larcher D., Guyot F., Brest J., Tarascon J.-M. (2014). Biomineralized α -Fe₂O₃: Texture and electrochemical reaction with Li Energy. *Environmental Science*, 7(1), 451–460.
- Möbius K. (1878), Der Bau des Eozoon canadense nach eigenen Untersuchungen verglichen mit dem Bau der Foraminifera. *Paleontographica* 35, 175-194.
- Morales G. P. et Delaye L. (2020), Was LUCA a hyperthermophilic prokaryote? The impact-bottleneck hypothesis revisited. *Astrobiology and Cuatro Ciénegas Basin as an Analog of Early Earth*, 75-88.
- Mortimer R. J. G., Galsworthy A. M. J., Bottrell S. H., Wilmot L. E., Newton R. J. (2011), Experimental evidence for rapid biotic and abiotic reduction of Fe (III) at low temperatures in salt marsh sediments: A possible mechanism for formation of modern sedimentary siderite concretions: Iron reduction in salt marsh sediments. *Sedimentology*, 58(6), 1514–1529.
- Morton J.L. et Sleep N.H. (1985), A Mid-Ocean Ridge Thermal Model: Constraints on the volume of axial hydrothermal heat flux. *Journal of Geophysical Research* 90 (B13), 11345-11353.
- Nabeh N., Brokaw C., Picard A. (2022), Quantification of Organic Carbon Sequestered by Biogenic Iron Sulfide Minerals in Long-Term Anoxic Laboratory Incubations. *Frontiers in Microbiology* 13, 662219.
- Naganuma T., Otsuki A., Seki H. (1989), Abundance and growth-rate of bacterioplankton community in hydrothermal vent plumes of the North Fiji Basin. *Deep Sea Research, Oceanographic Research Paper* 36, 1379–1390.
- Nercessian O., Reysenbach A.L., Prieur D., Jeanthon C. (2003), Archaeal diversity associated with in situ samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise (13 degrees N). *Environmental Microbiology* 5, 492-502.
- Neveu M., Hays L.E., Voytek M.A., New M.H., Schulte M.D. (2018), The ladder of life detection. *Astrobiology*, 18, 1375–1402.
- O'Brien C. F. (1970), Eozoön Canadense" The Dawn Animal of Canada". *Isis*, 61(2), 206-223.
- Oelkers E.H., Schott J. (1998), Does organic acid adsorption affect alkali-feldspar dissolution rates? *Chemical Geology* 151, 235-245.
- Park Y. et Faivre D., (2022), Diversity of Microbial Metal Sulfide Biomineralization, *ChemPlusChem* 87(1), 20.

- Pasteris J.D. et Wopenka B. (2003), Necessary, but Not Sufficient: Raman Identification of Disordered Carbon as a Signature of Ancient Life. *Astrobiology* 4(3), 727-738.
- Pepe-Ranney C. Berelson W.M., Corsetti F.A., Treants M., Spear J.R. (2012). Cyanobacterial construction of hot spring siliceous stromatolites in Yellowstone National Park. *Environmental Microbiology* 14(5), 1182–1197.
- Picard A., Gartman A., Girguis P. R. (2016a). What Do We Really Know about the Role of Microorganisms in Iron Sulfide Mineral Formation ? *Frontiers in Earth Science* 4.
- Picard A., Obst M., Schmid G., Zeitvogel F., Kappler A. (2016b), Limited influence of Si on the preservation of Fe mineral-encrusted microbial cells during experimental diagenesis. *Geobiology* 14(3), 276-292.
- Picard A., Gartman A., Clarke D. R., Girguis P. R. (2018), Sulfate-reducing bacteria influence the nucleation and growth of mackinawite and greigite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 220, 367–384.
- Picard A., Gartman A., Cosmidis J., Obst M., Vidoudez C., Clarke D.R., Girguis P.R. (2019), Authigenic metastable iron sulfide minerals preserve microbial organic carbon in anoxic environments. *Chemical Geology* 530, 1–13.
- Picard A., Gartman A., Girguis P.R. (2021), Interactions Between Iron Sulfide Minerals and Organic Carbon: Implications for Biosignature Preservation and Detection. *Astrobiology* 21(5), 587-604.
- Pinti D., Mineau R., Clement V. (2009), Hydrothermal alteration and microfossil artefacts of the 3,465-million-year-old Apex chert. *Nature Geoscience* 2, 640–643.
- Plekan O., Feyer V., Šutara F., Skála T., Švec M., Cháb V., Matolín V., Prince K.C. (2007), The adsorption of adenine on mineral surfaces: iron pyrite and silicon dioxide. *Surface Science* 601, 1973-1980.
- Pokrovsky O. S., Shirokova L. S., Bénézeth P., Schott J., Golubev S. V. (2009), Effect of organic ligands and heterotrophic bacteria on wollastonite dissolution kinetics. *American Journal of Science* 309 (8), 731-772.
- Posfai M., Buseck P. R., Bazylinski D. A., Frankel R. B. (1998a), Reaction sequence of iron sulfide minerals in bacteria and their use as biomarkers. *Science* 280, 880–883.
- Posfai M., Buseck P., Bazylinski D., Frankel R. (1998b), Iron sulfides from magnetotactic bacteria; structure, composition, and phase transitions, *American Mineralogist* 83 (11-12 Part 2), 1469–1481.
- Posfai M. et Dunin-Borkowski R.E. (2006), Sulfides in biosystems. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 61, 679-714
- Posfai M., Lefevre C.T., Trubitsyn D., Bazylinski D.A., Frankel R.B. (2013), Phylogenetic significance of composition and crystal morphology of magnetosome minerals. *Frontiers in Microbiology* 4.
- Prieur D., Erauso G., Geslin C., Lucas S., Gaillard M., Bidault A., Mattenet A.-C., Rouault K., Flament D., Forterre P., Le Romancer M. (2004), Genetic elements of Thermococcales. *Biochemical Society Transactions* 32, 184–187.
- Raiswell R. et Canfield D. E. (2011), The iron biogeochemical cycle past and present. *Geochemical Perspectives* 1, 1–2.
- Rickard D. (1969), The microbiological formation of iron sulphides. *Stockholm Contributions to Geology*, 20, 49–66.
- Rickard D. et Luther G.W. (2007), Chemistry of iron sulfides. *Chemical Reviews* 107, 514–562.
- Rickard D. (2012a), Sulfidic sediments and sedimentary rocks. In *Developments in Sedimentology*, 65. Amsterdam: Elsevier.

- Rickard D. T. (2012b), Microbial sulfate reduction in sediments, in *Developments in Sedimentology*, ed D. T. Rickard (Oxford: Elsevier), 319–351.
- Rickard D., Mussmann M. et Steadman J. A. (2017), Sedimentary Sulfides. *Elements*, 13(2), 117–122.
- Rona P. A., Thompson G., Mottl M. J., Karson J. A., Jenkins W. J., Graham D., Mallette M., Von Damm K., Edmond J. M. (1984), Hydrothermal Activity at the Trans-Atlantic Geotraverse Hydrothermal Field, Mid-Atlantic Ridge Crest at 26°N, *Journal of Geophysical Research* 89(B13), 11365-11377.
- Rona P. A., Klinkhamert G., Nelsen T. A., Trefry J. H., Elderfield H. (1986), Black smokers, massive sulphides and vent biota at the Mid-Atlantic Ridge, *Nature* 321, 33-37.
- Rona P. A., Hannington M. D., Raman C. V., Thompson G., Tivey M. K., Humphris S. E., Lalou C., Petersen S. (1993), Active and relict seafloor hydrothermal mineralization at the TAG hydrothermal field Mid-Atlantic Ridge, *Economic Geology* 18, 1989–2017.
- Rouillard J., García-Ruiz J. M., Kah L., Gérard E., Barrier L., Nabhan S., Van Zuilen M. A. (2020), Identifying microbial life in rocks: Insights from population morphometry. *Geobiology*, 18(3), 282-305.
- Rouxel O., Fouquet Y., Ludden J.N. (2004), Subsurface processes at the Lucky Strike hydrothermal field, Mid-Atlantic Ridge: evidence from sulfur, selenium, and iron isotopes. *Geochimica Cosmochimica Acta* 68, 2295–2311.
- Sander S., Koschinsky A. (2011), Metal flux from hydrothermal vents increased by organic complexation. *Nature Geoscience* 4, 145–150.
- Schallreuter R. E. (1984), Framboidal Pyrite in Deep-Sea Sediments. In *Initial Reports of the Deep Sea Drilling Project U.S. Government Printing Office* 75, 875–891.
- Schopf J. W. et Packer B. M. (1987), Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia. *Science* 237, 70–73.
- Schopf J. W. (1993), Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science* 260, 640–646.
- Schopf J. W., Kudryavtsev A.B., Agresti D. et al. (2002), Laser–Raman imagery of Earth's earliest fossils. *Nature* 416, 73–76.
- Schopf J.W. (2006), Fossil evidence of Archaean life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 361, 869-885.
- Schopf J.W., Kudryavtsev A.B., Czaja A.D., Tripathi A.B. (2007), Evidence of Archaean life: stromatolites and microfossils. *Precambrian Research* 158, 141-155.
- Schopf J. W. et Kudryavtsev A.B (2009), Confocal laser scanning microscopy and Raman imagery of ancient microscopic fossils. *Precambrian Research* 173(1–4), 39-49.
- Schneiderhöhn H. (1923), Chalkographische untersuchung des mansfelder kupferschiefers. *Neues Jahrbuch für Mineralogie. Geologie und Paläontologie* 47, 1–38.
- Schrenk M., Kelley D., Delaney J., Baross J. (2003), Incidence and diversity of microorganisms within the walls of an active deep-sea sulfide chimney, *Applied and Environmental Microbiology* 69 (6), 3580–3592.
- Schut G. J., Bridger S. L., Adams M. W. W. (2007). Insights into the metabolism of elemental sulfur by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: characterization of a coenzyme A-dependent NAD(P)H sulfur oxidoreductase. *Journal of Bacteriology* 189, 4431–4441.

- Schut, G., Boyd, E., Peters, J. and Adams, M. (2013), The modular respiratory complexes involved in hydrogen and sulfur metabolism by heterotrophic hyperthermophilic archaea and their evolutionary implications. *FEMS Microbiology Reviews* 37, 182–203.
- Scott S. (1997), Submarine hydrothermal systems and deposits. *Geochemistry of Hydrothermal Ore Deposits*, 797–875.
- Seyfried W. E. Jr. and Mottl M. J., (1995). Geologic setting and chemistry of deep-sea hydrothermal vents. In Karl, D. M. (ed.), *The Microbiology of Deep-Sea Hydrothermal Vents*. New York: CRC Press, 1–34.
- Soliman M. et Goresy A. (2012), Framboidal and idiomorphic pyrite in the upper Maastrichtian sedimentary rocks at Gabal Oweina, Nile Valley, Egypt: Formation processes, oxidation products and genetic implications to the origin of framboidal pyrite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 90, 195–220.
- Spiess F. N., Macdonald K. C., Atwater T., Ballard R., Carranza A., Cordoba D., Cox C., Diaz Garcia V. M., Francheteau J., Guerrero J., Hawkins J., Haymon R., Hessler R., Juteau T., Kastner M., Larson R., Luyendyk B., Macdougall J. D., Miller S., Normark W., Orcutt J., Rangin C. (1980), East Pacific Rise: Hot Springs and Geophysical Experiments, *Science* 207 (4438), 1421–1433.
- Stein C. et Stein S. (1994), Constraints on hydrothermal Heat-Flux through the oceanic lithosphere from global heat-flow. *Journal of Geophysical Research* 99, 3081–3095.
- Sugitani K., Grey K., Allwood A., Nagaoka T., Mimura K., Minami M., Walter M. R. (2007), Diverse microstructures from Archaean chert from the Mount Goldsworthy–Mount Grant area, Pilbara Craton, Western Australia: microfossils, dubiofossils, or pseudofossils?. *Precambrian Research*, 158(3-4), 228–262.
- Szostak, J., Bartel D., Luisi P. (2001), Synthesizing life. *Nature* 409, 387–390.
- Takai K., Horikoshi K. (1999), Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics* 152, 1285–1297.
- Takai K., Komatsu T., Inagaki F., Horikoshi K. (2001), Distribution of Archaea in a black smoker chimney structure. *Applied Environmental Microbiology* 67, 3618–3629.
- Takai K., Nakagawa T., Reysenbach A.L., Hoek J. (2006), Microbial ecology of Mid-Ocean Ridges and Back-Arc Basins. In *Back-Arc Spreading Systems: geological, biological, chemical, and physical interactions*. Christie D.M., Fisher C.R., Sang-Mook L., Givens S. (eds). Washington, DC: American Geophysical Union, 185–213.
- Taylor K.G. et Konhauser K.O. (2011), Iron in earth surface systems: a major player in chemical and biological processes. *Elements* 7, 83–88.
- Thatje S., Marsh L., Roterman C. N., Mavrogordato M. N., Linse K. (2015), Adaptations to Hydrothermal Vent Life in *Kiwa tyleri*, a New Species of Yeti Crab from the East Scotia Ridge, Antarctica. *PLoS ONE* 10(6): e0127621.
- Thiel J., Byrne, J.M. Kappler, A. Schink, B., Pester M. (2019), Pyrite formation from FeS and H₂S is mediated through microbial redox activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 116, 6897–6902.
- Thomas-Keprta K.L., Clemett S.J., Bazylinski D., Kirschvink J.L., McKay D.S., Wentworth S.J., Vali H., Gibson Jr. E.K., McKay M.F., Romane C.S. (2000), Elongated prismatic magnetite (Fe₃O₄) crystals in ALH84001 carbonate globules: potential Martian magnetofossils. *Geochimica Cosmochimica Acta* 64, 4049–408.

- Thomas-Keprta K.L., Clemett S.J., Bazylinski D., Kirschvink J.L., McKay D.S., Wentworth S.J., Vali H., Gibson Jr.E.K., McKay M.F., Romane C.S. (2001), Truncated hexa-octahedral magnetite crystals in ALH84001: presumptive biosignatures. *PNAS USA* 98, 2164-2169.
- Thomas-Keprta K.L., Clemett S.J., Bazylinski D., Kirschvink J.L., McKay D.S., Wentworth S.J., Vali H., Gibson Jr.E.K., McKay M.F., Romane C.S. (2002), Magnetofossils from ancient Mars: a robust biosignature in the Martian meteorite ALH84001. *Applied Environmental Microbiology* 68, 3663-3672.
- Thompson G., Mottl M. J., Rona P. A. (1985), Morphology, Mineralogy and Chemistry of Hydrothermal Deposits from the TAG Area, 26°N Mid-Atlantic Ridge. *Chemical Geology* 49, 243-257.
- Thompson G., Humphris S. E., Schroeder B., Sulanowska M. (1988), Active Vents and Massive Sulfides at 26°N (TAG) and 23°N (Snake Pit) on the Mid-Atlantic Ridge. *Canadian Mineralogist* 26, 697-711.
- Tian L., Tong J., Algeo T.J., Song H., Song H., Chu D., Shi L., Bottjer D.J. (2014), Reconstruction of Early Triassic ocean redox conditions based on framboidal pyrite from the Nanpanjiang Basin, South China. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 412, 68-79.
- Tivey M.A., Bradley A. M., Joyce T. M., Kadko D. (2002), Insights into tide-related variability at seafloor hydrothermal vents from time-series temperature measurements. *Earth and Planetary Science Letters* 202, 693-707.
- Toner B. M., Fakra S. C., Manganini S. J., Santelli C. M., Marcus M. A., Moffett J. W., et al. (2009), Preservation of iron(II) by carbon-rich matrices in a hydrothermal plume. *Natural Geosciences* 2, 197–201.
- Trudinger P. A., Chambers L. A., Smith J. W. (1985), Low-temperature sulphate reduction: biological versus abiological. *Can. J. Earth Sci.* 22, 1910–1918.
- Ueno Y., Isozaki Y., Yurimoto H., Maruyama S. (2001), Carbon isotopic signatures of individual Archean microfossils(?) from Western Australia. *International Geology Review* 43, 196–212.
- Van Dover C. L. (2000), *The Ecology of Deep-Sea Hydrothermal Vents*. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Van Dover C.L., Arnaud-Haond S., Gianni M., Helmreich S., Huber J.A., Jaeckel A.L., Metaxas A., Pendleton L.H., Petersen S., Ramirez-Llodra E., Steinberg P.E., Tunnicliffe V., Yamamoto H. (2018), Scientific rationale and international obligations for protection of active hydrothermal vent ecosystems from deep-sea mining, *Marine Policy* 90, 20-28.
- Van Dover C. (2019), Inactive Sulfide Ecosystems in the Deep Sea: A Review. *Frontiers in Marine Sciences, Deep-Sea Environments and Ecology* 6, 461.
- Ver Eecke H.C., Kelley D.S., Holden J.F. (2009), Abundances of hyperthermophilic autotrophic Fe(III) oxide reducers and heterotrophs in hydrothermal sulfide chimneys of the northeastern Pacific Ocean. *Appl Environmental Microbiology* 75, 242–245.
- Vietti L. A., Bailey J. V., Fox D. L., Rogers R. R. (2015), Rapid formation of framboidal sulfides on bones surfaces from a simulated marine carcass fall. *PALAIOS* 30(4), 327–334.
- Wacey D., Saunders M., Kong C., Brasier A., Brasier M. (2016). 3.46 Ga Apex chert ‘microfossils’ reinterpreted as mineral artefacts produced during phyllosilicate exfoliation. *Gondwana Research* 36, 296–313.
- Wacey D., Eiloart K., Saunders M. (2019), Comparative multi-scale analysis of filamentous microfossils from the c. 850 Ma Bitter Springs Group and filaments from the c. 3460 Ma Apex chert. *Journal of the Geological Society* 176 (6): 1247–1260.

- Wächtershäuser G. (1988), Pyrite Formation, the First Energy Source for Life: a Hypothesis. *Systematic and Applied Microbiology* 10:207–210.
- Wächtershäuser G. (1990), Evolution of the first metabolic cycles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 200–204.
- Wächtershäuser G. (1992), Groundworks for an evolutionary biochemistry: The iron-sulphur world. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 58(2), 85–201.
- Walker J.C.G. (1977), *Evolution of the Atmosphere*. Macmillan, New York.
- Watson J. H. P., Cressey B. A., Roberts A. P., Ellwood D. C., Charnock J. M., Soper A. K. (2000), Structural and magnetic studies on heavy-metal-adsorbing iron sulphide nanoparticles produced by sulphate-reducing bacteria. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 214, 13–30.
- Weiner S. et Dove P.M. (2003), An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 54, 1-29.
- Welch S.A., Ullman W.J. (1993), The effect of organic acids on plagioclase dissolution rates and stoichiometry. *Geochimica Cosmochimica Acta*, 57, 2725- 2736.
- Wheat C., Jannasch W., Plant, J., Moyer C, Sansone F., McMurtry G. (2000), Continuous sampling of hydrothermal fluids from Loihi Sea mount after the 1996 event, *Journal of Geophysical Research* 105, 19353–19367.
- White L.M., Bhartia R., Stucky G.D., et al. (2015), Mackinawite and greigite in ancient alkaline hydrothermal chimneys: identifying potential key catalysts for emergent life. *Earth and Planetary Science Letters* 430, 105–114.
- Winn C., Karl D., Massoth, G. (1986), Microorganisms in deep-sea hydrothermal plumes. *Nature* 320, 744–746.
- Wu J., Wells M. L., Rember R. (2011), Dissolved iron anomaly in the deep tropical–subtropical Pacific: evidence for long-range transport of hydrothermal iron. *Geochimica Cosmochimica Acta* 75, 460–468.
- Yuan Y., Wang L., Gao L. (2020), Nano-Sized Iron Sulfide: Structure, Synthesis, Properties, and Biomedical Applications, *Frontiers in Chemistry* 8 (818).
- Yücel M., Gartman A., Chan C.S., Luther G.W. (2011), Hydrothermal vents as a kinetically stable source of iron-sulphide-bearing nanoparticles to the ocean, *Natural Geoscience* 4, 367-371.
- Zhou C., Vannela R., Hayes K. F., Rittmann B. E. (2014), Effect of growth conditions on microbial activity and iron-sulfide production by *Desulfovibrio vulgaris*. *Journal of Hazardous Materials* 272, 28–35.

Chapitre II

Matériels et méthodes

I. Matériels, dispositifs et protocoles expérimentaux

1. Souche modèle : *Thermococcus kodakarensis* (KOD1)

L'ordre des Thermococcales appartient au phylum des Euryarchaeota et comprend deux genres majoritaires, *Thermococcus* et *Pyrococcus* (Huber et Stetter 2001 ; Itoh 2003), et un troisième genre comprenant moins d'espèces isolées et cultivées en laboratoire, *Palaeococcus* (Takai et al., 2000).

Thermococcus kodakarensis (souche modèle KOD1) (Fig 1A) est une archée hyperthermophile isolée à partir d'un solfatare (102°C, pH 5.8) sur l'île de Kodakara, Kagoshima, Japon (Morikawa et al., 1994 ; Atomi et al., 2004). En conditions de laboratoire, KOD1 se développe entre 60° et 100°C, à un pH compris entre 5 et 9 et avec 1 à 5% de NaCl dans le milieu de culture, et de manière optimale à 85°C, pH 6.5 et 3% de NaCl (Morikawa et al., 1994). Il s'agit d'une souche hétérotrophe et anaérobie stricte, qui se multiplie en présence de composés organiques complexes tels que les peptides, les acides organiques ou les polysaccharides, et de soufre élémentaire (e.g. Verhees et al., 2003) ou en présence de composés organiques seuls (Kanai et al., 2013). Les cellules sont polyploïdes (7-19 génomes/cellules), en forme de coques irrégulières et motiles, d'un diamètre d'environ 1.5µm et entourées d'une membrane diphytanylglycérole di- et tetra-éther lipides, ainsi que d'une couche externe de glycoprotéines appelée couche S ou S-layer (Atomi et al., 2019).

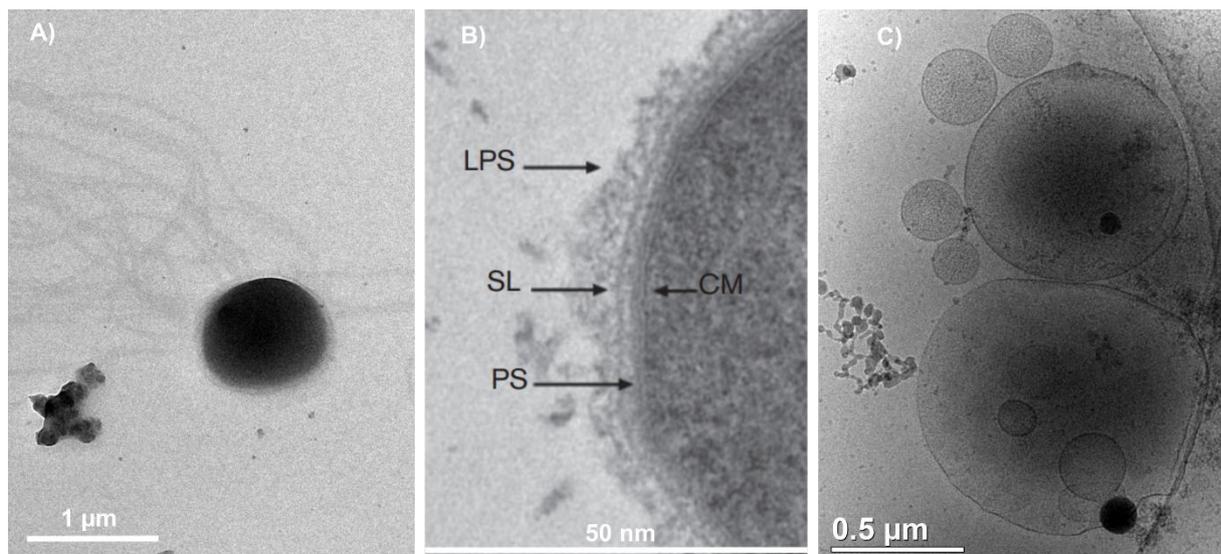


Figure 1 | A) Image cryo-MET d'une cellule de Thermococcales (souche KOD1) avec ses flagelles. **B)** Image MET d'une lame fine de cellule de Thermococcales (souche 30-1, *T. nautili*). CM = membrane cytoplasmique, LPS = lipopolysaccharides, PS = espace périplasmique et SL = S-layer (Gorlas et al., 2014). **C)** Cellules de KOD1 avec des vésicules membranaires (gris) et des vésicules de soufre (noir).

KOD1 est une souche modèle particulièrement étudiée parmi les hyperthermophiles du fait de sa croissance rapide. En conditions optimales de croissance (en présence de soufre élémentaire, 85°C, pH 6.5), son temps de doublement est de l'ordre de 40min, soit un temps similaire à celui d'*E. coli*. Elle dispose également d'une flexibilité métabolique, c'est-à-dire qu'il est possible de la cultiver en présence et en absence de soufre élémentaire, mais toujours en conditions anoxiques. En présence de soufre et de composés organiques, elle est connue pour produire de l'H₂S et elle est particulièrement étudiée en absence de soufre (composés organiques seuls) pour sa faculté à produire de grandes quantités d'H₂ (Kanai et al., 2013). Qui plus est, les Thermococcales produisent de nombreuses vésicules membranaires, ce quelles que soit les conditions de cultures (Soler et al., 2015). Lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu riche en soufre élémentaire, elles produisent en particulier des vésicules membranaires contenant du soufre (Gorlas et al., 2015) (Fig 1C). KOD1 dispose également d'une compétence naturelle à internaliser de l'ADN exogène sous forme circulaire ou linéaire, raison pour laquelle on dispose de nombreux outils génétiques utiles à son étude (e.g. Sato et al., 2003 ; Atomi et al., 2019).

2. Boîte à gants

La boîte à gants (BaG) est un dispositif d'enceinte anaérobie dont l'atmosphère est composée de gaz inerte contenant un taux de dioxygène (O₂) inférieur à 10ppm (1ppm = 1µmol/mol). L'ensemble des manipulations (cultures et préparations des échantillons) ont été exécutées en BaG Jacomex™ (Fig 1) sous atmosphère argon (Ar) (< 1ppm O₂) sur le site Buffon de l'IMPIC, ou sous atmosphère N₂ (< 1ppm O₂) sur le site Jussieu de l'IMPIC et à I2BC afin d'assurer un milieu anoxique pour la croissance de la souche KOD1 et de limiter le risque d'oxydation des échantillons au contact de l'air avant les différentes analyses.

Afin de manipuler dans l'enceinte anaérobie en ① (voir figure 2), le matériel est introduit par le sas en ② en effectuant trois cycles de vide/gaz (sous vide puis remplissage jusqu'à 1 bar). Les gants en ③ permettent de manipuler directement à l'intérieur de l'enceinte et le moniteur en ④ indique les taux d'humidité et d'oxygène à l'intérieur de l'enceinte anaérobie.



Figure 2 | BaG Jacomex™ composée de ① l'enceinte anaérobie, ② le sas d'introduction/d'extraction, ③ les gants de manipulation et ④ le moniteur avec indicateurs de pression, d'humidité (ppm H₂O) et d'oxygène (ppm O₂).

3. Fioles de verre et bombes réactionnelles en titane

Traditionnellement, les archées anaérobies sont cultivées dans des fioles de culture en verre qui peuvent être serties et rendues étanches (Fig 3A). L'oxygène est éliminé de la phase gazeuse en effectuant trois cycles de vide/gaz (Ar ou N₂) à l'intérieur de la fiole sertie, puis éliminé de la phase aqueuse en ajoutant un agent réducteur, tel que le Na₂S, directement dans le milieu de culture. Les cellules sont ensuite ajoutées et les fioles placées à incuber à la température optimale de croissance de KOD1 dans des étuves Memmert UN30.

Le matériel géochimique de l'IMPIC a permis de développer une méthode de culture biologique expérimentale dans des bombes réactionnelles en titane (Fig 3B), qui (1) supportent des températures jusqu'à 300°C et (2) peuvent être reliées au GC-TCD pour l'analyse des gaz sous pression. Les bombes réactionnelles Parr[®] d'une contenance de 22mL sont en titane gr4 passivé à 400°C, donc inerte, et n'interagissent ni avec le milieu de culture ni avec les souches ou les échantillons. Les bombes sont rentrées ouvertes dans la BaG puis chargées dans l'enceinte anaérobie avec les cultures et/ou les échantillons, avant d'être placées pour incubation dans des étuves Memmert UN30.

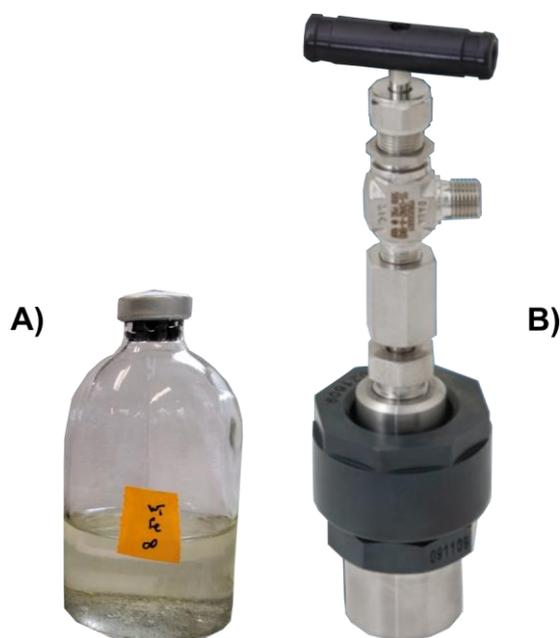


Figure 3 | A) Fiole de culture en verre sertie d'un bouchon en caoutchouc et d'une bague en aluminium. **B)** Bombe réactionnelle en titane model Parr[®].

4. Protocole de cultures en conditions optimales de croissance

Les cellules sont cultivées dans le milieu Ravot, contenant par litre d'eau distillée : 1g NH₄Cl, 0.2g MgCl₂.6H₂O, 0.1g CaCl₂.2H₂O, 0.1g KCl, 0.83g CH₃COONa.2H₂O, 20g NaCl, 2g d'extrait de levure, 2g tryptone, 3g PIPES, 0.001g résazurine (indicateur coloré d'oxydo-réduction) et du Na₂S à 0.05% (w/v) (concentration finale) afin de réduire le milieu de culture. En fonction de la condition testée (voir Chapitre 3), le milieu est supplémenté, au choix, (1) en soufre élémentaire (S(0)) à 1g/L, (2) en disulfure organique sous forme L-cystine (C₆H₁₂N₂O₄S₂) à 4.1mmol/L ou (3) en pyruvate de sodium (C₃H₃O₃Na) à 5g/L.

Les précultures sont réalisées en fiole de verre et permettent de contrôler la concentration cellulaire de départ et la phase de latence. Les cellules sont incubées pendant 12h à 85°C afin d'atteindre une concentration cellulaire de l'ordre de 1×10^8 cellules/mL. Les cellules sont ensuite inoculées au $1/10^{\text{ème}}$ dans les bombes réactionnelles en titane pour la durée de l'expérience (suivi sur 24h avec échantillonnage toutes les 3h de 0h à 12h, puis un échantillonnage à 24h) à une température de 85°C.

Pour chaque condition, un contrôle abiotique sans cellules a été réalisé afin de s'assurer d'une absence de contamination et/ou de réaction abiotique au contact du système expérimental.

5. Protocole de cultures en conditions de minéralisation et témoins abiotiques

En conditions de minéralisation, les précultures sont réalisées en fioles de verre selon le protocole décrit en partie 2.3, dans le milieu Ravot légèrement modifié, i.e. contenant moins de composés organiques, et uniquement supplémenté en soufre élémentaire à 1g/L. Le milieu Ravot modifié contient par litre d'eau distillée : 1g NH_4Cl , 0.2g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1g KCl , 0.83g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20g NaCl , 1g d'extrait de levure, 1g tryptone, 3g PIPES, 0.001g résazurine (indicateur coloré d'oxydo-réduction) et du Na_2S à 0.05% (w/v) (concentration finale) afin de réduire le milieu de culture. Après 12h de culture dans ces conditions, les cellules sont en début de phase de stationnaire.

Pour la minéralisation en fiole, une solution anoxique de sulfates de fer (FeSO_4) est directement ajoutée dans les cultures à une concentration finale de 5mM pour induire la précipitation de minéraux ferreux. Pour la minéralisation en bombes réactionnelles titane, les cultures sont transférées en BaG et transvasées dans les réacteurs. La solution de FeSO_4 est ensuite ajoutée aux cultures (concentration finale de FeSO_4 à 5mM). Les cultures minéralisées (réalisées en triplicat) sont incubées à 85°C pendant différentes durées, de manière à pouvoir comparer directement aux travaux antérieurs de Gorlas et al. (2018 ; 2022), à savoir 5h pour la précipitation de phosphates de fer amorphes, 96h pour la précipitation de sulfures de fer, 192h pour le phénomène d'éclaircissement du milieu observé dans Gorlas et al. (2022) et 35j pour documenter une longue période de minéralisation.

Différents contrôles expérimentaux ont été produits en triplicat à une température de 85°C et à une durée de 96h, correspondant au temps d'incubation nécessaire pour produire des sulfures de fer en présence de cellules :

(1) un contrôle biologique consistant en une culture de KOD1 réalisée en milieu Ravot modifié, supplémenté de $\text{S}(0)$ à 1g/L, de Na_2S à 0.05 (w/v) en concentration finale, mais sans ajout de FeSO_4 .

(2) un contrôle abiotique sans cellules consistant en du milieu Ravot modifié, supplémenté avec 1g/L de $\text{S}(0)$, du Na_2S à 0.05 (w/v) en concentration finale et la solution de FeSO_4 à 5mM en concentration finale.

(3) un contrôle abiotique sans cellules consistant en du milieu Ravot modifié, supplémenté de 30mmolal de soufre colloïdal, de Na_2S à 0.05 (w/v) en concentration finale et de FeSO_4 à 5mM en concentration finale.

(4) un contrôle abiotique sans cellules consistant en du milieu Ravot modifié dépourvu de matière organique (levure, tryptone et acétate de sodium CH_3COONa) supplémenté de 30mmolal de soufre colloïdal, de Na_2S à 0.05 (w/v) en concentration finale et de FeSO_4 à 5mM en concentration finale.

(5) un contrôle abiotique sans cellules consistant en du milieu Ravot modifié dépourvu de matière organique (levure, tryptone et acétate de sodium CH_3COONa) supplémenté de 2g/L de particules de carbone graphitique, de 30mmolal de soufre colloïdal, de Na_2S à 0.05 (w/v) en concentration finale et de FeSO_4 à 5mM en concentration finale.

(6) un contrôle abiotique sans cellules consistant en du milieu Ravot modifié dépourvu de matière organique (levure, tryptone et acétate de sodium CH_3COONa) supplémenté de lysats cellulaires de KOD1 (issus de cultures réalisées en Ravot supplémenté de S(0)), de 30mmolal de soufre colloïdal, de Na_2S à 0.05 (w/v) en concentration finale et de FeSO_4 à 5mM en concentration finale.

Pour la condition (6), les lysats ont été obtenus à partir de 100mL de cultures réalisées en présence de S(0). Toutes les manipulations ont été effectuées à l'air libre, en condition aérobie. Les cultures ont été transférées dans des tubes Falcon 50mL. La plus grosse partie du S(0) a été retirée en laissant sédimenter les cultures pendant 5min puis en transvasant les cultures dans 2 Falcon 50mL. Les Falcon ont ensuite été placés dans un bain à ultrasons pendant 20mn. Une première centrifugation a été réalisée pendant 15min à 3000g. Le surnageant a été débarrassé et le culot cellulaire repris dans 5mL d'eau ultrapure. Une deuxième centrifugation pendant 15min à 3000g a été réalisée puis le culot cellulaire repris dans 1.5mL d'eau ultrapure. Les culots cellulaires ont ensuite été stockés au congélateur -20°C .

II. Suivis de croissance et analyses biologiques

1. Comptage cellulaire

Pour le suivi de la croissance, des comptages cellulaires ont été effectués sur une cellule de Malassez, qui consiste en une lame avec un quadrillage de 5 par 5 unités, représentant un volume total de 1 μ L (Fig 4). Le nombre de cellules contenues dans une unité (0.2 * 0.25mm, constituée de carrés de 0.0025mm²) permet de déduire le nombre de cellules dans la grille totale. Une moyenne du nombre de cellules a été réalisée sur cinq unités, ramenée au nombre de cellules par millilitre d'échantillon via un facteur de conversion de 250 000 selon le calcul suivant :

$$m * 250\ 000 * d = C$$

avec m la moyenne du nombre de cellules sur 5 unités ; d le facteur de dilution ; C la concentration de cellules/mL.

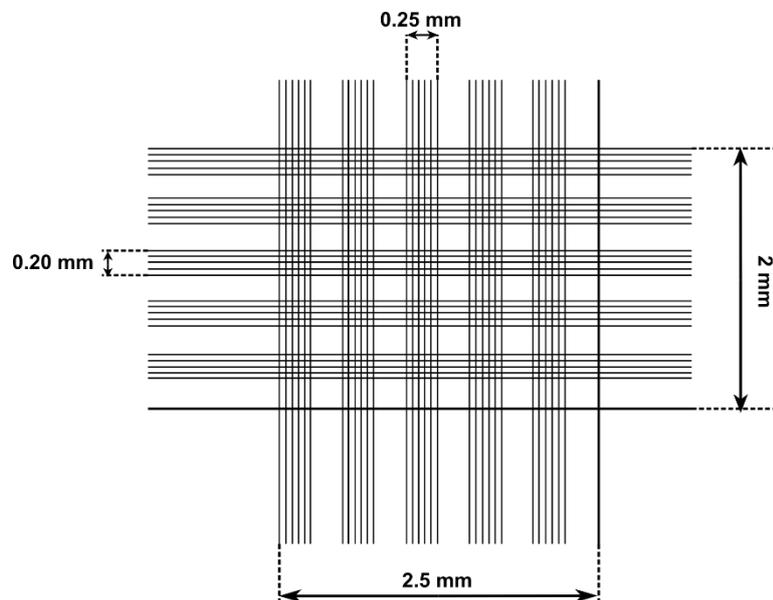


Figure 4 | Représentation schématique d'une cellule de Malassez utilisée pour les comptages cellulaires.

2. ATP-métrie

Toute cellule vivante produit et consomme de l'adénosine triphosphate (ATP), la présence d'ATP dans un échantillon témoigne donc de l'activité métabolique des cellules. L'ATP-métrie est une technique qui permet de mesurer la quantité d'ATP présente dans un échantillon par bioluminescence grâce à un luminomètre. La réaction de bioluminescence est catalysée par une enzyme appelée la luciférase, qui contrôle l'activation ATP-dépendante de molécules bioluminescentes appelées luciférines (Lundin, 2000). En présence de dioxygène et d'ATP, la luciférase active les luciférines qui produisent de la lumière, l'intensité lumineuse étant proportionnelle à la quantité d'ATP.

La réaction de bioluminescence étant catalysée par une enzyme sensible à des facteurs indépendants de la quantité d'ATP comme le pH, la température ou encore la présence d'inhibiteurs ou d'activateurs, une standardisation interne est nécessaire pour rendre la mesure d'ATP quantitativement exploitable. L'intensité lumineuse (I) est mesurée avant (I_{smp}) et après l'ajout d'un standard d'ATP connu (I_{std}), permettant de calculer la quantité d'ATP en pmole/mL de l'échantillon (ATP_{smp}) selon :

$$\text{ATP}_{\text{smp}} = I_{\text{smp}} / [I_{\text{smp} + \text{std}} - I_{\text{smp}}]$$

Il existe deux types d'ATP :

- (1) L'ATP intracellulaire ($\text{ATP}_{\text{intra}}$) : ATP contenu dans les cellules vivantes.
- (2) L'ATP extracellulaire ($\text{ATP}_{\text{extra}}$) : ATP localisé à l'extérieur des cellules.

Les mesures d'ATP ont été réalisées avec le kit BioThema, qui permet de mesurer l'ATP total (intracellulaire et extracellulaire) et l'ATP intracellulaire (Fig 5), et de calculer l'ATP extracellulaire en pmole/mL selon :

$$\text{ATP}_{\text{extra}} = \text{ATP}_{\text{total}} - \text{ATP}_{\text{intra}}$$

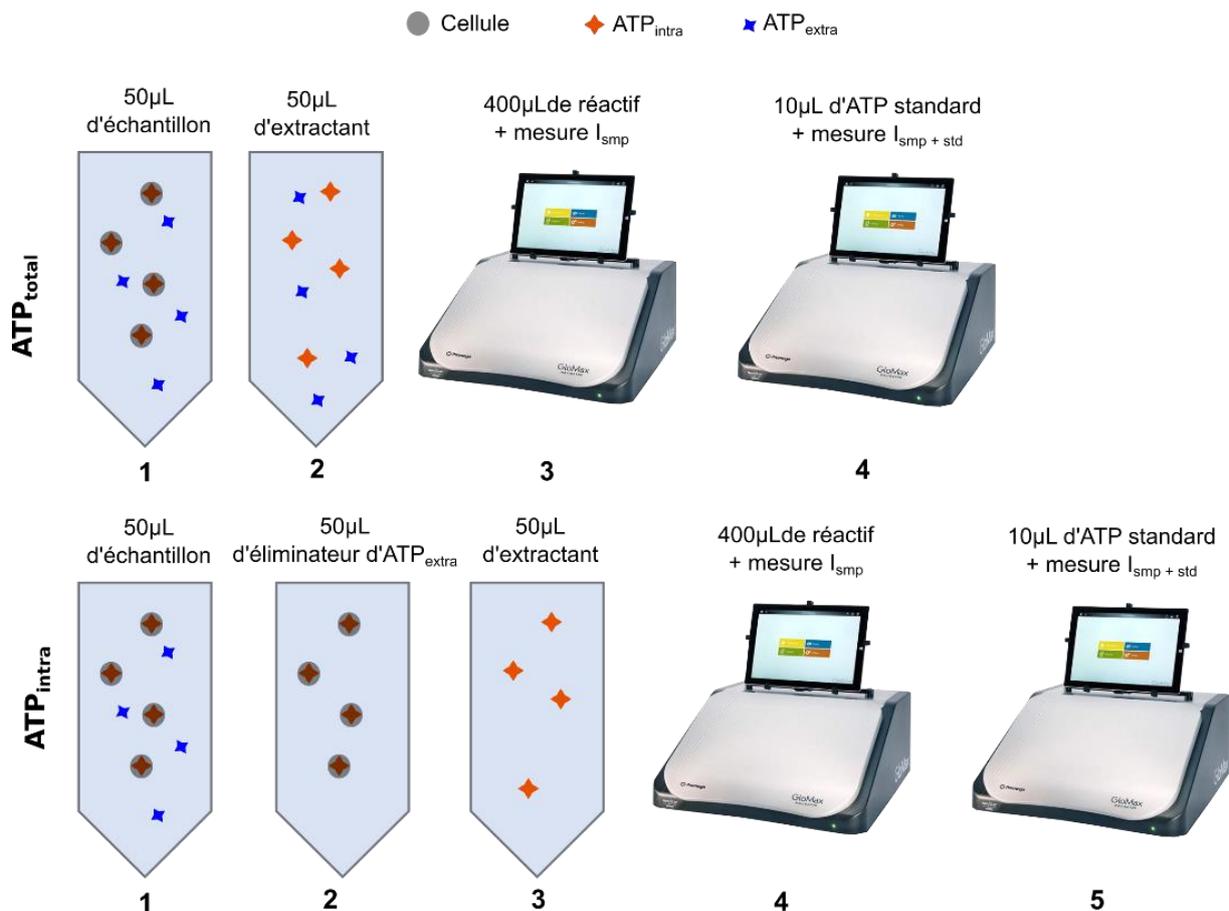


Figure 5 | Protocole de mesure de l'ATP total et de l'ATP intracellulaire en utilisant le kit BioThema et le luminomètre GloMax® Navigator.

3. Dosage d'acétate par chromatographie en phase liquide à haute performance

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est une technique d'analyse séparative des molécules en phase liquide, basée sur la migration progressive des composés dans une colonne supportant les hautes pressions. En chromatographie par échange d'ions (IC), les composés sont séparés selon l'interaction ionique de leurs groupes chargés avec les charges opposées de la phase stationnaire.

Les mesures HPLC ont été réalisées à l'I2BC, Gif-sur-Yvette, sur un chromatographe Shimadzu équipé d'une colonne anionique (exclusion et échange d'anions) débit 0.8mL/min à une pression de 15 bars et à une température de 55°C. Les cultures de KOD1 ont été réalisées selon le protocole décrit en 2.3, en conditions soufre et cystine. Les cultures ont été centrifugées à 4000g pendant 10 min à 10°C, le surnageant récupéré puis conservé à -20°C jusqu'à l'analyse. 20µL de surnageant ont été injectés dans la boucle d'injection et entraînés dans la colonne via une solution d'acide orthophosphorique (H₃PO₄) à 5 mM en concentration finale (phase mobile).

Le temps de rétention de l'acétate à 6.3 min et la quantification du composé ont été déterminés via la courbe d'étalonnage d'une gamme d'acétate de potassium à des concentrations de 25g/L, 12.5 g/L, 6.25 g/L, 3.125 g/L et 0 g/L (Fig 6). La droite de corrélation a permis d'obtenir le coefficient de corrélation (R²) indiquant le facteur de dilution de la gamme, et le coefficient directeur, implémenté dans la méthode du logiciel. La méthode permet d'obtenir directement la concentration en g/L d'acétate dans l'échantillon étudié grâce à l'aire du pic d'acétate obtenu sur les chromatogrammes.

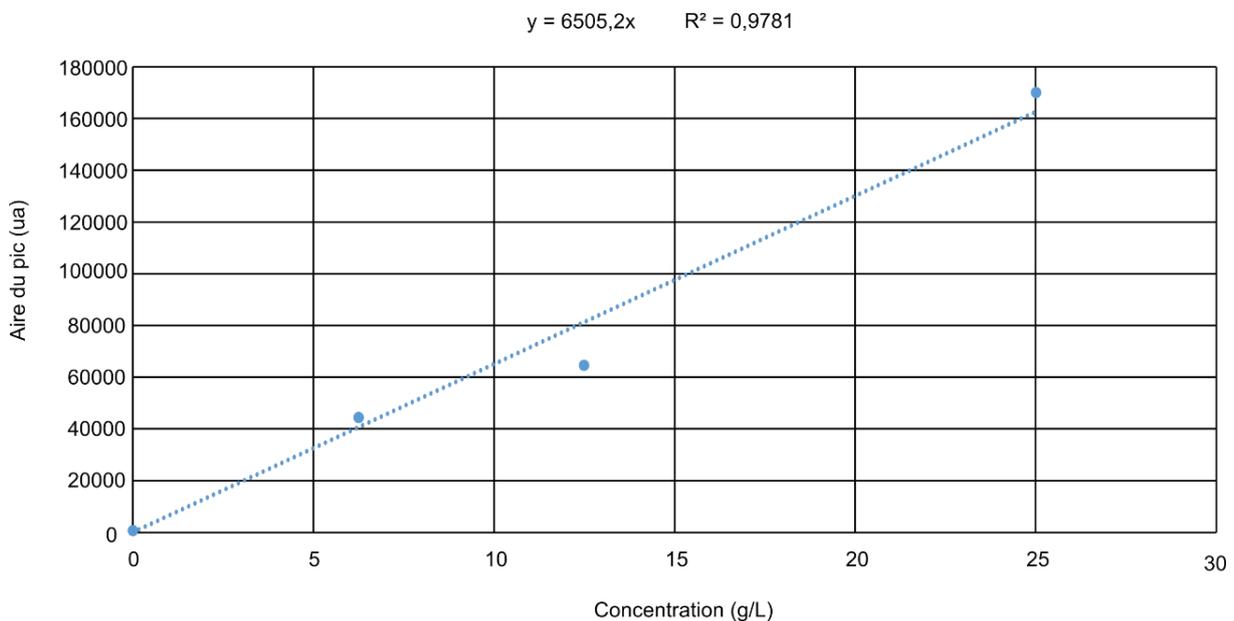


Figure 6 | Gamme réalisée à partir de l'aire du pic d'acétate obtenu sur les chromatogrammes en fonction de la concentration d'acétate de potassium en g/L. Coefficient de corrélation (R²) de 0.9781 et coefficient directeur (y) de 6505.2x.

4. Chromatographie en phase gazeuse avec détecteur de conductivité thermique

4.1. Principe du chromatographe en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (GC) permet de séparer les molécules d'un mélange gazeux. Les composés volatils de l'échantillon sont transportés par un gaz porteur inerte, ici de l'argon ($> 99.999\%$ - Air Liquide ALPHAGAZ 1), afin de n'interférer ni avec l'échantillon, ni avec la phase stationnaire. La phase stationnaire (colonne) retient les composants contenus dans l'échantillon et les sépare selon l'affinité des composants avec cette phase. On peut ainsi analyser la composition des gaz contenus dans les bombes réactionnelles en identifiant les molécules et en les quantifiant. Grâce à un adaptateur développé à l'IMPIC, les bombes réactionnelles en titane contenant les cultures peuvent être reliées au chromatographe afin de mesurer et d'analyser les gaz produits par les archées hyperthermophiles en fonction des conditions métaboliques décrites en partie 2.3.

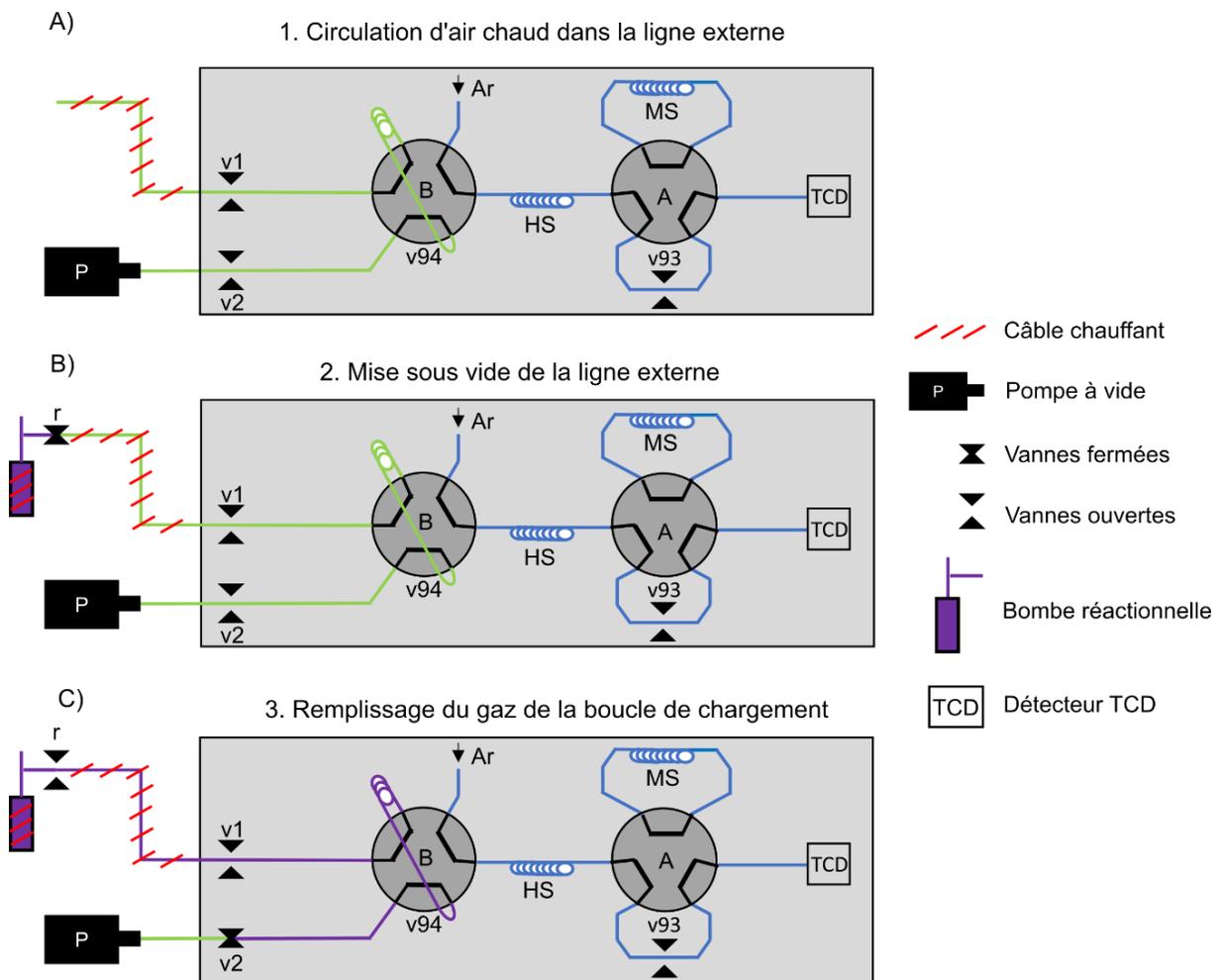


Figure 7 | Schéma du GC-TCD (en gris) avant l'analyse, adapté d'après Lecasble (2023). **A)** Circulation d'air chaud pour sécher le circuit externe (en vert). v1 et v2 sont en position ouverte, v94 en position B, v93 en position A. **B)** La bombe réactionnelle est connectée au circuit externe et la ligne est mis sous vide. Configuration identique à celle en A). **C)** La vanne de la bombe réactionnelle (r) est ouverte et le gaz de l'échantillon (en violet) s'équilibre dans la boucle de chargement. v1 est ouverte, v2 fermée, v94 en position B et v93 toujours en position A.

Les mesures ont été réalisées à l'IMPIC, site Buffon, sur un chromatographe Shimadzu GC-2014 couplé à un détecteur de conductivité thermique TCD-2014 qui mesure la différence de conductivité entre le gaz porteur et les gaz de l'échantillon. Le chromatographe est équipé de deux colonnes, à savoir une HayeSep Q (80/100, 1.8 m x 1/8 pouce, 2 mm) suivie d'une colonne Molecular Sieve 13X ou Molsieve (60/80, 1.8 m x 1/8 pouce, 2 mm) (désignées HS et MS en Fig 7 et 8, respectivement). La Molsieve est conçue pour piéger et séparer les gaz les plus volatils (O_2 , N_2 , H_2 , CO et CH_4) tandis que la colonne HayeSep sépare les gaz avec un temps de rétention plus long (CO_2 , NH_3 et H_2O). Dans cette thèse, la colonne MS a été isolée afin d'éviter tout risque de contamination avec l' H_2S produit par les cellules dans certaines conditions. L'intégralité des gaz passe donc uniquement par la colonne HS.

Un prétraitement est nécessaire avant l'analyse (Fig 7). Une pompe à vide DIVAC 1.4HV3C (<0.01 bar) est reliée au circuit externe (en vert sur la Fig 7A et B) sur lequel sont disposées deux vannes, v1 et v2. La pompe à vide permet, avant connexion de la bombe réactionnelle, de faire circuler de l'air chaud dans le circuit pendant 5min, v1 et v2 ouvertes, afin d'empêcher une éventuelle humidité (Fig 7A). Une bombe réactionnelle, vanne fermée, est connectée à la ligne externe qui est mise sous vide par activation de la pompe à vide pendant 10min (Fig 7B). Vanne v2 fermée, la vanne de la bombe est ensuite ouverte et le gaz (en violet) se détend dans la boucle de chargement (Fig 7C).

Une fois le gaz équilibré dans la boucle de chargement, le système est prêt pour l'analyse (Fig 8). La vanne v94 effectue une rotation et passe en position A, ce qui permet au gaz porteur de faire circuler le gaz de l'échantillon dans le circuit interne (en bleu) jusqu'à la colonne HS (Fig 8A). La vanne v94 revient ensuite en position B. L'intégralité des vannes du circuit externe sont ouvertes et le vide est effectué sur la ligne pour la débarrasser des résidus de gaz (Fig 8B). Pendant ce temps, le gaz de l'échantillon continue de circuler dans le circuit interne, les différents composés sont séparés par la colonne HS et arrivent jusqu'au détecteur TCD avec des temps de rétention différents.

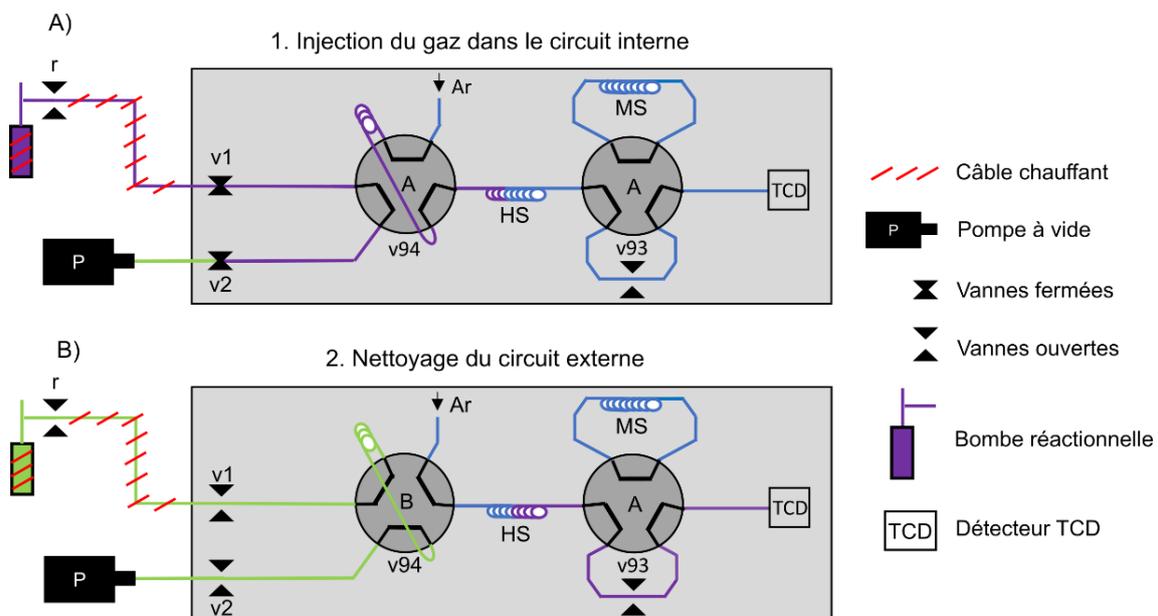


Figure 8 | Schéma du GC-TCD (en gris) pendant l'analyse, adapté d'après Lecasble (2023). **A)** Injection du gaz de l'échantillon dans le circuit interne, poussé par l'argon. v1 et v2 sont en position fermée, v94 passe en position A, v93 en position A. **B)** Vide sur le circuit externe pour retirer toute trace de gaz. Le gaz de l'échantillon circule dans le circuit interne et arrive jusqu'au TCD. v1 et v2 sont en position ouverte, v94 revient en position B, v93 toujours en position A.

4.2. Développement méthodologique

L'utilisation de la seule colonne HS rend plus difficile la séparation des gaz, par rapport à une configuration à deux colonnes (HS + Molsieve). Un programme spécifique a donc été adopté en réduisant la rampe de chauffe tout en optimisant la durée d'analyse (Fig 9). Malgré cette optimisation, O₂ et N₂ ne peuvent être séparés sans utilisation de la Molsieve (Fig 10).

Le protocole de quantification des gaz a été développé par Lecasble (2023). Brièvement, il s'agit d'analyser des mélanges de gaz de composition connue (Air products), ou gaz de référence, ce qui permet d'identifier leur temps de rétention (Fig 10). Analysés à différentes pressions, cela permet d'étalonner la réponse du gaz au détecteur TCD (Table 1). Ce protocole a été utilisé pour étalonner le détecteur à l'H₂S. Trois mesures ont été réalisées à 1 bar en faisant buller l'H₂S de référence dans une solution tampon de nitrate d'argent (AgNO₃) à une concentration finale de 0.1M (Fig 11). A noter que la réponse du gaz au TCD est directement proportionnelle à sa quantité, mais que chaque gaz présente une conductivité thermique différente et donc une réponse différente (Fig 10).

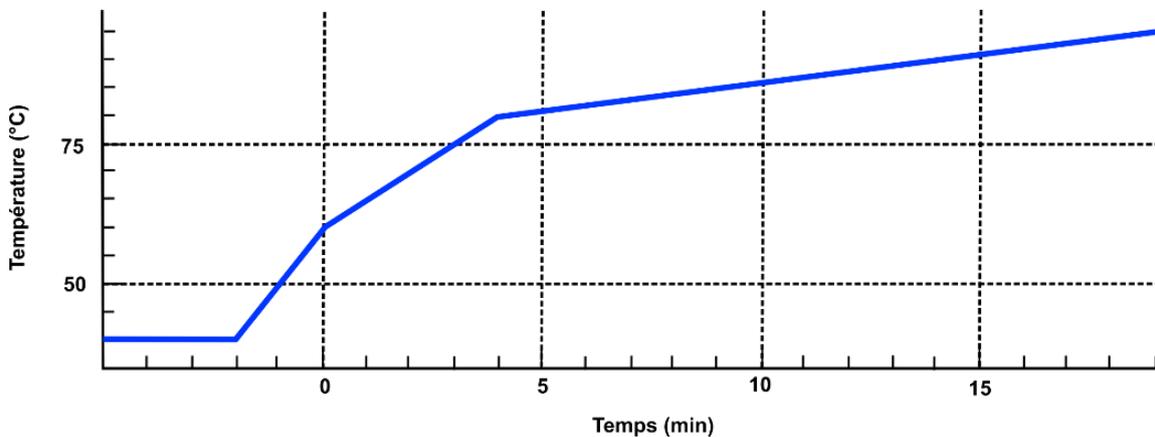


Figure 9 | Programme utilisé pour l'analyse des gaz au GC-TCD. La température de départ est de 40°C et la rampe de chauffe est particulièrement ralentie entre 9 et 24min pour optimiser la séparation d'H₂O et d'H₂S.

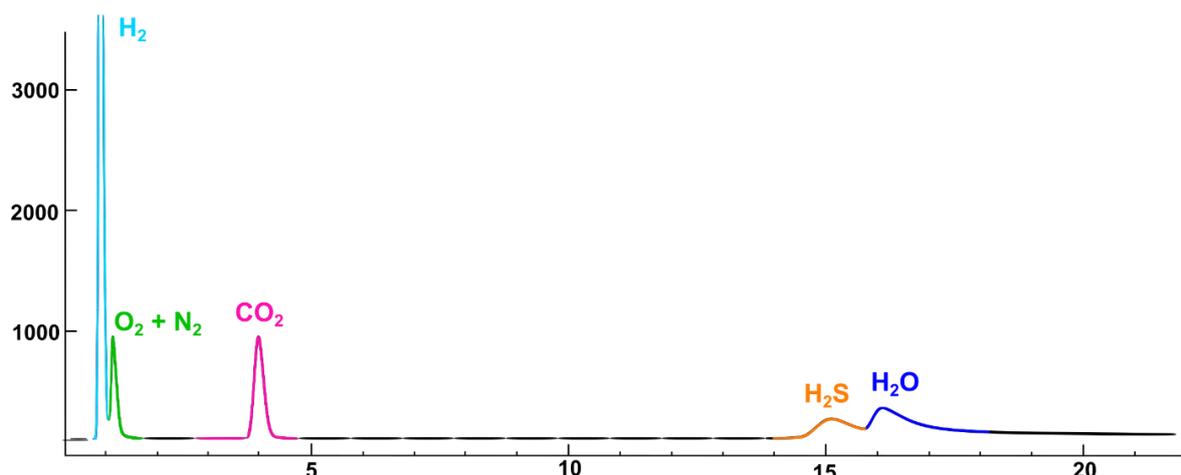
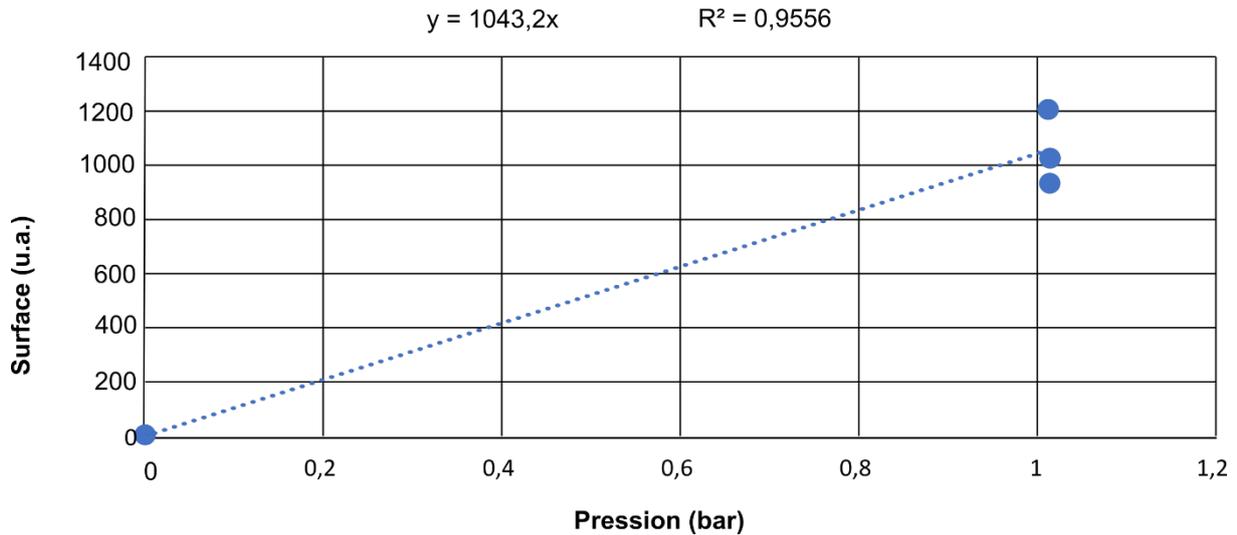


Figure 10 | Identification des gaz selon leur temps de rétention. H₂ à 1.1min (bleu clair), O₂+N₂ à 1.4min (vert), CO₂ 4.2min (rose), H₂S à 15.2min (orange) et H₂O à 16.3 (bleu).

Tableau 1 | Coefficient directeur pour les gaz H₂, O₂, N₂, CO₂, H₂S et H₂O, basé d'après Lecasble (2023).

	H ₂	O ₂	N ₂	CO ₂	H ₂ S	H ₂ O
Coefficient	14582	1335	1180	1100	1043	1E10 ⁹

**Figure 11** | Calibration du H₂S mesurés par le GC-TCD.

Il est important de noter que la calibration est effective pour la pression partielle à l'intérieur de la boucle de chargement, et non à l'intérieur de la bombe réactionnelle. Du fait de la décompression des gaz entre la bombe réactionnelle et la boucle de chargement, la concentration à l'intérieur de l'échantillon est supérieure à celle mesurée par le GC-TCD. Afin de connaître les concentrations absolues, un développement méthodologique additionnel est nécessaire pour connaître le volume de la boucle de chargement, les volumes de la bombe à chaque étape du parcours à l'intérieur du GC-TCD (Fig 7 et 8), ainsi que les volumes qu'occupent les différents gaz à l'intérieur de la bombe réactionnelle.

Durant cette thèse, il a principalement été question de réaliser un suivi cinétique (3h, 6h, 9h, 12h et 24h de croissance) des gaz dans des cultures de KOD1 réalisées en bombes réactionnelles en titane pour trois conditions métaboliques, à savoir en présence de soufre élémentaire, de L-cystine et de pyruvate de sodium.

III. Analyses sur les cultures en conditions de minéralisation

1. Diffraction de rayons X et affinement Rietveld

Dans une matière amorphe, les molécules et les atomes sont agencés sans ordre à grande distance, typiquement au-delà de 1nm. Dans le cas contraire, les molécules et les atomes sont agencés de manière ordonnée à grande distance, formant un réseau tridimensionnel composé de « nœuds ». Le matériau est alors défini comme cristallin. Les atomes d'un cristal sont arrangés selon des plans réticulaires regroupés en familles (hkl) de plans parallèles espacés par une distance interréticulaire (d).

La diffraction de rayons X (DRX) est une technique particulièrement bien adaptée à l'étude des matériaux cristallins qui donne des informations sur les structures et les orientations privilégiées des cristaux (texture). La diffraction des rayons X consiste en une interférence constructive (ondes en phase) d'un faisceau de rayons X avec une longueur d'onde (λ) de l'ordre de l'angström. Les conditions d'interférences constructives sont déterminées par la loi de Bragg (Bragg, 1913) :

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

avec n l'ordre de diffraction, λ la longueur d'onde des rayons X, d la distance interréticulaire de la famille de plans responsable de la diffraction et θ l'angle incident (Fig 12).

Dans le cas de la diffraction sur poudre, l'échantillon est irradié par une source monochromatique de rayons X selon des angles différents. La distribution aléatoire des cristallites permet d'avoir, pour chaque famille (hkl), un certain nombre de plans diffractant le faisceau incident selon la loi de Bragg, ce qui génère des pics d'intensité variable : le diffractogramme. Par conséquent, le diffractogramme peut être vu comme l'empreinte digitale d'un matériau donné.

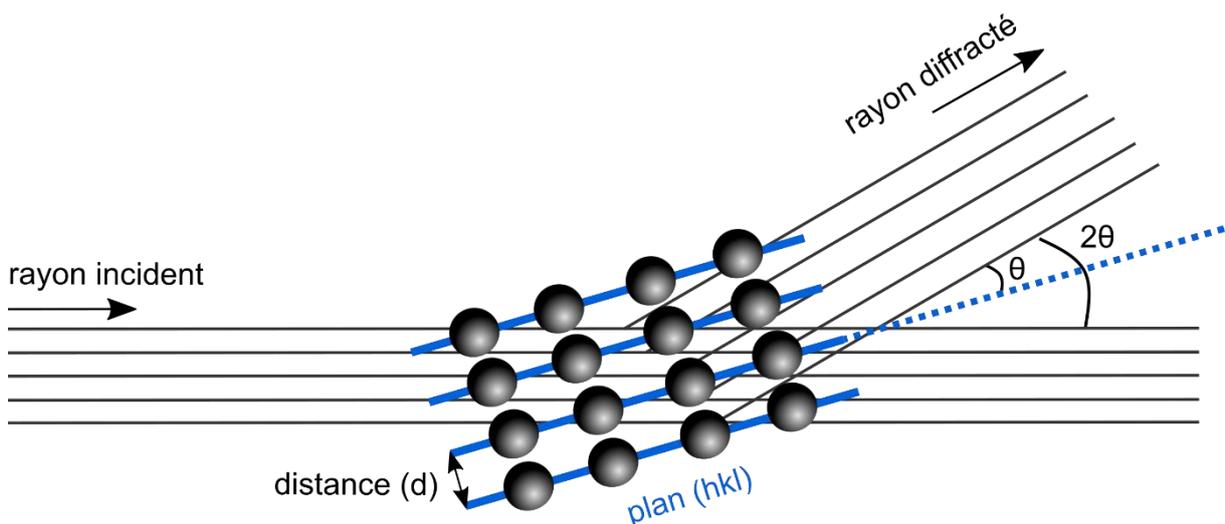


Figure 12 | Schéma illustrant le principe de la diffraction des rayons X. Adapté d'après Van Meerssche et Feneau-Dupont (1984).

1.1. Préparation des échantillons

La préparation des échantillons a été effectuée en BaG Jacomex™ sous atmosphère Ar et/ou N₂ (< 1 ppm O₂). 5mL de chaque suspension a été centrifugé à 3000g/min pendant 10min. Le culot a été repris dans 500µL d'éthanol pur puis séché dans l'enceinte anaérobie sans rinçage. Les échantillons ont été placés sur une pastille de Si monocristalline (111) insérée dans une chambre d'échantillonnage anoxique fabriquée sur mesure à l'IMPIC, équipée d'une fenêtre en film Kapton®. La chambre d'échantillonnage a ensuite été sortie de la BaG et les diffractogrammes acquis via un diffractomètre XPert Pro Panalytical.

Les données ont été obtenues en utilisant une source monochromatique Co K α ($\lambda = 1.78901 \text{ \AA}$) en mode continu. L'anode de cobalt permet, par rapport à l'anode traditionnelle en cuivre, de s'affranchir autant que possible de la fluorescence des phases porteuses de fer. Les diffractogrammes ont été acquis pour des angles variant de 5 à 100° avec un pas de 0.033° pour un temps de comptage de 200ms, soit un cycle de 1h30. Deux cycles ont été réalisés afin d'augmenter le rapport signal/bruit. Les diffractogrammes ont ensuite été raccourcis au domaine 10-100°2 θ pour éviter la bande diffuse du film Kapton® à 7.2°. Les données ont été analysées avec les logiciels HighScore et QualX, qui disposent respectivement des bases de données minéralogiques Powder Diffraction File (PDF2) (Gates-Rector et Blanton, 2019), base de données officielle de l'International Centre for Diffraction Data (ICDD), et Cristallographie Open Database (COD) (Gražulis et al., 2012), base de données en libre accès.

1.2. Affinement Rietveld

La méthode Rietveld permet d'extraire des informations structurales à partir d'un diffractogramme, et de quantifier les proportions relatives des différentes phases minérales contenues dans un échantillon (Rietveld, 1969). Tous les diffractogrammes ont été normalisés au pic du film Kapton® afin de pouvoir comparer les quantités des phases minérales présentes d'un échantillon à l'autre.

Les analyses Rietveld ont été réalisées avec le code xnd_1.3 (Berar et Baldinozzi, 1998) en utilisant des pseudo-fonctions de Voigt pour décrire les profils de pics de diffraction des phases minérales. Les paramètres cristallographiques de départ (groupe d'espace, positions atomiques, facteurs d'anisotropie Debye-Waller) sont issus de Rettig et Trotter (1987) pour le soufre élémentaire S(0), de Lennie et al. (1995) pour la mackinawite FeS, de Stanjek et Schneider (2000) pour la greigite Fe₃S₄ et de Bayliss (1977) pour la pyrite FeS₂. La structure de α -Fe₂PO₄O à partir de Ijjaali et al. (1990) a été utilisée pour le composé « barbosalite-like » dans la solution solide Fe₄(PO₄)₂O₂ – Fe₄(PO₄)₃(OH)₃. L'occupation du fer a été raffinée sur le composé « barbosalite-like » pour bien rendre compte des intensités relatives. Les facteurs d'échelle (S-factor) ont été raffinés pour toutes les phases minérales puis utilisés pour calculer la fraction massique relative des minéraux dans les échantillons, en utilisant la procédure de Bish et Post (1993).

2. Microscopie électronique

Tandis que la microscopie optique repose sur la lumière visible, le rayonnement utilisé par la microscopie électronique consiste en un faisceau d'électrons qui permet d'atteindre une résolution de l'ordre du pm. Les sources d'électrons sont généralement des filaments de tungstène (W), des cristaux de LaB6 ou des pointes de tungstène à effet de champ (FEG).

Les premiers microscopes électroniques sont construits par analogie avec les microscopes optiques et selon les mêmes principes optiques (Knoll et Ruska 1932). Il s'agit donc de microscopes électroniques en transmission qui nécessitent des échantillons très fins afin de pouvoir être traversés par le faisceau d'électrons. Les microscopes électroniques à balayage sont développés ultérieurement et permettent de produire des images sur des échantillons plus épais sans avoir à les traverser. Dans les deux cas, les lentilles utilisées sont des bobines électromagnétiques et électrostatiques qui font converger le faisceau d'électrons. La distance focale peut être modifiée en ajustant le courant dans les lentilles.

2.1. Microscopie électronique à balayage

Le microscope électronique à balayage (MEB) permet d'obtenir des images de la surface d'un échantillon épais $> 1\mu\text{m}$ en utilisant le principe des interactions électrons-matière. Un faisceau d'électrons primaires (énergie comprise entre 5 et 15kV) est envoyé sur l'échantillon, ce qui conduit à l'éjection d'électrons secondaires et rétrodiffusés dans le sens inverse du faisceau. Dans le cas de la diffusion inélastique, il y a perte d'énergie et une faible déviation spatiale : les électrons secondaires sont peu liés au noyau et proviennent d'atomes proches de la surface, ce qui permet de visualiser la topographie de l'échantillon avec une bonne résolution spatiale (Fig 13). Les électrons rétrodiffusés proviennent d'une diffusion élastique, sans perte d'énergie mais avec une forte déviation spatiale, et sont quant à eux des électrons primaires déviés par la présence des noyaux atomiques de l'échantillon (Fig 13). Ils proviennent d'atomes situés plus profondément dans l'échantillon ce qui produit un contraste dépendant des densités électroniques dans les zones imagées. A densité égale, les zones constituées d'éléments chimiques possédant un numéro atomique (Z) élevé produiront donc davantage d'électrons rétrodiffusés que celles contenant des éléments à Z moins élevé.

Dans le cas des échantillons liquides, la préparation a été effectuée en BaG JacomexTM sous atmosphère Ar ou N₂ ($< 1\text{ppm O}_2$). 1mL de chaque échantillon a été filtré à travers un filtre polycarbonate à $0.2\mu\text{m}$ afin de conserver la partie solide de l'échantillon. Les filtres ont ensuite été déposés sur un scotch carbone, séchés en BaG, puis sortis de la BaG et métallisés au carbone (épaisseur 16nm). Dans le cas d'échantillons sous forme de poudre, les poudres sèches ont été directement déposées sur un scotch carbone puis métallisées au carbone (épaisseur 16nm).

Les données MEB ont été acquises sur deux plateformes de microscopie : (1) sur le site Jussieu de l'IMPIC à l'aide d'un MEB GEMINI ZEISSTM Ultra55 avec une tension d'accélération de 10kV et à une distance de travail de 7.5mm, (2) sur le site Buffon de l'IMPIC à l'aide d'un MEB TESCAN VEGA II LSU à une tension d'accélération de 15kV, à une distance de travail 12.5mm et un courant de sonde de 300pA.

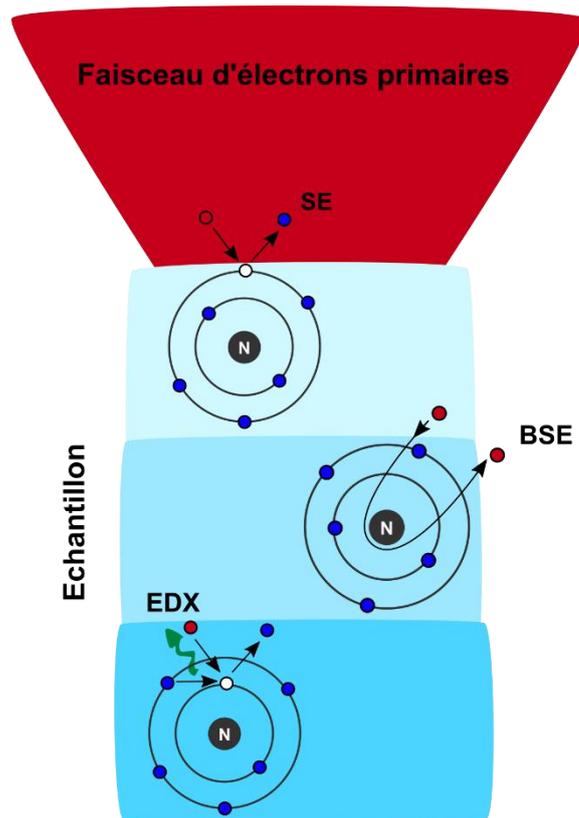


Figure 13 | Schéma illustrant les principes d'interaction électrons-matière et leur volume d'interaction. SE = électrons secondaires, BSE = électrons rétrodiffusés et EDX = rayons X caractéristiques.

2.2. Couplage avec la spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie

La spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDXS) couplée à l'imagerie MEB permet d'accéder à l'analyse élémentaire de surfaces dont le diamètre est de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres, intégrant des profondeurs de quelques microns. L'impact du faisceau d'électrons primaires sur l'échantillon produit, outre les électrons secondaires précédemment décrits et un rayonnement X continu (Brehmstrahlung, bruit de fond des spectres EDX), des rayons X caractéristiques des éléments chimiques présents dans la zone irradiée. Avec une tension d'accélération suffisante, le bombardement électronique va entraîner une ionisation des atomes de l'échantillon. En se désexcitant, ceux-ci vont émettre des rayons X caractéristiques ce qui permet de reconstruire des spectres EDS (Fig 13). Cette méthode analytique peut servir à déterminer des compositions élémentaires semi-quantitatives ponctuelles ou à produire des cartographies de la distribution d'éléments à l'échelle d'une image MEB.

De la même façon que pour les données MEB, les données EDXS ont été acquises sur les deux plateformes de microscopie évoquées précédemment dans les mêmes conditions de travail. Le MEB GEMINI ZEISSTM est équipé d'un détecteur BrukerTM et le MEB TESCAN VEGAII LSU est équipé de deux détecteurs BrukerTM XFlash en positions antagonistes.

2.3. Microscopie électronique en transmission et diffraction électronique

La microscopie électronique en transmission (MET) est une technique d'imagerie électronique basée sur les mêmes principes d'interactions électrons matière que pour le MEB, c'est-à-dire la diffusion inélastique et élastique. Elle permet d'analyser la morphologie, la structure et la chimie d'échantillons à l'échelle atomique et est utile pour réaliser des images à très fort grossissement sur des échantillons suffisamment fins pour être traversés ($< 100\text{nm}$). La résolution spatiale de l'ordre de l'angström, ce qui permet d'obtenir des informations sur le réseau cristallin.

Le faisceau d'électrons est modelé par un système de lentilles électromagnétiques (le système condenseur) qui contrôle son parallélisme et sa convergence, tandis que sa taille est contrôlée par une série de diaphragmes. En insérant une lentille objectif avant l'échantillon (plan focal arrière), l'image va être reconstruite par sélection du faisceau qui traverse l'échantillon. C'est cette lentille objectif qui permet de réaliser la mise au point et la résolution de l'image, ensuite agrandie par une série de lentilles intermédiaires puis projetée sur un écran fluorescent ou une caméra par un système de lentilles projectrices (Fig 14). Classiquement, les images sont obtenues en mode en champ clair (BF pour *bright field*) en positionnant le diaphragme dans l'axe du faisceau ce qui permet de sélectionner les électrons transmis. Les zones sombres sont donc celles qui dévient le plus les électrons.

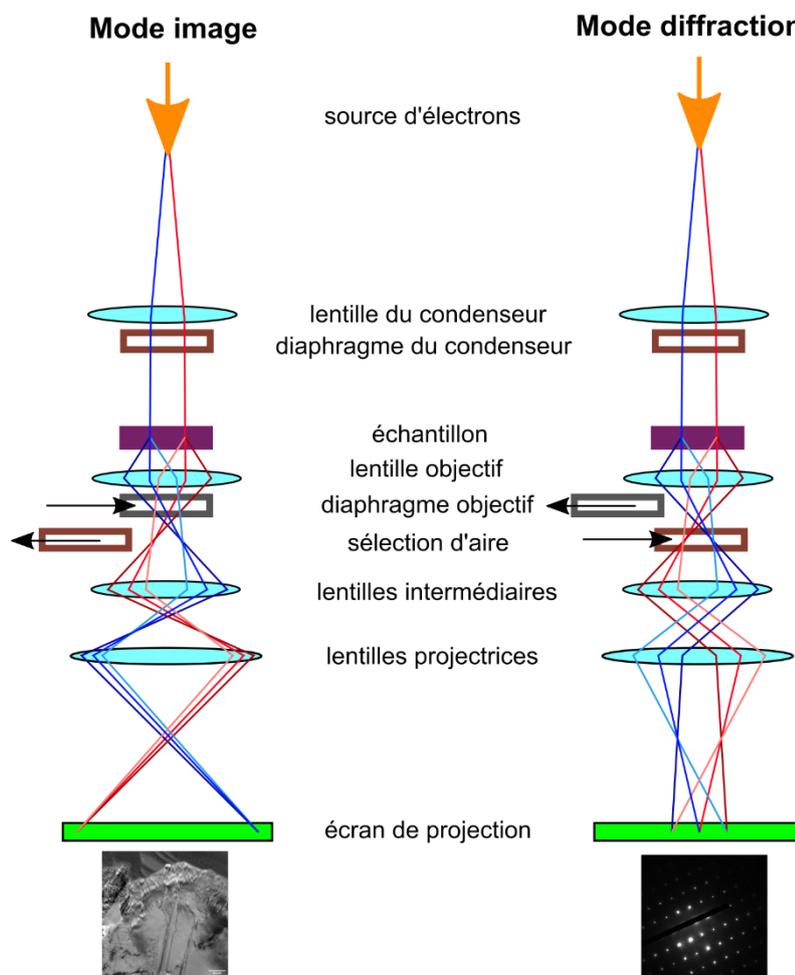


Figure 14 | Schéma représentant le fonctionnement d'un microscope électronique en transmission en mode image et en mode diffraction. Adapté d'après Duverger, 2021.

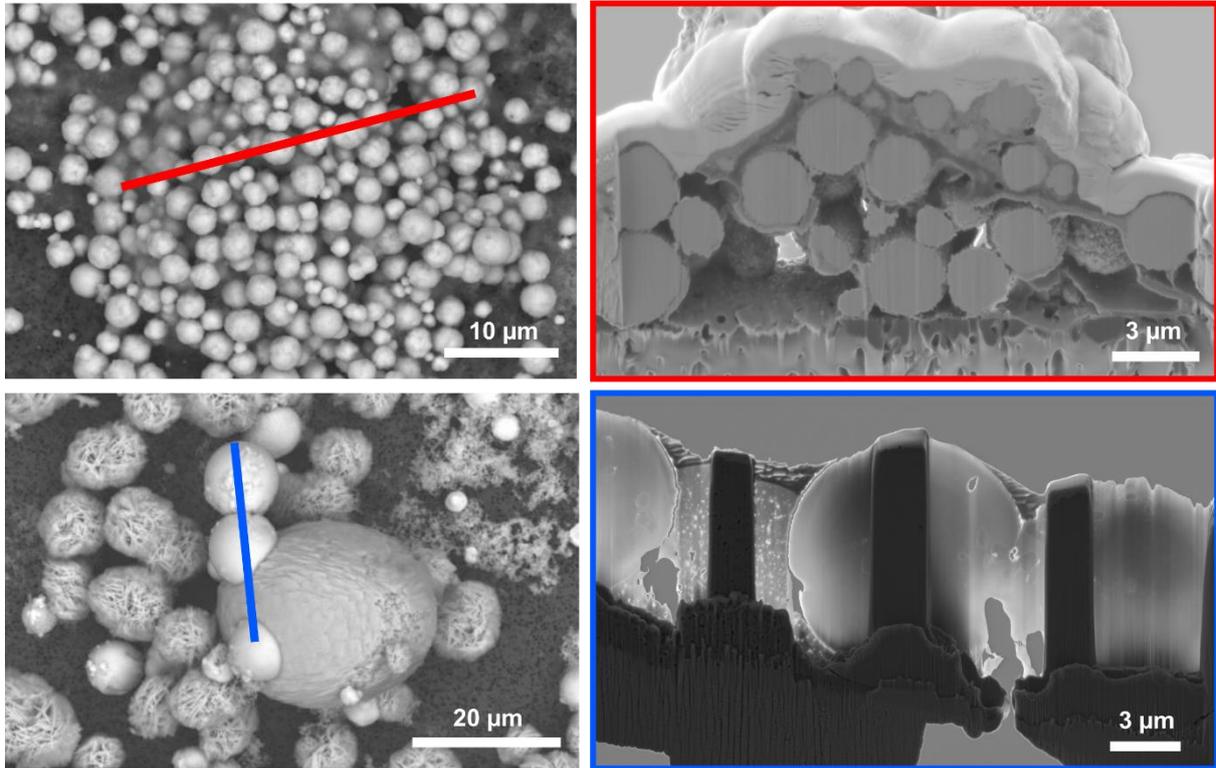


Figure 15 | A gauche, des échantillons de pyrite produites expérimentalement avec la zone ciblée pour la lame FIB. A droite, les lames FIB réalisées sur les échantillons.

En traversant l'échantillon, les électrons sont déviés de leur trajectoire initiale par un phénomène de diffusion élastique aussi appelée diffraction, qui dépend directement des caractéristiques du matériau, telles que la cristallinité, l'épaisseur ou la composition chimique. La diffusion des électrons par des matériaux cristallins redistribue le rayonnement dans des directions spécifiques selon la loi de Bragg. Il est donc possible d'obtenir des clichés de diffraction électronique (SAED) en substituant la lentille objectif par un diaphragme de sélection d'aire, placé derrière l'échantillon (plan image). La distance (r) entre les points de l'espace réciproque est liée à la distance interréticulaire (d) des plans de diffraction de la phase cristalline. Il est donc possible de retrouver les angles de déviation θ si l'on connaît la distance entre l'échantillon et la caméra, appelée longueur de caméra (L) :

$$r = L \tan \theta$$

Il est alors de calculer les distances interréticulaires (d) auxquels les distances (r) correspondent selon la loi de Bragg :

$$2d \sin \theta = n\lambda$$

où λ est la longueur d'onde du rayonnement de l'électron (0.025 Å à 200 kV).

La MET nécessitant des échantillons très fins, des lames ultrafines ont été extraites des échantillons étudiés à l'aide d'un SEM équipé d'un faisceau d'ions focalisés (FIB pour *focused ion beam*). Le FIB est une technique destructive qui permet de réaliser des coupes fines (typiquement $20\mu\text{m} * 5\mu\text{m} * 100\text{nm}$) avec une précision nanométrique sur une zone cible de l'échantillon. La lame est dégagée en creusant à l'aide d'un faisceau focalisé d'ions gallium Ga^{3+} à la surface de l'échantillon. La lame est ensuite soudée sur une demi-grille MET.

Les lames FIB ont été réalisées sur des pyrites produites expérimentalement dans différentes conditions et sur des pyrites provenant d'échantillons naturels (Fig 15). Elles ont été faites à l'IEMN, Lille, avec un FEI Strata DB 235. L'usinage par faible courant d'ions Ga^{3+} permet de minimiser les artefacts, à savoir la contamination au Ga, le mélange des composés ou le dépôt du matériau enlevé à la surface de l'échantillon (Bernard et al., 2009 ; Schiffbauer et Xiao, 2009).

Les analyses MET ont été réalisées à l'IMPIC, Jussieu, sur un microscope JEOL 2100F équipé d'un canon à émission (FEG) Schottky à 200 kV. Le MET est également équipé d'un détecteur EDXS Jeol (Si(Li)) pour les cartographies chimiques à l'échelle du nanomètre (mesure 1nm). Les analyses EDXS sont généralement effectuées alors que le MET est utilisé en mode balayage transmission (STEM) utilisant une sonde focalisée et un détecteur annulaire à grand angle en champ sombre (HAADF). Les caractérisations minéralogiques ont pu être complétées via diffraction électronique par sélection d'aire (SAED) et microscopie à haute résolution (HRTEM).

3. Spectroscopie et microscopie d'absorption des rayons X

3.1. Principe de la spectroscopie d'absorption des rayons X

La spectroscopie d'absorption de rayons X (XAS) permet d'explorer l'environnement électronique d'un atome d'intérêt et de caractériser la structure des matériaux à l'échelle atomique (Fig 16A). Lorsque l'énergie d'un élément est proche de son niveau de transition électronique, il va absorber des photons X de manière spécifique (Fig 16B). Le XAS repose sur la mesure de la différence d'intensité entre le faisceau incident et le faisceau transmis pour une énergie donnée, permettant de détecter et de quantifier un élément chimique. Les données se présentent sous forme de spectres avec des pics d'absorption qui correspondent aux occurrences de différentes transitions électroniques, i.e. le passage d'électrons de cœur (couche K) vers les couches de valence (L, M et N).

Cette technique nécessite de contrôler précisément l'énergie des rayons X et repose sur le rayonnement synchrotron. Dans un synchrotron, les électrons émis par un canon à particules sont soumis à une accélération centripète jusqu'à atteindre l'énergie souhaitée – 2.75GeV pour le synchrotron SOLEIL (Bessière, 1996). Les électrons sont ensuite injectés dans l'anneau de stockage avant d'être envoyés dans les lignes de lumière, disposées sur toute la circonférence du synchrotron. Un jeu d'optique permet de sélectionner le rayonnement d'intérêt propre à chaque ligne pour mener des analyses selon une gamme d'énergie spécifique (de l'infrarouge aux rayons X).

L'étude de la partie la plus proche du seuil d'absorption (seuil K), le XANES (*pour X-ray Absorption Near Edge Structure*), s'effectue sur un intervalle d'énergie d'environ 50eV de part et d'autre du seuil d'absorption, aux états d'énergie les plus bas, avec une résolution de 100meV dans le seuil (Fig 17). Elle peut être utilisée pour renseigner sur l'état redox de l'élément ou sur son environnement local. Quant à la partie la plus éloignée du seuil d'absorption, l'EXAFS (*pour Extended X-ray absorption fine structure*), elle est constituée d'oscillations qui peuvent s'étendre jusqu'à 1000eV après le seuil, aux états d'énergie les plus élevés (Fig 17).

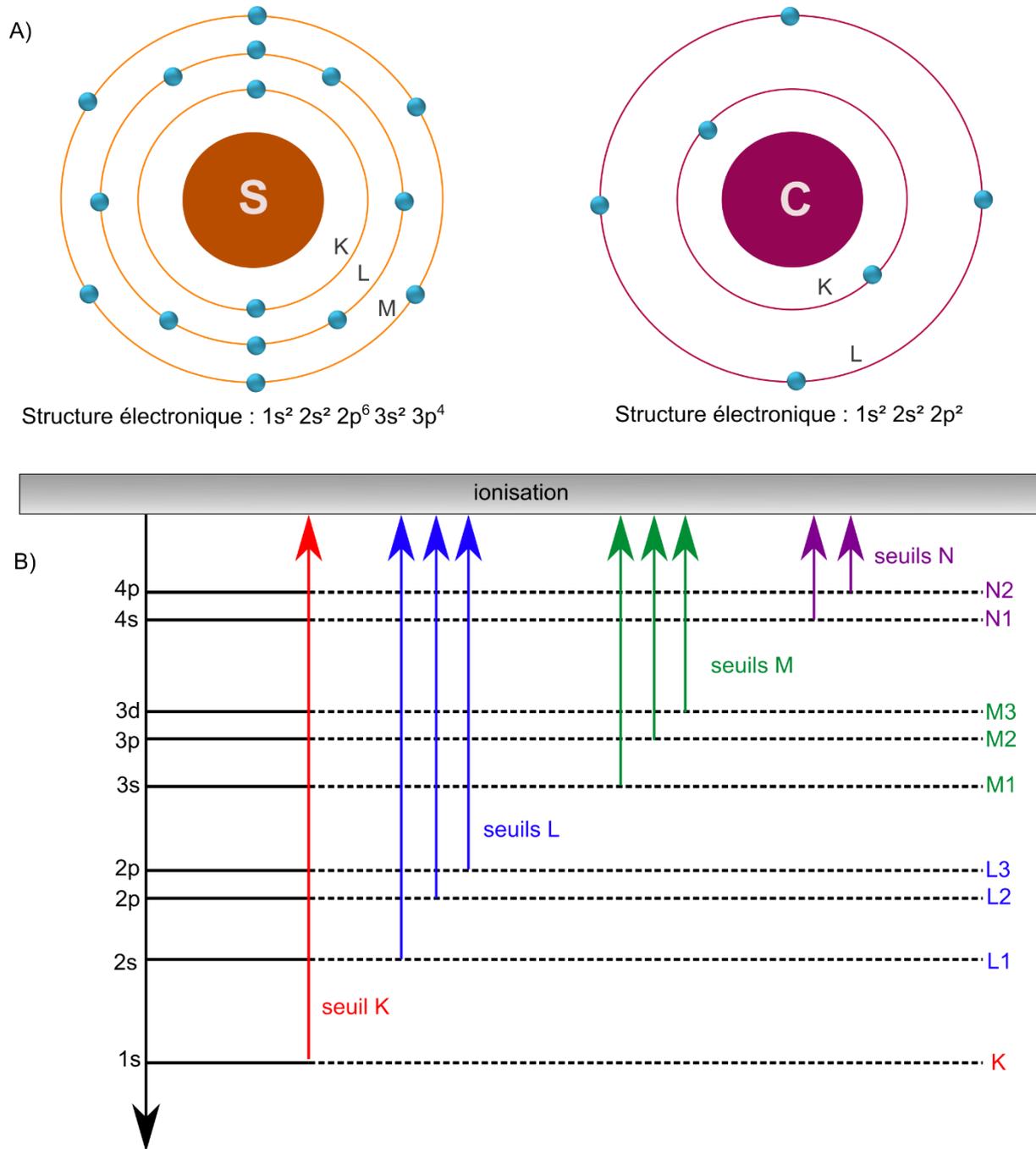


Figure 16 | A) Structures électroniques de l'atome de soufre et de l'atome de carbone. **B)** Niveaux d'énergie des différentes orbitales atomiques.

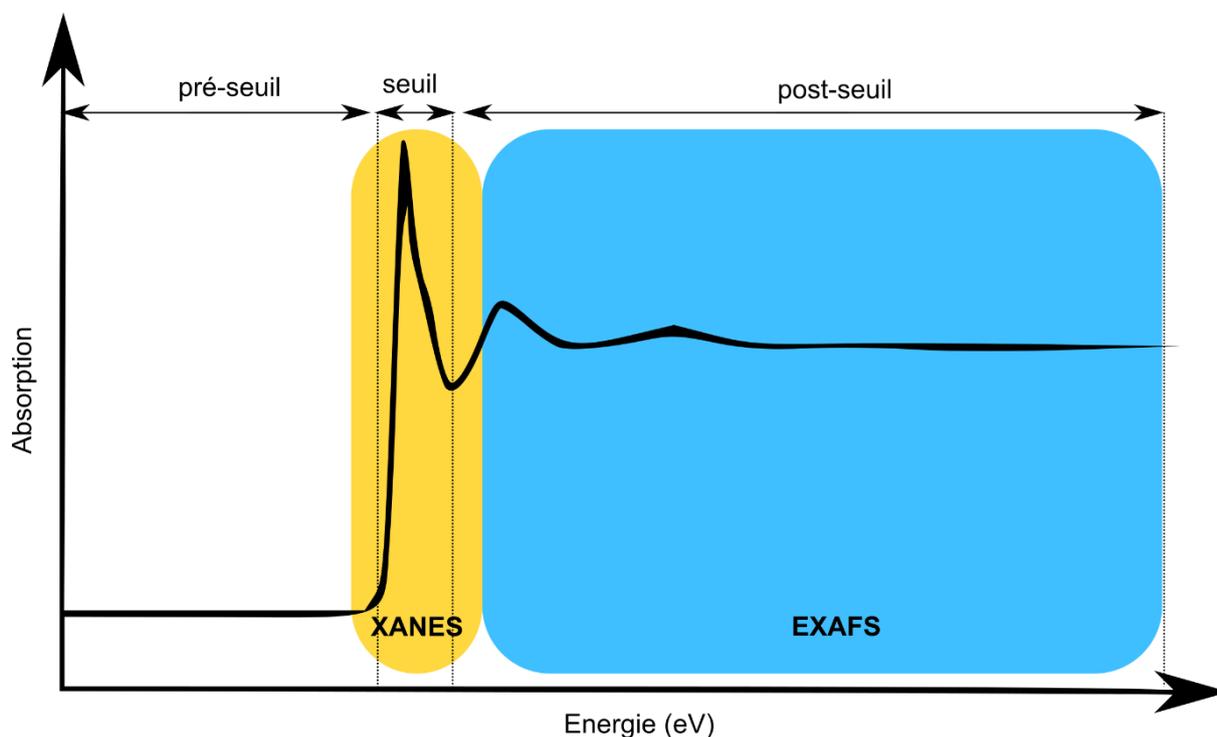


Figure 17 | Zones caractéristiques des signaux XANES (en jaune) et EXAFS (en bleu) sur un spectre d'absorption.

3.2. XANES au seuil K du soufre

Les mesures XANES au seuil K du soufre permettent de documenter la spéciation du soufre. Elles ont été réalisées au synchrotron SSRL de Stanford sur la ligne 4-3 (SSRL, California, CA, USA) avec un système Hitachi™ HTA et un détecteur de dérive Si 4-éléments pour les échantillons expérimentaux ou un détecteur PIPS pour les échantillons concentrés de référence. L'énergie d'incidence a été calibrée en mesurant une référence de thiosulfate (seuil d'absorption à 2472eV) sur une pastille de Si monocristalline (1 1 1) entre chaque changement de porte-échantillon durant l'expérience.

Les échantillons ont été préparés sous forme de poudre en conditions anoxiques dans une BaG Jacomex™ sous atmosphère de N₂ (< 1 ppm O₂), en centrifugeant 15mL d'échantillons liquides à 5000g pendant 10min. Les culots ont été séchés dans la BaG. Les poudres ainsi obtenues ont ensuite été transportées jusqu'au SSRL dans une boîte anoxique et préparées sur place. Quelques milligrammes de poudre pure ont été déposés sur du scotch Kapton, puis montés sur les porte-échantillons dans une BaG COY™ et analysés à température ambiante sous flux d'hélium. 1 à 4 scans ont été réalisés pour chaque échantillon.

Les données ont été calibrées et moyennées en utilisant le logiciel SIXPACK (Webb, 2005). Les spectres moyennés ont ensuite été normalisés en utilisant le logiciel ATHENA (Ravel et Newville, 2005). Pour l'analyse des données, des combinaisons linéaires ont été réalisées sur la base de composés de référence avec un programme basé sur l'algorithme Levenberg-Marquardt (Morin et al., 2003). La qualité du fit a été estimée par les facteurs R et χ^2 , et l'incertitude sur chaque paramètre est estimée dans un intervalle de confiance à 99.7% (3 sigma (protocole détaillé dans Baya et al., 2021).

Les spectres modèles de la nano-mackinawite (FeS), du soufre élémentaire (S(0)), de la pyrite nano-cristalline (FeS₂) sont disponibles dans Baya et al., 2021. Les composés de référence ont été synthétisés à l'IMPIC (Baya et al., 2021). La nano-mackinawite fait référence à une mackinawite biogénique synthétisée en incubant *Desulfovibrio capillatus* avec du citrate de fer (III) (Ikogou et al., 2017). Un aliquot de poudre de soufre élémentaire (Sigma Aldrich, pureté > 99.998) a été utilisé pour la calibration. La pyrite consiste en de la pyrite pure synthétisée selon le protocole décrit dans Baya et al. (2021). La greigite (Fe₃S₄) nano-cristalline a été synthétisée à température ambiante dans une BaG atmosphère N₂ (O₂ < 1ppm) en mélangeant du chlorure de fer (III) (FeCl₃) et du chlorure de fer (II) (FeCl₂) avec une solution de sulfure de sodium (Na₂S), conservé sous agitation magnétique pendant 3 mois, puis séché en BaG. Ce composé de référence contient des traces de FeS.

3.3. XANES au seuil K du carbone et microscopie d'absorption des rayons X

Le STXM (pour *scanning transmission X-ray microscopy*) est une technique de microscopie basée sur le XAS et qui permet de réaliser des cartographies d'absorption X. Contrairement à la microscopie optique, l'utilisation de lentilles traditionnelles n'est pas possible avec les rayons X. Des lentilles de Fresnel sont donc utilisées pour focaliser le faisceau sur l'échantillon à l'aide d'un réseau de diffraction circulaire. L'absorption du faisceau par l'échantillon peut alors être mesurée. La longueur d'onde très courte des rayons X (quelques nm) permet de sonder une très petite surface de l'échantillon avec une résolution pouvant aller jusqu'à 15nm en fonction de la lentille utilisée. L'échantillon est placé sur un support motorisé, ce qui permet de réaliser un balayage (comme pour le MEB) perpendiculairement à la trajectoire du faisceau et de reconstruire une image dans laquelle chaque pixel contient un spectre d'absorption X (hypermap).

Les mesures STXM ont été réalisées au seuil K du carbone sur les lames FIB de pyrite (voir section 2.3) au synchrotron SOLEIL, ligne HERMES (Saint-Aubin, France, Belkhou et al., 2015 ; Swaraj et al., 2017). Les analyses XANES-STXM au seuil K du carbone permettent de renseigner sur la présence de composés organiques dans l'échantillon et sur la nature des groupes fonctionnels qui les composent. En effet, les orbitales associées à une fonction donnée conduisent à des transitions variant sur un domaine d'énergie assez restreint, ce qui permet de retrouver la nature des fonctions chimiques présentes dans l'échantillon (Cody et al. 1995 ; Urquhart et al. 1999 ; Hitchcock et al. 2001 ; Le Guillou et al., 2018).

Les données XANES hypermap (stacks) ont été acquises avec une résolution spatiale de 100nm à une énergie d'incrément de 0.1eV sur le seuil d'absorption du carbone (270-340eV), avec un temps de comptage de moins de 1ms/px pour réduire les dégâts d'irradiation (Wang et al., 2009). Les alignements des stacks et le traitement des données XANES ont été réalisés en utilisant le package Hyperspy en langage python (De la Peña et al., 2018) et le logiciel aXis2000. La normalisation des données a été effectuée en utilisant le logiciel en libre accès QUANTORXS (Le Guillou et al., 2018).

Références

- Atomi H., Fukui T., Kanai T., Morikawa M., Imanaka T. (2004), Description of *Thermococcus kodakaraensis* sp. nov., a well-studied hyperthermophilic archaeon previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1. *Archaea* 1, 263 – 267.
- Atomi H. and Reeve J. (2019), Microbe Profile: *Thermococcus kodakarensis*: the model hyperthermophilic archaeon. *Microbiology* 165, 1166–1168.
- Baya C., Le Pape P., Baptiste B., Brest J., Landrot G., Elkaim E., Noël V., Blanchard M., Ona-Nguema G., Juillot F. and Morin G. (2021), Influence of trace level As or Ni on pyrite formation kinetics at low temperature. *Geochimica Cosmochimica Acta* 300, 333–353.
- Bayliss P. (1977), Crystal structure refinement of a weakly anisotropic pyrite. *American Mineralogist*, 62(11-12), 1168–1172.
- Belkhou R., Stanescu S., Swaraj S., Besson A., Ledoux M., Hajlaoui M., Dalle D. (2015), HERMES: a soft X-ray beamline dedicated to X-ray microscopy, *Journal of Synchrotron Radiation*, 22(4), 968-979.
- Berar J.-F. et Baldinozzi G. (1998), XND code: From X-ray laboratory data to incommensurately modulated phases. *Rietveld modeling of complex materials. CPD Newsletter* 20, 3–5.
- Bernard S., Benzerara K., Beyssac O., Brown G.E., Grauvogel Stamm L., Düringer P. (2009), Ultrastructural and chemical study of modern and fossil sporoderms by Scanning Transmission X517 ray Microscopy (STXM), *Review of Palaeobotany and Palynology* (1–2), 248-261.
- Bessière M. (1996), Introduction au rayonnement synchrotron et à ses avantages. *Le Journal de Physique IV* 06, C4-511-C4-535.
- Bish D. et Post J. E. (1993), Quantitative mineralogical analysis using the rietveld full-pattern fitting method. *American Mineralogist* 789, 932–940.
- Bragg W. L. (1913), The structure of some crystals as indicated by their diffraction of X-rays. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 89(610), 248–277.
- Cody G.D., Botto R.E., Ade H., et al (1995), Inner-Shell Spectroscopy and Imaging of a Subbituminous Coal: In-Situ Analysis of Organic and Inorganic Microstructure Using C(1s)-,Ca(2p)-,and C1(2s)-NEXAFSt. *Energy & Fuels* 9, 525–533.
- De la Peña F., Ostasevicius T., Fauske V.T., Burdet P., Prestat E., Jokubauskas P., Nord M., MacArthur K.E., Sarahan M., Johnstone D.N., Taillon J., Eljarrat A., Migunov V., Caron J., Furnival T., Mazzucco S., Aarholt T., Walls M., Slater T., Winkler F., Martineau B., Donval G., McLeod R., Hoglund E.R., Alxneit I., Hjorth I., Henninen T., Zagonel L.F., Garmannslund A. (2018), *HyperSpy* v1. 4.
- Duverger (2021), *Biominéralisation et diagenèse des sulfures de fer produits par les bactéries sulfato-réductrices : approches expérimentales*. Thèse, 275p.
- Gates-Rector S. et Blanton T. (2019), “The powder diffraction file: a quality materials characterization database.” *Powder Diffraction* 34(4), 352-360.
- Gorlas A., Croce O., Oberto J., Gaudiard E., Forterre P., Marguet E. (2014), *Thermococcus nautili* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a hydrothermal deep-sea vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, 1802–1810.

- Gorlas A., Marguet E., Gill S., Geslin C., Guigner J.-M., Guyot F., Forterre P. (2015), Sulfur vesicles from Thermococcales: A possible role in sulfur detoxifying mechanisms. *Biochimie*, 118, 356-364.
- Gorlas A., Jacquemot P., Guigner J.M., Gill S., Forterre P., Guyot F. (2018), Greigite nanocrystals produced by hyperthermophilic archaea of Thermococcales order. *PLoS One* 13: e0201549.
- Gorlas A., Mariotte T., Morey L., Truong C., Bernard S., Guigner J.-M., Oberto J., Baudin F., Landrot G., Baya C., Le Pape P., Morin G., Forterre P., Guyot F. (2022), Precipitation of greigite and pyrite induced by Thermococcales: an advantage to live in Fe- and S-rich environments? *Environmental Microbiology*.
- Gražulis S., Daškevič A., Merkys A., Chateigner D., Lutterotti L., Quirós M., Serebryanaya N. R., Moeck P., Downs, R. T. et Le Bail, A. (2012). Crystallography Open Database (COD) : An open-access collection of crystal structures and platform for world-wide collaboration. *Nucleic Acids Research*, 40(D1):D420–D427.
- Hitchcock A.P., Koprinarov I., Tyliszczak T., et al (2001), Optimization of scanning transmission X-ray microscopy for the identification and quantitation of reinforcing particles in polyurethanes. *Ultramicroscopy* 88, 33–49.
- Huber R. et Stetter K.O. (2001), Discovery of hyperthermophilic microorganisms. *Methods in Enzymology* 330, 11–24.
- Ijjaali M., Malaman B., Gleitzer C., Warner J., Hriljac J., Cheetham A. (1990), Stability, Structure Refinement, and Magnetic Properties of α -Fe₂PO₄O. *Journal of Solid State Chemistry* 86, 195-205.
- Ikogou M., Ona-Nguema G., Juillot F., Le Pape P., Menguy N., Richeux N., Guigner J.-M., Noël V., Brest J., Baptiste B. and Morin G. (2017) Long-term sequestration of nickel in mackinawite formed by *Desulfovibrio capillatus* upon Fe(III)-citrate reduction in the presence of thiosulfate. *Applied Geochemistry* 80, 143–154.
- Itoh T. (2003), Taxonomy of nonmethanogenic hyperthermophilic and related thermophilic archaea. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96, 203–212.
- Kanai T., Imanaka T., Atomi H. (2013), Hydrogen Production by the Hyperthermophilic Archeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Journal of the Japan Petroleum Institute* 56 (5), 267 – 279.
- Knoll M. et Ruska E. (1932), Das Elektronenmikroskop. *Z. Physik* 78, 318–339.
- Lecasble M. (2023), Evolution moléculaire et isotopique de la matière organique en condition d'altération hydrothermale au sein des astéroïdes carbonés. Thèse, 174p.
- Le Guillou C., Bernard S., De la Pena F., Le Brech Y. (2018), XANES-Based Quantification of Carbon Functional Group Concentrations. *Analytical Chemistry* 90, 8379–8386.
- Lennie A. R., Redfern S. A. T., Schofield P. F., Vaughan D. J. (1995), Synthesis and Rietveld crystal structure refinement of mackinawite, tetragonal FeS. *Mineralogical Magazine* 59, 677–683.
- Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP related assays of biomass, enzymes and metabolites. *Methods in Enzymology* 305, 346-370.
- Morin G., Juillot F., Casiot C., Bruneel O., Personné J.-C., Elbaz- Poulichet F., Leblanc M., Ildefonse P. and Calas G. (2003), Bacterial formation of tooeleite and mixed arsenic(III) or arsenic(V)-iron(III) gels in the Carnoulès acid mine drainage, France. A XANES, XRD, and SEM study. *Environ. Sci Technol* 37, 1705–1712.
- Ravel B. et Newville M. (2005), ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT, *Journal of Synchrotron Radiation* 12, 537–541.

- Rettig S. J. et Trotter J. (1987), Refinement of the structure of orthorhombic sulfur, α -S₈. *Acta Crystallographica Section C* 43, 2260–2262.
- Rietveld H. M. (1969), A profile refinement method for nuclear and magnetic structures, *Journal of Applied Crystallography* 2(2), 65-71.
- Sato T., Fukui T., Atomi H., Imanaka T. (2003), Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Journal of Bacteriology* 185, 210–220.
- Schiffbauer J. et Xiao S. (2009), Novel application of focused ion beam electron microscopy (FIB-EM) in preparation and analysis of microfossil ultrastructures: A new view of complexity in early Eukaryotic organisms. *PALAIOS* 24 (9), 616–626.
- Soler N., Krupovic M., Marguet E., Forterre P. (2015), Membrane vesicles in natural environments: a major challenge in viral ecology. *ISME Journal* 9, 793–796.
- Stanjek H., Schneider J. (2000), Anisotropic peak broadening analysis of a biogenic soil greigite (Fe₃S₄) with Rietveld analysis and single peak fitting, *American Mineralogist* 85(5-6), 839–846.
- Swaraj S., Stanescu S., Rioult M., Besson A., Hitchcock A. P. (2017), Performance of the HERMES beamline at the carbon K-edge, *Journal of Physics: Conference Series*, 849, 012046.
- Takai, K., A. Sugai, T. Itoh and K. Horikoshi. (2000), *Palaeococcus ferrophilus* gen. nov., sp. nov., a barophilic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 489–500.
- Urquhart S.G., Hitchcock A.P., Smith A.P., et al (1999), NEXAFS spectromicroscopy of polymers: overview and quantitative analysis of polyurethane polymers. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 100:119–135.
- Van Meerssche M. et Feneau-Dupont J. (1984), *Introduction à la cristallographie et à la chimie structurale*, 3^{ème} édition. Peeters, Louvain-La-Neuve.
- Verhees C. H., Kengen S. W. M., Tuininga J. E., Schut G. J., Adams M. W. W., De Vos W. M., Van Der Oost J. (2003), The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *Biochemical Journal* 375, 231-246.
- Wang J., Morin C., Li L., Hitchcock A.P., Scholl A., Doran A. (2009), Radiation damage in soft X-ray microscopy, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 170(1–3), 25-36.
- Webb S. M. (2005), SIXpack: a graphical user interface for XAS analysis using IFEFFIT. *Physica Scripta*, 1011.

Chapitre III.

Caractérisation du métabolisme de *T. kodakarensis*

I. Enjeux et stratégie

1. Enjeux

Il a été montré précédemment que les Thermococcales produisent différents minéraux de sulfures de fer et de manière plus ou moins efficace en fonction du milieu dans lequel elles sont cultivées (Gorlas et al., 2022). Il est donc nécessaire d'avoir une bonne compréhension de la réponse métabolique de l'organisme à son environnement afin de comprendre dans quelles conditions vont se former les minéraux au contact de l'organisme.

Les Thermococcales présentent deux voies métaboliques qui se distinguent selon la teneur en soufre dans le milieu : (1) un métabolisme réducteur de soufre élémentaire S(0) dans un milieu riche en soufre (Atomi et al., 2004) et (2) un métabolisme fermentaire de composés organiques, tels que des acides aminés, des peptides et des sucres, dans un milieu dépourvu de soufre élémentaire S(0) (Kanai et al., 2013). Qui plus est, des études réalisées sur la Thermococcales *Pyrococcus furiosus* ont montré un changement métabolique, de réduction du soufre à fermentation de composés organiques, en deçà d'un certain seuil de soufre élémentaire (Schut et al., 2013). Une autre voie métabolique a également été supposée, à savoir (3) la désulfuration de la L-cystine via la cystéine désulfurase (Hidese et al., 2014), ce qui permettrait la réduction de polysulfures à la place du soufre élémentaire. D'autres voies métaboliques sont donc envisageables en fonction de la concentration en soufre dans le milieu.

Bien que plusieurs études aient mis en évidence les gènes impliqués dans les voies métaboliques associées à la présence de soufre et de pyruvate ainsi que leur régulation, il y a encore trop peu de données concernant la physiologie, l'activité cellulaire et les produits métaboliques au cours de la croissance cellulaire dans ces deux conditions. De surcroît, aucune donnée n'est disponible lorsque les Thermococcales sont cultivées en présence de L-cystine alors même qu'il pourrait s'agir d'une voie métabolique exprimée dans les environnements naturels car les disulfures organiques ou minéraux y sont très nombreux (e.g. Bandy et al., 1982 ; Karpov et al., 1983 ; Isidorov et al., 1990 ; Gartman et al., 2014).

La caractérisation des produits métaboliques issus des trois métabolismes décrits ci-dessus, ainsi que de l'activité cellulaire découlant de ces différentes voies métaboliques, sont donc indispensables. Elles permettront de contraindre la formation des minéraux formés en présence des Thermococcales, et donc des biosignatures potentielles.

2. Stratégie

Ce travail a permis d'étudier les croissances cellulaires en fonction des trois voies métaboliques précédemment identifiées (réduction du soufre élémentaire, fermentation des composés organiques, désulfuration de la L-cystine). Pour cela, nous avons cultivés les cellules à la température et au pH optimaux de croissance de *T. kodakarensis* KOD1 (soit 85°C à pH 7) dans le milieu de culture Ravot en présence de trois accepteurs d'électrons différents voir Chapitre II) :

- Ravot + soufre élémentaire S(0) : contenant 1g/L de soufre élémentaire S(0) (soit 30mmolal) sous forme de particules de soufre.
- Ravot + L-cystine : contenant 4,1 mmolal de L-cystine (C₆H₁₂N₂O₄S₂), une molécule dimère de l'acide aminé cystéine (C₃H₇NO₂S) par formation d'un pont disulfure.
- Ravot + pyruvate de sodium : contenant 5g/L de pyruvate de sodium (C₃H₃O₃Na), un métabolite impliqué dans plusieurs voies métaboliques majeures telles que la glycolyse ou le cycle de Krebs.

Pour chaque condition, nous avons réalisé des suivis de croissance sur 24h (par des prélèvements toutes les 3h de 0h à 12h, puis un dernier prélèvement à 24h), afin (1) d'évaluer le nombre de cellules par comptage cellulaire et déterminer l'activité cellulaire au cours du temps par l'ATP-métrie, (2) d'identifier les produits métaboliques en phase gazeuse à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse (voir Chapitre II pour les méthodes détaillées) et enfin (3) quantifier la production d'acétate afin d'avoir une première idée des produits métaboliques en phase liquide.

En particulier, la méthode de culture mise en place au cours de cette thèse constitue une innovation méthodologique dans la culture d'organismes hyperthermophiles. Afin de réaliser les mesures de chromatographie en phase gazeuse, nous avons développé la culture de Thermococcales dans des bombes réactionnelles en titane traditionnellement utilisées pour les expériences de fossilisation ou d'altération jusqu'à 300°C. Ces bombes réactionnelles peuvent être reliées directement au chromatographe et supportent une pression et une température importantes, elles sont donc idéales pour la culture d'organismes extrêmophiles. Ce système permet, d'une part, d'apporter une information directe sur l'activité métabolique et sur l'impact géochimique des cellules sur leur environnement à travers la possibilité de mesurer leurs produits métaboliques gazeux. D'autre part, il permettra de réaliser des expériences en conditions élevées de pression et de température, ce qui assure une continuité avec des expériences de minéralisation et, dans une perspective plus lointaine, avec des expériences de fossilisation.

Il est à noter que chaque prélèvement n'est pas issu de la même culture, mais de cultures différentes réalisées chacune dans une bombe distincte à partir du même inoculum. Néanmoins, la réalisation de triplicats a permis d'obtenir des données robustes concernant la physiologie cellulaire et les produits métaboliques.

II. Résultats

1. Mesures de l'activité cellulaire

Les courbes de suivi de croissance (Fig 1A) montrent une phase de latence entre 0h et 3h pour les conditions soufre et cystine, et entre 0h et 6h pour la condition pyruvate ; l'acclimatation des cellules est donc plus lente lorsque le milieu ne contient que des composés organiques. *Nota bene*, au préalable, deux générations de précultures ont été réalisées afin d'assurer l'adaptation de cellules issues d'un milieu contenant du S(0) aux deux autres milieux.

En condition soufre, la phase de croissance exponentielle a lieu entre 3h et 12h. La vitesse de croissance maximale est de 1.56 h^{-1} , ce qui indique un temps de génération de 27min (Table 1, Fig 1A). Pour ces temps de croissance, on observe une forte quantité d'ATP (total, intracellulaire et extracellulaire) dans nos échantillons avec une quantité d'ATP total de l'ordre de 60 pmol/mL. Les cultures atteignent la phase stationnaire à partir de 12h d'incubation. Cette phase stationnaire est marquée par une diminution de la quantité d'ATP total, intracellulaire et extracellulaire à l'entrée en phase stationnaire, qui peut être due à une baisse de la production d'ATP. En effet, ces baisses d'ATP sont corrélées à une forte baisse de la division cellulaire (Fig 1B, C et D). La très faible quantité d'ATP extracellulaire suggère qu'il n'y a pas encore de lyse cellulaire après 24h de culture.

En condition cystine, la croissance suit une même tendance qu'en condition soufre avec une phase exponentielle qui débute à partir de 3h pour atteindre un nombre maximal de cellule comparable (de l'ordre de 9×10^7 cellules/mL) à 24h en phase stationnaire (Table 1, Fig 1A). Malgré une vitesse de croissance maximale de 1.70 h^{-1} indiquant un temps de génération de 25 min (Table 1, Fig 1A), comparable au temps de génération en soufre, on note des quantités d'ATP total, intracellulaire et extracellulaire bien inférieures en condition cystine. Après 12h d'incubation, on observe une quantité d'ATP total de 20 pmoles/mL en cystine contre 65 pmoles/mL en soufre (Fig 1B, C et D). La quantité d'ATP total augmente très légèrement entre 12h et 24h (20 pmoles/mL et 23.1 pmoles/mL, respectivement) (Fig 1B), et est certainement associée à la faible augmentation d'ATP extracellulaire (6.3 pmoles/mL et 14.5 pmoles/mL, respectivement) (Fig 1C). À l'inverse, on observe une baisse de l'ATP intracellulaire (13.7 pmoles/mL contre 8.7 pmoles/mL) (Fig 1D). Cette baisse est corrélée à une forte diminution de la division cellulaire, ce qui pourrait indiquer une baisse de la production d'ATP comme en condition soufre (Fig 1A). Associée à la faible augmentation de la quantité d'ATP extracellulaire, cela pourrait indiquer un tout début de lyse cellulaire.

En condition pyruvate, les quantités d'ATP total, intracellulaire et extracellulaire sont comparables à celle de la condition cystine (Fig 1B, C et D) alors même que le temps de génération est plus faible, à savoir 37min (Table 1, Fig 1A). La phase exponentielle ne démarre qu'à partir de 6h (Fig 1A). La phase stationnaire est moins marquée que dans les conditions soufre et cystine car elle survient plus tardivement ; des échantillonnages entre 12h et 24h seraient nécessaires afin de pouvoir l'observer. La croissance cellulaire est corrélée à la production d'ATP totale avec une quantité comparable entre 12h et 24h et entre 0h et 12h, soit une quantité d'environ 20 pmoles/mL (Fig 1B). Cette grande quantité d'ATP totale peut être liée à la quantité d'ATP extracellulaire, qui augmente drastiquement entre 12h (6.8 pmoles/mL) et 24h (48.7 pmoles/mL) (Fig 1D). À l'inverse, la production d'ATP intracellulaire diminue nettement (11.9 pmoles/mL et 2.6 pmoles/mL, respectivement). De fortes quantités d'ATP extracellulaire pourraient indiquer une lyse cellulaire à 24h. Le nombre élevé de cellules lors du comptage cellulaire serait alors erroné à cause de la présence de cellules fantômes.

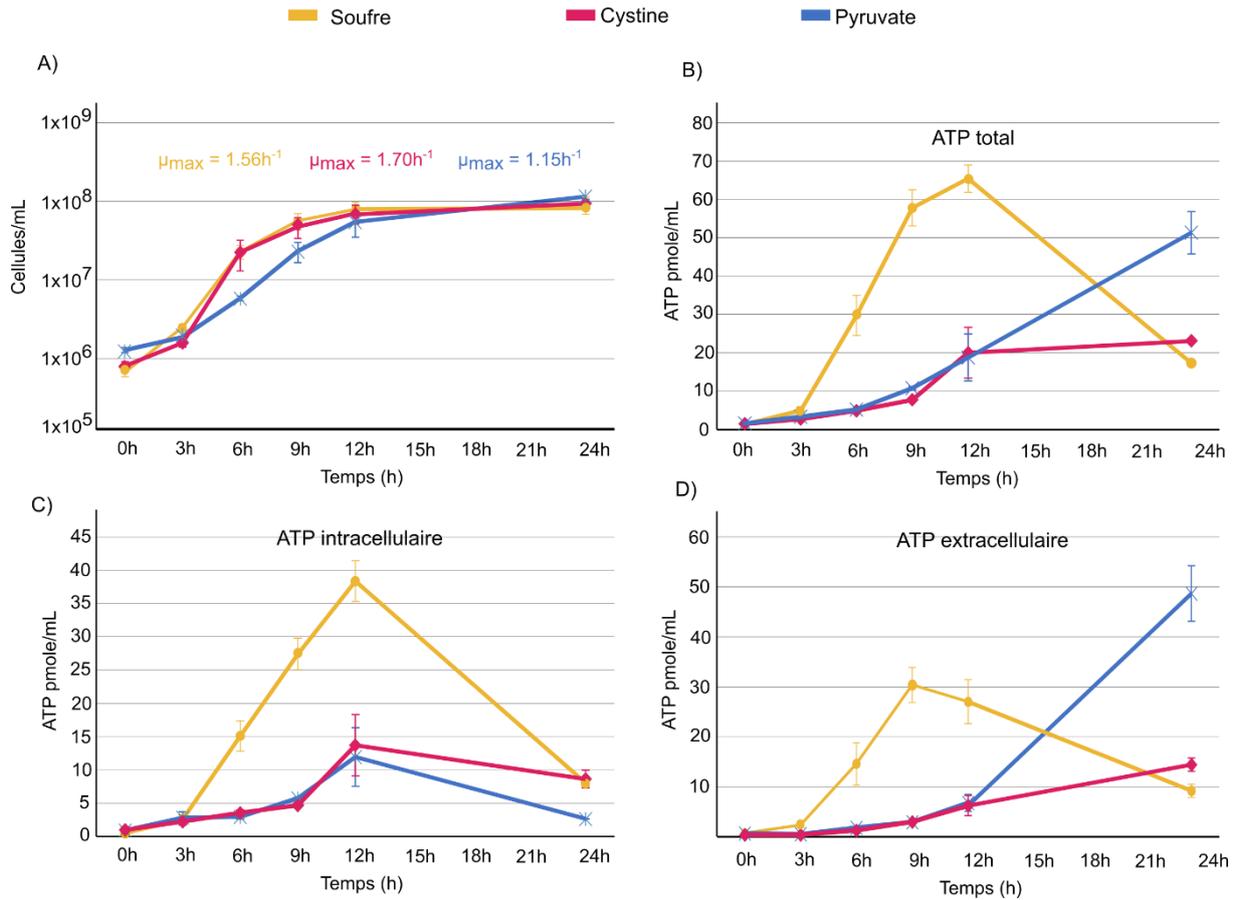


Figure 1 | A) Courbes de croissance en cellules/mL pour les conditions soufre, cystine et pyruvate sur 24h de suivi. Courbes d'activité **B)** de l'ATP total, **C)** de l'ATP intracellulaire et **D)** de l'ATP extracellulaire en pmole/mL

Table 1 | Résultats des comptages cellulaires en cellules/mL et des mesures d'ATP en pmoles/mL (ATPt = ATP totale, ATPi = ATP intracellulaire, ATPe = ATP extracellulaire) pour les conditions soufre, cystine et pyruvate.

Temps	Cellules/mL	ATPt	ATPi	ATPe	Temps de génération
Condition soufre					
0h	6.6E+5 (1.7E+5)	1.3 (0.6)	0.5 (0.4)	0.8 (0.4)	27min
3h	2.5E+6 (5.0E+5)	5.0 (1.9)	2.6 (1.4)	2.4 (1.0)	
6h	2.3E+7 (9.1E+6)	29.7 (10.4)	15.1 (4.6)	14.6 (8.2)	
9h	5.7E+7 (2.7E+7)	57.8 (9.4)	27.4 (4.8)	30.4 (7.0)	
12h	8.0E+7 (3.6E+7)	65.4 (7.1)	38.4 (6.2)	27.1 (8.8)	
24h	9.2E+7 (4.7E+7)	17.3 (1.0)	8.1 (1)	9.3 (2.6)	
Condition cystine					
0h	8.1E+05 (2.0E+5)	1.4 (1.2)	1.0 (0.8)	0.4 (0.2)	25min
3h	1.6E+06 (3.9E+5)	2.7 (1.2)	2.3 (1.2)	0.5 (0.2)	
6h	2.3E+07 (1.9E+7)	4.9 (0.8)	3.6 (0.8)	1.3 (0.4)	
9h	4.8E+07 (2.8E+7)	7.7 (0.6)	4.7 (0.2)	3.0 (0.6)	
12h	7.2E+07 (3.7E+7)	20.0 (13.2)	13.7 (9.2)	6.3 (4.0)	
24h	9.1E+07 (1.8E+7)	23.1 (0.1)	8.7 (2.8)	14.5 (2.6)	
Condition pyruvate					
0h	1.3E+6 (1.9E+5)	1.6 (0.2)	0.9 (0.6)	0.7 (0.1)	36min
3h	1.9E+6 (9.3E+5)	3.3 (0.4)	2.8 (1.8)	0.6 (0.1)	
6h	5.8E+6 (8.3E+5)	5.2 (0.4)	3.0 (0.6)	1.9 (0.1)	
9h	2.3E+7 (1.3E+7)	10.8 (0.8)	5.8 (0.2)	3.0 (0.6)	
12h	5.5E+7 (4.0E+7)	18.8 (12.2)	11.9 (8.8)	6.8 (2.4)	
24h	1.1E+8 (0)	51.3 (11.0)	2.6 (0.1)	48.7 (11.0)	

On observe donc un temps de génération rapide associé à une forte quantité d'ATP intracellulaire en condition soufre, et un temps de génération plus lent associé à une plus faible quantité d'ATP intracellulaire en condition pyruvate. Malgré une concentration cellulaire en augmentation à 24h, on note au même temps une forte quantité d'ATP extracellulaire en condition pyruvate, ce qui pourrait suggérer que des cellules fantômes ont été comptées à la place de cellules vivantes. Quant à la condition cystine, elle présente un temps de génération rapide associé à une faible quantité d'ATP intracellulaire.

2. Identification et quantification des produits métaboliques

2.1. Mesure des produits métaboliques en phase gazeuse

Nota bene, les pressions partielles des gaz présentées ici sont celles contenues dans la boucle de chargement. Les gaz se décompressent dans la ligne externe allant de la bombe à la boucle de chargement, par conséquent leurs pressions partielles absolues sont inférieures à celles de l'échantillon.

Certains gaz identifiés lors des suivis de croissance résultent de la production métabolique des cellules tandis que d'autres sont inhérents au montage expérimental. Le H₂O provient de l'évaporation du milieu de culture, tandis que le mélange O₂/N₂, principal composant de l'air environnant, peut provenir de micro fuites dans les connectiques du GC-TCD (voir Chapitre II). Dans le cas des gaz issus de l'activité métabolique des cultures (H₂, CO₂ et H₂S), on observe une augmentation progressive de la surface des pics au cours du temps ce qui témoigne d'une production continue (Fig 2, 3 et 4). Le H₂ et le CO₂ sont observés dans les trois conditions à partir de 3h de culture tandis que le H₂S est observé uniquement en condition soufre à partir de 9h de culture (Fig 2, 3 et 4). Un pic non identifié à 13 min de rétention a été observé dans certains échantillons (24h en soufre, 6h en cystine et 24h en pyruvate) et pourrait correspondre à de l'ammoniac (Fig 2, 3 et 4). Il ne s'agit pas d'une production progressive, ce qui indiquerait plutôt une contamination.

Bien que le H₂ soit produit dans les trois conditions, on note une production plus importante en condition pyruvate par rapport aux conditions soufre et cystine, avec un taux de production de 0.92 h⁻¹ contre 0.55 h⁻¹ et 0.40 h⁻¹, respectivement (Fig 5A). En normalisant la production d'H₂ au nombre de cellules, on remarque une production de H₂ bien plus importante en condition pyruvate, avec un taux de production de 0.33 h⁻¹ (Fig 5B). Par comparaison, le taux de production est de -0.03 h⁻¹ en condition soufre et de -0.18 h⁻¹ en condition cystine (Fig 5B). Les cellules sont donc bien plus productives en H₂ lorsqu'elles sont cultivées avec du pyruvate.

Le taux de production de CO₂ est plus élevé en condition soufre, à raison de 0.71 h⁻¹ (Fig 5C). Il est un peu plus faible en condition pyruvate et relativement bas en condition cystine, à raison de 0.54 h⁻¹ et de 0.33 h⁻¹, respectivement (Fig 5C). En normalisant les pressions partielles de CO₂ au nombre de cellules, on constate, pour chaque condition, une production plus importante de CO₂ durant la phase de latence qui diminue ensuite durant la phase de croissance exponentielle (Fig 5D).

La production de H₂S, uniquement en condition soufre, atteint un taux de production très élevé de 1.44 h⁻¹ (Fig 5E). La production de H₂S est importante durant la phase exponentielle. On note un taux de production par cellule de 0.41 h⁻¹, ce qui est encore plus élevé que le taux de production par cellule de H₂ en condition pyruvate (Fig 5F).

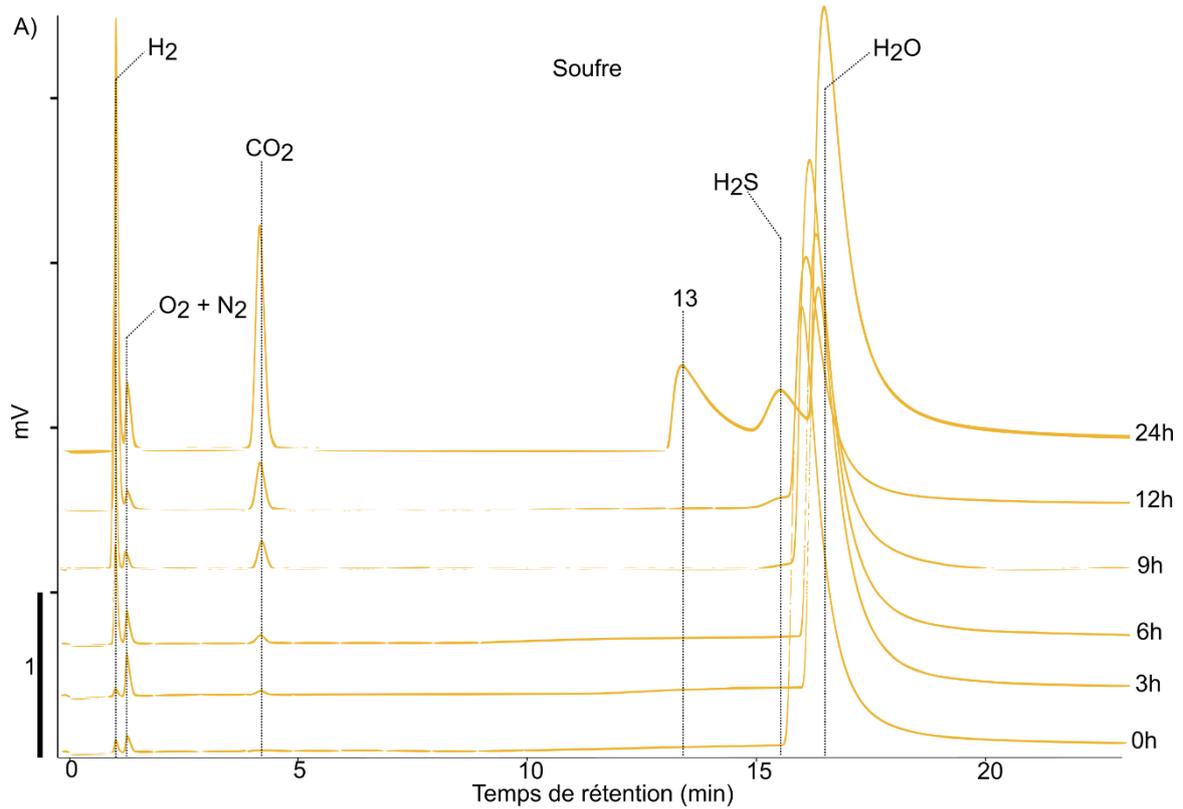


Figure 2 | Exemple d'un suivi des gaz produits par des cultures de *T. kodakarensis* en 24h pour la condition soufre. Les gaz sont identifiés selon leur temps de rétention : H₂ = 1min, O₂+N₂ à= 1.5min, CO₂ = 4.3min, non identifié à 13min, H₂S = 15.3min et H₂O = 16min. Tous les chromatographes sont normalisés au pic de l'eau.

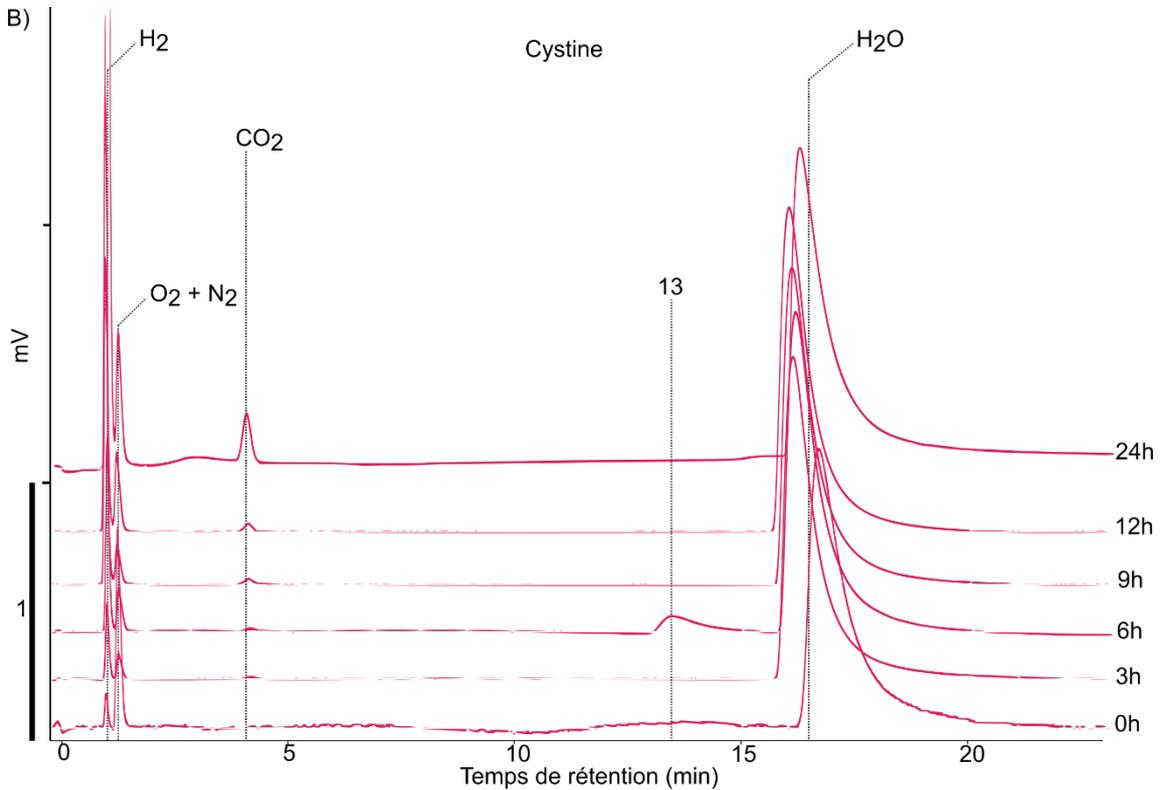


Figure 3 | Exemple d'un suivi des gaz produits par des cultures de *T. kodakarensis* en 24h pour la condition cystine. Les gaz sont identifiés selon leur temps de rétention : H₂ = 1min, O₂+N₂ à= 1.5min, CO₂ = 4.3min, non identifié à 13min, H₂S = 15.3min et H₂O = 16min. Tous les chromatographes sont normalisés au pic de l'eau.

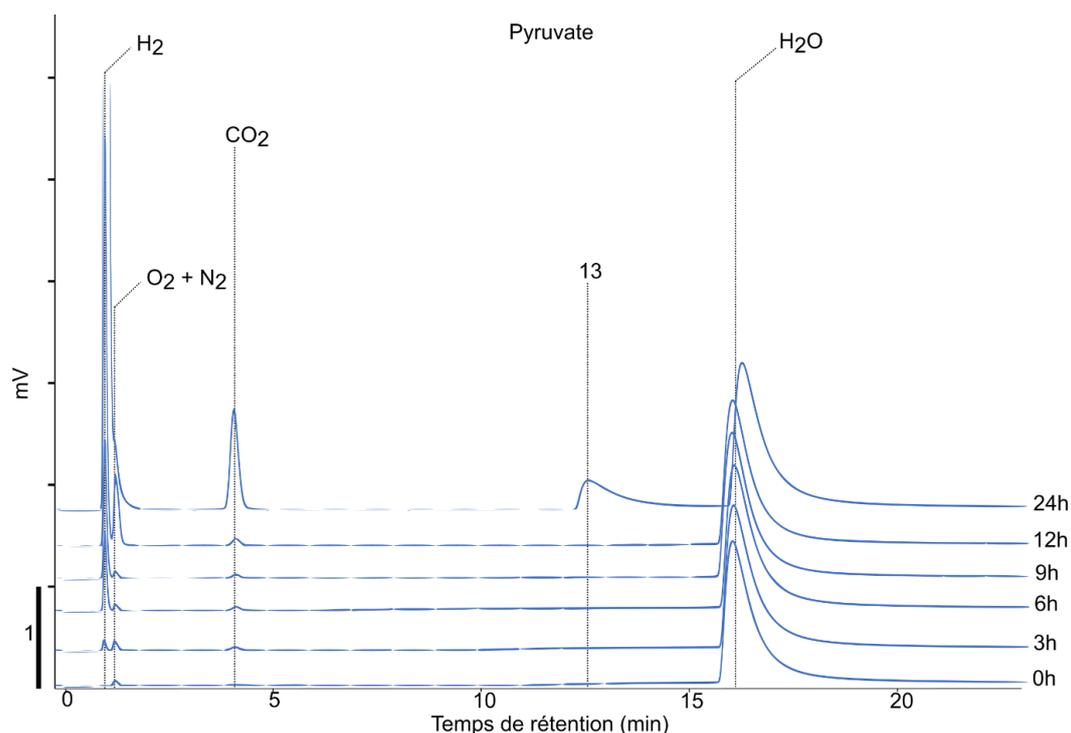


Figure 4 | Exemple d'un suivi des gaz produits par des cultures de *T. kodakarensis* en 24h pour la condition pyruvate. Les gaz sont identifiés selon leur temps de rétention : H₂ = 1min, O₂+N₂ à= 1.5min, CO₂ = 4.3min, non identifié à 13min, H₂S = 15.3min et H₂O = 16min. Tous les chromatogrammes sont normalisés au pic de l'eau.

Table 2 | Résultats de la quantification de gaz contenus dans la boucle de chargement du GC-TCD pour les conditions soufre, cystine et pyruvate. Les pressions partielles de H₂, de CO₂ et de H₂S sont exprimées en bar. Les marges d'erreur, calculées à partir des valeurs moyennes sur trois répliques, sont indiquées entre parenthèses.

Temps	H ₂	CO ₂	H ₂ S
Condition soufre			
0h	1.0E-4 (3.1E-5)	2.3E-4 (2.3E-4)	0
3h	1.9E-4 (5.5E-5)	1.4E-3 (4.2E-4)	0
6h	1.6E-3 (7.4E-4)	4.9E-3 (1.6E-4)	2.0E-3 (8.6E-4)
9h	2.8E-3 (1.7E-5)	1.1E-2 (1.9E-5)	5.5E-3 (1.2E-3)
12h	7.8E-3 (4.0E-4)	3.3E-2 (4.7E-3)	3.5E-2 (7.0E-3)
24h	7.9E-3 (1.9E-3)	9.3E-2 (9.8E-3)	1.3E-1 (2.2E-3)
Taux de production	0.55	0.71	1.44
Condition cystine			
0h	2.0E-4 (1.6E-4)	4.8E-4 (2.7E-4)	0
3h	5.1E-4 (3.0E-4)	1.2E-3 (2.9E-4)	0
6h	1.4E-3 (8.4E-4)	1.8E-3 (6.2E-4)	0
9h	2.6E-3 (1.4E-3)	2.6E-3 (6.0E-4)	0
12h	4.4E-3 (1.2E-3)	3.8E-3 (5.2E-4)	0
24h	5.7E-3 (2.7E-3)	8.4E-3 (2.2E-3)	0
Taux de production	0.40	0.33	na
Condition pyruvate			
0h	3.5E-5 (1.7E-5)	6.9E-4 (1.1E-4)	0
3h	5.4E-4 (2.0E-4)	2.6E-3 (8.1E-4)	0
6h	2.9E-3 (3.5E-4)	3.7E-3 (3.6E-4)	0
9h	5.3E-3 (9.2E-4)	4.4E-3 (4.7E-5)	0
12h	1.0E-2 (2.4E-3)	6.3E-3 (1.3E-3)	0
24h	1.3E-1 (1.5E-2)	7.9E-2 (9.3E-3)	0
Taux de production	0.92	0.54	na

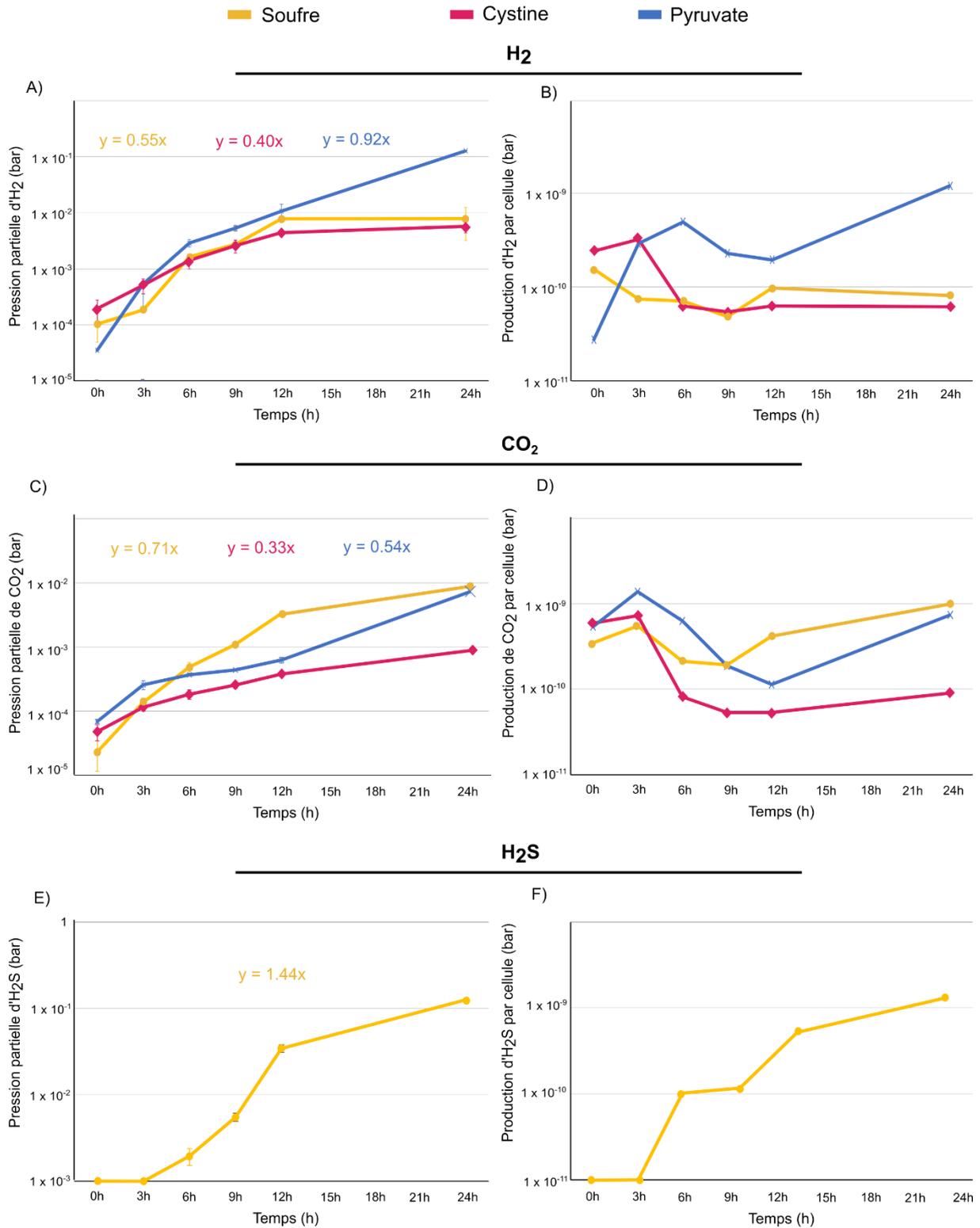


Figure 5 | Evolution de la pression partielle des gaz mesurée dans la boucle de chargement du GC-TCD et leur production par cellule (en bar) au cours du temps pour les conditions soufre, cystine et pyruvate. **A)** Pressions partielles d'H₂ et **B)** normalisation des pressions partielles d'H₂ par cellule. **C)** Pressions partielles de CO₂ et **D)** normalisation des pressions partielles de CO₂ par cellule. **E)** Pressions partielles d'H₂S et **F)** normalisation des pressions partielles d'H₂S par cellule, produit uniquement en condition soufre.

2.2. Mesures complémentaires : production d'acétate en présence de soufre et de L-cystine

Nota bene, ces mesures complémentaires de dosage de l'acétate par HPLC ont été acquises dans le cadre du stage de M2 de Bouthaina Ben Abdalla. Elles ne concernent que les conditions soufre et cystine et il ne s'agit pas d'un suivi de croissance sur 24h : les mesures ont été réalisées en phase exponentielle (après 5h de culture) et en phase (après 25h de culture). Elles ne peuvent donc être directement associées aux données issues des suivis de croissance, mais apportent toutefois des informations essentielles sur l'activité métabolique de *T. kodakarensis* dans ces deux conditions.

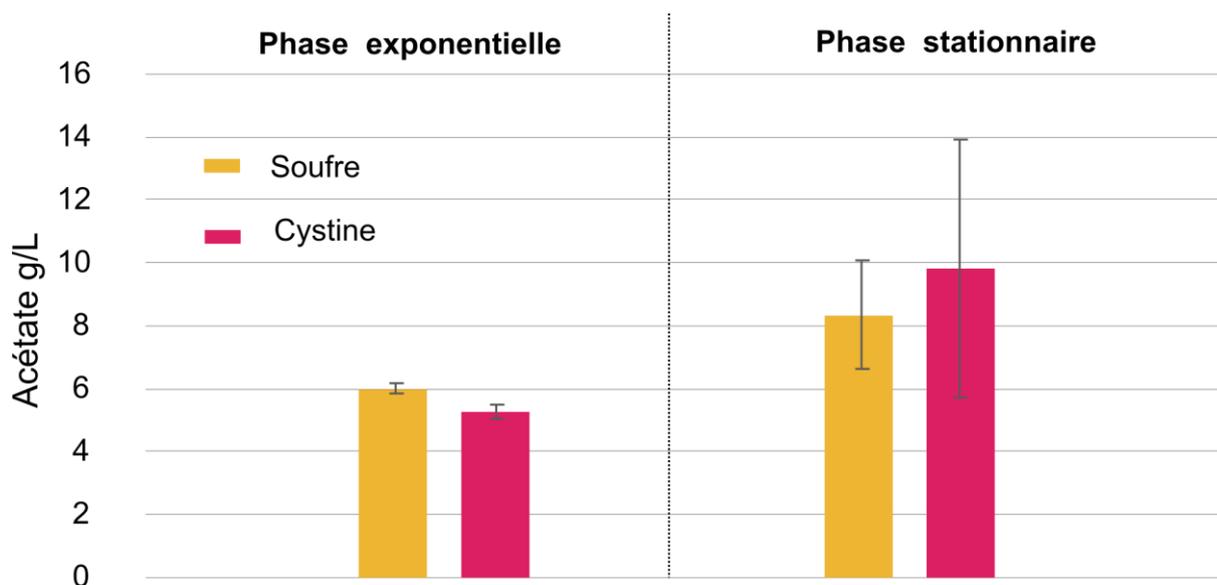


Figure 6 | Mesure de production d'acétate lorsque les cellules de *T. kodakarensis* sont cultivées en présence de soufre et de L-cystine pendant la phase exponentielle (5h) et la phase stationnaire (25h). Les barres d'erreur sont obtenues à partir de triplicats techniques et de duplicats biologiques.

En parallèle de la production d' H_2 détectée en condition pyruvate – connue pour induire un métabolisme fermentaire – ainsi qu'en conditions soufre et cystine, il s'avère que de l'acétate est également produit dans ces deux conditions (Fig 6). En phase exponentielle, les quantités d'acétate produites en conditions soufre et cystine sont similaires, à raison de 6g/L et de 5.3g/L, respectivement. En phase stationnaire, les quantités d'acétate produites entre les deux conditions ne présentent pas non plus de différence significative (voir barres d'erreur), à raison de 8.3g/L et de 9.8g/L, respectivement. On constate par ailleurs une augmentation de la production d'acétate dans les deux conditions entre la phase exponentielle et la phase stationnaire.

III. Discussion et implications des résultats

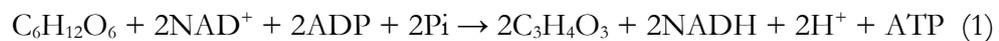
1. Production d'ATP extracellulaire : lyse cellulaire ou véritable rôle fonctionnel ?

Ces résultats démontrent des temps de division cellulaire et des quantités d'ATP différentes en fonction des conditions de culture, ce qui témoigne de l'utilisation de voies métaboliques différentes au même titre que la formation des produits métaboliques. Les voies métaboliques peuvent avoir un impact sur le niveau de maintenance des cellules et sur la lyse cellulaire.

En condition pyruvate, i.e. dans un milieu ne contenant que des composés organiques, nous avons calculé un temps de génération de *T. kodakarensis* plus long que dans les autres conditions, à savoir 37min contre environ 25min (Fig 1). Cette croissance plus lente est associée à une faible production d'ATP intracellulaire, proxy direct de l'activité cellulaire (Fig 1A, C). Nous avons observé une forte production d'ATP extracellulaire entre 12h et 24h – phase stationnaire – ce qui pourrait témoigner d'une lyse cellulaire importante entre ces deux points du suivi (Fig 1D).

Il existe des processus de relargage d'ATP non-lytiques, tels que l'exocytose de vésicules contenant de l'ATP ou de protéines membranaires (Bodin et al., 2001). Il serait intéressant de quantifier et de comparer la production de vésicules extracellulaires en phase stationnaire dans les trois conditions afin de tester si ceci est lié à la quantité d'ATP extracellulaire détectée. Il a également été démontré que la production d'ATP extracellulaire est régulée par les phases de croissance (Hironaka et al., 2013 ; Mempin et al., 2013). En effet, nos résultats montrent une forte quantité d'ATP extracellulaire durant la phase exponentielle en condition soufre (Fig 1D), il est donc peu probable que cette quantité soit liée à de la lyse cellulaire. Mais en condition pyruvate, c'est la phase stationnaire qui présente une forte quantité d'ATP extracellulaire (Fig 1D). Or, c'est durant cette phase que les cellules peuvent commencer à lyser.

L'ATP extracellulaire pourrait toutefois aussi être un signal dans le quorum sensing, et/ou pourrait jouer un rôle dans la survie des communautés microbiennes en fournissant des molécules de signalisation et/ou des nutriments. En particulier, la production extracellulaire d'ATP augmente la survie en phase stationnaire chez *E. coli* et *Salmonella* (Mempin et al., 2013). Les études de Hironaka et al. (2013) et de Mempin et al. (2013) suggèrent toutes deux que la sécrétion d'ATP extracellulaire est liée à l'étape métabolique de glycolyse. La glycolyse anaérobie est un processus de régénération d'ATP producteur de pyruvate ($C_3H_4O_3$) à partir de glucose ($C_6H_{12}O_6$) selon la réaction suivante :



où NAD^+ = nicotinamide adénine dinucléotide en tant qu'oxydant, ADP = adénosine diphosphate, P_i = phosphate inorganique, NADH = nicotinamide adénine dinucléotide en tant réducteur.

Il est possible que la libération extracellulaire d'ATP et de pyruvate par certaines cellules de la population de *T. kodakarensis* serve de source d'énergie pour les autres cellules, et limite ainsi la lyse cellulaire en phase stationnaire par la fermentation des produits de la glycolyse. En effet, *T. kodakarensis* possède un gène unique codant pour la lyase pyruvate-formiate (TK0289) qui pourrait être impliqué dans un chemin alternatif d'oxydation du pyruvate, offrant une voie métabolique efficace de recyclage des produits carbonés en cas de changement d'environnement extracellulaire (Fukui et al., 2005).

Contrairement à la condition pyruvate, nos résultats montrent que les quantités d'ATP extracellulaires sont bien plus basses aux phases stationnaires des conditions soufre et cystine, indiquant qu'il n'y a pas ou peu de lyse cellulaire. Il semblerait donc que la présence de composés soufrés retarde la lyse cellulaire.

En effet, des études ont proposé que la réduction du soufre serait un mécanisme de détoxification pour réduire la quantité de H₂ produite, car le H₂ inhibe la croissance (e.g. *Clostridia* dans Gottschalk, 1979 ; *Pyrococcus* dans Fiala et Stetter, 1986). En présence de S(0), le dihydrogène serait détoxifié à l'intérieur des cellules grâce à la formation de H₂S, comme proposé chez *Pyrococcus furiosus* (Fiala et Stetter, 1986). Néanmoins, ces études montrent des taux de croissance aussi rapides en présence et en absence de soufre, ce qui suggère que *Pyrococcus* ne tire pas d'énergie de la réduction du soufre (Fiala et Stetter, 1986), tandis que nos résultats montrent que le taux de croissance est bien plus rapide en présence de S(0) chez *Thermococcus kodakarensis* (Fig 1A). Le soufre élémentaire S(0) a donc un effet stimulant sur la croissance cellulaire, par conséquent la production de H₂S ne consisterait pas uniquement un moyen de détoxifier le H₂.

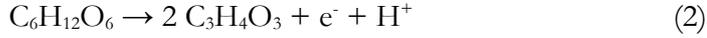
2. Produits gazeux, production d'acétate et voies métaboliques

Le métabolisme de *T. kodakarensis* dans un milieu dépourvu de soufre est au centre de nombreuses études pour sa forte production de H₂, un gaz convoité pour son intérêt énergétique majeur. Dans ce cas, les cellules peuvent fermenter des composés organiques en présence de pyruvate (C₃H₄O₃) ou de carbohydrates (Kanai et al., 2005). Ce sont les hydrogénases, des enzymes oxydatives, qui catalysent la conversion de H₂ en tant que donneur ou accepteur d'électrons, et qui permettent l'utilisation des protons H⁺ en tant qu'accepteurs terminaux d'électrons étant donné $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- = \text{H}_2$. Chez les Thermococcales, on distingue deux classes d'hydrogénases orthologues [NiFe], i.e. avec un complexe hétéro-bimétallique contenant un atome de fer et un atome de nickel, localisées au niveau de la membrane, et une [NiFe] hydrogénase cytosolique.

La protéine membranaire Mbh, constituée de plusieurs sous-unités, est une hydrogénase ferrédoxine-dépendante (protéine fer-soufre réalisant des transferts d'électrons) essentielle à la croissance de *T. kodakarensis* en condition dépourvue de soufre élémentaire (Kanai et al., 2011). Elle est directement impliquée dans la production de H₂ en fonctionnant à la manière d'une pompe à ions redox (Sapra et al., 2003) (Fig 7).

Ce serait l'activité conjointe de l'hydrogénase membranaire Mbs, structurellement similaire au type Mbh (Silva et al., 2000 ; Jenney et Adams, 2008 ; Wu et al., 2018), associée à une enzyme NADPH :S⁰ oxydoréductase (NSR), qui serait directement impliquée dans la production de H₂S (Fig 7). Kanai et al. (2011) ont démontré que des mutants Mbs-déficients avaient une croissance réduite si le milieu contient du soufre élémentaire, ce qui suggère que cette enzyme jouerait un rôle dans la réduction du soufre bien que le processus soit encore mal connu. En effet, son activité biogéochimique n'a pour l'instant pas été démontrée (Schut et al., 2007 ; Kanai et al., 2011). On peut également mentionner la protéine TK1481, une NADPH-oxidase qui participe à la production de H₂S à partir du H₂ et des polysulfures présents dans le cytoplasme (Harnvoravongchai et al., 2014) (Fig 7).

En condition soufre, nous avons observé la production de H₂S et de CO₂ par mesures de chromatographie en phase gazeuse (Fig 2, Table 2, Fig 5E et F). Depuis la description de *T. kodakarensis* – initialement identifiée comme une souche de *Pyrococcus sp.* – en 1994 (Morikawa et al., 1994), la souche est connue pour réduire le soufre élémentaire S(0) en présence de composés organiques. Lors de la glycolyse, du pyruvate se forme et des électrons sont libérés :



Ces électrons permettent la réduction de la ferrédoxine et l'activité des hydrogénases Mbh en condition pyruvate et Mbs en condition soufre (Fig 7). De récentes études ont proposé un mécanisme de respiration chez *Pyrococcus furiosus* pour expliquer la production de H₂S par l'activité de l'hydrogénase membranaire Mbs (Wu et al., 2018). Elle utiliserait la ferrédoxine réduite pour générer des polysulfures ou du soufre colloïdal, ce qui est cohérent avec les études montrant l'accumulation de polysulfures dans le cytoplasme (Schut et al., 2007). Ces polysulfures génèreraient ensuite spontanément du H₂S et du S(0) selon la réaction suivante (Wu et al., 2018) :



Mais nous avons également démontré que cette production de H₂S s'accompagne d'une production de H₂ et d'acétate (Fig 5A et 6), des produits métaboliques typiques de la fermentation de composés organiques. Kanai et al (2005) ont également détecté la production de H₂ en condition soufre, mais cette étude s'est surtout focalisée sur la production de H₂ en condition pyruvate et en présence d'amidon et n'a pas proposé de nouvelle voie métabolique pour expliquer la production de H₂S associée au H₂. D'après nos résultats, en accord avec ceux de Kanai et al. (2005), nous suggérons que la réduction du soufre élémentaire S(0) chez *T. kodakarensis* s'accompagne d'un mécanisme de fermentation, comme c'est le cas pour d'autres espèces de l'ordre des Thermococcales telle que *Pyrococcus furiosus* (Schicho et al., 1993 ; Adams et al., 2001). En accord avec les hypothèses de Schicho et al. (1993) chez *Pyrococcus furiosus*, nos résultats obtenus pour *T. kodakarensis* suggèrent que la présence de polysulfures S²⁻ ou de soufre élémentaire S(0) dans le milieu de culture ne change pas radicalement le métabolisme basal des cellules, à savoir la fermentation des composés organiques, mais plutôt l'activité des hydrogénases membranaires (Fig 7).

Enfin, la NiFe hydrogénase cytosolique (Hyh) chez *T. kodakarensis* consiste en une enzyme NADPH-dépendante (Bryant et Adams, 1989). Elle est impliquée dans l'absorption de H₂ pour permettre la régénération de NADPH (Silva et al., 2000 ; Kanai et al., 2011). Il a été démontré que des mutants Hyh-déficients se développent aussi bien en présence ou en absence de soufre élémentaire, ce qui suggère un rôle non essentiel dans la production de H₂ et de H₂S (Kanai et al., 2011).

Dans le cas des cultures de *T. kodakarensis* en présence de L-cystine, les polysulfures ne sont pas directement accessibles. Une étape de désulfuration de la L-cystine en L-alanine et polysulfures via la cystéine désulfurase est essentielle avant de pouvoir métaboliser les polysulfures (Hidese et al., 2014). Qui plus est, la cystéine désulfurase est indispensable à la croissance cellulaire en absence de S(0) (Hidese et al., 2014). La concentration en polysulfures en condition cystine est donc bien plus faible que la concentration en S(0). Le fonctionnement des hydrogénases en présence de polysulfures reste mal contraint, mais nos résultats montrent des quantités d'ATP intracellulaire très basses en condition cystine, ce qui semble attester d'une voie métabolique avec un plus faible rendement énergétique (Fig 1C).

Il est probable que la voie métabolique empruntée en présence de L-cystine ne soit pas la plus efficace en termes de production d'énergie. En plus d'une faible quantité d'ATP intracellulaire, nous ne détectons pas de H₂S en condition cystine (Fig 3). Par conséquent, la production de HS⁻ en phase liquide ne doit pas être suffisante pour passer en H₂S en phase gaz, contrairement à la condition soufre qui présente une activité métabolique plus forte et un bilan énergétique plus important, comme le démontre la forte production d'ATP intracellulaire (Fig 1C) et la détection de H₂S (Fig 2). Néanmoins, la voie métabolique L-cystine permet la croissance cellulaire dans un milieu présentant une faible concentration de polysulfures (Fig 1A).

Sur la base de nos résultats – mesure de gaz, d'acétate, ATP-métrie et comptage cellulaire – nous proposons des voies métaboliques pour les conditions pyruvate, soufre et cystine faisant intervenir les hydrogénases membranaires (Mbh ou Mbs), l'hydrogénase cytoplasmique (HyH) et la NADPH-oxidase TK1481 (Fig 7).

Les Thermococcales possèdent un régulateur transcriptionnel SurR (Lipscomb et al., 2009). Sous sa forme réduite, SurR peut se lier à l'ADN tandis qu'il ne le peut pas sous sa forme oxydée. En absence de soufre élémentaire, i.e. en condition pyruvate, SurR active la transcription des gènes codant l'hydrogénase membranaire Mbh et réprime l'expression des gènes impliqués dans la réduction du soufre, tels que le complexe Mbs-NSR et TK1481 (Adams et al., 2000 ; Schut et al., 2007 ; Santangelo et al., 2011). Dans ce cas, la voie métabolique passe par Mbh au niveau membranaire, directement impliqué dans la production de H₂, et HyH au niveau du cytoplasme, qui pourrait jouer un rôle de détoxification du H₂ comme TK1481 mais ne manière moins efficace. En effet, HyH ne permet pas l'oxydation du NADPH en NADP⁺, ce qui permettrait pourtant d'oxyder la ferrédoxine pour la réduire à nouveau via l'étape de glycolyse (cf équation (1)). Nous supposons donc que cela participe à la limitation du rendement énergétique en pyruvate, d'où une plus faible quantité d'ATP intracellulaire.

En présence de soufre, SurR ne peut pas se lier à l'ADN et ne réprime donc pas l'expression des gènes impliqués dans la réduction du soufre. Toutefois, bien que SurR peut activer la transcription des gènes codant pour Mbh, il ne les réprime pas pour autant. Etant donnée la détection de H₂ en condition soufre, nous envisageons une transcription basale des gènes codant pour Mbh et Hyh, i.e. ces hydrogénases sont actives en permanence. En parallèle de la réduction du soufre, la voie métabolique impliquée dans la fermentation des composés organiques est donc toujours active. Dans ce cas, le H₂, toujours produit, peut être éliminé efficacement du cytoplasme par l'activité de TK1481 qui réduit les polysulfures grâce au H₂ et entraîne la production de H₂S (Fig 7). TK1481 permet également d'oxyder le NADPH en NADP⁺, nous proposons donc que cela favorise la glycolyse, les cycles d'oxydo-réduction de la ferrédoxine et donc l'activité de Mbs-NSR au niveau membranaire, ce qui explique le contournement de la barrière énergétique imposée lorsque SurR s'exprime. Cette hypothèse explique la forte production de gaz et la grande quantité d'ATP intracellulaire que nous avons observées en condition soufre.

Dans le cas de la condition cystine, nous proposons une voie métabolique intermédiaire à celles exprimées en conditions pyruvate et en soufre. La concentration en polysulfures est peut-être insuffisante pour empêcher SurR de se lier à l'ADN. Il y aurait donc une répression, au moins partielle, des gènes liés à la réduction du soufre, et une dominance de la voie HyH et Mbh, énergétiquement limitée, ce qui explique la faible quantité d'ATP intracellulaire que nous avons observée. Toutefois, nous nous serions attendus à observer une quantité corrélée d'acétate et de CO₂, produits de la glycolyse qui devraient être limitée si la voie métabolique passe par HyH plutôt que par TK1481. Or, malgré une faible quantité de CO₂, on observe une quantité similaire d'acétate

entre les conditions soufre et cystine. Nous observons également une croissance cellulaire similaire entre les conditions soufre et cystine, ce qui suggère que la voie empruntée n'est pas identique à celle de la condition pyruvate. Nous supposons donc que le complexe Mbs-NSR et la protéine TK1481 fonctionnent malgré tout, bien que plus faiblement, ce qui permet tout de même de détoxifier le H_2 et de produire du HS^- mais de manière moins productive qu'en condition soufre.

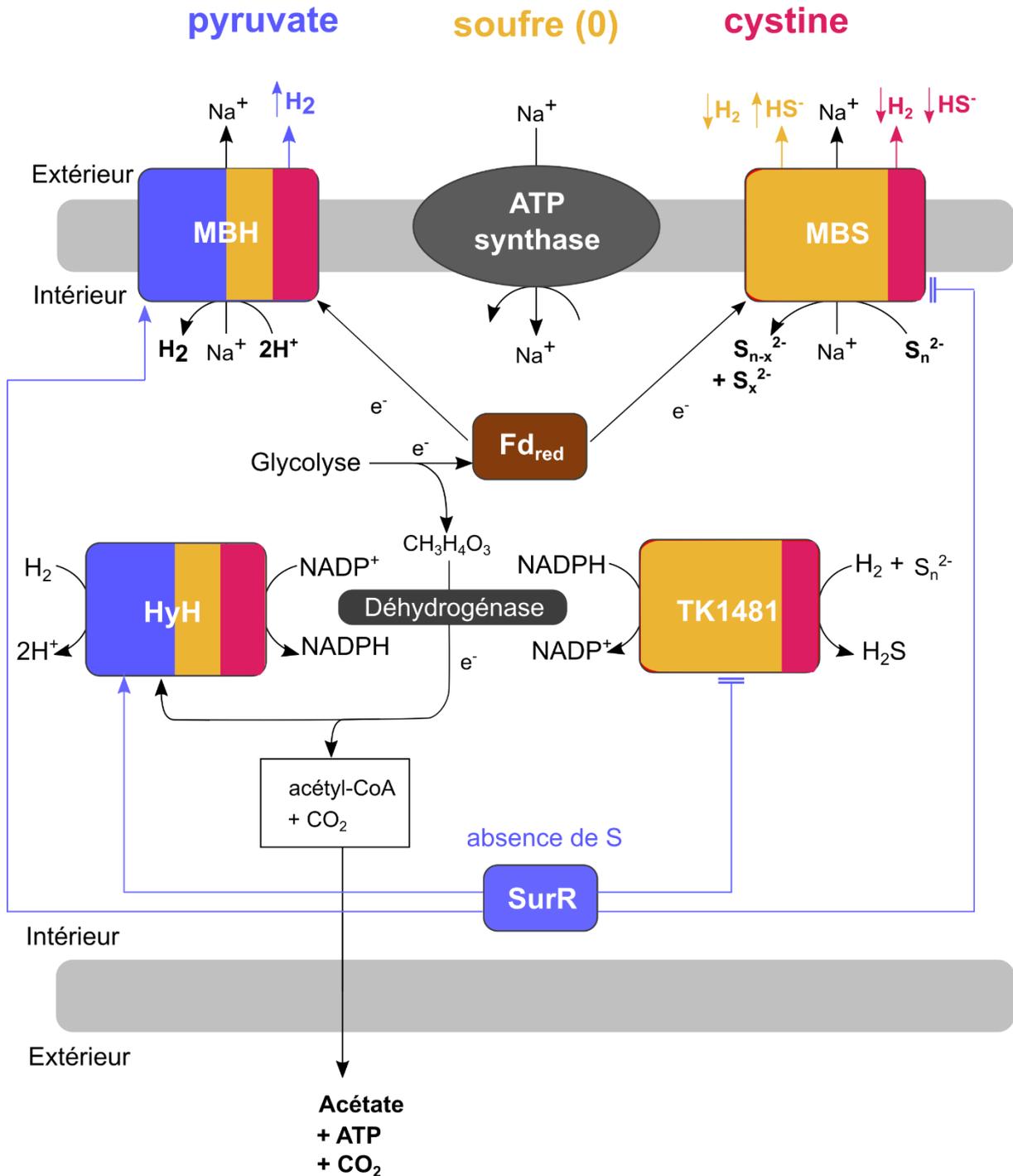


Figure 7 | Modèle proposé pour la fermentation de *T. kodakarensis* en condition pyruvate (absence de soufre), condition soufre élémentaire et condition cystine (polysulfures), avec le rôle des hydrogénases membranaires et cytoplasmiques associées à leurs produits métaboliques. Fd_{red} = ferrédoxine réduite. Adapté d'après Wu et al., 2018.

Références

- Adams M. W., Holden J. F., Menon A. L., Schut G. J., Grunden A. M., Hou C., Hutchins A. M., Jenney F. E. Jr., Kim C., Ma K., Pan G., Roy R., Sapra R., Story S. V., Verhagen M. F. (2001), Key role for sulfur in peptide metabolism and in regulation of three hydrogenases in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Bacteriology* 183, 716–724.
- Bandy A.R., Maroulis P.J., Wilner L.A., Torres A.L. (1982), Estimates of the fluxes of nitric oxide, sulfur dioxide, hydrogen sulfide, carbon disulfide, and carbonyl sulfide from Mt. St. Helens deduced from in situ plume concentration measurements. *Geophysical Research Letters* 9, 1097–1100.
- Bodin P., Burnstock G. Purinergic signalling: aTP release. (2001), *Neurochemistry Research* 26, 959–969.
- Bryant F. O., Adams M. W. W. (1989), Characterization of hydrogenase from the hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Biological Chemistry* 264, 5070–5079.
- Fiala G. et Stetter K.O. (1986), *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. *Archaeal Microbiology* 145, 56–61.
- Fukui T., Atomi H., Kanai T., Mastumi R., Fujiwara S., Imanaka T. (2005), Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes. *Genome Research* 15, 352–363.
- Gartman A., Findlay A. J., Luther G.W. (2014), Nanoparticulate pyrite and other nanoparticles are a widespread component of hydrothermal vent black smoker emissions, *Chemical Geology* 366, 32–41.
- Gorlas A., Mariotte T., Morey L., Truong C., Bernard S., Guigner J.-M., Oberto J., Baudin F., Landrot G., Baya C., Le Pape P., Morin G., Forterre P., Guyot F. (2022), Precipitation of greigite and pyrite induced by Thermococcales: an advantage to live in Fe- and S-rich environments? *Environmental Microbiology*.
- Gottschalk G. (1979), *Bacterial metabolism*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Harnvoravongchai P., Kobori H., Orita I. et al. (2014), Characterization and gene deletion analysis of four homologues of group 3 pyridine nucleotide disulfide oxidoreductases from *Thermococcus kodakaraensis*. *Extremophiles* 18, 603–616.
- Hideese R., Inoue, T., Imanaka, T., Fujiwara, S. (2014), Cysteine desulphurase plays an important role in environmental adaptation of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Molecular Microbiology* 93, 331–345.
- Hironaka I., Iwase T., Sugimoto S., Okuda K., Tajima A., Yanaga K., Mizunoe Y. (2013), Glucose triggers ATP secretion from bacteria in a growth-phase dependent manner. *Applied Environmental Microbiology* 79(7), 2328–2335.
- Isidorov V.A., Zenkevich I.G., Ioffe B.V. (1990), Volatile organic compounds in solfatic gases. *Journal of Atmospheric Chemistry* 10, 329–340.
- Jenney Jr. et Adams M. W. W. (2008), Hydrogenases of the model hyperthermophiles. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125, 252–266.
- Kanai K., Imanaka H., Nakajima A., Uwamori K., Omori Y., Fukui T., Atomi H., Imanaka T. (2005), Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Journal of Biotechnology* 116 (3), 271–282.

- Kanai T., Matsuoka R., Beppu H., Nakajima A., Okada Y., Atomi H., Imanaka T. (2011), Distinct Physiological Roles of the Three [NiFe]-Hydrogenase Orthologs in the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *Journal of Bacteriology* 193(12), 3109–3116.
- Kanai T., Imanaka T., Atomi H. (2013), Hydrogen Production by the Hyperthermophilic Archeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Journal of the Japan Petroleum Institute* 56 (5), 267 – 279.
- Karpov G.A., Miller Yu.M., Zavarzin G.A. (1983), Composition of the air and spontaneous gases in Death Valley on Kamchatka. *Vulkanologiya i Seismologiya* 4, 107–110.
- Lipscomb G. L., Keese A. M., Cowart D. M., Schut G. J., Thomm M., Adams M. W., Scott R. A. (2009), SurR: a transcriptional activator and repressor controlling hydrogen and elemental sulphur metabolism in *Pyrococcus furiosus*. *Molecular microbiology*, 71(2), 332-349.
- Ma K., Schicho R. N., Kelly R. M., Adams M. W. W. (1993), Hydrogenase of the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* is an elemental sulfur reductase or sulfhydrogenase: evidence for a sulfur-reducing hydrogenase ancestor. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* 90, 5341–5344.
- Ma K., Adams M. W. W. (1994), Sulfide dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: a new multifunctional enzyme involved in the reduction of elemental sulfur. *Journal of Bacteriology* 176, 6509–6517.
- Ma K., Weiss R., Adams M. W. W. (2000), Characterization of hydrogenase II from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and assessment of its role in sulfur reduction. *Journal of Bacteriology* 182, 1864–1871.
- Ma K., Adams M. W. W. (2001), Hydrogenases I and II from *Pyrococcus furiosus*. *Methods in Enzymology* 331, 208–216.
- Morikawa M., Izawa Y., Rashid N., Hoaki T., T. Imanaka T. (1994), Purification and characterization of a thermostable thiol protease from a newly isolated hyperthermophilic *Pyrococcus* sp., *Applied and Environmental Microbiology* 60, 4559–4566.
- Mempin R., Tran H., Chen C., Gong H., Kim K., Lu S. (2013), Release of extracellular ATP by bacteria during growth. *BMC Microbiology* 13, 301.
- Santangelo T.J., Čuboňová L., Reeve J.N. (2011), Deletion of alternative pathways for reductant recycling in *Thermococcus kodakarensis* increases hydrogen production. *Molecular Biology* 81(4), 897-911.
- Sapra R., Bagramyan K., Adams M. W. W. (2003). A simple energy conserving system: proton reduction coupled to proton translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* 100, 7545–7550.
- Schicho R., Kesen M.A., Adams M. W. W., Kelly R. M. (1993), Bioenergetics of Sulfur Reduction in the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Bacteriology* 175(6), 1823-1830.
- Schut G. J., Bridger S. L., Adams M. W. W. (2007). Insights into the metabolism of elemental sulfur by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: characterization of a coenzyme A-dependent NAD(P)H sulfur oxidoreductase. *Journal of Bacteriology* 189, 4431–4441.
- Silva P. J., van den Ban E., Wassink H., Haaker H., de Castro B., Robb F. T., Hagen W. R. (2000). Enzymes of hydrogen metabolism in *Pyrococcus furiosus*. *European Journal of Biochemistry* 267, 6541–6551.
- Wu C-H., Schut G.J., Poole F.L., Haja D.K., Adams M.W. (2018), Characterization of membrane-bound sulfane reductase: A missing link in the evolution of modern day respiratory complexes. *Journal of Biological Chemistry* 293 (43), 16687-16696.

Chapitre IV.

Production de minéraux en présence de *T. kodakarensis*

I. Enjeux et stratégie

1. Enjeux

Les bactéries et archées hyperthermophiles, capables de vivre au-delà de 80°C, ont été majoritairement isolées de systèmes ou de sédiments hydrothermaux, marins ou continentaux. Ces environnements se caractérisent par de hautes températures mais aussi par un contexte géochimique particulier, comme par exemple de fortes concentrations en métaux (e.g. Stetter et al., 1996). Bien que les microorganismes hyperthermophiles aient été très étudiés d'un point de vue biochimique et génétique afin de comprendre leurs mécanismes d'adaptation aux hautes températures, les connaissances sur leur rôle dans les cycles biogéochimiques et sur leur vie/survie dans de tels écosystèmes minéralisant restent limitées.

De fait, les interactions *in situ* des microorganismes hydrothermaux avec les métaux et/ou les minéraux sont peu connues. Concernant les métaux, les interactions se résument à trois aspects : soit les métaux sont toxiques pour la cellule ; soit ils sont utilisés en tant qu'accepteur ou donneur d'électrons et sont donc réduits ou oxydés dans des réactions de dissimilation ; soit ils représentent des sources de nutriments et sont impliqués dans des réactions d'assimilation (Holden et Adams, 2003). Quant aux interactions avec les phases minérales, la contribution des microorganismes dans la précipitation ou la dissolution des minéraux hydrothermaux est largement controversée (Jannasch et al., 1995 ; McCollom, 2007 ; Rouxel et al., 2007).

Les minéraux eux-mêmes peuvent avoir un impact sur la survie des populations cellulaires. Des études suggèrent la possibilité d'une dynamique environnementale soufre-fer-phosphore qui permettrait aux cellules de survivre face à des milieux hautement minéralisants : la précipitation de sulfures de fer induirait la libération de phosphates biodisponibles (Xiong et al., 2019 ; Wilfert et al., 2020 ; Gorlas et al., 2022), mais des interrogations demeurent quant aux dynamiques de précipitation des minéraux et de spéciation du soufre et du phosphore.

Stetter et al. (1996) mentionnait, il y a près de 20 ans, que la condition préalable à la compréhension du rôle des hyperthermophiles sur leur environnement et *vice versa* est d'apprendre à les cultiver. Or, le challenge représenté par la culture de tels organismes ne se résume pas à déterminer des conditions optimales de croissance laboratoire-dépendantes, qui ne représentent en rien les conditions réelles de leurs écosystèmes. Pour comprendre comment les hyperthermophiles interagissent avec les métaux et les minéraux, il est nécessaire d'adopter une approche expérimentale permettant de les cultiver et de les étudier dans un milieu hydrothermal minéralisant. Idéalement, il faudrait explorer différents milieux de culture, différents métaux en différentes concentrations, quitte à ce que ces milieux ne soient pas tous représentatifs du milieu naturel.

Un enjeu important est de comprendre l'impact des produits issus du métabolisme cellulaire des hyperthermophiles sur la précipitation des minéraux, sur leur composition, et sur leurs caractéristiques morphologiques et texturales. Si biominéraux il y a, comment se forment-ils ? La précipitation de ces biominéraux a-t-elle un rôle dans la vie/survie des hyperthermophiles dans les écosystèmes hydrothermaux ? Sont-ils discernables de minéraux produits dans le milieu hydrothermal par des processus abiotiques et dans quelle mesure peuvent-ils constituer des biosignatures ? Et surtout, pourrait-on retrouver ces biominéraux dans les cheminées hydrothermales pour traquer la présence d'hyperthermophiles et/ou estimer leur contribution dans la production des minéraux hydrothermaux ?

2. Stratégie

Afin d'apporter des éléments de réponse aux enjeux évoqués ci-dessus, il est nécessaire de cultiver des microorganismes hyperthermophiles en conditions hydrothermales dans des milieux riches en métaux. Gorlas et al. (2018 ; 2022) ont montré que les Thermococcales induisent la précipitation de greigite (Fe_3S_4) et de pyrite (FeS_2) lorsqu'elles sont soumises à un milieu riche en soufre et en fer. Qui plus est, les Thermococcales pourraient constituer une part importante de la communauté microbienne des portions intermédiaires et externes des fumeurs noirs (Takai et al., 2001 ; Prieur et al., 2004 ; Kormas et al., 2006). Ceci suggère que ces archées pourraient contribuer de façon non négligeable à la précipitation de sulfures de fer dans leurs biotopes. Elles constituent donc un modèle de choix pour mieux comprendre comment les microorganismes influencent la géochimie des environnements hydrothermaux et réciproquement.

Des travaux antérieurs ont montré que l'ajout de Fe^{2+} (concentration finale de 5mM) dans une culture de Thermococcales enrichie en soufre élémentaire $\text{S}(0)$ (1g/L) entraîne un obscurcissement immédiat du milieu, une chute de la quantité d'ATP et une lyse cellulaire massive (Gorlas et al., 2022). De manière surprenante, après un certain temps d'incubation (classiquement 192h), une nouvelle génération cellulaire est observée dans ces milieux de culture minéralisants (Gorlas et al., 2022). Il a été proposé que ce phénomène s'inscrit dans une dynamique soufre-fer-phosphore, comme évoqué plus haut. Des phases minérales après ajout de Fe^{2+} ont été identifiées. Des nano-cristaux extracellulaires de greigite (Fe_3S_4) se forment par la sulfurisation de phosphates de fer amorphes liés à la surface des cellules (Gorlas et al., 2018 ; 2022), ainsi que des sphérules de pyrite (FeS_2), pour lesquelles la production de vésicules de soufre par les Thermococcales est une condition primordiale à leur formation (Gorlas et al., 2015 ; 2018).

Pour progresser dans la connaissance de l'empreinte minérale des Thermococcales dans ces milieux complexes, il est maintenant nécessaire d'étudier la minéralogie détaillée de leurs productions minérales (ce Chapitre IV), ce qui n'a encore jamais été réalisé, ainsi que celle de productions abiotiques potentiellement similaires (Chapitre V). En se basant sur le protocole de culture en condition de minéralisation développé par Gorlas et al. (2018 ; 2022), ce travail propose (1) d'étudier la spéciation du soufre au cours de la minéralisation, (2) de préciser la séquence de production des minéraux et leur abondance relative ainsi que (3) de caractériser finement (taille, forme, texture, contenu en matériel organique) les sulfures de fer, en particulier les sphérules de pyrite. Les méthodes utilisées, traditionnellement associées au domaine de la minéralogie (e.g. XANES, STXM, DRX avec affinement Rietveld), permettront de mieux comprendre le rôle des cellules sur la formation des minéraux et l'impact rétroactif de ces minéraux sur la survie d'une partie de la population de cellules, et fourniront une grille de lecture quant à l'utilisation potentielle de ces minéraux en tant que biosignatures.

II. Article



OPEN ACCESS

EDITED BY
 Andreas Teske,
 University of North Carolina, Chapel Hill,
 United States

REVIEWED BY
 James F. Holden,
 University of Massachusetts Amherst,
 United States
 Aude Picard,
 University of Nevada, Las Vegas, United States

*CORRESPONDENCE
 Chloé Truong
 ✉ chloe.truong1@mnhn.fr

RECEIVED 16 January 2023

ACCEPTED 02 May 2023

PUBLISHED 25 May 2023

CITATION
 Truong C, Bernard S, Le Pape P, Morin G,
 Baya C, Merrot P, Gorlas A and Guyot F (2023)
 Production of carbon-containing pyrite
 spherules induced by hyperthermophilic
 Thermococcales: a biosignature?
Front. Microbiol. 14:1145781.
 doi: 10.3389/fmicb.2023.1145781

COPYRIGHT
 © 2023 Truong, Bernard, Le Pape, Morin, Baya,
 Merrot, Gorlas and Guyot. This is an
 open-access article distributed under the terms
 of the [Creative Commons Attribution License
 \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction
 in other forums is permitted, provided the
 original author(s) and the copyright owner(s)
 are credited and that the original publication in
 this journal is cited, in accordance with
 accepted academic practice. No use,
 distribution or reproduction is permitted which
 does not comply with these terms.

Production of carbon-containing pyrite spherules induced by hyperthermophilic Thermococcales: a biosignature?

Chloé Truong^{1*}, Sylvain Bernard¹, Pierre Le Pape¹,
 Guillaume Morin¹, Camille Baya¹, Pauline Merrot¹,
 Aurore Gorlas² and François Guyot^{1,3}

¹Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC), MNHN, CNRS, IRD, Sorbonne Université, Paris, France, ²CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France, ³Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France

Thermococcales, a major order of hyperthermophilic archaea inhabiting iron- and sulfur-rich anaerobic parts of hydrothermal deep-sea vents, are known to induce the formation of iron phosphates, greigite (Fe₃S₄) and abundant quantities of pyrite (FeS₂), including pyrite spherules. In the present study, we report the characterization of the sulfide and phosphate minerals produced in the presence of Thermococcales using X-ray diffraction, synchrotron-based X ray absorption spectroscopy and scanning and transmission electron microscopies. Mixed valence Fe(II)-Fe(III) phosphates are interpreted as resulting from the activity of Thermococcales controlling phosphorus-iron-sulfur dynamics. The pyrite spherules (absent in abiotic control) consist of an assemblage of ultra-small nanocrystals of a few ten nanometers in size, showing coherently diffracting domain sizes of few nanometers. The production of these spherules occurs via a sulfur redox swing from S⁰ to S⁻² and then to S⁻¹, involving a comproportionation of (-II) and (0) oxidation states of sulfur, as supported by S-XANES data. Importantly, these pyrite spherules sequester biogenic organic compounds in small but detectable quantities, possibly making them good biosignatures to be searched for in extreme environments.

KEYWORDS

archaea, biosignatures, hydrothermal vents, pyrite, greigite

1. Introduction

The activity of microorganisms may promote mineral dissolution and/or precipitation in hydrothermal mineral environments (e.g., [Holden and Adams, 2003](#); [Templeton et al., 2009](#); [Houghton and Seyfried, 2010](#)). Hydrothermal systems, in particular sulfur-rich hydrothermal vents, allow exchange of heat and chemical species between seawater and ocean rocks ([Edmond et al., 1979](#); [Stein and Stein, 1994](#); [Elderfield and Schultz, 1996](#); [Wheat et al., 2000](#)). The mixture of the hot – up to 400°C – reduced fluid discharging from the vents with the cold – about 2°C – oxygenated sea water, results in the formation of chimneys accommodating very steep temperature and geochemical gradients ([Tivey, 1995](#); [Von Damm, 1995](#); [Charlou et al., 2002](#); [Schmidt et al., 2007](#); [Flores et al., 2011](#)). Iron sulfide

minerals, such as pyrite (FeS_2) and chalcopyrite (CuFeS_2), are predominant in the inner and hotter parts ($>250^\circ\text{C}$) of active chimneys (Feely et al., 1994; Ludford et al., 1996). The cooler middle layers ($80\text{--}150^\circ\text{C}$) of the chimneys are mainly composed of calcium and magnesium sulfate minerals, such as anhydrite (CaSO_4), but contain iron sulfides such as pyrite and marcasite (FeS_2) as well (e.g., Langmuir et al., 1997; Schrenk et al., 2003; Rouxel et al., 2004). It has been proposed that those middle layers harbor a population of hyperthermophilic archaea (Schrenk et al., 2003; Lin et al., 2016), probably mainly composed of sulfur-reducers Thermococcales (Takai et al., 2001; Prieur et al., 2004; Kormas et al., 2006).

Thermococcales could be an important contributor to the precipitation of minerals in the middle and external cooler layers dominated by anhydrite. Gorlas et al. (2018, 2022) reported that Thermococcales induce the formation of greigite (Fe_3S_4) nanocrystals and of great amounts of pyrite (FeS_2) when they are cultivated in an iron and sulfur-rich synthetic medium simulating mineralizing hydrothermal fluids. These studies also showed that the production of pyrite only occurs in the cases where Thermococcales produce sulfur-rich vesicles (S(0)-vesicles), i.e., if they grow in a medium containing sulfur at zero valent state [S(0)] (Gorlas et al., 2015, 2018, 2022). In fact, fermentation-assisted by elemental sulfur reduction made by Thermococcales involves an NAD(P)H elemental sulfur oxidoreductase (NSR) enzyme (Liu et al., 2005; Kobori et al., 2010; Bridger et al., 2011; Herwald et al., 2013) and can lead to the rapid accumulation of elemental sulfur in the cytoplasm, as was reported for *Pyrococcus furiosus* exposed to high concentrations of elemental sulfur ($>6.4\text{ g/L}$) (Schut et al., 2007). The production of sulfur-rich vesicles could thus be seen as a detoxifying process, involving the sequestration of excess sulfur at oxidation state of (0) or close to (0) within the cell and its transport outside of the cell (Gorlas et al., 2015). This mechanism likely occurs in natural environments, since hydrothermal fluids are generally rich in polysulfides (Luther et al., 2001; Waite et al., 2008; Gartman et al., 2011) or colloidal reactive zero-valent sulfur.

In contact with an Fe (II)-rich fluid, these sulfur-rich vesicles could act as a precursor for pyrite formation, most likely after their release by the cells. In contrast, the production of greigite derives from the sulfurization of amorphous Fe (III) phosphates close to the surface of the cells (Gorlas et al., 2018, 2022). Although the excess of sulfide species (H_2S and HS^-) in the system should quickly convert greigite into pyrite (Posfai et al., 1998; Hunger and Benning, 2007), greigite was observed over a period ranging from a few days to several weeks in previous cultures (Gorlas et al., 2018, 2022). Because the stability of greigite depends on the balance between the abundance of reactive iron and the sulfide or polysulfide activities (Kao et al., 2004), its presence over rather long periods suggests that Thermococcales influence the reactivity of at least one, if not both, of these species. More data on the sequence of production and relative abundance of these mineral phases (pyrite, greigite, iron phosphates) in the presence of Thermococcales are needed to better understand the possible role of high temperature microorganisms in the mineralogy of hydrothermal systems. Special attention needs to be given to the habitus of these phases as identifying mineral phases with characteristics specific to the presence of Thermococcales (e.g., shape, size, crystallinity, content in organics), which could be used to track their presence in sulfur-rich hydrothermal vents.

To better understand how archaeal cells influenced the mineral environment and *vice versa*, this study focuses on the mineral characterization of the iron sulfides and iron phosphates produced in the presence/absence of *Thermococcus kodakarensis* in a medium containing zero-valent sulfur S(0). We determined the sequence of production and the habitus of the mineral phases produced in the cultures using X-ray diffraction (XRD), X-ray absorption (XAS) and electron microscopies (SEM and TEM). In addition to proposing a unified explanation of cell growth in strongly mineralized media, we documented the production of pyrite spherules. The specific shape and microstructure of these spherules possibly make them biosignature which presence in natural hydrothermal settings could be used to track the current or past activity of hyperthermophilic archaea.

2. Materials and methods

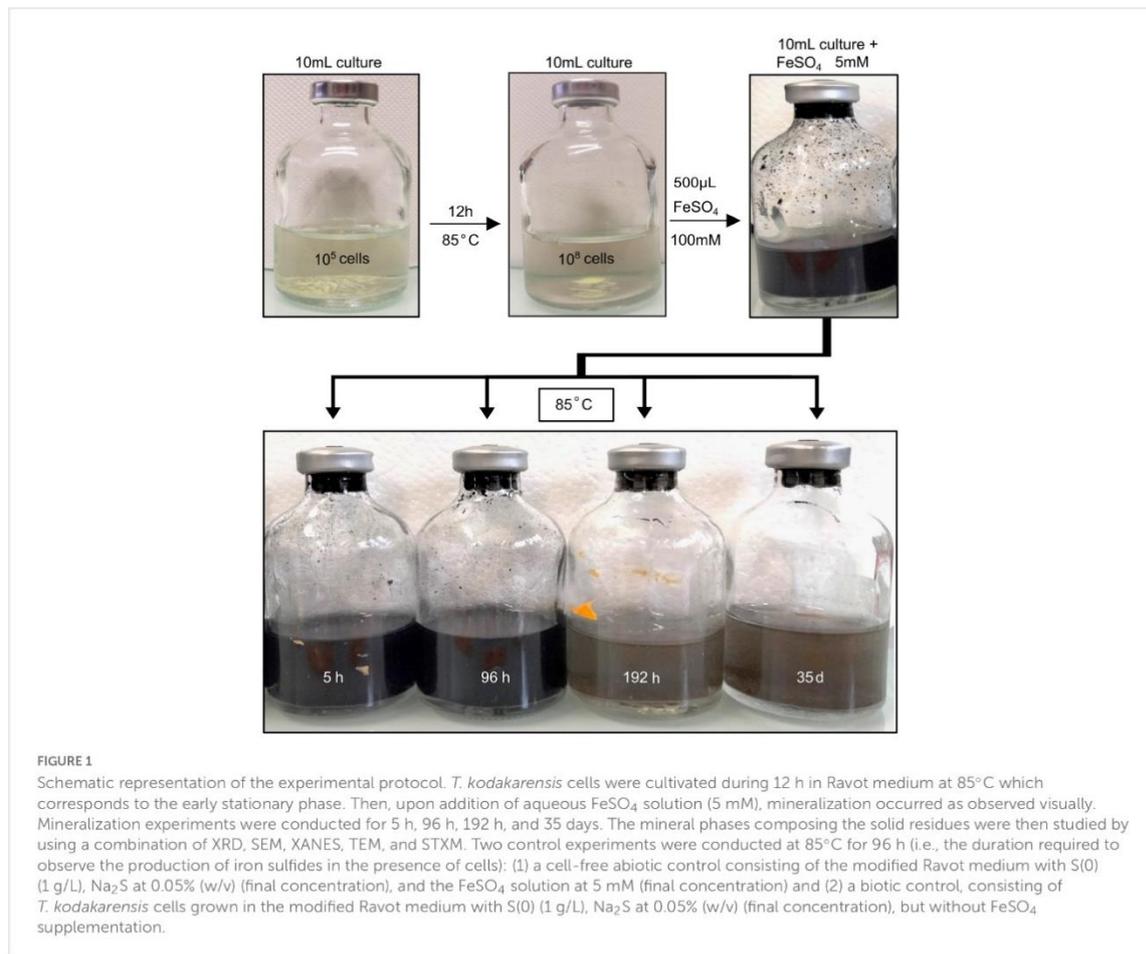
2.1. Mineralization process in anoxic conditions

Thermococcus kodakarensis KOD1 (JCM 12380) cultures were prepared under strictly anaerobic conditions under N_2 atmosphere in an anoxic JacomexTM glove box ($<1\text{ ppm O}_2$), as described in Gorlas et al. (2018). Cultures were performed in glass serum vials set with rubber stoppers and aluminium caps. Cells were grown during 12 h at 85°C in 10 mL of a modified Ravot medium (containing, per liter of distilled water : 1 g NH_4Cl , 0.2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g KCl , 0.83 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 g NaCl , 1 g yeast extract, 1 g tryptone, 3 g PIPES, 0.001 g resazurin and Na_2S to reduce the medium at 0.05% (w/v) (final concentration) in presence of S(0) (1 g/L) in order to reach $10^8\text{ cells/mL}^{-1}$. Then an anoxic solution of ferrous sulfate (FeSO_4) was added to the cultures (leading to a final concentration of 5 mM) to induce iron mineral precipitation. The mineralized cultures were incubated for different durations determined in previous studies (Gorlas et al., 2018, 2022), namely 5 h for the presence of amorphous iron phosphates, 96 h corresponding to the formation of iron sulfides, 192 h for the demineralization process correlated to the presence of iron phosphates and 35 days to document a very long mineralization period.

Two control experiments were conducted at 85°C for 96 h (i.e., the duration required to observe the production of iron sulfides in the presence of cells): (1) a cell-free abiotic control consisting of the modified Ravot medium with S(0) 1 g/L, Na_2S at 0.05% (w/v) (final concentration) and the FeSO_4 solution at 5 mM (final concentration), and (2) a biotic control, consisting of *T. kodakarensis* cells grown in the modified Ravot medium with S(0) (1 g/L), Na_2S at 0.05% (w/t) (final concentration), but without FeSO_4 supplementation.

2.2. X-ray absorption near edge structure at the S K-edge

The sulfur speciation in the bulk samples was determined by X-ray absorption near edge structure (XANES) spectroscopy analysis at the S K-edge. Samples were prepared using



centrifugation (15 mL of each sample were centrifugated at 5000 g for 10 min).

X-ray absorption near edge structure (XANES) was performed in fluorescence mode at the 4-3 beamline at the Stanford Synchrotron Radiation Light Source (SSRL, California, CA, USA) with a HitachiTM HTA 4-element solid-state Si drift detector for the samples produced in our experiments or a PIPS detector for some of the concentrated reference samples. The incident energy was set up with a Si(111) monochromator and calibrated by measuring a thiosulfate reference (absorption edge at 2472 eV) between each sample holder during the experiment. Samples were shipped to SSRL within anoxic containers, and a few mg of pure solid powders were spread over sulfur-free tape, mounted into sample holders in a COYTM glove box onsite, and analyzed at room temperature under He flow. Between 1 to 4 scans were collected for each sample. Data were calibrated and averaged using the SIXPACK software (Webb, 2005). Then, averaged spectra were normalized using the ATHENA software (Ravel and Newville, 2005).

For data analysis, a Linear Combination Fitting (LCF) procedure was conducted on the S K-edge XANES data with model compounds. LCF analysis of the XANES spectra at the S K-edge

was performed using a custom-built program (Morin et al., 2003) based on the Levenberg-Marquardt minimization algorithm. Fit quality was estimated by a R-factor and a reduced chi-square, and the uncertainty on each fitting parameter was estimated to 99.7% confidence (3 sigma) [see Baya et al. (2021) for details]. The set of model compounds included biogenic nanocrystalline mackinawite (FeS), elemental sulfur [S(0)], synthetic nanocrystalline pyrite (FeS₂), and synthetic nanocrystalline greigite (Fe₃S₄). For nanomackinawite, elemental sulfur, and pyrite, the spectra of model compounds are given in Baya et al. (2021). Briefly, nanomackinawite refers to a biogenic mackinawite synthesized by incubating *Desulfovibrio capillatus* with Fe(III)-citrate in Ikogou et al. (2017). A powder sample of α-sulfur S(0) was taken from the IMPMC chemical stocks, and pyrite was pure pyrite synthesized according to the protocol reported in Baya et al. (2021). The additional sample of nanocrystalline greigite (Fe₃S₄) was synthesized at ambient temperature in a glove box by mixing an appropriate volume of ferric chloride (FeCl₃) and ferrous chloride (FeCl₂) solutions with a sodium sulfide (Na₂S) solution while gently stirring, and was then kept under magnetic stirring during 3 months until being dried under vacuum in the IMPMC glove box. This last sample contains traces of FeS.

2.3. Powder X-ray diffraction and Rietveld refinement

Sample preparation was carried out under N₂ atmosphere in an anoxic Jacomex™ glove box (<1 ppm O₂). Samples were prepared using centrifugation (5 mL of each sample were centrifugated at 5000 g for 10 min). The supernatant was discarded and the solid phase was vacuum-dried in an anoxic glove-box (no rinsing). Powder samples were placed on a zero-background Si wafer and inserted in a custom-built anoxic sample chamber equipped with a Kapton® window. The sealed chamber was then removed from the glove-box and XRD patterns were collected using an XPert Pro Panalytical diffractometer. Data were collected using Co K α radiation in continuous scan mode with an equivalent 0.03° 2 θ step counting 2.5 h per sample over the 5–100° 2 θ . Scans were then shortened to the 10–100° 2 θ because of the bump signal from the Kapton® window at 7.2° 2 θ . Rietveld analysis was performed with the xnd_1.3 code (Berar and Baldinozzi, 1998) using pseudo-Voigt line-shape profiles. Starting crystallographic parameters including space group, unit-cell parameters, atomic positions and isotropic Debye-Waller factors were taken from Rettig and Trotter (1987) for α elemental sulfur S(0), from Lennie et al. (1995) for mackinawite FeS, from Stanjek and Schneider (2000) for greigite Fe₃S₄ and from Bayliss (1977) for pyrite FeS₂. The structure of β -Fe₂PO₄O from Ijjaali et al. (1990) was used for the barbosalite-like compound within the Fe₄(PO₄)₂O₂ – Fe₄(PO₄)₃(OH)₃ solid solution. Unit-cell and line-shape parameters were varied for major phases only. Iron occupation was refined for the barbosalite-like compounds in order to properly account for relative intensities. Scale factors were refined for all phases and were used to calculate relative weight fraction of the mineral phases in the samples using the classical procedure by Bish and Post (1993), assuming a sum of weight fractions equal to one.

2.4. Scanning electron microscopy coupled with energy dispersive X-ray spectroscopy

Sample preparation was carried out under N₂ atmosphere in an anoxic Jacomex™ glove box (<1 ppm O₂). 1 mL of each sample was filtered through a 0.2 μ m polycarbonate filter in order to conserve the solid part of the samples (no rinsing). Filters were then deposited on a carbon tape and carbon-coated. SEM-EDXS data were collected at IMPMC, with a GEMINI ZEISS™ Ultra55 Field Emission Gun Scanning Electron Microscope equipped with a Bruker silicon drift detector for EDXS. Both images and EDXS data were collected using an acceleration voltage of 10 kV at a working distance of 7.5 mm.

2.5. Sample preparation by focused ion beam

Focused ion beam (FIB) foils (20 μ m \times 5 μ m \times 100 nm) were extracted from pyrite spherules using a FEI Strata DB 235 (IEMN, Lille, France). Milling at low gallium ion currents allowed

minimizing common artifacts including local gallium implantation, mixing of components, redeposition of the sputtered material on the sample surface and significant changes in the speciation of carbon-based polymers (Bernard et al., 2009; Schiffbauer and Xiao, 2009).

2.6. Scanning transmission X-ray microscopy

Scanning transmission X-ray microscopy (STXM) analyses were performed on FIB foils to document the carbon speciation of the organics present within the pyrite spherules using the HERMES STXM beamline at the synchrotron SOLEIL (Saint-Aubin, France - Belkhou et al., 2015; Swaraj et al., 2017). Energy calibration was done using the well-resolved 3 p Rydberg peak of gaseous CO₂ at 294.96 eV for the C K-edge. XANES hypercube data (stacks) were collected with a spatial resolution of 100 nm at energy increments of 0.1 eV over the carbon (270–340 eV) absorption range with a dwell time of less than 1 ms per pixel to prevent irradiation damage (Wang et al., 2009). Stack alignments and extraction of XANES spectra were done using the Hyperspy python-based package (De la Peña et al., 2018). Normalization of data was done using the QUANTORXS freeware (Le Guillou et al., 2018).

2.7. Transmission electron microscopy (TEM)

Samples were examined using a JEOL JEM-2100F at IMPMC, equipped with a field emission gun (FEG) operating at 200 kV. Mineral characterization was completed by selected-area electron diffraction (SAED) and high-resolution transmission electron microscopy (HRTEM).

3. Results

3.1. Optical appearance

Upon addition of ferrous sulfate (FeSO₄) in the medium, abundant black precipitates were immediately generated both in abiotic controls (S(0)+Na₂S+FeSO₄) and in experiments conducted in the presence of cells (Figure 1). In presence of *T. kodakarensis*, the deep dark aspect of the precipitates faded after 192 h of mineralization (Figure 1), consistently with the observations reported in Gorlas et al. (2022). The abiotic controls retained their initial appearance over the entire duration of the experiments, no fading of the deep dark aspect of the precipitates occurred (Supplementary Figure 1).

3.2. Sulfur speciation

X-ray absorption near edge structure (XANES) at the S K-edge of mineralized cultures of *T. kodakarensis* indicate a peculiar

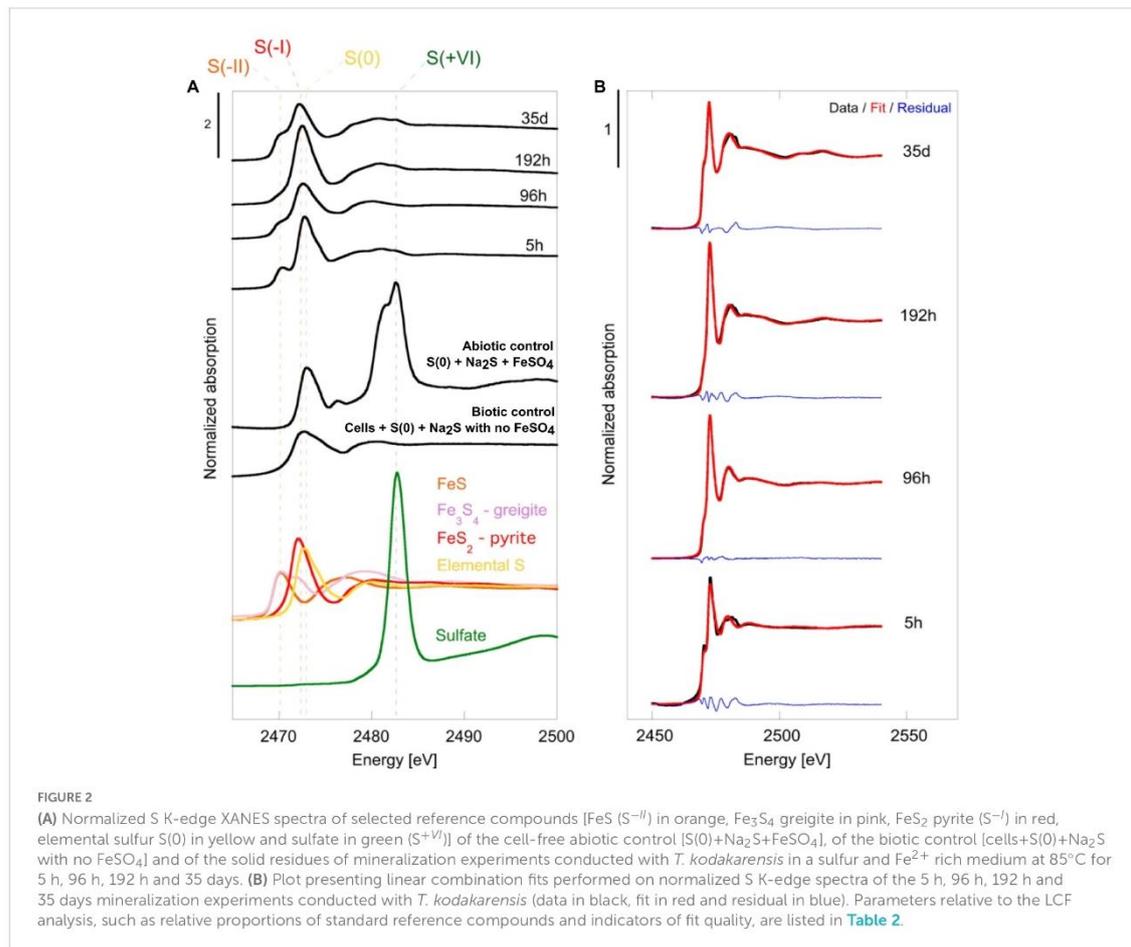


TABLE 1 Results of the LCF analysis applied to normalized S K-edge XANES spectra using chosen reference compounds (see the section "2. Materials and methods").

Sample	FeS %	S(0) %	Fe ₃ S ₄ %	FeS ₂ %	Sum	χ ² _R (0.10 ⁻⁴)	R-factor (0.10 ⁻⁵)
5 h	38 (4)	63 (4)	-	-	101	40.9	80.8
96 h	-	60 (3)	25 (1)	14 (3)	99	3.8	7.7
192 h	-	42 (8)	19 (3)	40 (8)	101	19.1	36.5
35 days	-	-	53 (2)	46 (2)	99	16.3	33.3

Uncertainties on the reported values are given considering a 99% confidence interval. Fit quality is estimated by a reduced chi-square and a R-factor (see the section "2. Materials and methods").

dynamic of sulfur redox evolution ([Figure 2](#) and [Table 1](#)). The solid residues of the 5 h long mineralization experiments are dominated by the elemental sulfur [S(0)] introduced in the medium (63% (±4) of the S atoms), nano-mackinawite (FeS) being also detected (38% (±4) of the S atoms). The proportion of sulfur as elemental sulfur corresponds to 60% (±3) of the S atoms in the solid residues of the 96 h long mineralization experiments. Nano-mackinawite is not present, while greigite (Fe₃S₄) and pyrite (FeS₂) represent 25% (±1) and 14 (±3) of the S atoms, respectively. In the solid residues of the 192 h long mineralization experiments, the proportion of elemental sulfur only corresponds to 43% (±8) of the S atoms, while the proportion of sulfur as greigite corresponds to 19% (±3)

of the S atoms and that of sulfur as pyrite to 40% (±8) of the S atoms. The solid residues of the 35 days long mineralization experiments do not contain any elemental sulfur, and sulfur is distributed between greigite (53% (±2) of the S atoms) and pyrite (46% (±2) of the S atoms). The solid residues of the abiotic control (S(0)+Na₂S+FeSO₄) and of the biotic control (cells+S(0)+Na₂S with no FeSO₄) ([Figure 2](#)) do not contain nano-mackinawite, greigite nor pyrite according to XANES data at the S K-edge. Although they are detected in the solid residues of the abiotic control ([Figure 2](#)), sulfates are not detected in the solid residues of mineralized cultures nor in the biotic control due to a common ion effect or a lack of iron in these experiments. The non-indexed

peaks at 2472 and 2481 eV (close to the sulfate peak) in the abiotic control could be attributed to thiosulfate (Fleet et al., 2005).

3.3. X-ray diffraction identification of the crystalline phases formed in the presence of Thermococcales

X-ray diffraction patterns of the solid residues collected during the time-course mineralization experiments are displayed in Figure 3. After 5 h of mineralization, α -sulfur [S(0)] and halite (NaCl) are the major crystalline phases, halite having been likely crystallized upon drying (no rinsing). An additional broadened mackinawite (FeS) pattern is also detected and was included in the Rietveld analysis for this sample. After 96 h of mineralization, α -sulfur is still the dominant crystalline phase but pyrite (FeS₂) and greigite (Fe₃S₄) are also observed in significant amounts, whereas halite is minor. After 192 h of mineralization, an iron (II)-(III) phosphate referred to as “barbosolite-like” is observed in large amount, in addition to pyrite and greigite. Based on Rietveld analysis it can be assigned to a member of the $\text{Fe}^{3+}_{(4-x)}\text{Fe}^{2+}_{3x}(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_{(3-3x)}\text{O}_{3x}$ solution (Schmid-Beurmann, 2000) with an x value of 0.28 as determined from iron occupancy-factor refinement, i.e., $\text{Fe}^{3+}_{2.53}\text{Fe}^{2+}_{0.42}(\text{PO}_4)_2\text{O}_{0.42}(\text{OH})_{1.58}$ when compared to barbosolite ($\text{Fe}^{3+}_2\text{Fe}^{2+}(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_2$) (Redhammer et al., 2000). After 35 days of mineralization, greigite, pyrite and some halite were the sole crystalline phases (Figure 3). Neither elemental sulfur nor crystalline iron (II)-(III) phosphate were detected. Note that large crystals may have not been sampled during preparation. Neither greigite, nor pyrite, nor barbosolite-like iron phosphate were detected in the solid residues of the abiotic control (S(0)+Na₂S+FeSO₄) and in the biotic control (cells+S(0)+Na₂S with no FeSO₄) (Figure 3 and Supplementary Figure 2).

Rietveld refinement (Table 2) allowed us to determine weight fractions of the crystalline phases composing the residues of the mineralization experiments and of the abiotic control (S(0)+Na₂S+FeSO₄). Mackinawite was detected in the form of “nano-mackinawite” after 5 h of mineralization with mean coherent domain size (MCD) <3 nm (Table 3) and unit-cell parameters close to those of mackinawite (Lennie et al., 1995). In this sample, elemental sulfur and nano-mackinawite accounted for 22(±6) wt% and 31(±9) wt% of the crystalline phases, respectively. After 96 h of mineralization, greigite and pyrite were present in similar proportions, 23(±1) wt% and 21(±4) wt%, respectively, and nano-mackinawite could not be quantified because of a too low amount. After 192 h of mineralization, greigite accounted for only 4(±1) wt% of the crystalline phases, whereas the barbosolite-like iron (II)-(III) phosphate was present at 50(±3) wt% and pyrite at 29(±3) wt%. After 35 days of mineralization, the proportion of greigite represented 34(±6) wt% of the crystalline fraction, while pyrite represented 52(±11) wt%. In the abiotic control (S(0)+Na₂S+FeSO₄), elemental sulfur accounted for 84(±16) wt% and the amount of nano-mackinawite was qualitatively estimated at ≤16 wt% (Table 2). After 96 h of mineralization, Rietveld refinement (Table 3) indicated isotropic mean coherent domain (MCD) size of 61(±11) nm greigite, and slightly anisotropic MCD for pyrite, with (111)-plane pseudo-platelets of 14(±4) nm width

and 10(±4) nm thickness. MCD of both greigite and pyrite did not significantly evolve through time.

3.4. Electron and X-ray microscopies on the minerals produced in the presence of Thermococcales

3.4.1. Nano-mackinawite (FeS)

In the solid residues of the 5 h long mineralization experiments, an iron-sulfur-phosphorus amorphous or poorly crystalline material was observed, containing sometimes NaCl crystals, as well as carbon, nitrogen and potassium (Figures 4A, B). At longer times, this amorphous material disappears for the benefit of crystalline phases. Those observations are consistent with XANES and XRD results. A similar iron-sulfur-phosphorus amorphous material is also detected in the abiotic control [S(0)+Na₂S + FeSO₄], but neither nitrogen nor potassium were detected (Supplementary Figure 3).

3.4.2. Greigite nano-crystals (Fe₃S₄)

Tiny greigite crystals are present in the solid residues of the 96 h long mineralization experiments (Figure 4C). These greigite crystals of about 40–60 nm are no longer present in the solid residues of the 192 h long mineralization experiments (Figure 4E), but crystals of greigite are present in the solid residues of the 35 days long mineralization experiments (Figure 4F). The nature of the nano-crystals as greigite was confirmed by Selected Area Electron Diffraction Pattern (SAED) and High Resolution TEM (HRTEM) images collected on the solid residues of the 96 h long mineralization experiments (Figures 5A–D).

3.4.3. Pyrite (FeS₂)

Submicrometric (from 200 nm to 1 μ m) pyrite spherules are present in the solid residues of the 96 h, 192 h and 35 days long mineralization experiments (Figure 4). Their size, shape and smooth surface texture are very similar in all residues. Low magnification observations show homogeneous aggregates of pyrite spherules with relatively low disparities over the whole mineralization experiments (Supplementary Figure 3).

Focused ion beam (FIB) foils extracted from aggregates of pyrite spherules found in the solid residues of the 96 h long mineralization experiments reveal that each spherule is made of pure pyrite (Figure 5A). The SAED patterns reveal very tiny crystalline domains with some common orientations between adjacent domains (Figure 5E). These observations are consistent with Rietveld refinement of XRD data according to which pyrites are made of small anisotropic coherent domains of 15 nm by 10 nm (Table 3). Moreover, STXM characterization of pyrite sections reveal the presence of organic compounds trapped within the spherules and in the matrix surrounding the spherules (Figure 5F). Absorption features at 285.0, 286.4, 287.4, 288.0, and 288.6 eV can be attributed to aromatic groups, unsaturated C-S bonds, aliphatic groups, amide groups and carboxylic groups, respectively, (Le Guillou et al., 2018). The organic material that can be found in the matrix exhibits the same absorption features as the one

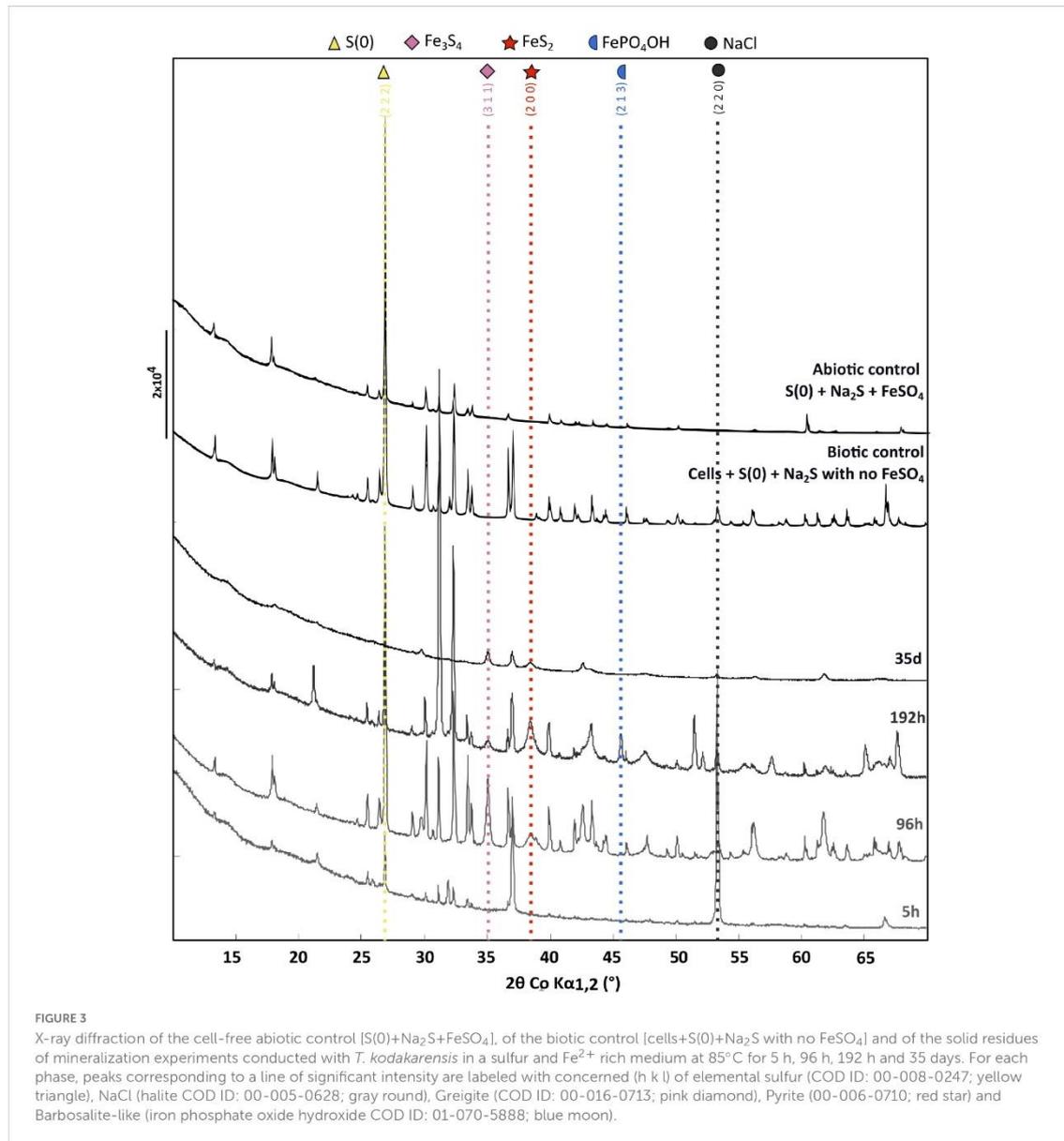


FIGURE 3 X-ray diffraction of the cell-free abiotic control [S(0)+Na₂S+FeSO₄], of the biotic control [cells+S(0)+Na₂S with no FeSO₄] and of the solid residues of mineralization experiments conducted with *T. kodakarensis* in a sulfur and Fe²⁺ rich medium at 85°C for 5 h, 96 h, 192 h and 35 days. For each phase, peaks corresponding to a line of significant intensity are labeled with concerned (h k l) of elemental sulfur (COD ID: 00-008-0247; yellow triangle), NaCl (halite COD ID: 00-005-0628; gray round), Greigite (COD ID: 00-016-0713; pink diamond), Pyrite (00-006-0710; red star) and Barboasalite-like (iron phosphate oxide hydroxide COD ID: 01-070-5888; blue moon).

TABLE 2 Relative weight fraction of the mineral phases determined by Rietveld analysis applied to samples XRD patterns using pseudo-Voigt line-shape profiles (see the section “2. Materials and methods”).

Sample	FeS %	S(0) %	Fe ₃ S ₄ %	FeS ₂ %	NaCl	FePO ₄ (OH)	Sum
5 h	31 (9)	22 (6)	-	-	47 (11)	-	100
96 h	-	52 (1)	23 (1)	21 (4)	4 (1)	-	100
192 h	-	12 (1)	4 (1)	29 (3)	5 (5)	50 (3)	100
35 days	-	-	34 (6)	52 (11)	12 (3)	-	100
Abiotic control S(0)+Na ₂ S+FeSO ₄	16	84 (16)	-	-	-	-	100

TABLE 3 Mean coherent domain size of the mineral phases based on Rietveld analysis applied to samples XRD patterns.

Sample	FeS	Fe ₃ S ₄	FeS ₂		FePO ₄ (OH)
			L ₀ ²	L ₂ ²	
5 h	<3	–	–	–	–
96 h	–	61 (10.7)	14.1 (3.5)	10.5 (3.5)	–
192 h	–	41.6 (0.1)	15.7 (1.9)	9.3 (1.6)	>1000
35 days	–	46.5 (11.4)	12.5 (3)	5.7 (1.8)	–

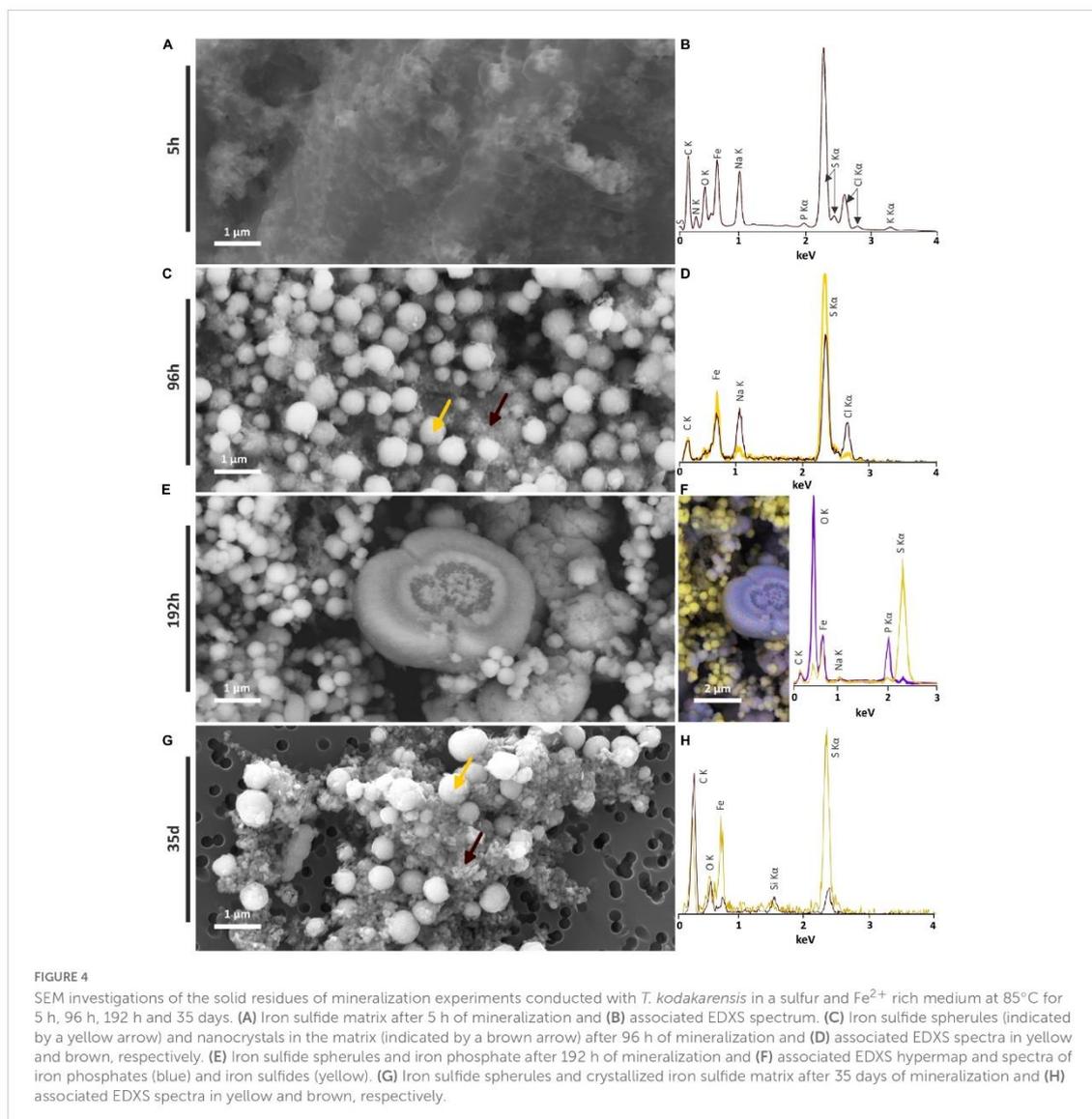
Mineral particle size was calculated by using the Scherrer equation.

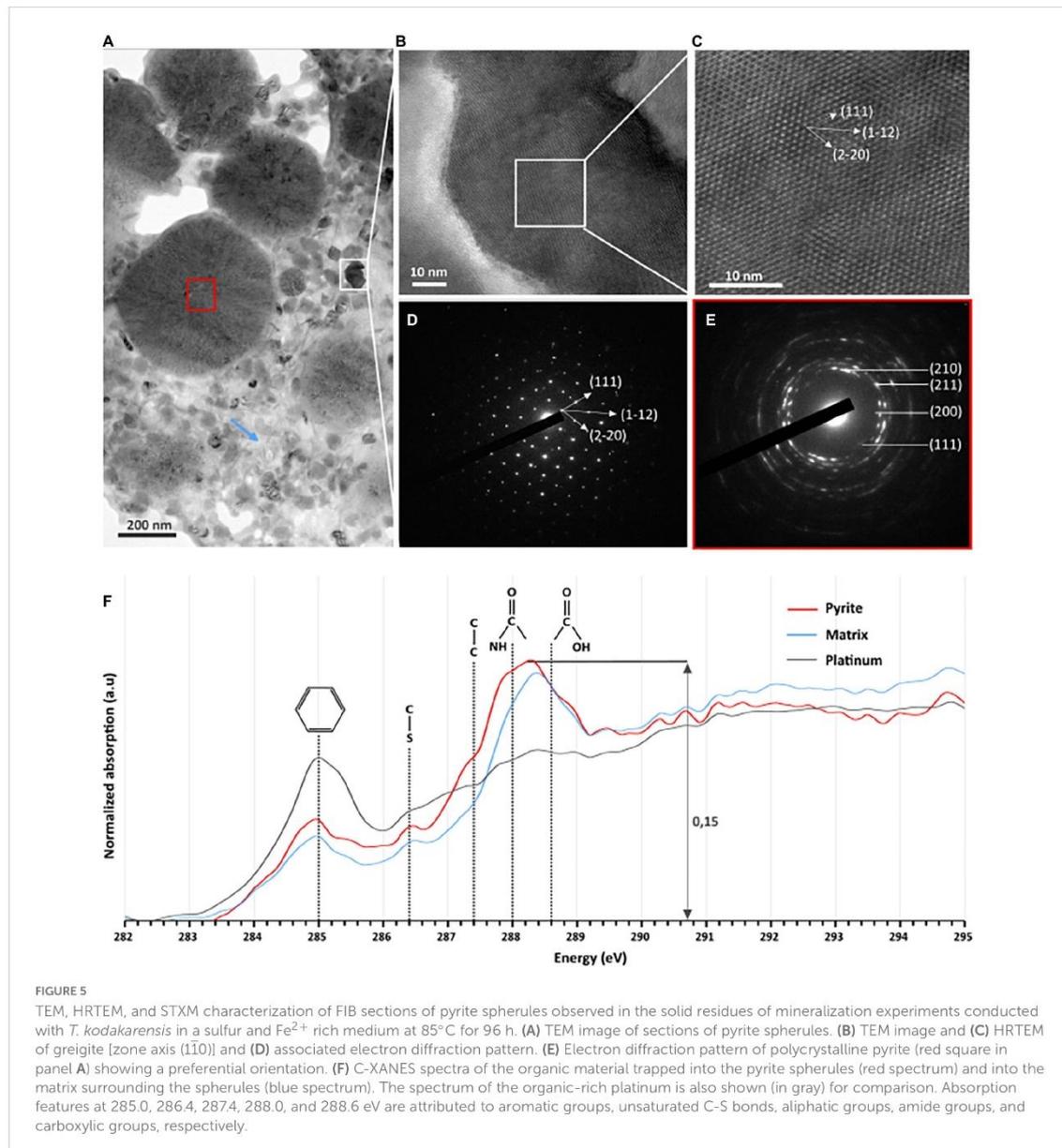
trapped into the pyrite spherules (Figure 5F). The carbon amount is rather low (~0.15 optical density units) but still detectable. As a comparison, the spectrum of the organic-rich platinum only shows

a feature at 285.0 eV, attributed to aromatic groups (Le Guillou et al., 2018).

3.4.4. Barbosalite-like (Fe³⁺_{2.53}Fe²⁺_{0.42}(PO₄)₂O_{0.42}(OH)_{1.58})

Barbosalite-like crystals are only observed in the solid residues of the 192 h long mineralization experiments. They exhibit heterogeneous shapes and sizes (Figures 4E, F). Some are several micrometers wide and display a spherical or broken spherical shape, while some submicrometric ones display a spherule shape and are in direct contact with pyrite.





4. Discussion

4.1. Evolution of the system over time: phosphorus–iron–sulfur dynamics

The formation of a black precipitate immediately after the addition in the medium of iron as Fe^{2+} (Figure 1) is caused by the precipitation of amorphous or poorly crystalline nanophases such as FeS nano-mackinawite [unambiguously detected by Rietveld refinement (Table 2) and XANES (Figure 2 and Table 1)] and iron phosphates (Figure 4B; Gorlas et al., 2018, 2022), the two

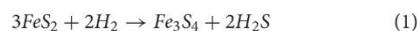
phases forming a three-dimensional matrix observed by electron microscopy. A similar amorphous matrix is observed in the abiotic control [$\text{S}(0) + \text{Na}_2\text{S} + \text{FeSO}_4$] at 96 h (Supplementary Figure 3), identified as FeS nano-mackinawite by Rietveld refinement (Table 2). Note that the nano-mackinawite contribution, estimated at $\leq 16\% \pm$ while elemental sulfur accounted for $84 (\pm 16)$ wt %, likely is overestimated by Rietveld refinement (Table 2) since we were not able to detect it in XANES S K-edge analysis (Figure 2 and Table 1). Thermococcales promote a redox evolution of both sulfur and iron: $\text{S}(0)$ is reduced by cellular metabolism producing sulfide (S^{-2}) which is then progressively oxidized into S^{-1} as pyrite

while Fe^{2+} , although not directly involved in cellular metabolism, is partially oxidized into Fe^{3+} in greigite and in barbosalite-like phosphate (Figures 2, 6 and Tables 1, 2). In parallel with the continuous reduction of sulfur (0), the system thus evolves from almost pure nano-mackinawite (FeS) at 5 h (Figures 4A, B, 6) to greigite (Fe_3S_4) nanocrystals and pyrite (FeS_2) submicrometric spherules starting 96 h (Figures 4C, D, 6).

While the precipitation of pyrite increases with increasing duration of mineralization (Figures 6A–C), the initial production of greigite, a sulfide containing 2 Fe(III) for 1 Fe(II), seems to be intimately related to that of Fe (II/III) phosphates in the present system: the proportion of greigite first decreases while barbosalite-like phosphates precipitate, before it increases once barbosalite-like are no longer present (Figures 6A, D). A number of studies have reported the microbial production of greigite either intracellularly (by magnetotactic bacteria for instance) or extracellularly (e.g., Mann et al., 1990; Bertel et al., 2012; Gorlas et al., 2018, 2022; Picard et al., 2018, 2019). Some authors proposed that the production of greigite requires a precursor already containing some Fe (III) (Etique et al., 2018; Picard et al., 2018; Berg et al., 2020; Duverger et al., 2020; Gorlas et al., 2022). This Fe(III) may come from Fe(III)-phosphates (e.g., Duverger et al., 2020) or from the oxidation of the Fe(II) of mackinawite (e.g., Lennie et al., 1997). Here, the FeS nano-mackinawite three-dimensional matrix contains some amorphous or poorly crystallized iron phosphates (Figure 4B), likely Fe(III)-phosphates as previously reported by Gorlas et al. (2022). Still, the initial production of Fe(III)-phases remains enigmatic since the experiments are conducted in strict anoxia. The oxidation of iron could have involved the S(0) contained in the cells, organic acids, or water (H^+), which reductions could have been catalyzed by the cell surfaces. Kish et al. (2016) have reported that *Sulfolobus acidocaldarius* S-layer of both active and ghost cells and membrane vesicles are effective nucleation sites for amorphous or crystalline Fe-phosphate phases in a phosphate-rich and sulfate-rich medium. This possibility is also consistent with the observations of iron phosphates on Thermococcales cell surfaces or extracellular materials (Gorlas et al., 2022).

Between 96 and 192 h, the proportions of well crystallized pyrite and large iron phosphates, namely barbosalite-like [resembling barbosalite (Schmid-Beurmann, 2000) or lipscombite (Ech-Chahed et al., 1988)], increase over that of greigite (Figures 6A, D). The crystallized phosphates could be formed by interaction between poorly crystallized phosphates and greigite. Moreover, when sulfur is present in the medium, it has been shown that the cells accumulate S(0) vesicles leading to the formation of pyrite when in contact with Fe^{2+} (Gorlas et al., 2022), which explains the abundance of this phase. The predominance of such large grain size phases over nanophases of iron phosphate, nano-mackinawite and greigite likely explains the clarification of the medium (Figure 1 and Supplementary Figure 1). In similar 192 h long mineralization experiments, Gorlas et al. (2022) detected significant amounts of intracellular ATP and visualized living cells and cell divisions suggesting that some cells had resisted the toxic initial high nanoparticle-rich medium and benefited from clear enough medium to resume growth and cell division. It is then likely that these cells largely depleted the stock of sulfur (0) in the medium and shift to an H_2 generating fermentative metabolism, below a certain threshold of zero valent sulfur in the system

(Figure 6; Kanai et al., 2013; Schut et al., 2013). This may result in some pyrite dissolution producing H_2S and greigite according to:

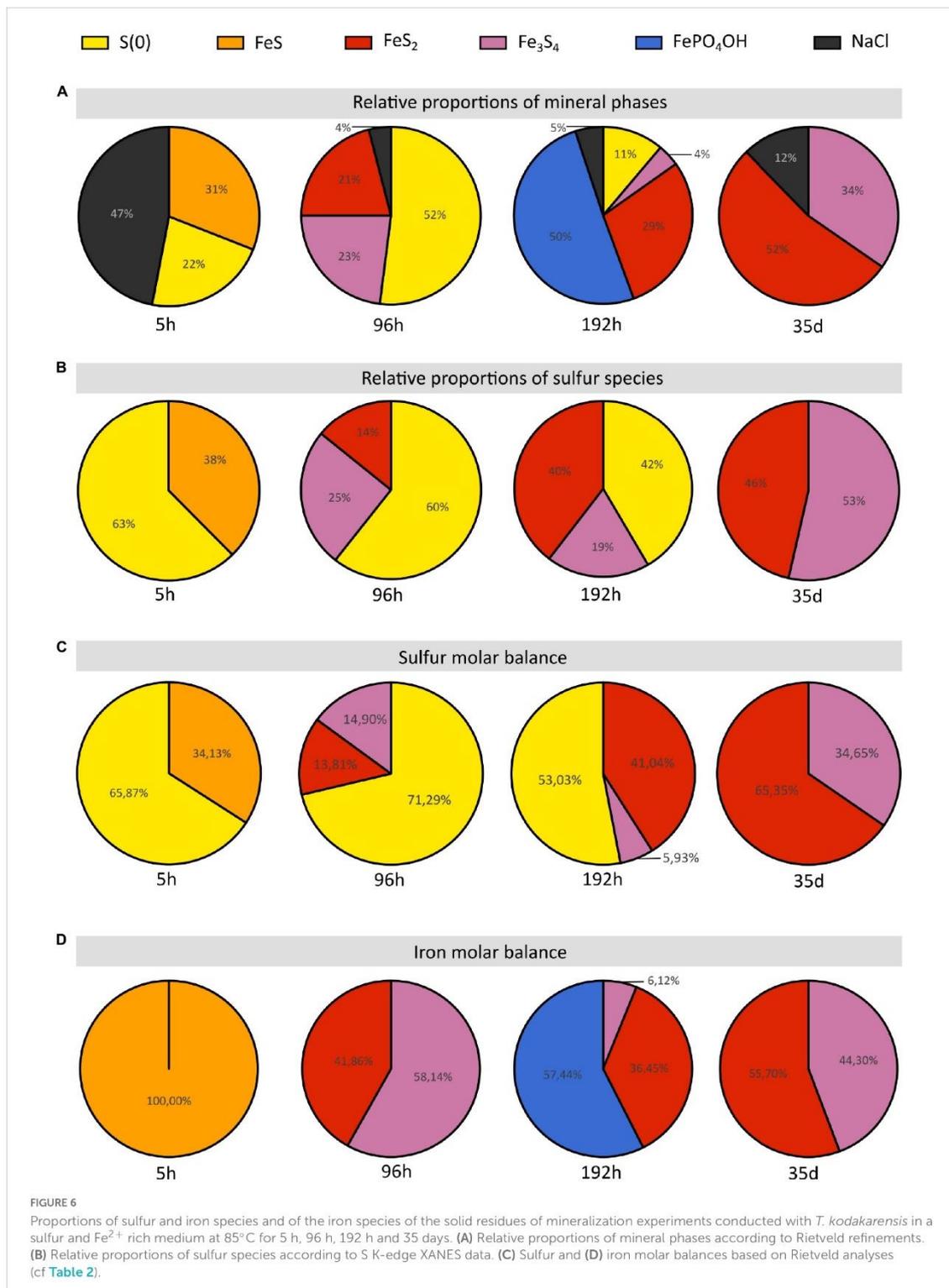


and possibly iron (II)-(III) phosphates, which allow the cell population to recover additional phosphorus. Such phosphorus-iron-sulfur dynamics would constitute an ecological strategy in natural environments (Xiong et al., 2019; Wilfert et al., 2020). Such mobilization of the phosphorus reservoir by the cells leaves an excess of Fe(III) which can then be used for greigite precipitation. This model is consistent with the second phase of greigite precipitation (Figure 6) and the absence of well crystallized phosphates in the solid residues of 35 days long mineralization experiments (Figure 6).

4.2. Carbon-containing pyrite spherules: a biosignature?

In contrast to amorphous ferrous sulfide (FeS), greigite (Fe_3S_4) or mackinawite (FeS), which biological production has been extensively reported (Posfai et al., 1998; Picard et al., 2016, 2018; Stanley and Southam, 2018; Park and Faivre, 2022), pyrite is generally produced abiotically in natural settings (e.g., Yuan et al., 2020). Still, biogenic production of pyrite can be achieved by some microorganisms, including sulfate-reducing microorganisms (SRM) (Thiel et al., 2019; Berg et al., 2020; Duverger et al., 2020) or methanogenic archaea (Thiel et al., 2019). Pyrite may form from greigite and ferrous sulfide (Rickard, 1997; Hunger and Benning, 2007; Rickard and Luther, 2007) or from elemental sulfur and ferrous sulfide (Wilkin and Barnes, 1996; Benning et al., 2000). Here, an early ferrous sulfide phase is unambiguously detected by XANES (Figure 2 and Table 1), Rietveld refinement (Table 2) and SEM (Figures 4A, B), confirming previous results (Gorlas et al., 2018, 2022). This ferrous sulfide phase has likely been produced via interactions between S(-II) and Fe(II). The presence of both sulfides and hydrogen sulfide (HS^-) results from the reduction of S(0) by *T. kodakarensis*, occurring partially before the addition of iron in the system (Morikawa et al., 1994). Note that it is likely that some sulfide ions come from the Na_2S , explaining the production of black precipitates identified as ferrous sulfides by Rietveld refinement (Table 2) in the abiotic control (S(0) + Na_2S + FeSO_4) after addition of FeSO_4 .

As stated above, with increasing duration of mineralization, phases containing iron and/or sulfur more oxidized than mackinawite (FeS) are produced, namely greigite (Fe_3S_4), pyrite (FeS_2) and barbosalite-like ($\text{Fe}_{1.47}\text{PO}_4(\text{OH})_{0.79}$) (Figures 2, 3, 4, 6). The sulfur of pyrite is at a formal oxidation state S(-I), i.e., it is more oxidized than that in mackinawite, which is formally S(-II), while both phases contain Fe(II). An oxidation process is thus necessary to form pyrite from mackinawite, i.e., electron acceptors must be present in the system. It is known that Thermococcales produce many extracellular vesicles (Soler et al., 2008; Gorlas et al., 2015; Liu et al., 2021), and particularly S(0)-vesicles which have been suggested to be involved in the detoxification of polysulfides (Gorlas et al., 2015). Here, the production of S(0)-vesicles may have enhanced the production of pyrite. Accordingly, Gorlas et al. (2015, 2018, 2022) have shown that no pyrite forms in culture devoid of



S(0)-vesicles. Thus, the main process of pyrite formation in this system likely involves S(0)-vesicles, S(0) acting in such a scheme as an acceptor of sulfide electrons, according to:



The present study suggests that the presence of metabolically active *T. kodakarensis* influences the sulfur reactivity by producing S(0)-vesicles, which leads to a redox disproportionation of S(0) from elemental sulfur and S(-II) from FeS, to S(-I) in pyrite. Of note, using zero valent sulfur as an oxidant does not exclude greigite as a pyrite intermediate (Hunger and Benning, 2007).

The pyrite produced in the presence of Thermococcales present a peculiar spherical shape. The spherules with a diameter of 200 nm to 1 μm exhibit a very smooth surface texture (Figures 4C, E, G) and consist in an accumulation of many ultra-small domains sharing common preferential orientations in the spherules (Figure 5E). The ultra-small domains are anisotropic and about 15 nm by 10 nm (Table 3), which explains the very smooth aspect of the spherules. Moreover, the presence of complex organic matter is detected within these pyrite spherules, although in low quantity. These compounds exhibit several functional groups, including aromatic groups, unsaturated C-S bonds, aliphatic groups, amide groups and carboxylic groups (Figure 5F), i.e., typical of the functional groups measured in mineralization studies involving prokaryotes (Benzerara et al., 2006; Miot et al., 2009; Li et al., 2013, 2014; Picard et al., 2021).

Pyrite mineralization by Thermococcales has been proposed to constitute a survival strategy at the population level (Gorlas et al., 2022). Still, the production of the pyrite spherules described here may be bio-induced rather than bio-controlled. Frankel and Bazylinski (2003), described biological induced mineralization (BIM) as the unintended and uncontrolled result of metabolic products reacting with ions or compounds present in the environment, making BIM products rather difficult to distinguish from abiotic minerals (Beveridge, 1989; Konhauser, 1998; Banfield and Zhang, 2001; Bäuerlein, 2003). In contrast, biologically controlled mineralization (BCM) minerals leads to the production of structurally well-ordered, narrow size distributed minerals exhibiting specific morphologies (Frankel and Bazylinski, 2003; Liu et al., 2012). Given the homogeneity in texture, shape and size of the pyrite spherules discussed here, it seems that they rather correspond to BCM than to BIM. But BCM minerals are usually formed within intracellular organic matrices or vesicles, and their nucleation and growth are genetically controlled by the organism itself (Bazylinski and Frankel, 2000a,b), which is not the case here since pyrite most likely precipitates after the release of the S(0)-vesicles outside the cells. However, it could be argued that the BCM concept is relevant to the S(0)-vesicles themselves. Further studies, especially of the transcriptome, are necessary to determine if Thermococcales genetics are able to control the characteristics of pyrite spherules.

5. Conclusion

When cultivated in a ferrous and sulfur-rich medium, Thermococcales influence the reactivity of both species through

iron sulfur and iron phosphate precipitation. After an initial precipitation of iron sulfide and phosphate nanophases that are toxic to most cells, the medium clears by evolving to the formation of larger structures of hundreds of nanometres pyrite spherules and well-crystallized iron II-III phosphates that are compatible with proper cell development. Moreover, this study shows that pyrite precipitation results from a redox disproportionation of S(0) (from elemental sulfur) and S(-II) (from FeS) to S(-I) (in pyrite), induced by the presence of Thermococcales and their production of S(0)-vesicles. Pyrites thus formed present specific textural features such as a peculiar spherule shape, ultra-small and anisotropic domains and a content in organic compounds that make them good candidates as biosignatures. However, before using them as tracers of the activity of Thermococcales in natural hydrothermal settings such as hydrothermal chimneys, additional experiments should be conducted to determine whether or not similar spherules containing similar organic compounds can be produced abiotically, and whether or not these specificities (shape, crystallinity and content in organics) may withstand hydrothermal and diagenetic conditions over long durations.

Data availability statement

The original contributions presented in this study are included in the article/Supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Author contributions

CT, AG, SB, and FG contributed to the conception and design of the study. CT and AG conducted the Thermococcales cultures, the mineralization process in anoxic conditions, and the powder X-ray diffraction. CT and FG conducted the electron microscopy analyses. PL, GM, CB, and PM conducted the XANES S K-edge measurements. GM realized the Rietveld refinement. CT and SB conducted the STXM analyses. CT wrote the first draft of the manuscript. CT, SB, FG, GM, and PL wrote the sections of the manuscript. All authors contributed to the manuscript revision, read, and approved the submitted version.

Funding

CT was supported by the Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), Sorbonne Université (SU) and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. AG was supported by the Agence Nationale de la Recherche, project HYPERBIOMIN (ANR-20-CE02-0001-01). FG was supported by Institut Universitaire de France. The SEM facility at IMPMC was supported by the Region Île-de-France grant SESAME Number I-07-593/R, INSU-CNRS, INP-CNRS, and UPMC-Paris 6, and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-07-BLAN-0124-01). The HERMES beamline (SOLEIL) was supported by the CNRS, the CEA, the Region Île-de-France, the Departmental Council of Essonne, and the Region Centre.

Acknowledgments

We acknowledge the support of the IMPMC microscopy platform, IMPMC X-ray diffraction platform, SSRL experimental station 4-3, and SOLEIL HERMES beamline. We thank Elisabeth Malassis (IMPMC) for her administrative support, Imène Estève (IMPMC) for her help in SEM-EDXS, Jean-Michel Guigner (IMPMC) for his help in TEM, Ludovic Delbes (IMPMC) for his help in XRD, David Troadec (IEMN) for the preparation of the FIB sections, Corentin Le Guillou (UMET) for his help with STXM, Pierre Lefebvre (ETH) for his help with XANES at SSRL, and Stefan Stanescu for his expert support of HERMES beamline at SOLEIL.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the

reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1145781/full#supplementary-material>

SUPPLEMENTARY FIGURE 1

(A) Mineralization experiments conducted with *T. kodakarensis* in a sulfur and Fe²⁺ rich medium at 85°C for 192 h. (B) Abiotic control [S(O) + Na₂S + FeSO₄] after 192 h of mineralization at 85°C.

SUPPLEMENTARY FIGURE 2

X-ray diffractograms of the solid residues of mineralization experiments conducted with *T. kodakarensis* in a sulfur and Fe²⁺ rich medium at 85°C for 5 h (A), 96 h (B), 192 h (C) and 35 days (D) and of abiotic control [S(O) + Na₂S + FeSO₄] (E) and of biotic control (cells + S(O) + Na₂S with no FeSO₄) (F). Each identified peaks are labeled with Elemental sulfur (COD ID: 00-008-0247; yellow triangle), NaCl (halite COD ID: 00-005-0628; gray round), Greigite (COD ID: 00-016-0713; pink diamond), Pyrite (00-006-0710; red star) and Barboosalite-like (iron phosphate oxide hydroxide COD ID: 01-070-5888; blue moon).

SUPPLEMENTARY FIGURE 3

Low magnification SEM images of the solid residues of mineralization experiments conducted with *T. kodakarensis* in a sulfur and Fe²⁺ rich medium at 85°C for 5 h (A), 96 h (B), 192 h (C), 35 days (D), and of abiotic control [S(O) + Na₂S + FeSO₄] after 96 h of mineralization (E).

References

- Banfield, J., and Zhang, H. (2001). Nanoparticles in the environment. *Rev. Mineral Geochem.* 44, 1–58.
- Bäuerlein, E. (2003). Biomineralization of unicellular organisms: An unusual membrane biochemistry for the production of inorganic nano- and microstructures. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 614–641. doi: 10.1002/anie.200390176
- Baya, C., Le Pape, P., Baptiste, B., Brest, J., Landrot, G., Elkaim, E., et al. (2021). Influence of trace level As or Ni on pyrite formation kinetics at low temperature. *Geochim. Cosmochim. Acta* 300, 333–353. doi: 10.1016/j.gca.2021.01.042
- Bayliss, P. (1977). Crystal structure refinement of a weakly anisotropic pyrite. *Am. Mineral.* 62, 1168–1172.
- Bazylnski, D., and Frankel, R. (2000a). "Magnetic iron oxide and iron sulfide minerals within organisms," in *Biomineralization: From biology to biotechnology and medical application*, ed. E. Bäuerlein (Weinheim: Wiley-VCH), 25–46.
- Bazylnski, D., and Frankel, R. (2000b). "Biologically controlled mineralization of magnetic iron minerals by magnetotactic bacteria," in *Environmental microbe-mineral interactions*, ed. D. Lovley (Washington, DC: ASM Press), 109–144. doi: 10.1128/9781555818098.ch5
- Belkhou, R., Stanescu, S., Swaraj, S., Besson, A., Ledoux, M., Hajlaoui, M., et al. (2015). HERMES: A soft X-ray beamline dedicated to X-ray microscopy. *J. Synchrotron Radiat.* 22, 968–979. doi: 10.1107/S1600577515007778
- Benning, L., Wilkin, R., and Barnes, H. (2000). Reaction pathways in the Fe–S system below 100°C. *Chem. Geol.* 167, 25–51.
- Benzerara, K., Menguy, N., López-García, P., and Brown, G. Jr. (2006). Nanoscale detection of organic signatures in carbonate microbials. *PNAS* 103, 9440–9445. doi: 10.1073/pnas.0603255103
- Berar, J.-F., and Baldinozzi, G. (1998). XND code: From X-ray laboratory data to incommensurately modulated phases. Rietveld modeling of complex materials. *CPD Newsletter* 20, 3–5.
- Berg, J., Duverger, A., Cordier, L., Laberty-Robert, C., Guyot, F., and Miot, J. (2020). Rapid pyritization in the presence of a sulfur/sulfate-reducing bacterial consortium. *Sci. Rep.* 10:8264. doi: 10.1038/s41598-020-64990-6
- Bernard, S., Benzerara, K., Beyssac, O., Brown, G. E., Grauvogel Stamm, L., and Düringer, P. (2009). Ultrastructural and chemical study of modern and fossil sporoderms by scanning transmission X-ray microscopy (STXM). *Rev. Palaeobot. Palynol.* 156, 248–261.
- Bertel, D., Peck, J., Quick, T. J., and Senko, J. M. (2012). Iron transformations induced by an acid-tolerant *Desulfosporosinus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 81–88. doi: 10.1128/AEM.06337-11
- Beveridge, T. J. (1989). Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. *Annu. Rev. Microbiol.* 43, 147–171.
- Bish, D., and Post, J. E. (1993). Quantitative mineralogical analysis using the rietveld full-pattern fitting method. *Am. Mineral.* 78, 932–940. doi: 10.1016/j.dib.2021.107746
- Bridger, S., Clarkson, S., Stirrett, K., DeBarry, M., Lipscomb, G., Schut, G., et al. (2011). Deletion strains reveal metabolic roles for key elemental sulfur-responsive proteins in *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* 193, 6498–6504. doi: 10.1128/JB.05445-11
- Charlou, J., Donval, J., Fouquet, Y., Jean-Baptiste, P., and Holm, N. (2002). Geochemistry of high H₂ and CH₄ vent fluids issuing from ultramafic rocks at the Rainbow hydrothermal field (36 degrees 14'N. MAR). *Chem. Geol.* 191, 345–359. doi: 10.1016/S0009-2541(02)00134-1
- De la Peña, F., Ostasevicius, T., Fauske, V. T., Burdet, P., Prestat, E., Jokubauskas, P., et al. (2018). *HyperSpy v1.4*.
- Duverger, A., Berg, J. S., Busigny, V., Guyot, F., Bernard, S., and Miot, J. (2020). Mechanisms of pyrite formation promoted by sulfate-reducing bacteria in pure culture. *Front. Earth Sci.* 8:588310. doi: 10.3389/feart.2020.588310
- Ech-Chahed, B., Jeannot, F., Malaman, B., and Gleitzer, C. (1988). Préparation et étude d'une variété basse température de l'oxyphosphate de fer de valence mixte β-Fe₂(PO₄)O et de NiCr(PO₄)O : Un cas d'échange électronique rapide. *J. Solid State Chem.* 74, 47–59. doi: 10.1016/0022-4596(88)90330-1
- Edmond, J., Measures, C., McDuff Chan, L., Collier, R., and Grant, B. (1979). Ridge crest hydrothermal activity and the balances of the major and minor element in the ocean : The Galapagos data. *Earth Planet. Sci. Lett.* 46, 1–18. doi: 10.1016/0012-821X(79)90061-X

- Elderfield, H., and Schultz, A. (1996). Mid-ocean ridge hydrothermal fluxes and the chemical composition of the ocean. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 24, 191–224. doi: 10.1146/annurev.earth.24.1.191
- Etique, M., Romaine, A., Bihannic, I., Gley, R., Carteret, C., Abdelmoula, M., et al. (2018). Abiotically or microbially mediated transformations of magnetite by sulphide species: The unforeseen role of nitrate-reducing bacteria. *Corros. Sci.* 142, 31–44. doi: 10.1016/j.corsci.2018.06.032
- Feely, R., Massoth, G., Trefry, J., Baker, E., Paulson, A., and Lebon, G. (1994). Composition and sedimentation of hydrothermal plume particles from north Cleft segment, Juan de Fuca Ridge. *J. Geophys. Res.* 99, 4985–5006. doi: 10.1029/93JB02509
- Fleet, M., Xiaoyang, L., Harmer, S., and Nesbitt, W. (2005). Chemical state of sulfur in natural and synthetic lazurite by S K-edge XANES and X-ray photoelectron spectroscopy. *Canad. Mineral.* 43, 1589–1603.
- Flores, G., Campbell, J., Kirshtein, J., Meneghin, J., Seewald, J., Tivey, M., et al. (2011). Microbial community structure of hydrothermal deposits from geochemically different vent fields along the Mid-Atlantic Ridge. *Environ. Microbiol.* 13, 2158–2171. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02463.x
- Frankel, R., and Bazylinski, D. (2003). Biologically induced mineralization by bacteria. *Rev. Mineral. Geochem.* 54, 95–114.
- Gartman, A., Yücel, M., Madison, A., Chu, D., Ma, S., Janzen, C., et al. (2011). Sulfide oxidation across diffuse flow zones of hydrothermal vents. *Aquat. Geochem.* 17, 583–601. doi: 10.1007/s10498-011-9136-1
- 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. doi: 10.1371/journal.pone.0201549
- Gorlas, A., Marguet, E., Gill, S., Geslin, C., Guigner, J.-M., Guyot, F., et al. (2015). Sulfur vesicles from *Thermococcales*: A possible role in sulfur detoxifying mechanisms. *Biochimie* 118, 356–364. doi: 10.1016/j.biochi.2015.07.026
- Gorlas, A., Mariotte, T., Morey, L., Truong, C., Bernard, S., Guigner, J.-M., et al. (2022). Precipitation of greigite and pyrite induced by *Thermococcales*: An advantage to live in Fe- and S-rich environments? *Environ. Microbiol.* 24, 626–642. doi: 10.1111/1462-2920.15915
- Herwald, S., Liu, A., Zhu, B., Sea, K., Lopez, K., Sazinsky, M., et al. (2013). Structure and substrate specificity of the pyrococcal coenzyme A disulphide reductases/polysulfide reductases (CoADR/PSr): Implications for S(0)-based respiration and a sulfur-dependent antioxidant system in *Pyrococcus*. *Biochemistry* 52, 2764–2773. doi: 10.1021/bi3014399
- Holden, J., and Adams, M. (2003). Microbe-metal interactions in marine hydrothermal environments. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 160–165. doi: 10.1016/s1367-5931(03)00026-7
- Houghton, J., and Seyfried, Jr (2010). An experimental and theoretical approach to determining linkages between geochemical variability and microbial diversity in sea floor hydrothermal chimneys. *Geobiology* 8, 457–470. doi: 10.1111/j.1472-4669.2010.00255.x
- Hunger, S., and Benning, L. G. (2007). Greigite: A true intermediate on the polysulfide pathway to pyrite. *Geochem. Trans.* 8:1. doi: 10.1186/1467-4866-8-1
- Ijjaali, M., Malaman, B., Gleitzer, C., Warner, J., Hriljac, J., and Cheetham, A. (1990). Stability, structure refinement, and magnetic properties of β -Fe₂PO₄O. *J. Solid State Chem.* 86, 195–205. doi: 10.1016/0022-4596(90)90135-K
- Ikogou, M., Ona-Nguema, G., Juillot, F., Le Pape, P., Menguy, N., Richeux, N., et al. (2017). Long-term sequestration of nickel in mackinawite formed by *Desulfovibrio capillatus* upon Fe(III)-citrate reduction in the presence of thiosulfate. *Appl. Geochem.* 80, 143–154. doi: 10.1016/j.apgeochem.2017.02.019
- Kanai, T., Imanaka, T., and Atomi, H. (2013). Hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *J. Japan Pet. Ins.* 56, 267–279. doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.11.002
- Kao, S., Horng, C., Roberts, A., and Liu, K. (2004). Carbon-sulfur-iron relationships in sedimentary rocks from Southwestern Taiwan: Influence of geochemical environment on greigite and pyrrhotite formation. *Chem. Geol.* 203, 153–168. doi: 10.1016/j.chemgeo.2003.09.007
- Kish, A., Miot, J., Lombard, C., Guigner, J., Bernard, S., Zirah, S., et al. (2016). Preservation of archaeal surface layer structure during mineralization. *Sci. Rep.* 6:26152. doi: 10.1038/srep26152
- Kobori, H., Ogino, M., Orita, I., Nakamura, S., Imanaka, T., and Fukui, T. (2010). Characterization of NADH oxidase/NADPH polysulfide oxidoreductase and its unexpected participation in oxygen sensitivity in an anaerobic hyperthermophilic archaeon. *J. Bacteriol.* 192, 5192–5202. doi: 10.1128/JB.00235-10
- Konhauser, K. O. (1998). Diversity of bacterial iron mineralization. *Earth Sci. Rev.* 43, 91–121.
- Kormas, L., Tivey, M., Von Damm, K., and Teske, A. (2006). Bacterial and archaeal phylotypes associated with distinct mineralogical layers of a white smoker spire from a deep-sea hydrothermal vent site (9°N, East Pacific Rise). *Environ. Microbiol.* 8, 909–920. doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00978.x
- Langmuir, C., Humphris, S., Fornari, D., VanDover, C., VonDamm, K., Tivey, M., et al. (1997). Hydrothermal vents near a mantle hot spot: The Lucky Strike vent field at 37 degrees N on the Mid-Atlantic Ridge. *Earth Planet. Sci. Lett.* 148, 69–91.
- Le Guillou, C., Bernard, S., De la Peña, F., and Le Brech, Y. (2018). XANES-based quantification of carbon functional group concentrations. *Anal. Chem.* 90, 8379–8386. doi: 10.1021/acs.analchem.8b00689
- Lennie, A. R., Redfern, S. A. T., Champness, P. E., Stoddart, C. P., Schofield, P. F., and Vaughan, D. J. (1997). Transformation of mackinawite to greigite; an in situ X-ray powder diffraction and transmission electron microscope study. *Am. Mineral.* 82, 302–309.
- Lennie, A. R., Redfern, S. A. T., Schofield, P. F., and Vaughan, D. J. (1995). Synthesis and rietveld crystal structure refinement of mackinawite, tetragonal FeS. *Mineral. Mag.* 59, 677–683. doi: 10.1180/minmag.1995.059.397.10
- Li, J. H., Benzerara, K., Bernard, S., and Beyssac, O. (2013). The link between biomineralization and fossilization of bacteria: Insights from field and experimental studies. *Chem. Geol.* 359, 49–69. doi: 10.1016/j.chemgeo.2013.09.013
- Li, J. H., Bernard, S., Benzerara, K., Beyssac, O., Allard, T., Cosmidis, J., et al. (2014). Impact of biomineralization on the preservation of microorganisms during fossilization: An experimental perspective. *Earth Planet. Sci. Lett.* 400, 113–122. doi: 10.1016/j.epsl.2014.05.031
- Lin, T., Ver Eecke, H., Breves, E., Dyar, M., Jamieson, J., Hannington, M., et al. (2016). Linkages between mineralogy, fluid chemistry, and microbial communities within hydrothermal chimneys from the Endeavour segment, Juan de Fuca ridge. *Geochem. Geophys. Geosyst.* 17, 300–323. doi: 10.1002/2015GC006091
- Liu, G., Natarajan, S., and Kim, S. (2005). Photochemical production of oligothiophene and polythiophene micropatterns from 2,5-dithiodiophene on Au in UHV. *Surf. Sci.* 592, 305–309.
- Liu, J., Soler, N., Gorlas, A., Krupovic, V., Krupovic, M., and Forterre, P. (2021). Extracellular membrane vesicles and nanotubes in archaea. *MicroLife* 2:uqab007.
- Liu, Y., Beer, L., and Whitman, W. (2012). Sulfur metabolism in archaea reveals novel processes. *Environ. Microbiol.* 14, 2632–2644. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02783.x
- Ludford, E., Palmer, M., German, C., and Klinkhammer, G. (1996). The geochemistry of Atlantic hydrothermal particles. *Geophys. Res. Lett.* 23, 3503–3506.
- Luther, G., Glazer, B., Hohmann, L., Popp, J., Taillefert, M., Rozan, T., et al. (2001). Sulfur speciation monitored in situ with solid state gold amalgam voltammetric micro-electrodes: Polysulfides as a special case in sediments, microbial mats and hydrothermal vent waters. *J. Environ. Monit.* 3, 61–66. doi: 10.1039/b006499h
- Mann, S., Sparks, N. H. C., Frankel, R., Bazylinski, D., and Jannasch, H. W. (1990). Biomineralization of ferromagnetic greigite (Fe₃S₄) and iron pyrite (FeS₂) in a magnetotactic bacterium. *Nature* 343, 258–261.
- Miot, J., Benzerara, K., Obst, M., Kappler, A., Hegler, F., Schädl, S., et al. (2009). Extracellular iron biomineralization by photoautotrophic iron-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5586–5591. doi: 10.1128/AEM.00490-09
- Morikawa, M., Izawa, Y., Rashid, N., Hoaki, T., and Imanakai, T. (1994). Purification and characterization of a thermostable thiol protease from a newly isolated hyperthermophilic *Pyrococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4559–4566. doi: 10.1128/aem.60.12.4559-4566.1994
- Morin, G., Juillot, F., Casiot, C., Brunel, O., Personné, J.-C., Elbaz-Poulichet, F., et al. (2003). Bacterial formation of toleelite and mixed arsenic(III) or arsenic(V)-iron(III) gels in the Carnoules acid mine drainage, France. A XANES, XRD, and SEM study. *Environ. Sci. Technol.* 37, 1705–1712. doi: 10.1021/es025688p
- Park, Y., and Faivre, D. (2022). Diversity of microbial metal sulfide biomineralization. *Chempluschem* 87:20.
- Picard, A., Gartman, A., and Girguis, P. (2016). What do we really know about the role of microorganisms in iron sulfide mineral formation? *Front. Earth Sci.* 4:68. doi: 10.3389/feart.2016.00068
- Picard, A., Gartman, A., and Girguis, P. (2021). Interactions between iron sulfide minerals and organic carbon: Implications for biosignature preservation and detection. *Astrobiology* 21, 587–604. doi: 10.1089/ast.2020.2276
- Picard, A., Gartman, A., Clarke, D. R., and Girguis, P. R. (2018). Sulfate-reducing bacteria influence the nucleation and growth of mackinawite and greigite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 220, 363–384.
- Picard, A., Gartman, A., Cosmidis, J., Obst, M., Vidoudez, C., Clarke, D. R., et al. (2019). Authigenic metastable iron sulfide minerals preserve microbial organic carbon in anoxic environments. *Chem. Geol.* 530, 1–13. doi: 10.1016/j.chemgeo.2019.119343
- Posfai, M., Buseck, P., Bazylinski, D., and Frankel, R. (1998). Iron sulfides from magnetotactic bacteria; structure, composition, and phase transitions. *Am. Min.* 83, 1469–1481. doi: 10.2138/am-1998-11-1235
- Prieur, D., Erauso, G., Geslin, C., Lucas, S., Gaillard, M., Bidault, A., et al. (2004). Genetic elements of *Thermococcales*. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 184–187. doi: 10.1042/bst0320184
- Ravel, B., and Newville, M. (2005). ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: Data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *J. Synchrotron. Rad.* 12, 537–541. doi: 10.1107/S0909049505012719

- Redhammer, G. J., Tippelt, G., Roth, G., Lottermoser, W., and Amthauer, G. (2000). Structure and mossbauer spectroscopy of barbosalite $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+2}(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_2$ between 80 K and 300 K. *Phys. Chem. Min.* 27, 419–429. doi: 10.1007/s002699900078
- Rettig, S. J., and Trotter, J. (1987). Refinement of the structure of orthorhombic sulfur, α -S8. *Acta Cryst.* 43, 2260–2262. doi: 10.1107/S0108270187088152
- Rickard, D. (1997). Kinetics of pyrite formation by the H_2S oxidation of iron (II) monosulfide in aqueous solutions between 25 and 125°C: The mechanism. *Geochim. Cosmochim. Acta* 61, 135–147. doi: 10.1016/S0016-7037(96)00322-5
- Rickard, D., and Luther, G. W. (2007). Chemistry of iron sulfides. *Chem. Rev.* 107, 514–562.
- Rouxel, O., Fouquet, Y., and Ludden, J. N. (2004). Subsurface processes at the Lucky Strike hydrothermal field, mid-atlantic ridge: Evidence from sulfur, selenium, and iron isotopes. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68, 2295–2311.
- Schiffbauer, J., and Xiao, S. (2009). Novel application of focused ion beam electron microscopy (FIB-EM) in preparation and analysis of microfossil ultrastructures: A new view of complexity in early Eukaryotic organisms. *PALAIOS* 24, 616–626.
- Schmid-Beurmann, P. (2000). Synthesis and phase characterization of a solid solution series between β - $\text{Fe}_2(\text{PO}_4)\text{O}$ and $\text{Fe}_4(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_3$. *J. Solid State Chem.* 153, 237–247.
- Schmidt, K., Koschinsky, A., Garbe-Schonberg, D., de Carvalho, L. M., and Seifert, R. (2007). Geochemistry of hydrothermal fluids from the ultramafic-hosted Logatchev hydrothermal field, 15 degrees N on the Mid-Atlantic Ridge: Temporal and spatial investigation. *Chem. Geol.* 242, 1–21.
- Schrenk, M., Kelley, D., Delaney, J., and Baross, J. (2003). Incidence and diversity of microorganisms within the walls of an active deep-sea sulfide chimney. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3580–3592. doi: 10.1128/AEM.69.6.3580-3592.2003
- Schut, G., Boyd, E., Peters, J., and Adams, M. (2013). The modular respiratory complexes involved in hydrogen and sulfur metabolism by heterotrophic hyperthermophilic archaea and their evolutionary implications. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 182–203. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00346.x
- Schut, G., Bridger, S., and Adams, M. (2007). Insights into the metabolism of elemental sulfur by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: Characterization of a coenzyme A-dependent NAD(P)H sulfur oxidoreductase. *J. Bacteriol.* 189, 4431–4441. doi: 10.1128/JB.00031-07
- Soler, N., Krupovic, M., Marguet, E., and Forterre, P. (2008). Membrane vesicles in natural environments: A major challenge in viral ecology. *ISME J.* 9, 793–796. doi: 10.1038/ismej.2014.184
- Stanjek, H., and Schneider, J. (2000). Anisotropic peak broadening analysis of a biogenic soil greigite (Fe_3S_4) with Rietveld analysis and single peak fitting. *Am. Mineral.* 85, 839–846.
- Stanley, W., and Southam, G. (2018). The effect of gram-positive (*Desulfosporosinus orientis*) and gram-negative (*Desulfovibrio desulfuricans*) sulfate-reducing bacteria on iron sulfide mineral precipitation. *Can. J. Microbiol.* 64, 629–637. doi: 10.1139/cjm-2017-0545
- Stein, C., and Stein, S. (1994). Constraints on hydrothermal Heat-Flux through the oceanic lithosphere from global heat-flow. *J. Geophys. Res.* 99, 3081–3095.
- Swaraj, S., Stanescu, S., Rioult, M., Besson, A., and Hitchcock, A. P. (2017). Performance of the HERMES beamline at the carbon K-edge. *J. Phys.* 849:012046.
- 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. doi: 10.1128/AEM.67.8.3618-3629.2001
- Templeton, A., Knowles, E., Eldridge, D., Arey, B., Dohnalkova, A., Webb, S., et al. (2009). A seafloor microbial biome hosted within incipient ferromanganese crusts. *Nat. Geosci.* 2, 872–876. doi: 10.1038/ngeo696
- Thiel, J., Byrne, J., Kappler, A., Schink, B., and Pester, M. (2019). Pyrite formation from FeS and H_2S is mediated through microbial redox activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 6897–6902. doi: 10.1073/pnas.1814412116
- Tivey, M. (1995). The influence of hydrothermal fluid composition and advection rates on black smoker chimney mineralogy: Insights from modelling transport and reaction. *Geochim. Cosmochim. Acta* 59, 1933–1949. doi: 10.1016/0016-7037(95)00118-2
- Von Damm, K. L. (1995). "Controls on the chemistry and temporal variability of seafloor hydrothermal fluids," in *Seafloor hydrothermal systems: Physical, chemical, biological, and geological interactions*, eds S. Humphris, R. Zierenberg, L. Mullineaux, and R. Thomson (Washington, DC: American Geophysical Union), 222–247. doi: 10.1029/GM091p0222
- Waite, T., Moore, T., Childress, J., Hsu-Kim, H., Mullaugh, K., Nuzzio, D., et al. (2008). Variation in sulfur speciation with shellfish presence at a Lau Basin diffuse flow vent site. *J. Shellfish Res.* 27, 163–168. doi: 10.2983/0730-8000(2008)27[163:V1SSWS]2.0.CO;2
- Wang, J., Morin, C., Li, L., Hitchcock, A. P., Scholl, A., and Doran, A. (2009). Radiation damage in soft X-ray microscopy. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenomena* 170, 25–36.
- Webb, S. M. (2005). SIXpack: A graphical user interface for XAS analysis using IFEFIT. *Phys. Scr.* 115:1011. doi: 10.1238/Physica.Topical.115a01011
- Wheat, C., Jannasch, W., Plant, J., Moyer, C., Sansone, F., and McMurtry, G. (2000). Continuous sampling of hydrothermal fluids from Loihi Sea mount after the 1996 event. *J. Geophys. Res.* Earth 105, 19353–19367. doi: 10.1029/2000JB900088
- Wilfert, P., Meerdink, J., Degaga, B., Temmink, H., Korving, L., Witkamp, G. J., et al. (2020). Sulfide induced phosphate release from iron phosphates and its potential for phosphate recovery. *Water Res.* 171:115389.
- Wilkin, R., and Barnes, H. (1996). Pyrite formation by reactions of iron monosulfides with dissolved inorganic and organic sulfur species. *Geochim. Cosmochim. Acta* 60, 4167–4179. doi: 10.1016/S0016-7037(97)81466-4
- Xiong, Y., Guilbaud, R., Peacock, C. L., Cox, R. P., Canfield, D. E., Krom, M. D., et al. (2019). Phosphorus cycling in Lake Cadagno, Switzerland: A low sulfate euxinic ocean analogue. *Geochim. Cosmochim. Acta* 251, 116–135.
- Yuan, Y., Wang, L., and Gao, L. (2020). Nano-sized iron sulfide: Structure, synthesis, properties, and biomedical applications. *Front. Chem.* 8:818. doi: 10.3389/fchem.2020.00818

III. Discussion et implications des résultats

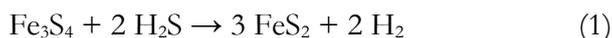
1. Dynamique soufre-fer-phosphore : une stratégie écologique ?

Un précipité noir se forme immédiatement après ajout du Fe^{2+} dans le milieu, que ce soit dans le témoin abiotique ou dans les expériences de minéralisation en présence de cellules. Ce précipité correspond à une matrice contenant plusieurs nano-phases, i.e. des phases amorphes ou faiblement cristallisées, identifiées comme étant de la nano-mackinawite (FeS) amorphe et des phosphates de fer amorphes. Dans le cas du témoin abiotique, ces nano-phases n'évoluent pas vers des phases minérales plus cristallines, même après 96 heures d'incubation, tandis que des sulfures de fer bien cristallisés se forment dans les expériences de minéralisation en présence de cellules, à savoir de la greigite (Fe_3S_4) et de la pyrite (FeS_2). La précipitation de ces phases est induite par l'évolution redox du soufre et du fer dans le système, évolution directement liée à l'activité cellulaire des Thermococcales. L'activité métabolique des cellules entraîne une réduction du soufre élémentaire $\text{S}(0)$ en sulfures S^{-2} (Atomi et al., 2004) qui sont ensuite partiellement oxydés – le S de la pyrite étant sous forme S^{-1} – tandis que le fer à l'état Fe^{2+} est partiellement oxydé à l'état Fe^{3+} à travers la précipitation de greigite et de phosphates de fer (II)-(III).

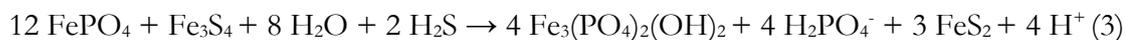
La précipitation de greigite requiert la présence d'un précurseur contenant du Fe(III) (Etique et al., 2018; Picard et al., 2018; Berg et al., 2020; Duverger et al., 2020; Gorlas et al., 2022) qui pourrait provenir de phosphates de fer (III) amorphes (e.g. Duverger et al., 2020) et/ou de l'oxydation du fer (II) de la nano-mackinawite (e.g. Lennie et al., 1997). Ces deux phases, présentes dans la matrice, sont observées à 5 heures après contact avec le fer. D'après Gorlas et al. (2018), la greigite se forme par sulfuration des phosphates de fer (III) amorphes produits au contact des membranes cellulaires suite au stress lié à la forte concentration en fer. Néanmoins, l'oxydation du fer dans des expériences conduites en stricte anoxie reste pour l'instant d'origine indéterminée et pourrait avoir impliqué le soufre élémentaire contenu dans les cellules, des acides organiques ou encore les ions H^+ de l'eau, dont la réduction aurait été catalysée par les surfaces cellulaires.

Cette séquence d'oxydation du soufre et du fer est corrélée à la précipitation progressive de phases minérales, dont la taille des assemblages augmente au cours de l'expérience. Les nano-phases dominant aux temps courts (5 heures), à travers la précipitation initiale de phosphates de fer amorphes et de nano-mackinawite (FeS) < 3 nm, puis sont remplacées par des nano-cristaux de greigite < 60 nm et des sphérules de pyrite submicrométriques (200 nm à 1 μm) à partir de 96 heures. Un phénomène particulier de « déminéralisation » (Gorlas et al., 2022) a été observé à 192 heures et correspond à un éclaircissement du milieu de culture auparavant dominé par un précipité noir. Cet éclaircissement résulte de la présence de phosphates de fer (II)-(III) d'une taille allant de moins d'1 μm à une dizaine de micromètres, et à une réduction importante de la proportion relative de nano-cristaux de greigite, tandis que la proportion de pyrite continue d'augmenter au fur et à mesure du temps sans être impactée par la précipitation d'autres phases. Autrement dit, après 192 heures, la dominance des assemblages micrométriques sur les nano-phases, i.e. les phases amorphes et les nano-cristaux de greigite, entraîne une clarification du milieu.

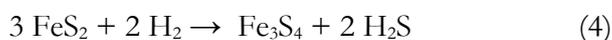
D'une part, la greigite, souvent présentée comme un intermédiaire dans la formation de la pyrite (Hunger et Benning, 2007), peut évoluer selon les réactions suivantes :



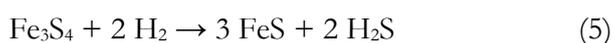
D'autre part, la greigite peut réagir avec les phosphates de fer amorphes, ce qui conduirait à la précipitation d'un phosphate de fer à valence mixte fer (II)-(III) selon la proposition de réaction suivante :



Toutes ces étapes impliquent la production initiale de phosphates de fer (III) amorphes par des cellules ainsi que la production de H_2S nécessaire à la sulfurisation de ces phosphates en greigite, ce qui suggère qu'une partie de la population initiale a survécu à l'ajout de sulfates de fer dans le milieu. Dans des expériences de minéralisation similaires, Gorlas et al. (2022) ont observé une augmentation de la quantité d'ATP liée à la présence de cellules en division durant ce phénomène d'éclaircissement du milieu à 192 heures. Ces observations démontrent qu'une partie des cellules a survécu à la précipitation initiale de nano-phases et ont pu se multiplier à nouveau lorsque les conditions du milieu se sont avérées favorables, formant une deuxième génération de cellules. On note également une diminution de la proportion relative de soufre élémentaire. Or, les Thermococcales sont capables de passer d'un métabolisme de fermentation assistée par le soufre, productrice de H_2S , à une fermentation productrice de H_2 lorsque la quantité de soufre élémentaire disponible passe en-dessous d'un certain seuil (Kanai et al., 2013 ; Schut et al., 2013). Qui plus est, l'étude des produits métaboliques en phase gazeuse présentée dans le Chapitre III a pu mettre en avant une production de H_2 concomitante à la production de H_2S dans un milieu pourtant riche en soufre élémentaire. La production de H_2 par les Thermococcales est donc tout à fait probable dans ces conditions, ce qui pourrait conduire à la dissolution des sulfures de fer (Payne et al., 2021) selon les équations suivantes :



(dissolution réductive de la pyrite)



(dissolution réductive de la greigite)

Ces réactions de dissolution réductive restent hypothétiques, car (1) elles se produiraient entre 192 heures et 35 jours, la cinétique actuelle ne permettant donc pas d'avoir le détail des données entre ces deux points et (2) les données de gaz durant le processus de minéralisation ne sont pas encore disponibles, ce qui ne permet pas de déterminer si la pression partielle de H_2 est suffisante pour la dissolution réductive des sulfures de fer. Néanmoins, les résultats présentés dans l'article ci-dessus montrent la disparition du phosphate de fer (II)-(III) à 35 jours de minéralisation et une nouvelle phase de précipitation de la greigite. La dissolution du phosphate de fer (II)-(III) peut s'expliquer par la production de HS^- par la deuxième génération de cellules, selon les réactions suivantes :



(production de greigite)



(production de pyrite)

La deuxième phase de précipitation de greigite résulterait donc de la libération de phosphates par la deuxième génération de cellules, selon le mécanisme de sulfuration des phosphates proposé à 5 heures de minéralisation.

En résumé, les cellules ont une influence directe sur la dynamique de précipitation des phosphates et des sulfures de fer à travers :

- (1) un phénomène de formation initiale de phosphates de fer (II)-(III) amorphes en réaction à l'ajout de fer.
- (2) un phénomène de biominéralisation induite (BIM) par une partie métaboliquement active de la population de cellules, productrice de HS^- , qui permet la transformation des phosphates de fer (II)-(III) amorphes en greigite.
- (3) la transformation de ces greigites en phosphates de fer (II)-(III) amorphes résiduels en phosphates de fer (II)-(III) bien cristallisés, ce phénomène ne pouvant se produire sans cellules car aucun fer (III) n'est présent.
- (4) la formation d'une seconde génération de greigites suite à la transformation des phosphates de fer (II)-(III) bien cristallisés en greigite sous l'effet des sulfures métaboliques produits par la deuxième génération de cellules.

Ces phénomènes se produisent initialement du fait de la population de cellules mises au contact du fer, puis de nouveau à la deuxième génération qui a émergé à partir des cellules initiales survivantes. Des données supplémentaires seront nécessaires pour mieux comprendre la cyclicité du phénomène et la présence de générations supplémentaires. Il faudra envisager un échantillonnage entre 192h et 35j afin de tester si une troisième génération de cellules est envisageable, la quantification des gaz indicatifs du métabolisme des cellules afin d'avoir une compréhension plus fine des réactions de précipitation et de dissolution, et enfin un dosage des phosphates en solution afin de tester si cette dynamique permet la libération de phosphates biodisponibles, potentiellement recyclés par les cellules survivantes dans un environnement où le phosphore est un élément limitant.

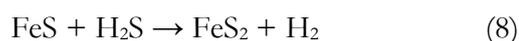
2. Mécanisme de formation des sphérules de pyrite

La pyrite est un minéral ordinairement produit en conditions abiotiques (e.g. Yuan et al., 2020), souvent à partir de greigite (Fe_3S_4) et de monosulfure de fer (FeS) (Rickard, 1997 ; Hunger et Benning, 2007 ; Rickard et Luther, 2007) ou de soufre élémentaire et de monosulfure de fer (FeS) (Wilkin et Barnes, 1996 ; Benning et al., 2000). Toutefois, la production biogénique de pyrite a été démontrée dans le cas de microorganismes sulfato-réducteurs (Thiel et al., 2019 ; Berg et al., 2020 ; Duverger et al., 2020) et d'archées méthanogènes (Thiel et al., 2019), mais s'avère bien plus rare que la production biogénique d'autres sulfures de fer, comme la mackinawite (FeS) ou la greigite (Fe_3S_4) (e.g. Posfai et al., 1998a ; Picard et al., 2016a ; Picard et al., 2018 ; Stanley et Southam, 2018 ; Park et Faivre, 2022). Quoi qu'il en soit, une production initiale de monosulfure de fer (FeS) est nécessaire à la précipitation de pyrite (FeS_2).

La production initiale de nano-mackinawite (FeS) résulte de l'interaction entre des ions sulfures (S^{2-}) et les ions ferreux (Fe^{2+}), ces derniers provenant des sulfates de fer (FeSO_4). Les ions sulfures proviennent certainement en majorité de sulfures et d'hydrogénosulfures (HS^-) produits

lors de la réduction métabolique du soufre élémentaire S(0) par les Thermococcales (Atomi et al., 2004) durant l'étape de culture en conditions optimales de croissance, i.e. avant ajout des sulfates de fer (FeSO₄). Toutefois, on ne peut exclure qu'une partie de la nano-mackinawite (FeS) résulte de la réaction entre les ions sulfures (S²⁻) du sulfure de sodium (Na₂S) – agent réducteur ajouté avant l'inoculation des cellules – du milieu avec les sulfates de fer (FeSO₄), étant donnée la présence de monosulfure de fer (FeS) dans le témoin abiotique, bien qu'en quantité minimale. Aux concentrations étudiées, les ions sulfures du Na₂S ne réagissent pas, ou très peu, avec le soufre élémentaire présent dans le milieu de culture, ce qui indique une faible réactivité du soufre utilisé dans ces expériences. Par conséquent, l'activité métabolique des cellules a pour effet d'augmenter la réactivité du soufre particulaire pour permettre la production de sulfures de fer par réaction avec les ions sulfures. Une fois la nano-mackinawite (FeS) formée, des réactions d'oxydation sont nécessaires à la formation des phases cristallines contenant du soufre et/ou du fer à un degré d'oxydation plus important, à savoir la greigite (Fe₃S₄), la pyrite (FeS₂) et le phosphate de fer(II)-(III).

Dans le cas de la pyrite, le soufre se trouve à un état d'oxydation S(-I) contre S(-II) pour le sulfure de fer (FeS) ; des accepteurs d'électron doivent donc être présents dans le système afin d'oxyder le S(-II) en S(-I). Il pourrait s'agir des protons H⁺ provenant du H₂S, produit par la réduction du soufre suite à l'activité métabolique des cellules (Atomi et al., 2004 ; Atomi et Reeve, 2019), réagissant avec le sulfure de fer (FeS) selon la réaction suivante :



Une autre possibilité implique le soufre élémentaire S(0) en tant qu'accepteur final d'électrons selon la réaction suivante :



Or, les Thermococcales produisent des vésicules extracellulaires (Soler et al., 2008 ; Liu et al., 2021), et notamment des vésicules qui ont la particularité d'être riches en soufre (SVs) lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu riche en soufre élémentaire (Gorlas et al., 2015). La fermentation assistée par le soufre réalisée par les Thermococcales implique une enzyme NAD(P)H sulfur-oxydoréductase (NSR) (Kobori et al., 2010 ; Herwald et al., 2013) qui peut conduire à l'accumulation de soufre dans le cytoplasme suite à une exposition à de fortes concentrations en soufre élémentaire (> 6,4g/L), comme démontré chez *Pyrococcus furiosus* (Schut et al., 2007). La production de SVs a donc été interprétée comme un mécanisme de détoxification, permettant de transporter en dehors de la cellule du soufre à l'état d'oxydation (0) séquestré en excès dans le cytoplasme (Gorlas et al., 2015).

Gorlas et al. (2018 ; 2022) ont ensuite démontré que la pyrite ne précipite que dans les expériences de minéralisation faites à partir de cultures productrices de SVs, i.e. dans un milieu riche en soufre élémentaire. C'est cette dernière réaction, impliquant le soufre élémentaire en tant qu'oxydant, qui mène à la formation de pyrite dans ce système. La production de SVs influence donc la réactivité du soufre élémentaire, implémenté dans le milieu sous forme solide peu réactive (voir Chapitre II), et le transforme en soufre réactif tels que des polysulfures ou des colloïdes capables de recevoir les électrons pour l'oxydation du monosulfure de fer (FeS) en pyrite (FeS₂). A noter que la formation de pyrite à partir de soufre élémentaire n'exclut pas, en parallèle, la transformation de greigite en pyrite discutée dans la partie 1.

Par conséquent, l'activité cellulaire des Thermococcales induit une réaction redox de comproportionation du soufre élémentaire $S(0)$ avec $S(-II)$ pour former du $S(-I)$ à travers deux produits métaboliques : (1) la production de sulfures S^{2-} suite à la fermentation assistée par le soufre, i.e. la réduction du soufre élémentaire $S(0)$, conduisant à la formation de sulfure de fer (FeS), soit $S(-II)$, et (2) la production de polysulfures/soufre colloïdal ($S(0)$ ou proche $S(0)$) réactifs et accepteurs d'électrons à travers la production de SVs, conduisant à l'oxydation du sulfure de fer (FeS) en pyrite (FeS_2), soit $S(-I)$.

3. Les sphérules de pyrite, des biosignatures ?

Les pyrites formées suite au processus décrit en partie 2. sont peu dispersées en taille et homogènes dans tous les échantillons. Elles se présentent sous la forme caractéristique de sphérules lisses de 200 nm à 1 μm , majoritairement proche de 1 μm , constituées de cristallites de quelques nanomètres assemblées entre elles pratiquement sans porosité résiduelle. Il s'agit de domaines cristallins anisotropes d'une dizaine de nanomètres qui partagent une orientation préférentielle commune au sein d'une même sphérule. Qui plus est, des composés organiques piégés à l'intérieur des sphérules de pyrite ont été détectés, à savoir des composés présentant des groupements aromatiques, aliphatiques, amides et/ou carboxyliques, ainsi que composés organo-soufrés. Ces composés sont similaires à ceux identifiés dans d'autres expériences de minéralisation de procaryotes (Benzerara et al., 2006 ; Miot et al., 2009 ; Li et al., 2013 ; Li et al., 2014 ; Picard et al. 2021), et sont identiques à ceux détectés dans la matrice environnante, ce qui suggère que les sphérules de pyrite ont piégé les composés cellulaires et les produits intracellulaires issus de la lyse et de l'activité des Thermococcales.

La production de sphérules de pyrite, résultant directement de l'activité métabolique des Thermococcales, pourrait être classée dans de la minéralisation bio-induite (BIM) plutôt que bio-contrôlée (BCM). Pour rappel, Frankel et Bazylinski (2003) décrivent la BIM comme le résultat non contrôlé de produits métaboliques réagissant avec les ions ou les composés présents dans l'environnement, ce qui résulte en des minéraux difficilement discernables de minéraux abiotiques (Beveridge, 1989 ; Konhauser, 1998 ; Banfield and Zhang, 2001 ; Bäuerlein, 2003). Par opposition, les minéraux issus de BCM présentent des morphologies spécifiques et une distribution de taille homogène (Frankel et Bazylinski, 2003 ; Liu et al., 2012). Etant données les caractéristiques des sphérules de pyrite produites en présence de Thermococcales, il semblerait qu'elles correspondent plus à des produits de BCM que de BIM. Néanmoins, les minéraux issus de BCM sont normalement formés de manière intracellulaire, et leur croissance et nucléation sont contrôlées génétiquement par l'organisme lui-même (Bazylinski et Frankel, 2000a,b), ce qui ne semble pas être le cas ici puisque la pyrite précipite une fois les SVs relarguées par les cellules. La morphologie spécifique et la gamme de taille des sphérules suggèrent que les SVs et les cellules, ayant potentiellement accumulé des polysulfures dans leur cytoplasme, ont servi de site nucléation pour la précipitation des sphérules. Le concept de BCM s'appliquerait plutôt à la biominéralisation du soufre à travers la production de SVs, et qui, en réagissant avec le fer, transmettrait indirectement les caractéristiques spécifiques propres aux produits de BCM aux sphérules de pyrite ainsi formées.

Afin d'explorer plus avant la possibilité d'utiliser ces sphérules de pyrite en tant que biosignatures, il est nécessaire de tester si de tels minéraux peuvent être retrouvés dans les cheminées hydrothermales. Il sera également nécessaire de tester si des minéraux similaires, présentant les mêmes caractéristiques (morphologie, taille, cristallographie, contenu en composés organiques), peuvent se former en conditions abiotiques.

Références

- Atomi H., Fukui T., Kanai T., Morikawa M., Imanaka T. (2004), Description of *Thermococcus kodakaraensis* sp. nov., a well-studied hyperthermophilic archaeon previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1. *Archaea* 1, 263 – 267.
- Atomi H. and Reeve J. (2019), Microbe Profile: *Thermococcus kodakarensis*: the model hyperthermophilic archaeon. *Microbiology* 165, 1166–1168.
- Banfield J., Zhang H. (2001), Nanoparticles in the environment. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 44, 1-58.
- Bäuerlein E. (2003), Biomineralization of unicellular organisms: An unusual membrane biochemistry for the production of inorganic nano- and microstructures, *Angewandte Chemie International Edition* 42, 614-641.
- Bazylnski D., Frankel R. (2000b) Biologically controlled mineralization of magnetic iron minerals by magnetotactic bacteria. In: *Environmental Microbe-Mineral Interactions*. Lovley DR (ed) ASM Press, Washington, DC, 109-144.
- Bazylnski D, Frankel R. (2003), Biologically Controlled Mineralization in Prokaryotes. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 54 (1), 217–247.
- Benning L., Wilkin R., Barnes H. (2000), Reaction pathways in the Fe–S system below 100°C. *Chemical Geology*, 167, 25–51.
- Benzerara K., Menguy N., López-García P., Brown G. Jr. (2006), Nanoscale detection of organic signatures in carbonate microbialites, *PNAS*, 103 (25), 9440-9445.
- Berg J., Duverger A., Cordier L., Laberty-Robert C., Guyot F., Miot J. (2020), Rapid pyritization in the presence of a sulfur/sulfate-reducing bacterial consortium. *Scientific Reports* 10, 8264.
- Beveridge T.J. (1989), Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization, *Annual Review of Microbiology* 43, 147-171.
- Duverger A., Berg J.S., Busigny V., Guyot F., Bernard S., Miot J. (2020), Mechanisms of pyrite formation promoted by sulfate-reducing bacteria in pure culture, *Frontiers in Earth Science* 8, 588310.
- Etique M., Romaine A., Bihannic I., Gley R., Carteret C., Abdelmoula M., Ruby C., Jeannin M., Sabot R., Refait P., Jorand F. (2018), Abiotically or microbially mediated transformations of magnetite by sulphide species: The unforeseen role of nitrate-reducing bacteria, *Corrosion Science*, 142, 31-44.
- Frankel R., Bazylnski D. (2003), Biologically Induced Mineralization by Bacteria, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 54 (1), 95–114.
- Gorlas A., Marguet E., Gill S., Geslin C., Guigner J.-M., Guyot F., Forterre P. (2015), Sulfur vesicles from *Thermococcales*: A possible role in sulfur detoxifying mechanisms. *Biochimie*, 118, 356-364.
- Gorlas A., Jacquemot P., Guigner J.M., Gill S., Forterre P., Guyot F. (2018), Greigite nanocrystals produced by hyperthermophilic archaea of *Thermococcales* order. *PLoS One* 13: e0201549.
- Gorlas A., Mariotte T., Morey L., Truong C., Bernard S., Guigner J.-M., Oberto J., Baudin F., Landrot G., Baya C., Le Pape P., Morin G., Forterre P., Guyot F. (2022), Precipitation of greigite and pyrite induced by *Thermococcales*: an advantage to live in Fe- and S-rich environments? *Environmental Microbiology*.

- Herwald S., Liu A., Zhu B., Sea K., Lopez K., Sazinsky M., Crane E. (2013) Structure and substrate specificity of the pyrococcal coenzyme A disulphide reductases/polysulfide reductases (CoADR/Psr): implications for S(0)-based respiration and a sulfur-dependent antioxidant system in *Pyrococcus*, *Biochemistry* 52(16), 2764–2773.
- Holden J.F. et Adams M. (2003), Microbe-metal interactions in marine hydrothermal environments. *Current Opinion in Chemical Biology* 7, 160–165.
- Hunger S. et Benning L.G. (2007), Greigite: a true intermediate on the polysulfide pathway to pyrite. *Geochemical Transactions* 8, 1.
- Jannasch H. W. (1995), Microbial Interactions with Hydrothermal Fluids. Dans Humphris, S. E., et al. (eds.), *Seafloor Hydrothermal Systems: Physical, Chemical, Biological, and Geological Interactions*. Washington, DC: American Geophysical Union, 273-296.
- Kanai T., Imanaka T., Atomi H. (2013), Hydrogen Production by the Hyperthermophilic Archeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Journal of the Japan Petroleum Institute* 56 (5), 267 – 279.
- Kobori H., Ogino M., Orita I., Nakamura S., Imanaka T., Fukui T. (2010), Characterization of NADH oxidase/NADPH polysulfide oxidoreductase and its unexpected participation in oxygen sensitivity in an anaerobic hyperthermophilic archaeon, *Journal of Bacteriology* 192(19), 5192–5202.
- Konhauser K.O. (1998), Diversity of bacterial iron mineralization, *Earth-Science Reviews* 43, 91-121.
- Kormas L., Tivey M., Von Damm K., Teske A. (2006), Bacterial and archaeal phylotypes associated with distinct mineralogical layers of a white smoker spire from a deep-sea hydrothermal vent site (9°N, East Pacific Rise), *Environmental Microbiology* 8(5), 909–920.
- Lennie A. R., Redfern S. A., Champness P. E., Stoddart C. P., Schofield P. F., Vaughan D. J. (1997), Transformation of mackinawite to greigite; an in situ X-ray powder diffraction and transmission electron microscope study. *American Mineralogist*, 82(3-4), 302-309.
- Li J. H., Bernard S., Benzerara K., Beyssac O., Allard T., Cosmidis J., Moussou J. (2014), Impact of biomineralization on the preservation of microorganisms during fossilization: An experimental perspective, *Earth and Planetary Science Letters*, 400: 113-122.
- Liu J., Soler N., Gorlas A., Krupovic V., Krupovic M., Forterre P. (2021), Extracellular membrane vesicles and nanotubes in Archaea. *MicroLife* 2, uqab007.
- Liu Y., Beer L., Whitman W. (2012), Sulfur metabolism in archaea reveals novel processes, *Environmental Microbiology* 14(10), 2632-2644.
- McCollom T.M. (2007), Geochemical constraints on sources of metabolic energy for chemolithoautotrophy in ultramafic-hosted deep-sea hydrothermal systems. *Astrobiology* 7, 933–950.
- Miot J., Benzerara K., Obst M., Kappler A., Hegler F., Schädler S., Bouchez C., Guyot F., Morin G. (2009), Extracellular iron biomineralization by photoautotrophic iron-oxidizing bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 75(17), 5586-5591.
- Park Y. et Faivre D., (2022), Diversity of Microbial Metal Sulfide Biomineralization, *ChemPlusChem* 87(1), 20.
- Payne D., Spietz R.L., Boyd E.S. (2021), Reductive dissolution of pyrite by methanogenic archaea. *ISME J* 15, 3498–3507.
- Picard A., Gartman A., Girguis P. R. (2016a). What Do We Really Know about the Role of Microorganisms in Iron Sulfide Mineral Formation ? *Frontiers in Earth Science* 4.

- Picard A., Gartman A., Clarke D.R., Girguis P.R. (2018), Sulfate-reducing bacteria influence the nucleation and growth of mackinawite and greigite. *Geochimica Cosmochimica Acta* 220, 363–384.
- Picard A., Gartman A., Girguis P. (2021), Interactions Between Iron Sulfide Minerals and Organic Carbon: Implications for Biosignature Preservation and Detection. *Astrobiology* 21(5), 587–604.
- Posfai M., Buseck P. R., Bazylinski D. A., Frankel R. B. (1998a), Reaction sequence of iron sulfide minerals in bacteria and their use as biomarkers. *Science* 280, 880–883.
- Prieur D., Erauso G., Geslin C., Lucas S., Gaillard M., Bidault A., Mattenet A.-C., Rouault K., Flament D., Forterre P., Le Romancer M. (2004), Genetic elements of Thermococcales. *Biochemical Society Transactions* 32, 184–187.
- Rickard D. (1997), Kinetics of pyrite formation by the H₂S oxidation of iron (II) monosulfide in aqueous solutions between 25 and 125°C: the mechanism. *Geochimica Cosmochimica Acta* 61, 135–147.
- Rickard D. et Luther G.W. (2007), Chemistry of iron sulfides. *Chemical Reviews* 107, 514–562.7
- Rouxel O., Fouquet Y., Ludden J.N. (2004), Subsurface processes at the Lucky Strike hydrothermal field, Mid-Atlantic Ridge: evidence from sulfur, selenium, and iron isotopes. *Geochimica Cosmochimica Acta* 68, 2295–2311.
- Schut G. J., Bridger S. L., Adams M. W. W. (2007). Insights into the metabolism of elemental sulfur by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: characterization of a coenzyme A-dependent NAD(P)H sulfur oxidoreductase. *Journal of Bacteriology* 189, 4431–4441.
- Schut, G., Boyd, E., Peters, J. and Adams, M. (2013), The modular respiratory complexes involved in hydrogen and sulfur metabolism by heterotrophic hyperthermophilic archaea and their evolutionary implications. *FEMS Microbiology Reviews* 37, 182–203.
- Soler N., Krupovic M., Marguet E., Forterre P. (2008), Membrane vesicles in natural environments: a major challenge in viral ecology. *ISME Journal* 9, 793–796.
- Stanley W. and Southam G. (2018), The effect of gram-positive (*Desulfosporosinus orientis*) and gram-negative (*Desulfovibrio desulfuricans*) sulfate-reducing bacteria on iron sulfide mineral precipitation. *Canadian Journal of Microbiology* 64, 629–637.
- Stetter K.O. (1996), Hyperthermophilic Prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 18, 149–158.
- Takai K., Komatsu T., Inagaki F., Horikoshi, K. (2001), Distribution of archaea in a black smoker 785 chimney structure. *Applied Environmental Microbiology* 67, 3618–3629.
- Thiel J., Byrne, J.M. Kappler, A. Schink, B., Pester M. (2019), Pyrite formation from FeS and H₂S is mediated through microbial redox activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 116, 6897–6902.
- Wilfert P., Meerdink J., Degaga B., Temmink H., Korving L., Witkamp G.J., Goubitz K., Van Loosdrecht M. (2020), Sulfide induced phosphate release from iron phosphates and its potential for phosphate recovery. *Water Research* 171, 115389.
- Wilkin R. et Barnes H. (1996), Pyrite formation by reactions of iron monosulfides with dissolved inorganic and organic sulfur species, *Geochimica Cosmochimica Acta*, 60, 4167–4179.
- Xiong Y., Guilbaud R., Peacock C.L., Cox R.P., Canfield D. E., Krom M.D., Poulton S.W. (2019) Phosphorus cycling in Lake Cadagno, Switzerland: a low sulfate euxinic ocean analogue. *Geochimica Cosmochimica Acta* 251, 116–135.

Yuan Y., Wang L., Gao L. (2020), Nano-Sized Iron Sulfide: Structure, Synthesis, Properties, and Biomedical Applications, *Frontiers in Chemistry* 8 (818).

Chapitre V.

Recherche de biosignatures dans des échantillons naturels

I. Enjeux et stratégie

1. Enjeux

La recherche de traces d'organismes hyperthermophiles dans le corps d'une cheminée hydrothermale nécessite de savoir (1) où et (2) quoi chercher, en gardant à l'esprit que le milieu naturel est différent des conditions de laboratoire. Il faut en premier lieu identifier la biosignature : est-il plus vraisemblable que l'objet étudié ait été produit par le vivant plutôt que par des processus abiotiques ? Il faut ensuite démontrer que la biosignature est authigène à la portion de cheminée où elle a été trouvée, i.e. qu'elle n'a pas été transportée. Les questions de la préservation et de la contamination se posent aussi : la biosignature présente-elle des signes d'altération thermique ? La matière organique présente a-t-elle été piégée au moment de la formation de l'objet et cette matière organique est-elle bien d'origine biologique ?

Où devrait-on chercher des biosignatures ? Le profil de température d'une cheminée se découpe grossièrement en trois zones, à savoir les portions internes au contact direct du fluide et soumises à des températures $> 250^{\circ}\text{C}$ (jusqu'à 400°C), les portions intermédiaires $< 250^{\circ}\text{C}$ et les portions externes, au contact direct de l'eau de mer à une température de 2°C (e.g. Schmidt et al., 2007 ; Tivey, 1995 ; Von Damm, 1995). Evidemment, ce profil n'est pas figé dans le temps et dans l'espace. En particulier, les portions intermédiaires les plus froides aux portions externes subissent des variations de température très importantes, la température pouvant passer de 250°C à 2°C en quelques minutes (Tivey et al., 2002). La colonisation d'hyperthermophiles au sein de ce gradient reste inconnue, mais les portions intermédiaires à externes sont néanmoins les seules à pouvoir héberger le vivant.

Que devrait-on chercher ? Les chapitres précédents ont permis d'identifier des biosignatures minérales : les sphérules de pyrite. Chose importante, j'ai observé leur production en conditions expérimentales dans des systèmes simples, ne contenant qu'une seule souche d'archées (*Thermococcus kodakarensis* KOD1), à une température constante (85°C) et en présence de fer à une concentration elle aussi constante (5mM). Les systèmes naturels, ouverts, présentent une complexité bien supérieure. Les paramètres des systèmes naturels sont différents de ceux du laboratoire et variables, notamment la température (Tivey, 2002), la concentration en métaux (Zn, Cu, Co, etc en plus du Fe) (e.g. Klevenz et al., 2011 ; Gartman et al., 2014 ; Findlay et al., 2015), et les conditions rédox (gradient rédox entre le fluide réducteur et l'eau de mer oxydée). Autant de facteurs qui vont possiblement influencer sur les caractéristiques initiales des biosignatures et les rendre plus difficiles à distinguer de leurs pendants abiotiques. Qui plus est, il faut prendre en compte l'activité concomitante et non négligeable d'une biodiversité de souches (e.g. Dick et al., 2010 ; Cathalot et al., 2021) dont qui pourrait avoir des effets inconnus sur la production de sphérules de pyrite.

Quelle est la probabilité de trouver des biosignatures ? Les sphérules de pyrite sont potentiellement rares dans les environnements naturels. En conditions expérimentales, les sphérules sont produites au contact de cultures pures de Thermococcales (1×10^7 cellules/mL). Une concentration cellulaire similaire a été estimée dans le panache hydrothermal (Winn et al., 1986), mais une telle concentration dans certaines portions des cheminées, bien que suggérée, reste à démontrer (Schrenk et al., 2003). Rien ne garantit une abondance de sphérules de pyrite identique à celle observée dans les conditions expérimentales.

Les biosignatures sont-elles bien authigènes ? Il faut démontrer que la biosignature n'a pas été transportée dans la portion de cheminée étudiée, mais qu'elle y a été produite. Même si des études ont révélé la présence de biomarqueurs dans l'entièreté d'un transect horizontal de cheminée, i.e. les gènes codant pour l'ARN 16S (Schrenk et al., 2003) et des lipides archéens et bactériens (Blumenberg, 2007), aucune n'a pu démontrer leur production *in situ*.

Les biosignatures sont-elles bien préservées ? Une recristallisation et/ou une maturation thermique est possible dans le milieu naturel. Il faudra alors comparer avec les biosignatures produites expérimentalement et déterminer si les caractéristiques initiales peuvent être reconnues. La dégradation/préservation des biosignatures au cours d'épisodes thermiques devra être déterminée lors d'expériences d'altération expérimentale.

Les biosignatures ont-elles pu être contaminées ? Les apports constants en matière organique peuvent brouiller le caractère authigène ou allogène de la matière organique. Qui plus est, la matière organique peut être d'origine abiotique, ou provenir d'organismes qui ne vivent pas nécessairement dans la cheminée.

2. Stratégie

Pour répondre à l'enjeu de la localisation, la stratégie est de mener une étude comparative de pyrites localisées dans différentes portions de la cheminée, depuis le cœur (portion interne) jusqu'à la périphérie (portion externe). Des échantillons issus de la campagne Bicose 2 (Cambon-Bonavita, 2018) ont été sélectionnés en collaboration avec l'IFREMER (Erwan Roussel et Marie-Anne Cambon-Bonavita). Ils proviennent du site hydrothermal TAG situé $26^{\circ}08'N$ sur la ride Médio-Atlantique. Le site se compose de cheminées disposées en deux plateformes concentriques avec un gros diffuseur central relarguant des fluides riches de haute température, et d'un champ extérieur de plus basse température (Rona et al. 1993 ; Humphris et Kleinrock, 1996 ; White et al. 1998 ; Pontbriand and Sohn, 2014) (Fig 1A). Le site d'échantillonnage est une zone active située dans la caldeira intérieure, au sud-est du gros diffuseur (Fig 1B), et présente une macrofaune constituée de crevettes abyssales du genre *Rimicaros* (Cambon-Bonavita, 2014 ; Konn et al., 2022) (Fig 1C). Les échantillons notés Int, Mid et Ext 1 proviennent de la même cheminée active et retracent l'épaisseur d'un mur de cheminée, des portions les plus internes jusqu'aux plus externes.

A l'aide des données obtenues avec les mêmes techniques que celles utilisées pour caractériser les sphérules expérimentales de pyrite (DRX, TEM, SEM-EDXS, XANES et STXM), nous avons documenté la composition, la morphologie, la microtexture et le contenu en composés organiques de pyrites prélevées dans les différentes portions de la cheminée. La comparaison des pyrites issues des portions habitables avec les pyrites synthétisées expérimentalement et identifiées comme étant des biosignatures ont permis de discuter de la possible présence de microorganismes au sein des cheminées.

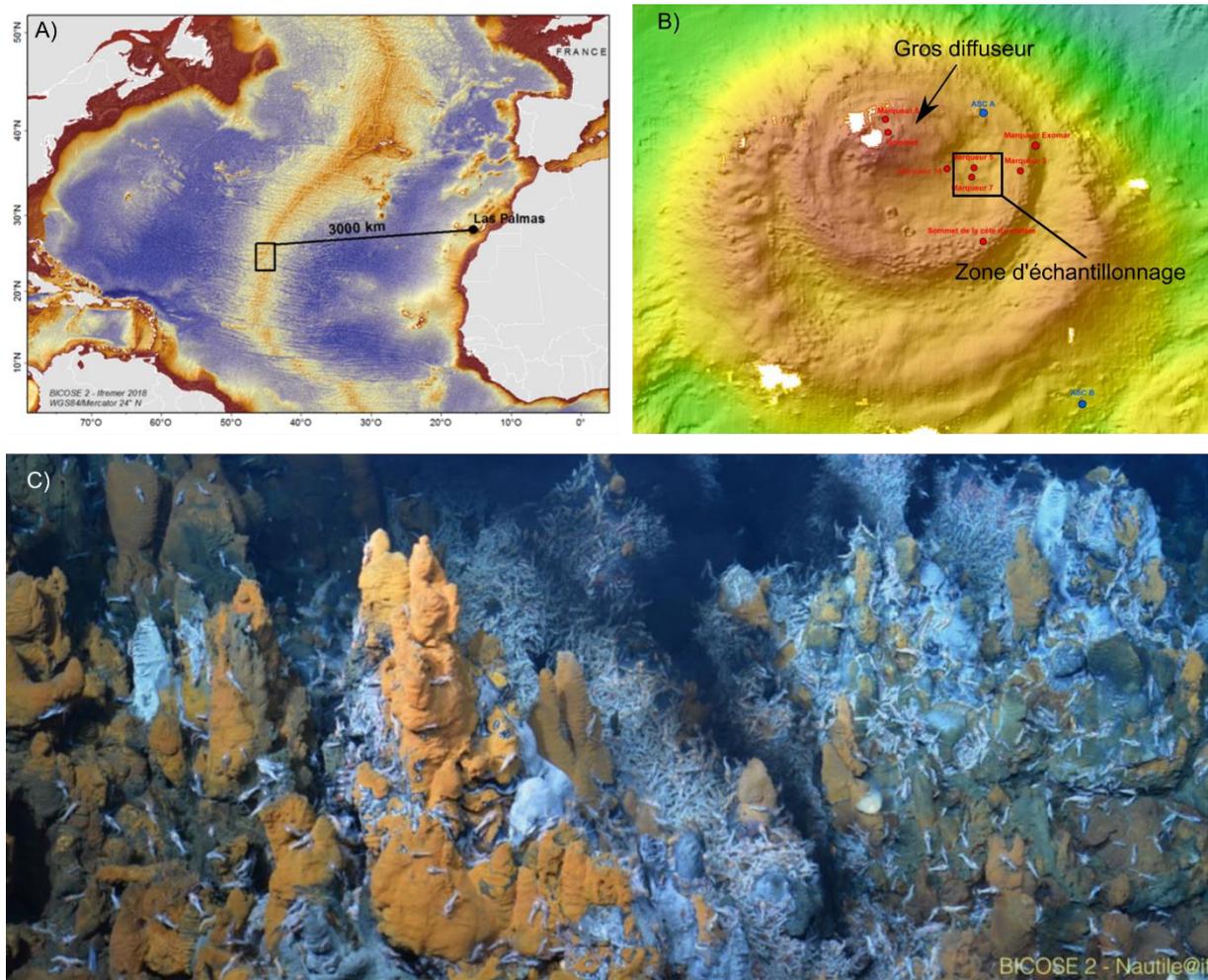


Figure 1 | Figure réalisée d'après le rapport de campagne Bicosse 2 © IFREMER. **A)** Localisation (rectangle noir) du site hydrothermal TAG sur la ride Médio-Atlantique. **B)** Carte du site hydrothermal TAG avec les positions du gros diffuseur (indiqué par une flèche) et de la zone d'échantillonnage (carré noir). **C)** Photo de la zone de prélèvement réalisé par le Nautille, dominée par la macrofaune de crevettes de type *Rimicaris*.

II. Article soumis dans European Journal of Mineralogy

Comparative study of pyrites in a black smoker based on microtexture and organic contents

C. Truong^{1*}, S. Bernard¹, F. Baudin³, E. Roussel², A. Gorlas⁴ and F. Guyot^{1,5}

¹ Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC), Museum National d'Histoire Naturelle, CNRS, Sorbonne Université, Paris, France.

² Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Plouzané, France.

³ Institut des Sciences de la Terre de Paris (ISTeP), Sorbonne Université, CNRS, Paris, France.

⁴ Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Gif-sur-Yvette, France.

⁵ Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France.

* Correspondence:

Chloé Truong

chloe.truong1@mnhn.fr

Keywords: Biosignature, Hydrothermal Vents, Pyrite, Organic matter, Mid-Atlantic Ridge

Abstract

The activity of black smokers impacts the carbon, sulfur and iron geochemical cycles and a possible role of hyperthermophilic microorganisms in these geochemical processes is as yet undocumented. To date, no direct observations have confirmed the presence of living microorganisms within chimneys of black smokers. Since biomarkers such as environmental DNA can be transported over significant distances, demonstrating that chimneys are colonized by hyperthermophilic microorganisms requires identifying fixed, non-transported biosignatures *in situ*, i.e. within the chimney wall.

Here we report the morphological, textural and chemical characterization of pyrite crystals sampled across a section of a chimney, from the inner-hotter portion to the external-cooler portion, providing a promising track in the search of hyperthermophilic biosignatures.

The internal and middle portions of the chimney mainly harbour cubic-shaped pyrites containing rather low quantities of hydrocarbons and thermally matured organic compounds. In contrast, the samples from the external portion contain pyrite spherules, composed of a mosaic of slightly disoriented domains with rather large amounts of organic materials chemically similar to thermally mature biogenic organic compounds. Such pyrites are similar, but not identical, to pyrites spherules produced in the laboratory in the presence of Thermococcales.

To confirm that these black smoker chimneys were indeed colonized by hyperthermophilic microorganisms, it remains to be determined whether the pyrite spherules observed in these hydrothermal samples could really result from the diagenetic transformation of pyrite spherules actually produced in the presence of Thermococcales

1. Introduction

Sulfur-rich hydrothermal vents and their associated ecosystems were discovered in 1977 (Corliss et al., 1979). The discovery of black smokers has given birth to new hypotheses (and controversies) about the emergence of life and its primitive evolution. In fact, the redox activity and reactive surfaces of metal sulfides such as pyrite (FeS_2), chalcopyrite (CuFeS_2) and sphalerite (ZnS) – which are major mineral phases of black smokers – may have promoted fundamental prebiotic process (Huber and Wächtershäuser, 1997; Russell et al., 1994, 2010; Wächtershäuser, 1990). Furthermore, black smokers play a unique role in exchanging heat and chemical species between seawater and ocean rocks (Edmond et al., 1979; Stein and Stein, 1994; Elderfield and Schultz, 1996; Wheat et al., 2000). Their intense biochemical and geochemical discharges produce hydrocarbons and massive sulfides deposits, thereby impacting all oceanic geochemical cycles including carbon, iron and sulfur (Amend et al., 2011; Hannington et al., 2011; German and Seyfried, 2014).

Life proliferates around black smokers. It is within the deep-sea sediments surrounding black smokers that the superphylum Asgard archaea was initially identified from metagenomic data and positioned as a sister group to Eukaryotes (Spang et al., 2015; MacLeod et al., 2019; Weiss et al., 2016). The buoyant hydrothermal fluid more or less mixed with seawater contains microorganisms

exhibiting distinct communities from those present in the surrounding seawater (e.g. Cowen et al., 1986; Winn et al., 1986; Juniper et al., 1998; Dick et al., 2010; Sheik et al., 2015).

Yet, the colonization of chimneys by (hyper)thermophile microorganisms remains an open question (Wirth, 2017). The middle-outer portions of a chimney wall are highly porous and likely permeable which favours the mixing between reduced hydrothermal fluids and oxygenated seawater, thereby creating steep physico-chemical gradients varying at small spatial scales (Tivey et al., 2002). Some authors have been proposed that these layers harbour a population of hyperthermophilic microorganisms or, at least, that they could afford conditions suitable for their growth (Tivey et al., 2002; Schrenk et al., 2003; Lin et al., 2016). Consistently, some studies reported the detection of biomarkers within chimney samples such as the gene encoding 16S ribosomal RNA (Schrenk et al., 2003; Li et al., 2014), or bacterial and archaeal lipids (Blumenberg, 2007). However, no direct observations have confirmed the presence of living microorganisms within chimneys. Demonstrating that chimneys are colonized by (hyper)thermophilic microorganisms requires identifying fixed, non-transported biosignatures *in situ*, i.e. within the chimney wall.

Mineral phases may help deciphering whether or not chimneys are inhabited. In fact, microbial activity may influence the dissolution and/or precipitation of hydrothermal minerals (e.g. Jannasch et al., 1995; Holden and Adams, 2003; Templeton et al., 2009; Houghton and Seyfried, 2010; Meier et al., 2019), including pyrite, i.e. the most predominant sulfide of middle-outer layers (e.g. Lafitte et al., 1984; Rona et al., 1986; Langmuir et al., 1997; Grant et al., 2018).

For instance, the metabolic activity of some hyperthermophilic, heterotrophic and S(0)-reducers archaea from the order Thermococcales, primarily isolated from hydrothermal marine vents, has been shown to induce the formation of greigite (Fe_3S_4) and of pyrite (FeS_2) when they are cultivated at 85°C in an iron and sulfur-rich synthetic medium simulating hydrothermal fluids (Gorlas et al. 2018, 2022; Truong et al., 2023). The pyrite formed in the presence of Thermococcales displays a specific spherule shape with a diameter ranging from 200 nm to 1 μm , a specific nanoscale texture with many ultra-small domains measuring 10 to 15 nm on average, and contains biogenic organic compounds albeit in small but detectable quantities (Truong et al., 2023). These unique characteristics make them promising biosignatures to be searched for in extreme environments such as black smokers.

Here, we use elemental analyses (CHNS), X-ray diffraction (XRD), scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM), scanning transmission X-ray microscopy (STXM) and X-ray absorption near edge structure (XANES) spectroscopy to characterize the pyrite crystals sampled across a chimney of a black smoker (from the inner-hotter portion to the external-cooler portion) sampled from the TAG site during the BicoSE 2 mission, documenting their shape, nanoscale texture, and organic content. We then discuss the pertinence to use some of these pyrites as biosignatures, which would thus be indicative of the past and/or actual colonization of chimneys by living microorganisms.

2. Materials and methods

2.1. The Trans-Atlantic Geotraverse hydrothermal site

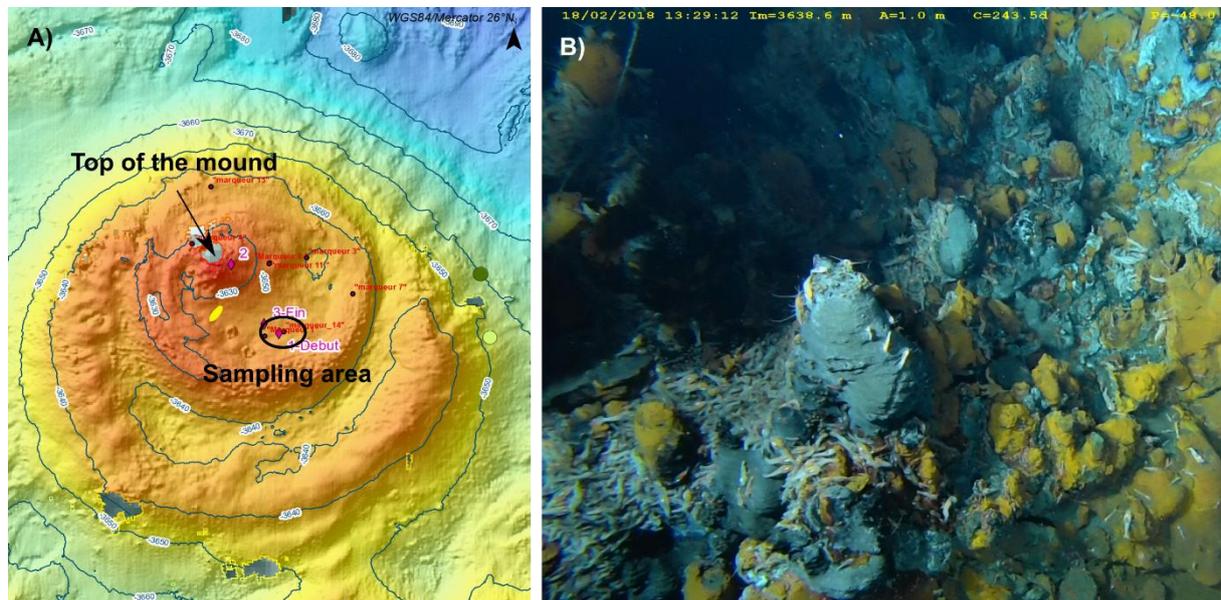


Figure 1 | A) Bathymetric map of the TAG site. The two concentric platforms appear in orange. **B)** Photograph of the area called the "nursery-zone" located in the inner caldera at the south-eastern basis of the inner high-temperature mound. We can see abyssal shrimps belonging to the *Rimicaris* genus.

The Transatlantic Geotraverse (TAG) site, at 26°08'N on the Mid-Atlantic Ridge (MAR), is a mature vent field which has been active for ~140 000 years (Lalou et al., 1993; Lalou et al., 1995). It is located on the hanging wall of an active detachment fault at 3600 m depth (Rona et al., 1986; Canales et al., 2007; deMartin et al., 2007). The chimneys are laying in two concentric platforms which form a compound and elliptical mound with a 50 m-high inner high-temperature mound and a 200 m-wide outer low-temperature mound (Rona et al. 1993; Humphris et Kleinrock, 1996; White et al. 1998; Pontbriand and Sohn, 2014) (Fig 1A).

The inner high-temperature mound receiving the hotter discharging fluid is mainly composed of sulfides and some sulfates, but a few oxides, hydroxides and silicates were also reported (Rona et al. 1986; 1993), while the outer low-temperature mound and the surrounding sediments field receive discharges of lower temperature fluids over extended periods. As a result, they exhibit deposits of red Fe-Mn rich amorphous iron oxides, Fe-silicates and Mn-Fe rich materials (Thomson et al. 1985; Lalou et al. 1986; Thompson et al. 1988; Rona et al. 1993; Becker and Von Herzen, 1996). The plumes are dominated by nanoparticles of euhedral pyrites (Rona et al. 1986; Yücel et al., 2011; Gartman et al. 2014).

The TAG mound was the first hydrothermal vent to be discovered on the MAR during the 1972 and 1973's cruises by the National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) TAG Project (Scott et al., 1974; Rona, 1980) and eventually recognized as a presently active hydrothermal site comprising black smokers and massive sulfide mounds (Rona et. Al, 1986; Thompson et al. 1988, Beaulieu et al. 2015). In the last ten years, four campaigns were conducted at the TAG hydrothermal field: Bicosé 1 (Cambon-Bonavita, 2014), Hermine (Fouquet and Pelleter, 2017), Bicosé 2 (Cambon-Bonavita, 2018) and Hermine 2 (Pelleter and Cathalot, 2022).

The sampling site of the present study, called “nursery-zone”, is inhabited by abyssal shrimps belonging to the *Rimicaris* genus (Cambon-Bonavita, 2014; Konn et al., 2022). It was discovered during the Bicose 1 campaign but sampled during the Bicose 2 campaign. It consists in an active area composed of tiny recently formed black smokers, located in the inner caldeira at the south-eastern basis of the inner high-temperature mound (Fig 1B).

2.2. Samples selection

For this study, we selected three samples of the same active chimney (labelled as Int, Mid and Ext, respectively sampled from the internal, the middle and the external part of the chimney wall). The chimney, located at 26° 8.223' N - 44° 49.532' W at a depth of 3640m, was sampled on the 04/02/2018 (Bicose 2 campaign, operation BIC2-PL01-01). The temperature at the core of this chimney reaches 441°C (temperature probe of the Nautilie). The samples were stored in anaerobic flasks filled with seawater from the sampling site and the gas phase was replaced by N₂ to limit interaction with O₂. They were stored at 4°C for 1 year, then the solid phase was vacuum-dried in an anoxic Jacomex™ glove-box under an N₂ atmosphere (<1 ppm O₂) at IMPMC. Samples were kept at 4°C before being analyzed for the present study.

2.3. X-ray diffraction

Powder samples (Ext, Mid and Int) were deposited on zero-background Si wafers which were placed in a Spinner configured bracket. XRD patterns were collected on a XPert Pro Panalytical™ diffractometer at IMPMC. Data were collected using Co K α radiation in continuous scan mode with an equivalent 0.03°2 θ step counting 3 hours per sample over the 5-90°2 θ . Identification of mineral phases was done using EVA software (XRD patterns converted into Cu K α) and PDF4 database : bianchite (PDF ID : 00-032-1478), marcasite (PDF ID : 00-037-0475), pyrite (PDF ID : 00-042-1340), sphalerite (PDF ID : 04-003-6940) and chalcopyrite (PDF ID : 01-074-1737).

2.4. Carbon, hydrogen, azote and sulfur (CHNS), mass fraction: estimation of the elemental composition

Three fractions of each sample were weighted and measured to estimate their mean elemental composition. Vanadium pentoxide (formula V₂O₅) was added as an oxidation catalyst to convert reduced sulfur phases into sulfur dioxide, thereby increasing the quality of total sulfur analysis. CHNS elemental data were collected at IStEP with a Thermo-Fischer Flash 2000 analyser, equipped with a He gas vector chromatograph column and a thermal conductivity detector (karathometer TCD). The EAGER Xperience software was used to calculate the mass percentage of each element.

2.5. Scanning electron microscopy coupled with energy dispersive X-ray spectroscopy

SEM-EDXS data were collected at IMPMC, using the GEMINI ZEISS™ Ultra55 Field Emission Gun Scanning Electron Microscope of the MNHN PtME platform. This SEM is equipped with two Bruker™ XFlash silicon drift detectors in antagonist positions for EDXS. Both images and EDXS data were collected using an acceleration voltage of 15 kV at a working distance of 12.5 mm and 300 pA probe current.

2.6. Samples preparation by focused ion beam

Ultrathin FIB sections ($20\ \mu\text{m} * 5\ \mu\text{m} * 100\ \text{nm}$) were extracted at IEMN from one cubic pyrite isolated from the sample Int, one cubic pyrite aggregate isolated from the sample Mid, and two micrometric pyrite spherules found in the sample Ext using a FEI Strata DB 235. Milling at low gallium currents allowed minimizing common artefacts including local gallium implantation, mixing of components, redeposition of the sputtered material on the sample surface and significant changes in the speciation of carbon-based polymers (Bernard et al., 2009; Schiffbauer and Xiao, 2009).

2.7. Transmission electron microscopy

TEM data were collected at IMPMC using a JEOL JEM-2100F equipped with a field emission gun (FEG) operating at 200 kV. Mineral identification was achieved using selected-area electron diffraction (SAED) and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDXS) in Scanning TEM (STEM) mode.

2.8. Scanning transmission X-ray microscopy and X-ray absorption near edge structure spectroscopy

Scanning transmission X-ray microscopy (STXM) analyses were performed on FIB foils to document the carbon speciation of the organic compounds present within the pyrite spherules using the HERMES STXM beamline at the synchrotron SOLEIL (Saint-Aubin, France - Belkhou et al., 2015; Swaraj et al., 2017). X-ray absorption near edge structure (XANES) hypercube data (stacks) were collected with a spatial resolution of 100 nm at energy increments of 0.1 eV over the carbon (270–340 eV) absorption range with a dwell time of less than 1 ms per pixel to prevent irradiation damage (Wang et al., 2009). Energy calibration was done using the well-resolved 3p Rydberg peak of gaseous CO₂ at 294.96 eV for the C K-edge.

Stack alignments and extraction of XANES spectra were done using the using the Hyperspy python-based package (De La Peña et al., 2018). Normalization of data was done using the QUANTORXS freeware (Le Guillou et al., 2018). A parameter related to the concentration of C ($[C]_{\text{STXM}}$) was estimated from stacks collected at the C K edge by normalizing the carbon quantity estimated from the spectra (following Le Guillou et al., 2018) to the absorption at 280 eV (i.e. below the carbon absorption edge). The value obtained is proportional to the true concentration of carbon, but the proportionality factor remains unknown. The $[C]_{\text{STXM}}$ values discussed here should thus be seen as indicators of concentration rather than absolute concentrations. As a reference, the pyrites spherules produced in the presence of Archaea (Truong et al., 2023) display a $[C]_{\text{STXM}}$ value of 4.65,

3. Results

3.1. X-ray diffraction

The X-ray diffractogram (Fig 2) of Int reveal the only presence of pyrite (FeS_2) and chalcopyrite (CuFeS_2). An assemblage of marcasite (FeS_2), pyrite (FeS_2), sphalerite (ZnS) and chalcopyrite (CuFeS_2) is detected in Mid. An assemblage of marcasite (FeS_2), pyrite (FeS_2), sphalerite (ZnS), bianchite (ZnSO_4) and minor chalcopyrite (CuFeS_2) is detected in Ext.

3.2. CHNS elemental composition

CHNS analyses confirm that each of the samples investigated is dominated by sulfure compared to carbon and hydrogen contents (Table 1 and Fig 3). The sample Int contains $32.4(\pm 0.05)$ wt% of S, the Mid sample contains $37.5(\pm 0.09)$ wt% of S and the sample Ext contains $40(\pm 0.09)$ wt% of S. Carbon content is minor in Int sample ($0.08(\pm 0.02)$ wt%), whereas it accounts for $0.14(\pm 0.02)$ wt% and for $0.21(\pm 0.09)$ wt% in Ext. Similarly, the hydrogen content is $0.05(\pm 0.04)$ wt% in Int, $0.05(\pm 0.02)$ wt% in Mid and $0.08(\pm 0.02)$ wt% in Ext. Nitrogen is below the detection limit in all samples.

3.3. Scanning-electron microscopy

Pyrite and chalcopyrite are the main phases in Int, consistently with XRD data. Most pyrites in Int are cubic-shaped crystals of about $50\mu\text{m}$ in size (Fig 4A) or aggregates of more than several hundreds of micrometers composed of cubic-shaped crystals up to $80\mu\text{m}$ in size (Fig 4B). Octahedral-shaped pyrite are smaller, ranging from $2\mu\text{m}$ to $10\mu\text{m}$ in size (Fig 4D). Int also contains occurring as platelet-shaped single crystals of $10\mu\text{m}$ to $100\mu\text{m}$ (Fig 4C, D and E). Some Al-rich phyllosilicate can be associated to pyrite and chalcopyrite (Fig 4D and E).

Different morphologies of pyrite crystals are found in Mid, including aggregates measuring $50\mu\text{m}$ in size and made of irregular micrometric grains (4F et G), as well as cubic and octahedral-shaped crystals ranging from $2\mu\text{m}$ to $20\mu\text{m}$ in sizes (Fig 4H). Pyrites are also associated to quartz and other gr silicates as grains of sizes ranging from 2 to $10\mu\text{m}$ (Fig 4F, G). Chalcopyrite also occurs as platelet-shaped crystals of $10\mu\text{m}$ to $50\mu\text{m}$ (Fig 4I).

In Ext, sphalerite is the predominant mineral phase and occurs as globular aggregates of hundreds of micrometers, composed of irregular micrometric grains (Fig 4J-N). Pyrites are present as micrometric spherules of about $2\mu\text{m}$ to $5\mu\text{m}$, with some of them being trapped within sphalerite aggregates.

3.4. Transmission electron microscopy

As shown by TEM data collected on FIB foils, the cubic-shaped pyrites of Int and Mid are massive single crystals (Fig 5A, B, C, F, G and H) containing micrometric sphalerite inclusions, ranging from 800 nm to several micrometers in sizes (Fig 5D, E, I and J). In contrast, the pyrite spherules of Ext exhibit more complex nanoscale texture. They also are composed of single crystals of pyrite as evidenced by SAED patterns (Fig 6A, B, C, F, G and H), but composed of a mosaic of slightly disoriented domains which never exceeds a few hundred of nanometers in size (Fig 6D and E). TEM investigations and SAED pattern of the sphalerite matrix revealed that it is composed of micrometric single crystals, measuring 1 to 2 micrometers (Fig 6I, J and K).

3.5. Scanning transmission X-ray microscopy

Additional investigations using STXM and XANES spectroscopy reveal that the pyrites of Ext contain some carbon ($4.77 < [C]_{\text{STXM}} < 8.81$), i.e. values even higher than that of pyrites spherules produced in the presence of Archaea ($[C]_{\text{STXM}} = 4.65$ - Truong et al., 2023), while pyrites from Int and Mid exhibit lower $[C]_{\text{STXM}}$ values (1.55 and 2.62, respectively) (Table 2). The organic compounds detected in pyrites from Ext show a XANES spectrum with absorption features at 285.0, 286.5, 287.6, 288.5 and 290.5 eV attributed to aromatic rings or C=C bonds, C-S bonds, C-H bonds, C-C bonds and COOH groups, respectively (Bernard et al., 2012; Le Guillou et al., 2018). The asymmetry of the main feature at 288.5 eV may be related to the presence of amide groups absorbing at 288.2 eV. In contrast, the organic compounds detected in pyrites from Int show a XANES spectrum with almost no feature besides a very large one centred at about 288 eV attributed to C-H bonds and a shoulder at 285 eV possibly attributed to C=C bonds (Bernard et al., 2012; Le Guillou et al., 2018). The organic compounds detected in pyrites from Mid could be interpreted as a mixture between those from Ext and Int, given the shape and features of their XANES spectra.

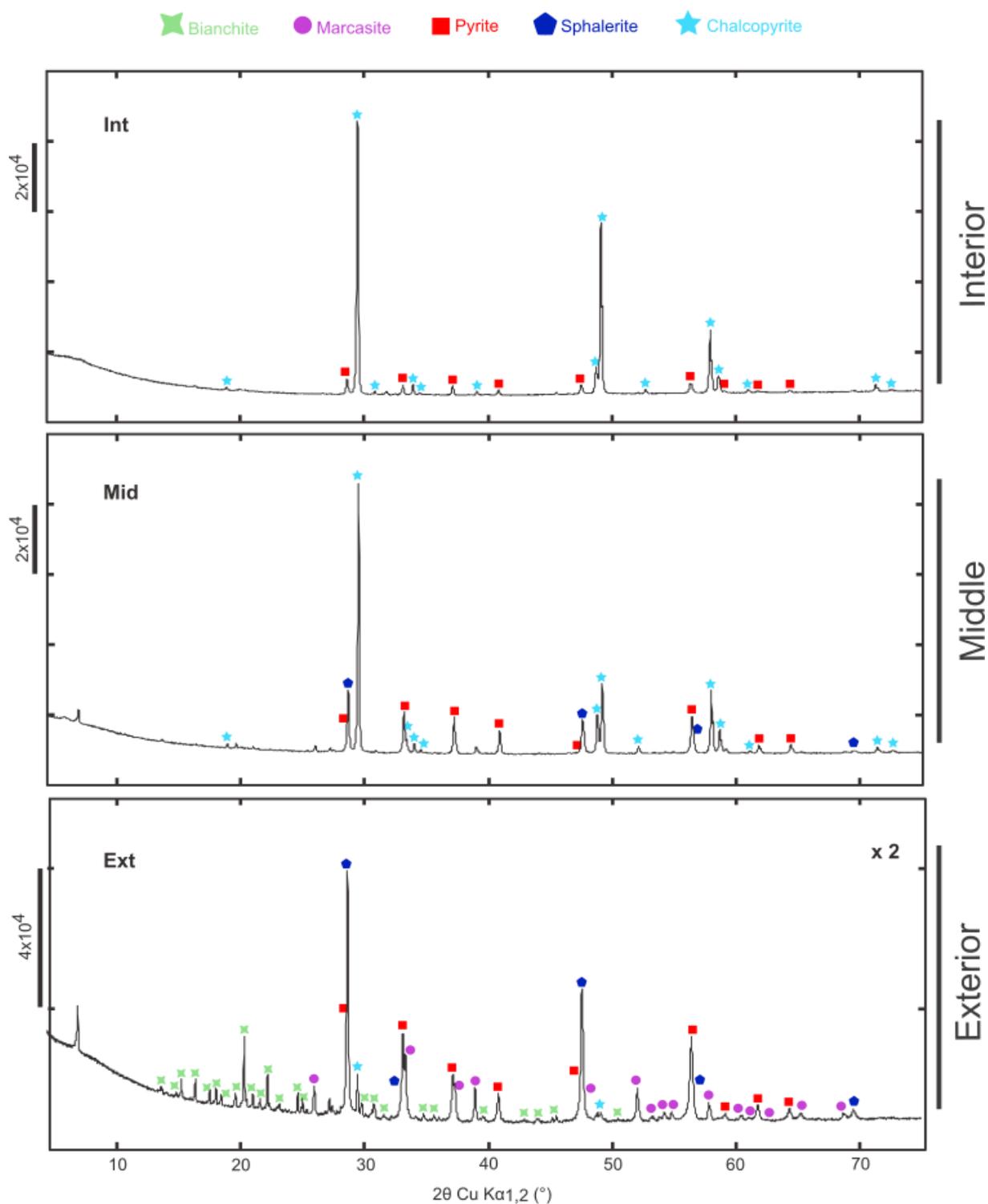


Figure 2 | X-Ray Diffraction of TAG hydrothermal vent samples corresponding to different parts of the lead: interior (Int), middle (Mid) and exterior (Ext). Each identified peak is labelled with Bianchite (PDF ID: 00-032-1478; green cross), Marcasite (PDF ID: 00-037-0475; purple round), Pyrite (PDF ID: 00-042-1340; red square), Sphalerite (PDF ID: 04-003-6940; blue pentagon) and Chalcopyrite (PDF ID: 01-074-1737; light blue star). Of note, the diffractogram of Ext sample has been zoomed x2 for reasons of readability.

Table 1 | Elemental composition (CHNS) given in mass fraction of TAG hydrothermal vent samples corresponding to different parts of the lead: interior (Int), middle (Mid), exterior (Ext 1 and Ext 2). Uncertainties on the reported values are given considering reproducibility to the hundredth on a measurement triplicate.

	Mass fraction of C %	Mass fraction of H %	Mass fraction of N %	Mass fraction of S %	Mass fraction of others % (calculated)
Int	0.08 (0.02)	0.05 (0.04)	0	32.4 (0.05)	67.47
Mid	0.14 (0.02)	0.05 (0.02)	0	37.5 (0.09)	62.31
Ext	0.21 (0.09)	0.08 (0.02)	0	40.0 (0.09)	59.71

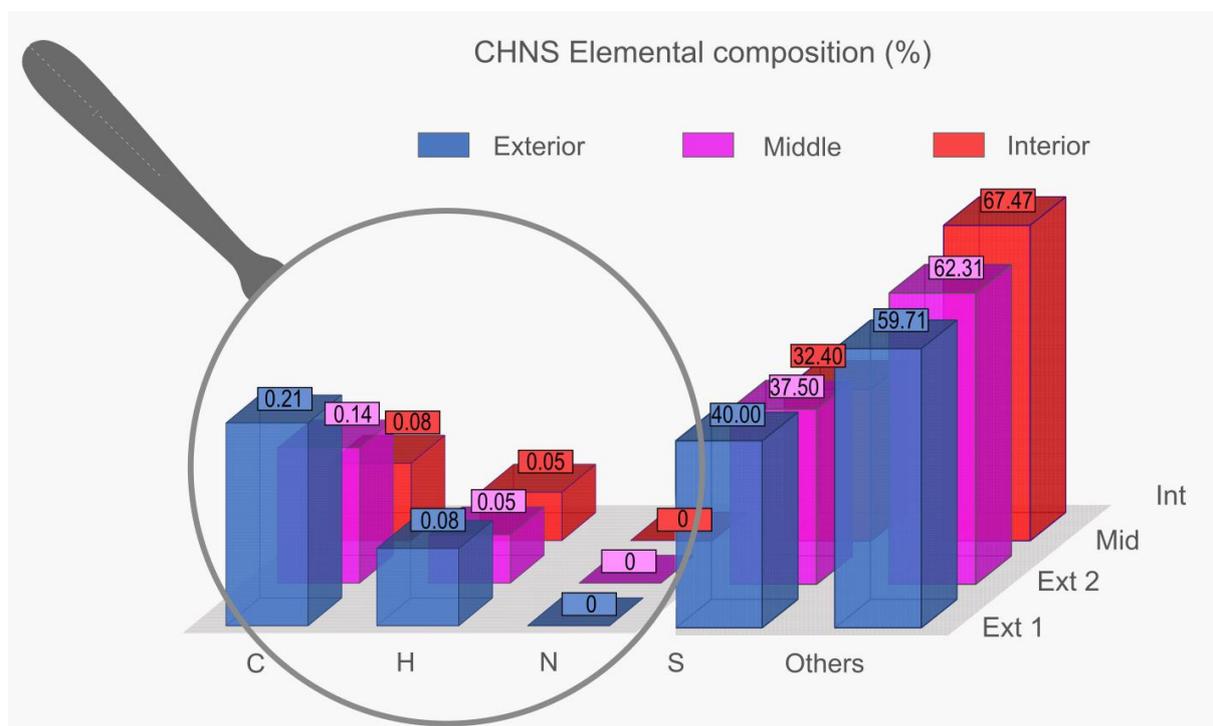


Figure 3 | Mass fraction percentage of carbon, hydrogen, sulfur and other elements for Int (in red), Mid (in pink) and Ext (in blue).

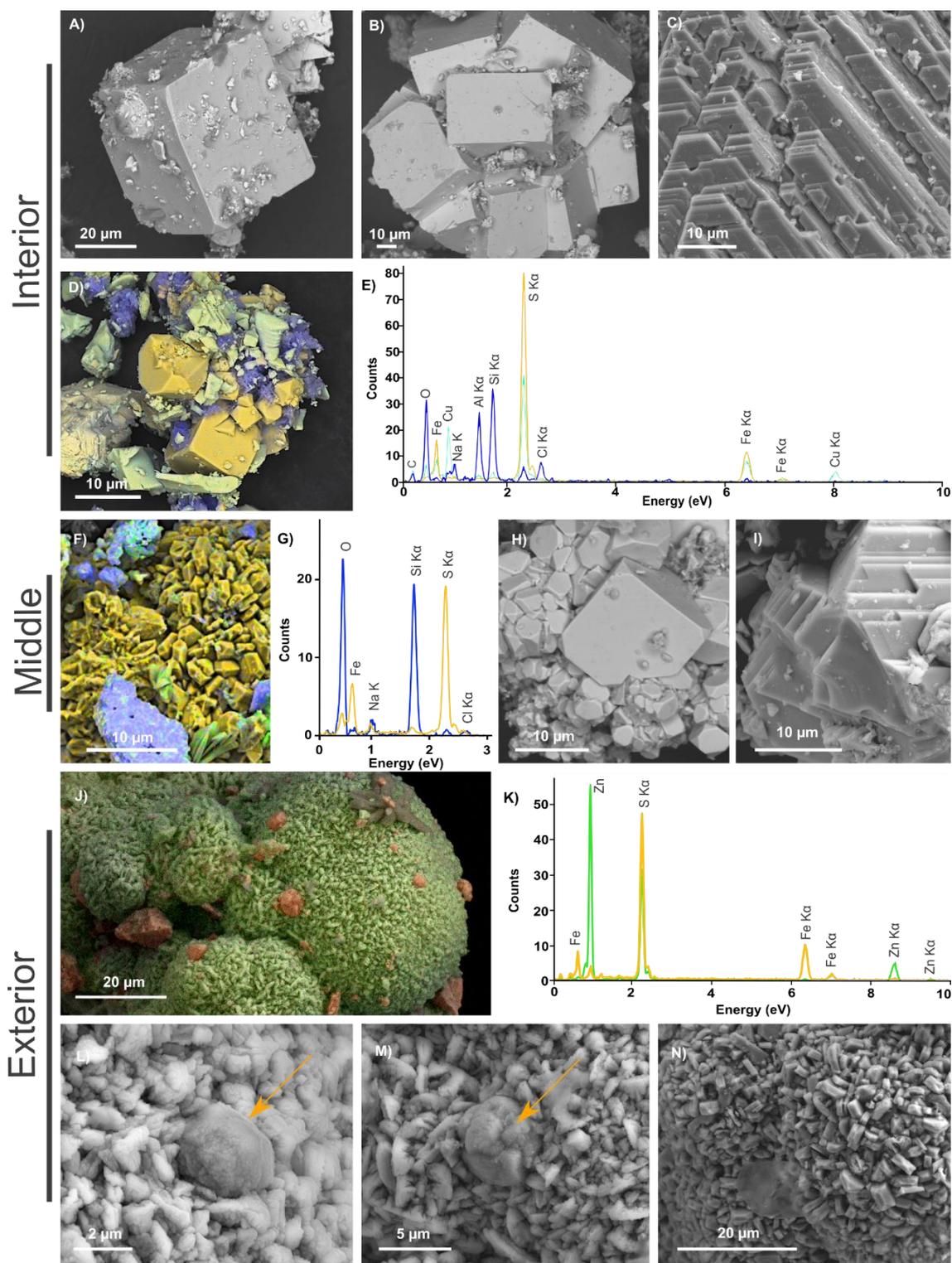


Figure 4 | SEM investigations of pyrites from of a chimney wall: **(A-E)** inner part of the wall (Int), **(F-I)** middle part of the wall (Mid) and **(J-N)** external part of the wall (Ext). **A)** Automorphic cubic pyrite crystal. **B)** Aggregates of automorphic pyrite crystals. **C)** Platelet-shaped chalcopyrite crystals. **D-E)** EDXS chemical map of an aggregate of pyrites (in yellow), chalcopyrites (in light green) and phyllosilicates (in blue) and corresponding EDXS spectra. **F-G)** EDXS chemical map of an aggregate of pyrites (in yellow) associated to silicates (in blue) and associated EDXS spectra using the same colour code. **H)** Aggregates of automorphic single crystals of pyrite with large distribution in sizes and facies. **I)** Platelet-shaped chalcopyrite single crystals. **J-K)** EDXS chemical map of a rounded sphalerite aggregate (in green) with small pyrites (in orange) from Ext sample and associated EDXS spectra using the same colour code. **L-M)** Micrometric pyrite spherules (orange arrow) trapped into a sphalerite matrix in Ext sample. **N)** Focus on the sphalerite matrix, composed of irregular micrometric grains.

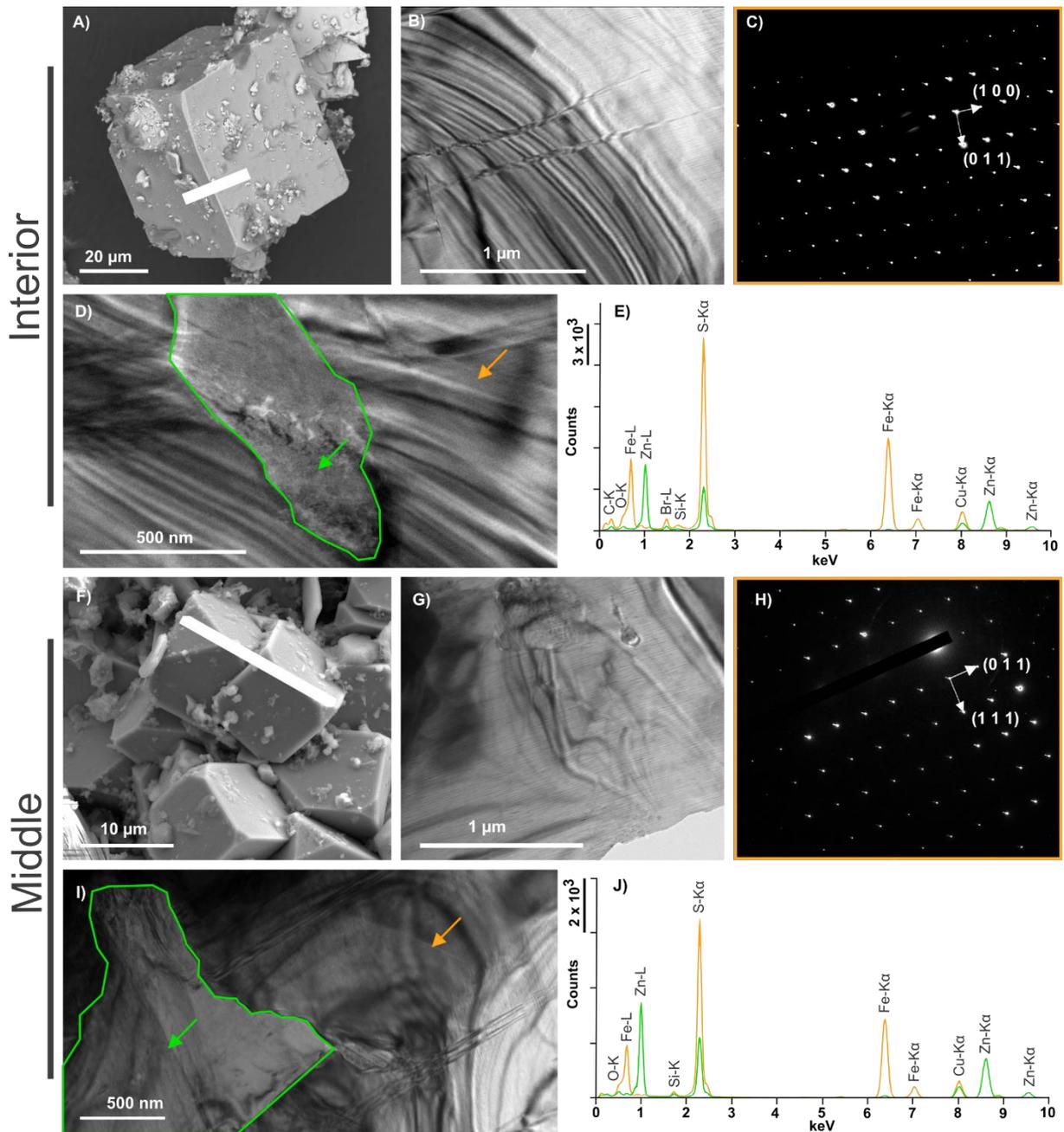


Figure 5 | TEM characterization of FIB sections of pyrite detected in Int (A-E) and Mid (F-J). **A**) SEM image showing the location of the Int FIB section. **B**) TEM overview of the Int FIB section and **C**) associated SAED pattern revealing that the entire FIB section corresponds to a single cubic crystal of pyrite (zone axis $[0\bar{1}1]$). **D**) Micrometric ZnS inclusion (green arrow) into pyrite (orange arrow). **E**) EDXS spectra of the zones highlighted by the arrows. **F**) SEM image showing the location of the Mid FIB section. **G**) TEM overview of the Mid FIB section and **H**) associated SAED revealing that the entire FIB section corresponds to a single cubic crystal of pyrite (zone axis $[0\bar{1}\bar{1}]$). **I**) Micrometric ZnS inclusion (green arrow) into pyrite (orange arrow). **J**) EDXS spectra of the zones highlighted by the arrows.

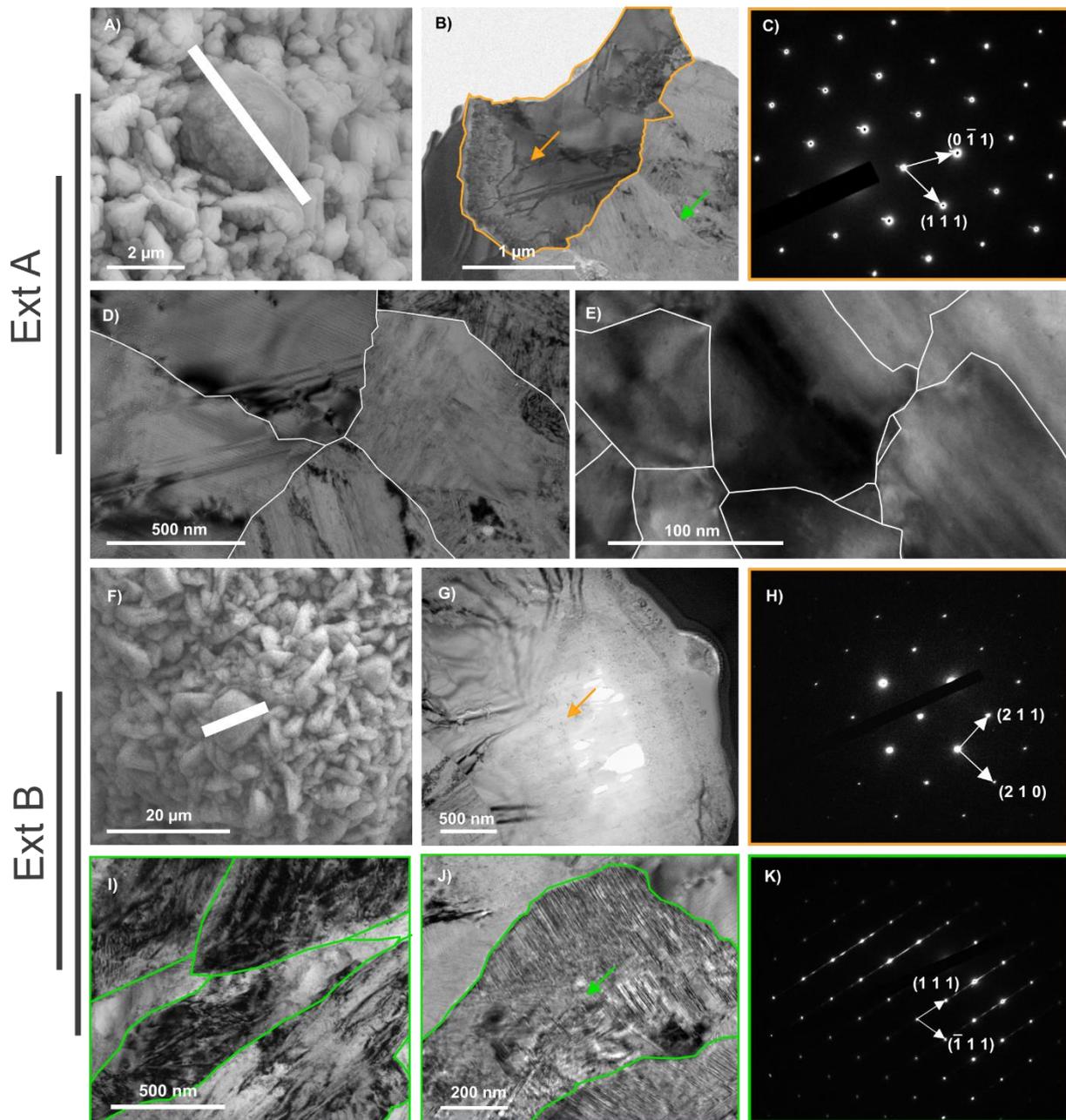


Figure 6 | TEM characterization of two FIB sections of pyrite spherules isolated from Ext (Ext A and Ext B). **A)** SEM image showing the location of the Ext A FIB section. **B)** TEM image of the Ext A FIB section showing the pyrite spherule (orange arrow) entrapped into the sphalerite matrix (green arrow) and **C)** associated pyrite's SAED pattern revealing that the spherule consists in a single crystal (zone axis $[2\bar{1}1]$). **D)-E)** TEM images of subgrain boundaries (in white) within the pyrite single crystal. **F)** SEM image showing the location of the Ext B FIB section. **G)** TEM image of the Ext B FIB section showing the pyrite spherule (orange arrow) and **H)** associated SAED pattern revealing that the spherule consists in a single crystal (zone axis $[1\bar{2}0]$). **I)-J)** TEM images of the sphalerite matrix composed of a number of micrometric crystals (grain boundaries in green). **K)** SAED pattern of the single sphalerite crystal shown in J (zone axis $[0\bar{2}2]$).

Table 2 | $[C]_{STXM}$ values as an estimation of the carbon content within the pyrites.

	Int	Mid	ExtA	ExtB
$[C]_{STXM}$	1.55	2.62	7.61	8.81

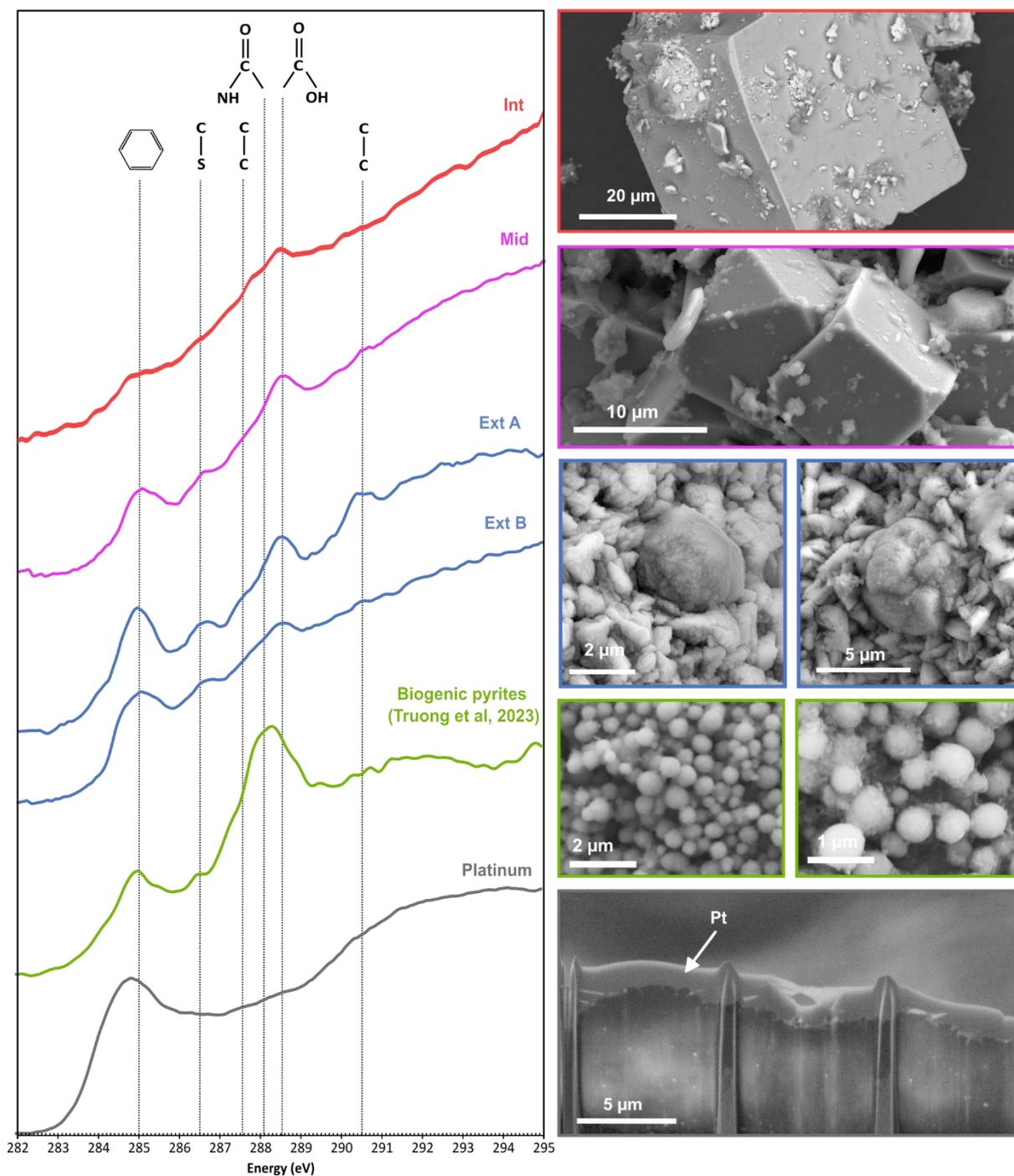


Figure 7 | C-XANES spectra (left) of the organic compounds detected in pyrites from the samples investigated in this study (Int, Mid, Ext A and Ext B) and SEM images of these pyrites (right). Furthermore, the spectrum of the organic compounds detected in spherules of pyrite produced in the presence of *Thermococcales* (labelled Biogenic pyrites) and SEM images of these pyrites (Truong et al., 2023) are shown for comparison. The spectrum of the organo-metal used to protect the FIB sections during preparation serves as reference (marked Platinum). Absorption features at 285.0, 286.4, 287.6, 288.1, 288.5 and 290.5 eV are attributed to C=C bonds, C-S bonds, C-H bonds, C-N bonds (amide groups), COOH (carboxylic groups) and C-C bonds, respectively.

4. Discussion

4.1. Textural variations along the temperature gradient

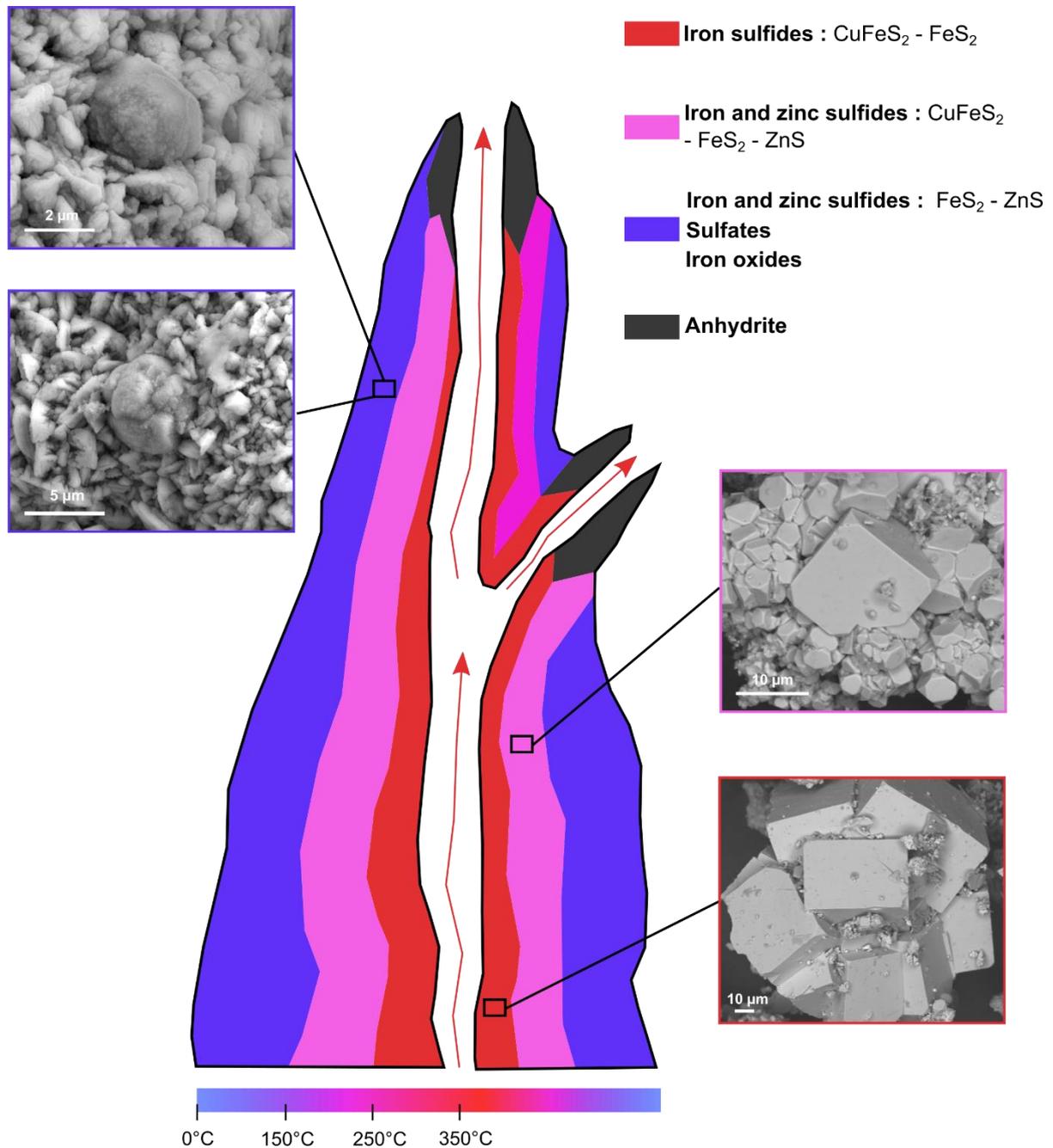


Figure 8 | Schematic longitudinal transect of an hydrothermal vent showing the sulfide assemblages and pyrite morphologies at different locations within the chimney wall.

Sulfide assemblages as well as pyrite morphologies vary from the center to the exterior of the chimney wall (Fig 8). In the inner part of the structure (Sample Int), the mineral assemblage consists almost exclusively of chalcopyrite and pyrite, with some rare sphalerite and Al-rich silicates (Fig 2, Fig 4A-E, Fig 8). Chalcopyrite is observed as large platelet-shaped crystals (Fig 4C) while pyrite occurs as cubic-shaped crystals of almost 100 μm size (Fig 4B) or as octahedron-shaped

crystals of 10 μm (Fig 3D). The close association of micrometric crystals of sphalerite (Fig 5D and E) with cubic-shaped pyrite crystals indicates a quick precipitation at high temperature ($> 250^\circ\text{C}$) under high supersaturation conditions (Murowchick and Barnes, 1987; Hu et al., 2019). Such high temperature is consistent with the periodic of short-lived high-temperature discharges of hydrothermal fluids (Rona et al., 1986).

In the middle section of the chimney wall (Sample Mid), sphalerite is present in higher concentration, as shown by its detection using XRD, together with the presence of pyrite and chalcopyrite (Fig 2, Fig 8). This is consistent with previous observations of Zn-rich phases within porous portions of chimney walls (Rona et al., 1986; Fouquet et al., 1998). Of note, the presence of some micrometric sphalerite occurring as inclusions within cubic crystals of pyrite (Fig 5I and J) attests that at least some of the sphalerite crystals have precipitated at high temperature ($> 250^\circ\text{C}$) under high supersaturation conditions (Murowchick and Barnes, 1987; Hu et al., 2019) as is the case for the micrometric sphalerite crystals of Int. Although more porous than the innermost part of the chimney, the middle part of the chimney is still exposed to high temperature.

In the external part of the chimney wall (Sample Ext), sulfates (such as bianchite) and iron oxides were identified in addition to pyrite, sphalerite and chalcopyrite (Fig 2, Fig 8). These mineral phases are typical products of low temperature alteration of sulfides by seawater (Hekinian et al., 1980). Still, the presence of globular assemblages of about 100 μm made of micrometric-sized pyrite spherules and sphalerite (Fig 5J to N, Fig 6I to K and Fig 8) shows that the outermost part of the chimney wall has also been affected by hydrothermal fluids discharges, but at moderately elevated temperature ($< 250^\circ\text{C}$) (Rona et al., 1986; Hu et al., 2019). Of note, the microtexture of sphalerite aggregates, characterized by a mosaic of irregular grains, indicates sequential precipitation, i.e. several episodes of cooling and recrystallization (deRonde et al., 2003). This evidences that the external part of the chimney wall has been submitted to strong temperature variations, ranging from rather elevated temperature (although below 250°C) to seawater temperature (2°C).

Altogether, the variations in nature, size and shape of sulfide minerals from the inner to the outer part of the chimney wall inform about the temperature gradient across the chimney wall, from very elevated temperature in the inner part ($> 250^\circ\text{C}$) to very low temperature in the outer part (close to 2°C). This is consistent with previous studies, where euhedral crystals are found to precipitate at temperatures above and around 250°C , submitted to surface-controlled growth, while dendritic crystals precipitate at lower temperature, submitted to diffusion-controlled growth (Murowchick and Barnes, 1987).

4.2. Looking for traces of life in the chimney wall

The question of the colonization of chimney walls by hyperthermophilic microorganisms is still open. Obviously, the inner part of the chimney, in direct contact with the hot ($> 300^\circ\text{C}$) hydrothermal fluid, cannot support life. To date, the highest temperature withstood by hyperthermophilic microorganisms is 122°C under 40 MPa hydrostatic pressure (*Methanopyrus kandleri* – Takai et al., 2008). In this study, carbon and hydrogen were however detected in Int (Fig 3, Table 2). The carbon speciation in this organic material is consistent with hydrocarbons (Fig 7), likely abiotically produced within the hydrothermal vent via Fischer-Tropsch-like processes (e.g.

Simoneit et al., 1993; Kvenvolden and Simoneit, 1990; Cruse et al., 2006; McCollom et al. 2007; 2010). Alternatively, it could have been produced via the thermal cracking of (biogenic) organic materials before having been transported from the external part of the chimney.

The pyrite spherules identified in the external lower temperature part of the chimney exhibit morphologies, microtextures and organic contents similar to pyrite spherules produced by (or at least in the presence of) hyperthermophilic archaea such as Thermococcales. Relying on cultures of *Thermococcus kodakarensis*, Truong et al. (2023) reported the production of pyrite spherules of about 1 to 2 μm in diameter composed of many ultra-small domains, resulting in a very smooth surface texture at the spherule scale. Remarkably, the pyrites found in Ext are indeed spherules of sizes of about 2 μm to 5 μm (Fig 4L, M and N). They are made of an assemblage of smaller crystallographically coherent domains delimited by annealed sub-grain boundaries (Fig 6D). Such a microtexture could result from the recrystallization or an Ostwald ripening of an assemblage of even smaller initial domains upon thermal annealing (e.g. Li et al., 2013, Nielsen et al., 2014; De Yoreo et al., 2015). The pyrite spherules from Ext could thus be seen as a thermally matured version of biogenic pyrite spherules similar to those reported as made by *Thermococcus kodakarensis* (Truong et al., 2023).

Moreover, STXM-XANES investigations revealed that the pyrite spherules in Ext contain a relatively high concentration of organic compounds with aromatic rings or C=C bonds, C-S bonds, C-H bonds, C-C bonds, COOH groups and possibly amides groups (Fig 7), i.e. organic compounds with a chemical structure consistent with the thermal maturation of the organic compounds found in the biogenic pyrite spherules produced by (or at least in the presence of) *Thermococcus kodakarensis* (Truong et al., 2023). Considering these morphological, textural and chemical similarities, the pyrite spherules found in Ext could be viewed as recrystallized/mature equivalents of the biogenic spherules reported by Truong et al. (2023). If this is really the case, the occurrence of these spherules demonstrates that hyperthermophilic archaea have colonized the external parts of the chimneys investigated in the present study, confirming previous suggestions based on laboratory experiments (Wirth et al., 2017; 2018).

Of note, although significantly less than the pyrite spherules from Ext, the cubic pyrites from Mid contain more organic compounds than those from Int. Moreover, these organic compounds are chemically consistent with a mixture of the compounds detected in the cubic pyrites from Int with those detected in the pyrite spherules from Ext. This is puzzling, since the portions from which Int and Ext have been sampled are very different in terms of temperature conditions. The most likely explanation involves transport of (and possible reactions between) organic compounds produced in the most inner part (likely via Fischer-Tropsch-like processes) and organic compounds produced in the most outer part (likely by life) within the porosity of the chimney wall (Tivey et al., 2002; Zhu et al., 2007). This suggests that the different portions of the chimney wall are not completely isolated from one another and that, depending on the temperature, hyperthermophilic microorganisms have the potential to colonize a significant fraction of the chimney wall.

5. Conclusions

The study of hydrothermal pyrites encompassing both inner and outer portions of a black smoker chimney wall down to the nanometer scale provides promising track in the search of hyperthermophilic biosignatures. The identification of pyrite spherules sharing similarities with pyrite spherules produced in the lab in the presence of hyperthermophilic archaea suggests that the external part of the chimney wall investigated here is (or at least has been) inhabited by microorganisms. Obviously, additional information remains to be obtained to undoubtedly confirm that these pyrites can be used as biosignatures. First, isotopic measurements could/should be performed, the sulfur-rich minerals produced by (or in the presence of) life generally exhibiting peculiar sulfur isotope compositions (e.g. Marin-Carbone 2018; 2020; 2022). Furthermore, laboratory experiments have to be conducted under abiotic conditions (i.e. in the absence of life) to determine whether or not similar pyrites could form in the absence of life. Last, since the chimney of a black smoker can be subject to wide variations in temperature, thermal ageing experiments should be conducted to document the morphological, microtextural and chemical evolution of biogenic pyrite spherules, in order to provide strong constraints to help their identification in natural settings. Although much work remains to be done, there is no doubt that combining the fine scale mineralogical characterization of chimneys and perfectly controlled laboratory experiments will contribute to the creation of a solid base to support further biological exploration of black smokers

Acknowledgements

We acknowledge the support of the Bicose 2 campaign (IFREMER), of the IMPMC-MNHN microscopy platform, of the IMPMC X-Ray Diffraction platform and of the SOLEIL HERMES beamline. We thank Marie-Anne Cambon-Bonavita (IFREMER) for providing us the valuable samples from the Bicose 2 campaign, Elisabeth Malassis (IMPMC) for her administrative support, Sylvain Pont (IMPMC) for his help in SEM-EDXS, Jean-Michel Guigner (IMPMC) for his help in TEM, Ludovic Delbes (IMPMC) for his help in XRD, David Troadec (IEMN) for the preparation of the FIB sections, Corentin Le Guillou (UMET) for his help with STXM and Stefan Stanescu for his expert support of HERMES beamline at SOLEIL. Chloé Truong was supported by the Muséum National d'Histoire Naturel (MNHN), Sorbonne-Université (SU) and the Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche. Aurore Gorlas was supported by the Agence Nationale de la Recherche, project HYPERBIOMIN (ANR-20-CE02-0001-01). François Guyot was supported by Institut Universitaire de France. The HERMES beamline (SOLEIL) is supported by the CNRS, the CEA, the Region Ile de France, the Departmental Council of Essonne and the Region Centre.

References

- Amend J.P., McCollom T.M., Hentscher M., Bach W. (2011), Catabolic and anabolic energy for chemolithoautotrophs in deep-sea hydrothermal systems hosted in different rock types. *Geochimica Cosmochimica Acta* 75 (19), 5736–5748.
- Ammou-Chokroum M. (1975), Aspects électrochimiques de la dissolution des sulfures et des minerais sulfurés, *Bulletin de la Société française de minéralogie* 98, 121-129.
- Barton P. B. Jr., Skinner B.J. (1979), Sulfide mineral stabilities. In: *Geochemistry of hydrothermal ore deposits*, 2nd edn. J. Wiley, New York, 278-403.
- Barton P. B. Jr. and Bethke P.M. (1987), Chalcopyrite disease in sphalerite: Pathology and epidemiology, *American Mineralogist* 72, 451-467.
- Beaulieu S. E., Baker E. T., German C. R. (2015), Where are the undiscovered hydrothermal vents on oceanic spreading ridges? *Deep-Sea Research II* 121, 202–212.
- Becker K. and von Herzen, R.P. (1996). Pre-drilling observations of conductive heat flow at the TAG active mound using ALVIN. In: Humphris, S.E., Herzig, P.M., Miller, D.J. (Eds.), *Proc. ODP Init. Repts.*, 158. College Station, TX (Ocean Drilling Program), 23–29.
- Benzerara K., Menguy N., López-García P., Brown G. Jr. (2006), Nanoscale detection of organic signatures in carbonate microbialites, *PNAS*, 103 (25), 9440-9445
- Bernard S., Benzerara K., Beyssac O., Brown G.E., Grauvogel Stamm L., Düringer P. (2009), Ultrastructural and chemical study of modern and fossil sporoderms by Scanning Transmission X517 ray Microscopy (STXM), *Review of Palaeobotany and Palynology* (1–2), 248-261.
- Blöch E., Rachel R., Burggraf S., Hafenbradl D., Jannasch H., Setter K., (1997), *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. Nov., represents a novel group of archaea, extending the upper limit for life at 113°C. *Extremophiles* 1, 14-21.
- Blumenberg M., Seifert R., Petersen S., Michaelis W. (2007), Biosignatures present in a hydrothermal massive sulfide from the Mid-Atlantic Ridge, *Geobiology* 5, 435-450.
- Bortnikov N. S., Genkin A. D., Dobrovolskaya M. G., Muravitskaya G. N., Filimonova A. A. (1991), The Nature of Chalcopyrite Inclusions in Sphalerite: Exsolution, Coprecipitation, or "Disease"?, *Economic Geology* 86, 1070-1082.
- Brault M. and Simoneit B. R. T. (1989), Trace Petroliferous Organic Matter Associated With Hydrothermal Minerals From the Mid-Atlantic Ridge at the Trans-Atlantic Geotraverse 26°N Site, *Journal of Geophysical Research* 94(C7), 9791-9798.
- Brasier M., McLoughlin N., Green O., Wacey D. (2006). A fresh look at the fossil evidence for early Archaean cellular life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361, 887–902.
- Brasier M., Green O., Lindsay J., McLoughlin N., Steele A., Stoakes C. (2005). Critical testing of Earth's oldest putative fossil assemblage from the ~3.5Ga Apex chert, Chinaman Creek, Western Australia. *Precambrian Research* 140, 55–102.
- Brasier M. D., Green O. R., Jephcoat A. P., Kleppe A. K., Van Kranendonk M. J., Lindsay J. F., Steele A., Grassineau N. V. (2002). Questioning the evidence for Earth's oldest fossils. *Nature* 416, 76–81.
- Cambon-Bonavita, M.-A. (2018) BICOSE 2 cruise, RV Pourquoi pas? <https://doi.org/10.17600/18000004>

- Cambon-Bonavita M.-A. Marie-Anne (2014) BICOSE cruise, RV Pourquoi pas ?, <https://doi.org/10.17600/14000100>
- Canales J.P., Sohn R.A., deMartin B.J. (2007), Crustal structure of the Trans-Atlantic Geotraverse (TAG) segment (Mid-Atlantic Ridge, 26°10'N): Implications for the nature of hydrothermal circulation and detachment faulting at slow spreading ridges. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 8(8).
- Ciglencečki I., Čosović B., Vojvodić V., Plavšić M., Furić K., Minacci A., Baldi F. (2000). The role of reduced sulfur species in the coalescence of polysaccharides in the Adriatic Sea, *Marine Chemistry* 71(3-4), 233–249.
- Corliss J. B., Dymond J., Gordon L. I., Edmond J. M., von Herzen R. P., Ballard R. D., Green K., Williams D., Bainbridge A., Crane K., van Andel T. H. (1979). Submarine Thermal Springs on the Galápagos Rift. *Science* 203,1073-1083.
- Cowen J.P., Massoth G.J., Baker E.T. (1986), Bacterial scavenging of Mn and Fe in a mid- to far-field hydrothermal particle plume. *Nature* 322 (6075), 169–171.
- Cruse A. M. and Seewald S.S. (2006), "Geochemistry of low-molecular weight hydrocarbons in hydrothermal fluids from Middle Valley, northern Juan de Fuca Ridge." *Geochimica et cosmochimica acta* 70(8), 2073-2092.
- DeMartin B.J., Sohn R.A., Canales J.P., Humphris S.E. (2007), Kinematics and geometry of active detachment faulting beneath the Trans-Atlantic Geotraverse (TAG) hydrothermal field on the Mid-Atlantic Ridge. *Geology*, 35(8), 711-714.
- deRonde C., Faure K., Bray C., Chappell D., Wright I. (2003), Hydrothermal fluids associated with seafloor mineralization at two southern Kermadec arc volcanoes, offshore New Zealand. *Mineralium Deposita* 38, 217–233.
- De Yoreo J. J., Gilbert P., Sommerdijk N., Penn L., Whitelam S., Joester D., Zhang H., Rimer J., Narvotsky A., Banfield J., Wallace A., Michel M., Meldrum F., Cölfen H., Dove P. (2015), Crystallization by particle attachment in synthetic, biogenic, and geologic environments. *Science* 349, aaa6760.
- Dick G. J., Tebo B. M. (2010), Microbial diversity and biogeochemistry of the Guaymas Basin deep-sea hydrothermal plume. *Environmental Microbiology* 12(5), 1334–1347.
- Edmond J., Measures C. McDuff, Chan L., Collier R., Grant B. (1979), Ridge crest hydrothermal activity and the balances of the major and minor element in the ocean: the Galapagos data, *Earth and Planetary Science Letters* 46, 1-18.
- Elderfield H. and Schultz A. (1996), Mid-ocean ridge hydrothermal fluxes and the chemical composition of the ocean, *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 24,191–224.
- Eldridge C. S., Barton P. B. Jr., Ohmoto H. (1983), Mineral textures and their bearing on formation of Kuroko orebodies, *Economic Geology Monograph Series* 5, 241-281.
- Eldridge C. S., Bourcier W. L., Ohmoto H., Barnes H. L. (1988), Hydrothermal inoculation and incubation of the chalcopyrite disease in sphalerite: *Economic Geology* 83, 972-989.
- Embley R., Baker E. (1999), Interdisciplinary group explores seafloor eruption with remotely operated vehicle. EOS, *Transactions. American Geophysical Union* 80 (19), 213–228.
- Feely R., Massoth G., Trefry J., Baker E., Paulson A., Lebon G. (1994), Composition and sedimentation of hydrothermal plume particles from north Cleft segment, Juan de Fuca Ridge. *Journal of Geophysical Research* 99, 4985–5006.
- Fouquet Y., Pelleter E. (2017), HERMINE cruise, RV Pourquoi pas ?, <https://doi.org/10.17600/17000200>

- Fouquet Y., Henry K., Knott R., Cambon P. (1998), Geochemical section of the TAG hydrothermal mound, *Oceanographic Literature Review* 45 (8), 1356.
- Gartman A., Yücel M., Madison A., Chu D., Ma S., Janzen C., Becker E., Beinart R., Girguis P., Luther G. (2011), Sulfide oxidation across diffuse flow zones of hydrothermal vents. *Aquatic Geochemistry* 17, 583–601.
- Gartman A., Findlay A. J., Luther G.W. (2014), Nanoparticulate pyrite and other nanoparticles are a widespread component of hydrothermal vent black smoker emissions, *Chemical Geology* 366, 32-41.
- German C.R., Seyfried Jr W.E. (2014). Hydrothermal processes. In: Holland, H.D., Turekian, K.K. (Eds.), *Treatise on Geochemistry*. Elsevier, Oxford, 191–233.
- Gorlas A., Mariotte T., Morey L., Truong C., Bernard S., Guigner J.-M., Oberto J., Baudin F., Landrot G., Baya C., Le Pape P., Morin G., Forterre P., Guyot F. (2022), Precipitation of greigite and pyrite induced by Thermococcales: an advantage to live in Fe- and S-rich environments? *Environmental Microbiology*.
- Gorlas A., Jacquemot P., Guigner J.M., Gill S., Forterre P., Guyot F. (2018), Greigite nanocrystals produced by hyperthermophilic archaea of Thermococcales order. *PLoS One* 13: e0201549.
- Grant H. L.J., Hannington M. D., Petersen S., Frische M., Fuchs S. H. (2018), Constraints on the behavior of trace elements in the actively-forming TAG deposit, Mid-Atlantic Ridge, based on LA-ICP-MS analyses of pyrite. *Chemical Geology* 498, 45-71.
- Haymon R. M (1983), Growth history of hydrothermal black smoker chimneys, *Nature* 301 (24), 695-698.
- Hekinian R., Fevrier M., Bischoff J. L., Picot P., Shanks W. C. (1980), Sulfide deposits from the East Pacific Rise near 21°N, *Science* 207, 1433-1444.
- Hannington M., Jamieson J., Monecke T., Petersen S., Beaulieu S. (2011), The abundance of seafloor massive sulfide deposits, *Geology* 39 (12), 1155–1158.
- Holden J. and Adams M. (2003), Microbe-metal interactions in marine hydrothermal environments. *Current Opinion in Chemical Biology* 7, 160–165.
- Houghton J. and Seyfried Jr. (2010), An experimental and theoretical approach to determining linkages between geochemical variability and microbial diversity in sea floor hydrothermal chimneys. *Geobiology* 8, 457–470.
- Hu S.-Y., Barnes S. J., Glenn M. A., Pagès A., Parr J., MacRae C., Binns R. (2019), Growth history of sphalerite in a modern sea floor hydrothermal chimney revealed by electron backscattered diffraction. *Economic Geology* 114(1), 165–176.
- Huber C., Wächtershäuser G. (1997), Activated acetic acid by carbon fixation on (Fe, Ni)S under primordial conditions. *Science* 276, 245–247.
- Humphris S. E. et Kleinrock M. C. (1996), Detailed morphology of the TAG active hydrothermal mound: Insights into its formation and growth, *Geophysical Research Letters* 23(23), 3443-3446.
- Jannasch H. W. (1995), *Microbial Interactions With Hydrothermal Fluids*, Geophysical Monograph Series 91, 273-296.
- Juniper S.K., Bird D.F., Summit M., Vong M.P., Baker E. T. (1998), Bacterial and viral abundances in hydrothermal event plumes over northern Gorda Ridge, *Deep Sea Research Part II Topical Studies in Oceanography* 45, 2739–2749.
- Kojima S. (1990), A coprecipitation experiments on intimate association of sphalerite and chalcopyrite and its bearing on the genesis of Kuroko ores, *Mining Geology* 40, 147-158.

- Kojima S. and Sugaki, A. (1987), An experimental study on chalcopyritization of sphalerite induced by hydrothermally metasomatic reactions, *Mining Geology*, 373-380.
- Konn C., Donval J. P., Guyader V., Germain Y., Alix A.-S., Roussel E., Rouxel O., (2022), Extending the dataset of fluid geochemistry of the Menez Gwen, Lucky Strike, Rainbow, TAG and Snake Pit hydrothermal vent fields: investigation of temporal stability and organic contribution, *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 179.
- Kvenvolden K., Rapp J. B., Hostettler F. D., Morton J. L., King J. D., Claypool G. F. (1986), Petroleum associate with polymetallic sulfide in sediment from Gorda Ridge, *Science* 234, 1231-1234.
- Kvenvolden K., Simoneit B. (1990), Hydrothermally Derived Petroleum: Examples from Guaymas Basin, Gulf of California, and Escanaba Trough, Northeast Pacific Ocean. *AAPG Bulletin* 74 (3), 223–237.
- Lai H., Deng J., Wen S., Wu D. (2019), Homogenization phenomena of surface components of chalcopyrite and sphalerite during grinding processing, *Colloids and Surfaces A*, 123601.
- Lafitte M., Maury R., Perseil E. A. (1984), Analyse Minéralogique de Cheminées à Sulfures de la Dorsale Est Pacifique (13 °N), *Mineralium Deposita* 19, 274-282.
- Lafitte M. (1980), Variation de stoechiométrie des sulfures naturels et de synthèse du système Cu-Fe-S. Thèse 36ème cycle, Paris.
- Lalou C., Thompson G., Rona P. A., Bricchet E., Jehanno C. (1986), Chronology of selected hydrothermal Mn oxide deposits from the transatlantic geotraverse “TAG” area, Mid-Atlantic Ridge 26°N. *Geochimica and Cosmochimica Acta* 50(8), 1737–1743.
- Lalou C., Reyss J.-L., Bricchet E. (1995), Hydrothermal activity on a 10S-year scale at a slow-spreading ridge, TAG hydrothermal field, Mid-Atlantic Ridge 26°N, *Journal of Geophysical Research* 100(B9), 17855-17862.
- Lalou C., Reyss J.-L., Bricchet E., Arnold M., Thompson G., Fouquet Y., Rona P.A. (1993), New Age Data for Mid-Atlantic Ridge Hydrothermal Sites' TAG and Snakepit Chronology Revisited, *Journal of Geophysical Research* 98(B6), 9705-9713.
- Langmuir C., Humphris S., Fornari D., VanDover C., VonDamm K., Tivey, M., Colodner D., Charlou J.-L., Desonie D., Wilson C., Fouquet Y., Klinkhammer G., Bougault H. (1997), Hydrothermal vents near a mantle hot spot: the Lucky Strike vent field at 37 degrees N on the Mid-Atlantic Ridge. *Earth Planet Science Letter* 148, 69–91.
- Le Guillou C., Bernard S., De la Peña F., Le Brech Y. (2018), XANES-Based Quantification of Carbon Functional Group Concentrations, *Analytical Chemistry* 90(14), 8379-8386.
- Li M.-L., Yao Q.-Z., Zhou G.-T., Qu X.-F., Mu C.-F., Fu S.-Q. (2013), Microwave-assisted controlled synthesis of monodisperse pyrite microspherulites. *CrystEngComm* 13, 5936.
- Li J. H., Benzerara K., Bernard S., Beyssac O. (2013), The link between biomineralization and fossilization of bacteria: Insights from field and experimental studies, *Chemical Geology* 359, 49-69.
- Li J. H., Bernard S., Benzerara K., Beyssac O., Allard T., Cosmidis J., Moussou J. (2014), Impact of biomineralization on the preservation of microorganisms during fossilization: An experimental perspective, *Earth and Planetary Science Letters* 400, 113-122.
- Lin T., Ver Eecke H., Breves E., Dyar M., Jamieson J., Hannington M., Dahle H., Bishop J., Lane M., Butterfield D., Kelley D., Lilley M., Baross J., Holden J. (2016), Linkages between mineralogy, fluid chemistry, and

- microbial communities within hydrothermal chimneys from the Endeavour segment, Juan de Fuca ridge. *Geochemistry Geophysics Geosystems* 17, 300–323.
- Ludford E., Palmer M., German C., Klinkhammer, G. (1996), The geochemistry of Atlantic hydrothermal particles. *Geophysical Research Letter* 23, 3503–3506.
- Luther G., Glazer B., Hohmann L., Popp J., Taillefert M., Rozan T., Brendel P., Theberge S., Nuzzio D., (2001) Sulfur speciation monitored in situ with solid state gold amalgam voltammetric micro-electrodes: polysulfides as a special case in sediments, microbial mats and hydrothermal vent waters. *Journal of Environmental Monitoring* 3, 61–66.
- MacLean L. C. W., Tyliczszak T., Gilbert P., Zhou D., Pray T. J., Onstott T. C., Southam G. (2008), Blackwell Publishing Ltd A high-resolution chemical and structural study of framboidal pyrite formed within a low-temperature bacterial biofilm. *Geobiology* 6, 471–480.
- MacLeod F., Kindler G. S., Wong H. L., Chen R., Burns B. P. (2019), Asgard archaea: Diversity, function, and evolutionary implications in a range of microbiomes. *AIMS Microbiology* 5(1), 48-61.
- Marin-Carbonne J., Remusat L., Sforna M. C., Thomazo C., Cartigny P., Philippot P. (2018), Sulfur isotope's signal of nanopyrites enclosed in 2.7 Ga stromatolitic organic remains reveal microbial sulfate reduction. *Geobiology*, 16(2), 121–138.
- Marin-Carbonne J., Busigny V., Miot J., Rollion-Bard C., Muller E., Drabon N., Philippot P. (2020), In Situ Fe and S isotope analyses in pyrite from the 3.2 Ga Mendon Formation (Barberton Greenstone Belt, South Africa): Evidence for early microbial iron reduction. *Geobiology*, 18(3), 306-325.
- Marin-Carbonne J., Decraene M. N., Havas R., Remusat L., Pasquier V., Alléon J., Thomazo C. (2022), Early precipitated micropyrrite in microbialites: a time capsule of microbial sulfur cycling. *Geochemical Perspectives Letters* 21, 7-12.
- Maruyama A., Mita N., Higashihara T., (1993), Particulate materials and microbial assemblages around the Izena black smoking vent in the Okinawa Trough. *Journal of Oceanography* 49 (3), 353–367.
- McCollom T. M. and Seewald J. S. (2007), Abiotic Synthesis of Organic Compounds in Deep-Sea Hydrothermal Environments. *Chemical Review* 107, 382-401.
- McCollom T.M., Lollar B.S., Lacrampe-Couloume G., Seewald J.S. (2010), The influence of carbon source on abiotic organic synthesis and carbon isotope fractionation under hydrothermal conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74(9), 2717-2740.
- Meier D., Pjevac P., Bach W., Markert S., Schweder T., Jamieson J., Petersen S., Amann R., Meyerdierks A. (2019), Microbial metal-sulfide oxidation in inactive hydrothermal vent chimneys suggested by metagenomic and metaproteomic analyses. *Environmental Microbiology* 21(2), 682–701.
- Miot J., Benzerara K., Obst M., Kappler A., Hegler F., Schädler S., Bouchez C., Guyot F., Morin G. (2009), Extracellular iron biomineralization by photoautotrophic iron-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (17), 5586-91.
- Moyer C.L., Dobbs F.C., 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. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 871–879.
- Murowchick J. B., Barnes H. L. (1987), Effects of temperature and degree of supersaturation on pyrite morphology. *American Mineralogist* 72 (11-12): 1241–1250.

- Nagase T. and Kojima S. (1997), An SEM examination of the chalcopyrite disease texture and its genetic implications, *Mineralogical Magazine* 61, 89-97.
- Nielsen M. H., Li D., Zhang H., Aloni S., Han Y.-J., Frandsen C., Seto J., Banfield J. F., Cölfen H., De Yoreo J. J. (2014), Investigating processes of nanocrystal formation and transformation via liquid cell TEM. *Microscopy and Microanalysis* 20, 425–436.
- Ohfuji H. and Rickard D. (2005), Experimental syntheses of framboids—a review. *Earth-Science Reviews* 71(3-4), 147-170.
- Pelleter E., Cathalot C. (2022), HERMINE2 cruise, RV Pourquoi pas?, <https://doi.org/10.17600/18001851>
- Pontbriand C.W. and Sohn R.A. (2014), Microearthquake evidence for reaction-driven cracking within the Trans-Atlantic Geotraverse active hydrothermal deposit. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 119(2), 822-839.
- Popa R., Kinkle B. K., Badescu A. (2004), Pyrite Framboids as Biomarkers for Iron-Sulfur Systems. *Geomicrobiology Journal* 21(3), 193–206.
- Prol-Ledesma R. M.; Canet C.; Villanueva-Estrada R. E.; Ortega-Osorio A. (2010), Morphology of pyrite in particulate matter from shallow submarine hydrothermal vents, *American Mineralogist* 95 (10), 1500–1507.
- Rona P. A., Hannington M. D., Raman C. V., Thompson G., Tivey M. K., Humphris S. E., Lalou C., Petersen S. (1993), Active and relict seafloor hydrothermal mineralization at the TAG hydrothermal field Mid-Atlantic Ridge, *Economic Geology* 18, 1989–2017.
- Rona P. A., Klinkhamert G., Nelsen T. A., Trefry J. H., Elderfield H. (1986), Black smokers, massive sulphides and vent biota at the Mid-Atlantic Ridge, *Nature* 321, 33-37.
- Rona P. A., Thompson G., Mottl M. J., Karson J. A., Jenkins W. J., Graham D., Mallette M., Von Damm K., E2dmond J. M. (1984), Hydrothermal Activity at the Trans-Atlantic Geotraverse Hydrothermal Field, Mid-Atlantic Ridge Crest at 26°N, *Journal of Geophysical Research* 89(B13), 11365-11377.
- Rona P. A. (1980), TAG Hydrothermal Field: Mid-Atlantic Ridge crest at latitude 26°N, *Journal of the Geological Society* 137, 385-402.
- Runge E. A., Mansor M., Kappler A., Duda J.-P. (2022), Microbial biosignatures in ancient deep-sea hydrothermal sulfides. *Geobiology* 21, 355–377.
- Russell M. J., Daniel R. M., Hall A. J., Sherringham J. A. (1994), A hydrothermally precipitated catalytic iron sulphide membrane as a first step toward life. *Journal of Molecular Evolution* 39, 231–243.
- Schiffbauer J., Xiao S. (2009), Novel application of focused ion beam electron microscopy (FIB-EM) in preparation and analysis of microfossil ultrastructures: A new view of complexity in early Eukaryotic organisms. *PALAIOS* 24 (9), 616–626.
- Schopf J., Packer B. (1987). Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona group, *Australian Science* 237, 70–73.
- Schrenk M., Kelley D., Delaney J., Baross J. (2003), Incidence and diversity of microorganisms within the walls of an active deep-sea sulfide chimney, *Applied and Environmental Microbiology* 69 (6), 3580–3592.
- Scott R. B., Rona P. A., Mc Gregor B. A. and Scott M. R. (1974), The TAG Hydrothermal Field, *Nature* 251, 301-302.

- Sheik C. S., Anantharaman K., Breier J.A., Sylvan J.B., Edwards K.J., Dick G.J. (2015), Spatially resolved sampling reveals dynamic microbial communities in rising hydrothermal plumes across a back-arc basin. *ISME J.* 9, 1434–1445.
- Simoneit B. R. T. and Lonsdale P. F. (1982), Hydrothermal petroleum in mineralized mounds at the seabed of Guaymas Basin, *Nature* 295, 198–202.
- Simoneit B. R. T. (1993), Aqueous high-temperature and high-pressure organic geochemistry of hydrothermal vent systems. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 57.14, 3231–3243.
- Spang A., Saw J. H., Jørgensen S. L., Zaremba-Niedzwiedzka K., Martijn J., Lind A. E., van Eijk R., Schleper C., Guy L., Ettema T. J. G. (2015), Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature* 521, 173–179.
- Spiess F. N., Macdonald K. C., Atwater T., Ballard R., Carranza A., Cordoba D., Cox C., Diaz Garcia V. M., Francheteau J., Guerrero J., Hawkins J., Haymon R., Hessler R., Juteau T., Kastner M., Larson R., Luyendyk B., Macdougall J. D., Miller S., Normark W., Orcutt J., Rangin C. (1980), East Pacific Rise: Hot Springs and Geophysical Experiments, *Science* 207 (4438), 1421–1433.
- Stein C. and Stein S. (1994), Constraints on hydrothermal Heat-Flux through the oceanic lithosphere from global heat-flow. *Journal of Geophysical Research* 99, 3081–3095.
- Templeton A., Knowles E., Eldridge D., Arey B., Dohnalkova A., Webb S., Bailey B., Tebo B., Staudigel H. (2009), A seafloor microbial biome hosted within incipient ferromanganese crusts. *Nature Geoscience* 2, 872–876
- Tivey M.A., Schouten H., Kleinrock M.C. (2003), A near-bottom magnetic survey of the Mid-Atlantic Ridge axis at 26°N: Implications for the tectonic evolution of the TAG segment. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 108(B5).
- Tivey M.A., Bradley A. M., Joyce T. M., Kadko D. (2002), Insights into tide-related variability at seafloor hydrothermal vents from time-series temperature measurements. *Earth and Planetary Science Letters* 202, 693–707.
- Thompson G., Humphris S. E., Schroeder B., Sulanowska M. (1988), Active Vents and Massive Sulfides at 26°N (TAG) and 23°N (Snake Pit) on the Mid-Atlantic Ridge. *Canadian Mineralogist* 26, 697–711.
- Thompson G., Mottl M. J., Rona P. A. (1985), Morphology, Mineralogy and Chemistry of Hydrothermal Deposits from the TAG Area, 26°N Mid-Atlantic Ridge. *Chemical Geology* 49, 243–257.
- Truong C., Bernard S., Le Pape P., Morin G., Baya C., Merrot P., Gorlas A., Guoyt F. (2023), Production of carbon-containing pyrite spherules induced by hyperthermophilic Thermococcales: a biosignature? *Frontiers in Microbiology* 14.
- Wacey D., Saunders M., Kong C., Brasier A., Brasier M. (2016). 3.46 Ga Apex chert ‘microfossils’ reinterpreted as mineral artefacts produced during phyllosilicate exfoliation. *Gondwana Research* 36, 296–313.
- Wächtershäuser G. (1990), Evolution of the first metabolic cycles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 200–204.
- Waite T., Moore T., Childress J., Hsu-Kim H., Mullaugh K., Nuzzio D., Amber P., Tsang J., Fisher C., Luther G. (2008), Variation in sulfur speciation with shellfish presence at a Lau Basin diffuse flow vent site. *Journal of Shellfish Research* 27, 163–168.
- Weiss M. C., Sousa F. L., Mrnjavac N., Neukirchen S., Roettger M., Nelson-Sathi S., Martin W. F. (2016), The physiology and habitat of the last universal common ancestor. *Nature Microbiology* 1, 16116.

- Wheat C., Jannasch W., Plant, J., Moyer C, Sansone F., McMurtry G. (2000), Continuous sampling of hydrothermal fluids from Loihi Sea mount after the 1996 event, *Journal of Geophysical Research* 105, 19353–19367.
- White S. N., Humphris S. E., Kleinrock M. C. (1998), New observations on the distribution of past and present hydrothermal activity in the TAG area of the Mid-Atlantic Ridge (26°08'N), *Marine Geophysical Research* 20, 41–56.
- Winn C., Karl D., Massoth, G. (1986), Microorganisms in deep-sea hydrothermal plumes. *Nature* 320, 744–746.
- Wirth R. (2017), Colonization of black smokers by hyperthermophilic microorganisms. *Trends in microbiology*, 25(2), 92-99.
- Wirth R., Luckner M., Wanner G. (2018), Validation of a hypothesis: colonization of black smokers by hyperthermophilic microorganisms. *Frontiers in Microbiology* 9, 524.
- Yücel M., Gartman A., Chan C.S., Luther G.W. (2011), Hydrothermal vents as a kinetically stable source of iron-sulphide-bearing nanoparticles to the ocean, *Natural Geoscience* 4, 367-371.
- Zhu W., Tivey M. K., Gittings, H., Craddock P. R. (2007), Permeability-porosity relationships in seafloor vent deposits: Dependence on pore evolution processes. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 112(B5).

III. Discussion et implications des résultats

1. Variations texturales influencées par le gradient de température

On note que les assemblages de sulfures varient entre les différentes portions de la cheminée. Il en va de même pour la morphologie des pyrites. Dans la portion interne, la chalcoppyrite et la pyrite constituent les principales phases minérales, avec de rares occurrences de sphalérite et de silicate d'aluminium. La pyrite se présente sous la forme de gros cristaux cubiques mesurant une centaine de micromètres, ou de cristaux octaédriques d'une dizaine de micromètres. Dans tous les cas, il s'agit de cristaux euhédriques, ce qui indique des conditions de précipitation à haute température ($> 250^{\circ}\text{C}$) et de fortes conditions de sursaturation (Murowchick et Barnes, 1987 ; Hu et al., 2019). De telles conditions témoignent d'un contact direct avec le fluide hydrothermal. Dans ce cas, les cristaux sont soumis à des processus de croissance contrôlée par des réactions de surface (Murowchick and Barnes, 1987 ; Söhnle et Garside, 1992).

Dans la portion intermédiaire de la cheminée, on trouve une plus grande proportion de sphalérite, associée à la chalcoppyrite et à la pyrite. L'abondance de phases riches en zinc semble associée à une plus grande porosité de cette portion de la cheminée (Rona et al., 1986 ; Fouquet et al., 1998). On note également la présence d'inclusions de cristaux micrométriques de sphalérite dans des cristaux cubiques de pyrites. De telles inclusions sont aussi présentes dans les pyrites de la portion interne. Qui plus est, les pyrites de la portion intermédiaire présentant une gamme de taille inférieure à celle des pyrites de la portion interne sont également euhédriques en grande majorité. Toutes ces observations suggèrent des conditions assez proches entre les portions internes et intermédiaires, à savoir une température élevée (250°C) et une sursaturation élevée (Murowchick et Barnes, 1987 ; Hu et al., 2019), résultant d'un contact direct avec le fluide hydrothermal de haute température.

Dans la portion externe de la cheminée, des sulfates de fer ont été identifiés, associés à des sulfures tels que la pyrite, la chalcoppyrite et la sphalérite. Or, les sulfates sont des produits typiques d'une oxydation à basse température et de l'altération des sulfures par l'eau de mer (Hekinian et al., 1980). On trouve également des assemblages globulaires de sulfures de fer, mesurant plusieurs centaines de micromètres, constitués en majorité de sphalérite et de quelques cristaux de pyrite. De telles structures se forment suite à des décharges de fluide hydrothermal à une température $< 250^{\circ}\text{C}$ (Rona et al., 1986 ; Hu et al., 2019). En parallèle, l'irrégularité des grains suggèrent des processus de croissance contrôlée plutôt par des réactions de diffusion (Bonev et al., 1985 ; Murowchic et Barnes, 1987). La texture des assemblages de sphalérite, constitués d'une multitude de gros grains irréguliers, indique des épisodes de refroidissement et de recristallisation induisant une précipitation séquentielle (Rona et al., 1986). Ces observations suggèrent donc que la portion externe de la cheminée a été soumise à de très fortes variations de température, allant d'une température environnant les 250°C jusqu'à la température de l'eau mer avoisinant les 2°C .

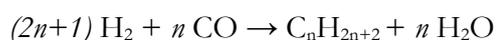
Les caractéristiques morphologiques et texturales des différentes phases minérales sont donc directement liées à la température, confirmant les conclusions expérimentales de Murowchic et Barnes (1987). Ce lien nous permet de dresser un profil des températures et de leurs variations de la partie intérieure ($> 250^{\circ}\text{C}$) jusqu'à la partie extérieure, soumise à de fortes variations (de 250°C à 2°C). Des cristaux euhédriques sont trouvés dans les portions les plus chaudes ($> 250^{\circ}\text{C}$) avec de fortes conditions de sursaturation et sont soumis à des processus de croissance contrôlée par des réactions de surface, tandis que des cristaux irréguliers (définis comme dendritiques par

Murowchic et Barnes, 1987) précipitent à plus basse température (< 250°C) et sont soumis à des processus de croissance contrôlés par des réactions de diffusion (Bonev et al., 1985 ; Murowchic et Barnes, 1987).

2. A la recherche de traces de vie dans le mur de la cheminée

La question de la colonisation des cheminées hydrothermales par des organismes hyperthermophiles demeure une question ouverte. De toute évidence, la partie interne de la cheminée, au contact direct du fluide de très haute température (> 300°C), ne peut abriter la vie. A ce jour, la température la plus haute à laquelle la vie pourrait se développer est de 122°C à une pression hydrostatique de 40MPa (*Methanopyrus kandleri* – Takai et al., 2008), ou de 113°C pour citer l'étude la plus consensuelle (*Pyrolobus fumarii* – Blöchl et al., 1997).

Ici, du carbone et de l'hydrogène ont toutefois été détectés dans toutes les portions de la cheminée, y compris dans la portion intérieure. Le matériel carboné trouvé à l'intérieur des pyrites cubiques de cet échantillon est cohérent avec des hydrocarbures qui auraient pu se former via des réactions de Fischer-Tropsch (e.g. Simoneit et al., 1993 ; Kvenvolden et Simoneit, 1990 ; Cruse et al., 2006 ; McCollom et al. 2007 ; 2010). Ce processus abiotique de formation de matière organique implique la réduction du CO₂ par le H₂ pour produire des hydrocarbures simples selon la réaction suivante (Fischer et Trosch, 1926 ; Brady et Pettit, 1981) :



Ces composés organiques pourraient aussi être des produits de craquage de matériel organique biologique, qui auraient été transportés à l'intérieur de la cheminée.

De façon très différente, les sphérules de pyrite trouvées dans la portion externe présentent une morphologie et une microtexture cohérente avec les sphérules de pyrite formées en présence de Thermococcales. En effet, nous avons détaillé la production de sphérules de pyrite mesurant entre 1µm et 2µm de diamètre, constituées de domaines nanocristallins anisotropes (cf Chapitre IV et V). Les sphérules trouvées dans la portion externes présentent une gamme de taille comparable comprise en 2µm et 5µm de diamètre. Elles sont constituées de nombreux domaines cohérents délimités par des limites de sous-grains recuits, pour ne former plus qu'un monocristal. Une telle microtexture est vraisemblablement issue de la recristallisation d'un assemblage initial constitué de domaines plus petits suite à des épisodes de haute température. Une possibilité est un mûrissement d'Ostwald (e.g. Li et al., 2013, Nielsen et al., 2014 ; De Yoreo et al., 2015) : les cristaux dont la taille est inférieure à un diamètre critique deviennent instables (en raison de leur grande énergie libre de surface et de la réduction de la saturation) et se dissolvent, tandis que les spécimens plus grands croissent à leurs dépens (Voorhees, 1985).

Qui plus est, les données STXM-XANES révèlent une quantité de matériel organique relativement importante dans les sphérules de pyrite de la portion externe. Les composés organiques ont des liaisons C=C, des liaisons des liaisons C-C, des liaisons C-S, des liaisons C-H, et des groupements COOH. Nous suggérons également la présence de groupements fonctionnels amides étant donnée l'asymétrie de la bande d'absorption principale à 288,5 eV, qui pourrait être liée à la présence de groupes amides absorbant à 288,2 eV.

La taille, la morphologie, la microtexture et le contenu en matière organique de ces sphérules de pyrite en fait de possibles équivalents matures (i.e. ayant subi une maturation thermique) des sphérules de pyrites formées en présence de *T. kodakarensis* et décrites dans le Chapitre IV (Truong et al., 2023). Si tel est le cas, cela indiquerait que des archées hyperthermophiles ont colonisé les parties externes de la cheminée étudiée. Elles auraient alors produit des sphérules de pyrite, ces dernières ayant recristallisé suite à une ou plusieurs augmentations de température ayant eu lieu pendant la croissance de la cheminée. Ce modèle est cohérent avec d'autres études, qui proposent que les archées hyperthermophiles colonisent effectivement les fumeurs noirs grâce à leur capacité à adhérer à une variété de substrats minéraux présents dans les cheminées (Wirth et al., 2017 ; 2018).

Nous devons également noter la présence de composés organiques dans les pyrites localisées à l'intérieur et au milieu de la cheminée, les pyrites des parties intermédiaires contenant plus de matière organique que celle des parties internes. Les composés organiques des pyrites situées au milieu de la cheminée ressemblent chimiquement à un mélange entre les composés des pyrites internes et celles des portions externes. Pourtant, les conditions de température sont très différentes entre ces trois portions. Une explication plausible impliquerait le transport de composés organiques – et possiblement des réactions entre ces composés – produits à l'intérieur de la cheminée (via des réactions abiotiques de type Fischer-Tropsch) et produits à l'extérieur de la cheminée (via des processus biologiques) dans la porosité de la paroi (Tivey et al., 2002 ; Zhu et al., 2007). Cette interprétation suggère que les différentes portions de la structure ne sont pas imperméables les unes par rapport aux autres et que, en fonction de la température, les microorganismes hyperthermophiles pourraient coloniser une fraction significative de la cheminée.

Références complémentaires

- Blumenberg M., Seifert R., Petersen S., Michaelis W. (2007), Biosignatures present in a hydrothermal massive sulfide from the Mid-Atlantic Ridge, *Geobiology* 5, 435-450.
- Blöch E., Rachel R., Burggraf S., Hafenbradl D., Jannasch H., Setter K., (1997), *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. Nov., represents a novel group of archaea, extending the upper limit for life at 113°C. *Extremophiles* 1, 14-21.
- Bonev I. K., Reiche M., Marinov M. (1985), Morphology, perfection and growth of natural pyrite whiskers and thin platelets. *Physics and Chemistry of Minerals*, 12, 223-232.
- Brady R. C. et Pettit R. J. (1981), Mechanism of the Fischer-Tropsch reaction. The chain propagation step. *Journal of the American Chemical Society*, 103(5), 1287-1289.
- Cambon-Bonavita, M.-A. (2018) BICOSE 2 cruise, RV Pourquoi pas? <https://doi.org/10.17600/18000004>
- Cambon-Bonavita M.-A. Marie-Anne (2014) BICOSE cruise, RV Pourquoi pas ?, <https://doi.org/10.17600/14000100>
- Cathalot C., Roussel E., Perhirin A., Creff V., Donval J-P., Guyader V., Rouillet G., Gula J., Tamburini C., Garel M., Godfroy A., Sarradin P-M. (2021), Hydrothermal plumes as hotspots for deep-ocean heterotrophic microbial biomass production. *Nature Communications* 12, 6861.
- Dick G. J., Tebo B. M. (2010), Microbial diversity and biogeochemistry of the Guaymas Basin deep-sea hydrothermal plume. *Environmental Microbiology* 12(5), 1334–1347.
- Findlay A. J., Gartman A., Shaw T., Luther G. W. (2015), Trace metal concentration and partitioning in the first 1.5m of hydrothermal vent plumes along the Mid-Atlantic Ridge: TAG, Snakepit, and Rainbow. *Chemical Geology* 412, 117-131.
- Fischer F. et Tropsch H. (1926), The Synthesis of Petroleum at Atmospheric Pressures from Gasification Products of Coal. *Brennstoff-Chemie* 7, 97-104.
- Gartman A., Findlay A.J., Luther G.W. (2011), Nanoparticulate pyrite and other nanoparticles are a widespread component of hydrothermal vent black smoker emissions. *Chemical Geology* 366, 32-41
- Humphris S. E., Kleinrock M. C. (1996), Detailed morphology of the TAG active hydrothermal mound: Insights into its formation and growth, *Geophysical Research Letters* 23(23), 3443-3446.
- Klevenz V., Bach W., Schmidt K., Hentscher M., Koschinsky A., Petersen S. (2011), Geochemistry of vent fluid particles formed during initial hydrothermal fluid–seawater mixing along the Mid-Atlantic Ridge. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* 12.
- Konn C., Donval J. P., Guyader V., Germain Y., Alix A.-S., Roussel E., Rouxel O., (2022), Extending the dataset of fluid geochemistry of the Menez Gwen, Lucky Strike, Rainbow, TAG and Snake Pit hydrothermal vent fields: investigation of temporal stability and organic contribution, *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 179.
- Pontbriand C.W. and Sohn R.A. (2014), Microearthquake evidence for reaction-driven cracking within the Trans-Atlantic Geotraverse active hydrothermal deposit. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 119(2), 822-839.

- Rona P. A., Hannington M. D., Raman C. V., Thompson G., Tivey M. K., Humphris S. E., Lalou C., Petersen S. (1993), Active and relict seafloor hydrothermal mineralization at the TAG hydrothermal field Mid-Atlantic Ridge, *Economic Geology* 18, 1989–2017.
- Schmidt, K., Koschinsky, A., Garbe-Schonberg, D., de Carvalho, L. M., and Seifert, R. (2007). Geochemistry of hydrothermal fluids from the ultramafic-hosted Logatchev hydrothermal field, 15 degrees N on the Mid-Atlantic Ridge: Temporal and spatial investigation. *Chemical Geology* 242, 1–21.
- Schrenk M., Kelley D., Delaney J., Baross J. (2003), Incidence and diversity of microorganisms within the walls of an active deep-sea sulfide chimney, *Applied and Environmental Microbiology* 69 (6), 3580–3592.
- Söhnle O. et Garside J. (1992), *Precipitation: basic principles and industrial applications*.
- Takai K., Nakamura K., Toki T., Tsunogai U., Miyazaki M., Miyazaki J., Hirayama H., Nagakawa S., Nunoura T., Horikoshi K. (2008), Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *PNAS* 105 (31), 10949-10954.
- Tivey, M. (1995). The influence of hydrothermal fluid composition and advection rates on black smoker chimney mineralogy: Insights from modelling transport and reaction. *Geochimica Cosmochimica Acta* 59, 1933–1949.2
- Von Damm, K. L. (1995). “Controls on the chemistry and temporal variability of seafloor hydrothermal fluids,” in *Seafloor hydrothermal systems: Physical, chemical, biological, and geological interactions*, eds S. Humphris, R. Zierenberg, L. Mullineaux, and R. Thomson (Washington, DC: American Geophysical Union), 222–247.
- Voorhees P. W. (1985), The theory of Ostwald ripening. *Journal of Statistical Physics* 38, 231-252.
- White S. N., Humphris S. E., Kleinrock M. C. (1998), New observations on the distribution of past and present hydrothermal activity in the TAG area of the Mid-Atlantic Ridge (26°08'N), *Marine Geophysical Research* 20, 41–56.
- Winn C., Karl D., Massoth, G. (1986), Microorganisms in deep-sea hydrothermal plumes. *Nature* 320, 744–746.

Chapitre VI.

Synthèses abiotiques de pyrites

I. Enjeux et stratégie

1. Enjeux

Détailler les caractéristiques d'une structure minérale ne suffit pas à déterminer son origine biogénique ni n'autorise son utilisation comme biosignature. Il est en effet nécessaire de vérifier si des équivalents (présentant les mêmes caractéristiques) peuvent être produits ou non en conditions abiotiques. De fait, des expériences de synthèse en conditions abiotiques permettent de mieux cerner les processus de formation des structures minérales ciblées, et de déterminer si leur identification dans le milieu naturel informe ou non sur l'existence (passée ou présente) d'une activité biologique.

Le chapitre IV a mis en évidence l'importance de la réactivité du soufre dans la formation des sphérules de pyrite. En présence de Thermococcales, le soufre particulaire – sous forme de fleur de soufre – est transformé en polysulfures et/ou en soufre colloïdal, plus réactif, qui réagit avec le sulfure ferreux (FeS) pour former des sphérules de pyrite. Ces pyrites, constituées de domaines nanocristallins, contiennent des composés organiques typiques de ceux retrouvés dans la minéralisation de microorganismes. Les expériences contrôlées, i.e. sans cellules, conduites dans les mêmes conditions et avec les mêmes ingrédients que les cultures (soufre particulaire, fer ferreux et sulfures) n'ont pas conduit à la formation de pyrite.

L'étude d'échantillons de cheminée d'un fumeur noir du site TAG a révélé la présence de sphérules de pyrite (FeS₂) qui pourraient être utilisées comme biosignatures (Chapitre V). D'autres pyrites polycristallines ont été détectées à l'extérieur de la cheminée, au contact direct de l'eau de mer. Elles présentent une forme arrondie, avec un diamètre mesurant de 20µm à 100µm (Fig 1). De plus, selon les données STXM-XANES, elles contiennent des composés organiques comprenant des groupes aromatiques, des liaisons C-S insaturées, des groupes aliphatiques, des groupes amides et des groupes carboxyliques (Fig 1). Bien que les similitudes entre les sphérules de pyrite produites en présence de KOD1 et celles observées dans la cheminée du site TAG suggèrent une origine similaire, la question d'une éventuelle production abiotique de ces sphérules de pyrite doit être posée. Dans le milieu naturel, i.e. dans les cheminées et les panaches des fumeurs noirs, la proportion de soufre nanoparticulaire n'est pas négligeable. Les nanoparticules de soufre élémentaire peuvent représenter jusqu'à 44 % du soufre élémentaire total présent dans les panaches de la dorsale médio-atlantique (Findlay et al., 2014). Mais du soufre colloïdal (pas forcément en lien avec une activité microbienne) (Findlay, 2016) et des polysulfures sont également présents. Ces polysulfures sont issus de réactions entre soufre élémentaire et ions sulfures (HS⁻) (Schwarzenbach et Fischer, 1960) ou de l'oxydation de sulfures par l'oxygène (Luther, 1991 ; Steudel, 1996). Pour des pH peu basiques à neutres, les polysulfures peuvent évoluer en soufre colloïdal sous forme S₈ (Giggenbach, 1974 ; Steudel, 1996 ; Kamyshny et al., 2004). Des pyrites pourraient donc être produites à partir de ce soufre colloïdal de façon abiotique et présenter les mêmes caractéristiques que les sphérules produites en présence d'archées.

Pouvons-nous alors déterminer la nature (biogénique ou abiotique) des pyrites des cheminées de fumeurs noirs ? La présence de matériel organique est-elle nécessaire à la production de sphérules ? La nature de la matière organique présente influence-t-elle les caractéristiques des pyrites ? Les pyrites enregistrent-elles des informations sur cette matière organique ? Pour répondre à ces questions, il est essentiel de réaliser des expériences de synthèses abiotiques en présence de soufre colloïdal et en présence de différents composés organiques.

2. Stratégie

Une série de synthèses abiotiques a été réalisée en présence de soufre colloïdal, en présence ou non de différents types de composés organiques à 85°C pendant 96h (i.e. le temps nécessaire à la formation des sulfures de fer dans les expériences de minéralisation avec cellules). Dans la continuité du travail présenté en chapitre IV, les synthèses abiotiques ont été réalisées à partir de milieu Ravot dépourvu de matière organique, en présence de sulfures (Na_2S) et de fer ferreux (FeSO_4) (Table 1).

Tout d'abord, deux synthèses en présence de composés organiques sans lien avec les cellules de KOD1 ont été réalisées : (1) une synthèse en présence de particules de carbone graphitique peu soluble et peu réactif et (2) une synthèse en présence de l'extrait de levure et de la tryptone utilisés dans le milieu de culture des KOD1.

Ensuite, trois synthèses ont été réalisées à partir de composés organiques produits par des cellules de KOD1 : (1) une synthèse en présence de membranes cellulaires (sans le contenu intracellulaire) ; (2) une synthèse en présence du contenu intracellulaire obtenu par lyse des cellules (sans les membranes) ; (3) une synthèse en présence de lysats cellulaires, i.e. en présence de membranes et du contenu intracellulaire.

En parallèle, une expérience contrôle négatif a été réalisée en absence de matière organique.

Tableau 1 | Conditions expérimentales pour tester la précipitation de pyrite en présence de soufre colloïdal et de différents composés organiques à 85°C pendant 96h.

Echantillon	Contrôle négatif	Levure + tryptone	Carbone graphitique	Membranes	Surnageant	Lysats
Milieu de base	- S(0) colloïdal 20mM - Na_2S 0.05% - FeSO_4 5mM - 0.83g/L acétate de sodium	- S(0) colloïdal 20mM - Na_2S 0.05% - FeSO_4 5mM - 0.83g/L acétate de sodium	- S(0) colloïdal 20mM - Na_2S 0.05% - FeSO_4 5mM - 0.83g/L acétate de sodium	- S(0) colloïdal 20mM - Na_2S 0.05% - FeSO_4 5mM - 0.83g/L acétate de sodium	- S(0) colloïdal 20mM - Na_2S 0.05% - FeSO_4 5mM - 0.83g/L acétate de sodium	- S(0) colloïdal 20mM - Na_2S 0.05% - FeSO_4 5mM - 0.83g/L acétate de sodium
Matière organique		- Levure 1g/L - Tryptone 1g/L	- Carbone graphitique 2g/L	- Membranes KOD1 à partir de 100mL de culture en S(0) à 10^7 cellules/mL	- Surnageant KOD1 à partir de culture en S(0) à 10^7 cellules/mL	- Lysats KOD1 à partir de 100mL de culture en S(0) à 10^7 cellules/mL

II. Article en préparation pour *Geochemical Perspectives Letters*

Abiotic synthesis of pyrite to discuss the biogenicity of pyrite spherules from black smokers

C. Truong^{1*}, S. Bernard¹, A. Gorlas² and F. Guyot^{1,3}

¹ Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC), Sorbonne Université- Museum National d'Histoire Naturelle, CNRS, Paris, France.

² Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Gif-sur-Yvette, France.

³ Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France.

*** Correspondence:**

Chloé Truong

chloe.truong1@mnhn.fr

Keywords: Hydrothermal Vents, Pyrite, Organic matter, Biosignature, Biomorph

⇒ Geochemical Perspectives Letters = 4 figures / 3000 mots

In 50 years of research, the thermal limit of life has been extended several times, rising from 70°C, to over 100°C, to 113°C and finally to 122°C (Brock and Freeze, 1969; Blöchl et al., 1997; Kashefi and Lovley, 2003; Takai et al., 2008). Current estimations set the maximum temperature at which life can exist lies between 113°C and 150°C (Stetter, 1999; Don Cowan, 2004; Merino et al., 2019). Life could thus withstand the temperature conditions of the chimneys of black smokers. Yet, in addition to high temperature conditions, sulfur-rich hydrothermal vents are subject to a significant physico-chemical gradient and strong chemical imbalances. In fact, the middle and outer parts of a chimney are characterized by high porosity and permeability, submitting them to rapid fluctuations of temperature, pH and redox conditions (Tivey et al. 2002; Schrenk et al., 2003; Lin et al., 2016). Such abrupt fluctuations do not offer optimal conditions for the proliferation of microorganisms and make it difficult to undertake *in situ* observations.

The incubation of chimney pieces enabled a variety of microbial strains to be isolated (e.g. Takai et al., 2001; Nercessian et al., 2003). Furthermore, the detection of biomarkers within chimney samples, such as the gene encoding 16S ribosomal RNA (Schrenk et al., 2003) or bacterial and archaeal lipids (Blumenberg, 2007), have led authors to suggest that chimneys are (or have been) colonized by some (hyper)thermophilic microorganisms. Yet, life may be restricted to the surface, biomarkers detected within the walls having possibly been transported after their production. To date, there is still no definitive evidence of the presence of (hyper)thermophilic microorganisms within the walls of black smoker chimneys. Demonstrating that chimneys are indeed colonized by (hyper)thermophilic microorganisms requires identifying biosignatures *in situ*, while ensuring that they were produced where they are observed.

A recent study of chimney samples of a black smoker from the TAG site Mid-Atlantic Ridge reveals the presence of pyrite spherules (FeS₂) that could be used as a biosignature (Truong et al., submitted). These polycrystalline pyrite spherules exhibit a rounded shape, with a diameter measuring from 20µm to 100µm (Fig 1 and 2A). Plus, according to STXM-XANES data, they contain organic compounds including aromatic groups, unsaturated C-S bonds, aliphatic groups, amide groups, and carboxylic groups (Fig 1). The possibly biogenic origin of these spherules relies on cultures of hyperthermophilic Thermococcales (strain KOD1) conducted in a mineralizing medium rich in S and Fe at 85°C (Truong et al., 2023). In the presence of Fe, these microorganisms induce the production of pyrite spherules exhibiting a polycrystalline microtexture and a certain content in organic compounds typical of living cells (Truong et al., 2023) (Fig 1 and 2B). Although the similarities between the pyrite spherules produced in the presence of KOD1 and those observed in the chimney from the TAG site suggest a similar origin, the question of a possible abiotic production of such pyrite spherules remains.

The use of pyrite spherules as biosignatures requires providing answers to a number of questions. Can pyrite spherules be produced abiotically? Is the presence of organic material necessary for the production of these spherules? Does the nature of the organic material present influence the morphology and microtexture of these spherules? Do the pyrites record information about the organic material initially present? Providing answers to these questions requires conducting abiotic syntheses of pyrites in conditions mimicking those existing within chimneys of black smokers.

Here we report results of a series of abiotic syntheses conducted in experimental conditions mimicking those of black smokers, i.e. in a medium rich in reactive Fe and colloidal sulfur (Gartman et al., 2011; Findlay et al., 2014). Solutions containing colloidal sulfur (20mM), ferrous iron Fe^{2+} (FeSO_4 5mM) and sulfides (Na_2S at 0.05%) were submitted to 85°C for 96h in the presence (or not) of various carbon compounds (Table 1). A first series of two syntheses were carried out in the presence of organic compounds unrelated to archaea cells: (1) a synthesis in the presence of poorly soluble and poorly reactive graphitic carbon flakes and (2) a synthesis in the presence of the yeast extract and tryptone used in the KOD1 culture medium by Gorlas et al. (2015, 2018, 2022) and Truong et al. (2023). A second series of three syntheses were carried out in the presence of organic compounds produced by KOD1 cells: (1) a synthesis in the presence of cell membranes only (recovered from cell lysis); (2) a synthesis in the presence of the intracellular material only (recovered from cell lysis); (3) a synthesis in the presence of all cell lysates, i.e., in the presence of the membranes and the intracellular material of KOD1. In parallel, a control experiment was carried out in the absence of organic material. The products of these syntheses were then characterized using XRD, SEM, TEM and STXM-XANES to document the nature, the morphology, the microtexture and the nature of the potential organic content of the pyrites produced.

No pyrite was produced in the absence of organic material (Fig 2C), highlighting that the presence of colloidal sulfur, ferrous iron and sulfides is not sufficient to produce pyrite, at least at the concentrations studied here. In contrast, pyrites were produced during all the syntheses carried in the presence of organic material, but these pyrites differ in size, morphology and microtexture depending on the organic material used for the synthesis. The pyrites produced in the presence of flakes of graphitic carbon are sub-micrometric (around 1 μm or less) and can be observed on the surface of graphitic carbon flakes as sand-rose-like crystals (Fig 2D and E). Similarly, the pyrites produced in the presence of the yeast extract and tryptone display a sand-rose shape, but measure 2 to 10 μm in diameter (Fig 2F and G). In the presence of KOD1 membranes only, the pyrites occur as spherules measuring 10 μm in diameter, with no visible crystallite at the SEM scale (Fig 2H) in contrast to the 2 to 5 μm large pyrite spherules produced in the presence of KOD1 cell lysates (Fig 2I). No pyrite was produced in the presence of KOD1 intracellular material only (Fig 2J). An explanation could be the available reactive surface necessary for pyrite growth, absent in the absence of organic material and too low in the presence of KOD1 intracellular material only. Altogether, considering size and morphology at the micrometer scale, only the pyrites formed in the presence of KOD1 membranes or KOD1 cell lysates share similarities with the pyrites spherules produced in the presence of living KOD1 (Truong et al., 2023) and with the pyrite spherules reported to occur in chimney walls of black smokers (Truong et al., submitted).

Consistent with observations made at the micrometer scale, TEM and STXM analyses revealed that the pyrites produced in the presence of graphitic carbon flakes display significant differences from the spherules produced in the presence of KOD1 cells. The crystallographic domains range from 200 to 300nm in size and the low $[\text{C}]_{\text{STXM}}$ value of 2.08 suggests a very low amount of organic material trapped into the pyrite, organic material which XANES spectrum exhibits no absorption features (Fig 3, Table 1). The pyrites produced in the presence of yeast extract and tryptone also show specificities: they display crystallographic domains of several hundred of nanometers and only trapped a low amount of carbon, with a very low $[\text{C}]_{\text{STXM}}$ value of 1.86. The XANES spectrum of this organic material is dominated by an absorption feature at 288.6

eV (attributed to COOH groups – Le Guillou et al., 2018) (Fig 3). Last, the pyrites produced in the presence of KOD1 membranes do not display neither nanoscale features similar to those of the pyrite spherules produced in the presence of living KOD1 cells: the microtexture itself is not very different, with crystal domains ranging from 50 to 100nm in size, but it contains less organic material (the $[C]_{\text{STXM}}$ value is only 2.12). The XANES spectrum of this organic carbon is consistent with lipids, with a small absorption feature at 285.1 eV (attributed to C=C bonds – Le Guillou et al., 2018) and a main absorption feature at 287.6eV (attributed to C-H bonds – Le Guillou et al., 2018) (Fig 3).

Only the pyrite spherules produced in the presence of KOD1 cell lysates resemble the pyrite spherules produced in the presence of living KOD1 cells: the microtexture is almost identical, with ultra-small crystalline domains smaller than 10nm, and the carbon content is similar, with a $[C]_{\text{STXM}}$ value of 4.45. The XANES spectrum of this organic material shows features at similar energies that the spectra of living cells (Benzerara et al., 2006; Miot et al., 2009; Li et al., 2014; Alleon et al., 2016, 2017; Picard et al. 2021; Truong et al., 2023) and of the organic material trapped within the pyrite spherules produced in the presence of living KOD1 cells (Truong et al., 2023), with absorption features at 285.1, 286.5, 287.6, 288.1 and 288.6 eV, attributed to C=C bonds, C-S bonds, C-H bonds, amide groups and carboxylic groups, respectively (Le Guillou et al., 2018) (Fig 3). This is not completely absurd, given that these pyrites were produced in the exact same conditions than those produced in the presence of living KOD1 cells, the only difference being that the cells are dead. Thus, this synthesis demonstrates that the chemical nature of the organic material in presence controls the final morphology, microtexture and organic content of the pyrite spherules produced. Plus, it evidences that the production of pyrite spherules is not controlled by living KOD1 cells but rather induced by their metabolism. An explanation for the production of pyrite spherules may reside in the surface charge of microbial cells, either living or dead. The surfaces of microbial cells are indeed negatively charged, thus conferring them the capability of creating bonds with Fe^{2+} (Ferris et al., 1987; Beveridge, 1989).

The differences in carbon sequestration between the pyrites produced in the presence of yeast extract and tryptone, KOD1 cell membranes and KOD1 cell lysates remain to be discussed. In a recent experimental study, Nabeih et al. (2022) investigated the precipitation of iron sulfides in the presence of various organic compounds (amino acids, tryptone, yeast extract and microbial cells). Their results demonstrated, consistently with the present results, that the sequestration of organic material by iron sulfides in the presence of amino acids, tryptone and yeast extract is low compared to the sequestration of organic material by iron sulfides in the presence of microbial cells (Nabeih et al., 2022). Their explanation involved the binding of iron sulfides and organic molecules on the surface of cells and the formation of organo-mineral aggregates (Nabeih et al., 2022). According to the present results, another important factor would be, in addition to surface availability as discussed above, the solubility of the organic material in presence and (maybe most importantly) its anionization potential.

Of note, the pyrite spherules found within the chimney walls of the black smoker sample at the TAG mound are in fact more similar to the pyrite spherules produced in the present study in the presence of KOD1 cell lysates than to the pyrite spherules produced in the presence of living KOD1 cells. Still, the pyrite spherules from the TAG mound display a larger variability in size and larger crystallographic domains (~200nm - Fig 1). The likely constant, or at least unlimited and

non-limiting supply of Fe and S in natural hydrothermal environments may explain this bigger size. Plus, natural environments do not only last 96 hours as is the case for the present syntheses. Other parameters not that well mimicked here would be the pressure and temperature conditions: pressure conditions are obviously higher at the TAG mound (lying 3650m below the sea surface), and temperatures may vary greatly to values significantly higher than 85°C, eventually leading to the growth of pyrite possibly produced at lower temperature. Obviously, additional abiotic syntheses as well as experimental fossilization of biogenic pyrite spherules should be conducted to further investigate the possibility of unambiguously determining the origin (i.e., biogenic or abiotic) of natural pyrite spherules.

A trail to follow would be the molecular structure of the organic material trapped within the pyrites. As shown here, the chemical nature of the organic material that can be detected within the pyrite spherules produced may inform about the nature of organic material initially present in the system. Yet, hydrothermal vents are the location of significant mixing between seawater (possibly rich in biogenic organic materials) and hydrothermal fluids (possibly rich in abiotic organic materials) (e.g. Maruyama et al., 1993; Elderfield and Schultz, 1996; Dick et al., 2010), making it difficult to identify sources and origins. Furthermore, organic compounds can be transported, making possible its presence within walls of chimney even though it has not been produced there. In such a case, some chemical selection could be expected, which does not seem to be the case according to XANES data (Truong et al., submitted). Given the thermal maturation that such mineral structures have inevitably experienced, it remains difficult to expect detecting pristine biogenic organic materials. For instance, amino acids are irreversibly destroyed above 240°C (Bada et al., 1995), which is well below the temperature of the hydrothermal fluid circulating through a chimney (e.g. Tivey et al., 2002).

All in all, can we use pyrite spherules as biosignatures? By definition, a biosignature provides irrefutable proof of biogenicity. In fact, the conformity of a biosignature does not only depend on the fact that it has been produced by life, but also on the fact that abiotic processes cannot produce it. However, there are no irrefutable criteria on which to base the claim that a mineral is biogenic. Mineral biosignatures may thus not exist as such. The only way of thinking to go further would thus be asking the following question: given the environmental conditions and given the morphology, microtexture and organic content (both its value and its nature), is it more likely that the mineral structure investigated was produced by (or in the presence of) living microorganisms or by abiotic processes? Here, the production of pyrite spherules involves the presence of ferrous iron, reactive sulfur in the form of colloidal sulfur and the presence of cellular organic material, including both membranes and intracellular content. In hydrothermal vents, colloidal sulfur can be produced both by living microorganisms and by abiotic processes. In contrast, cellular organic material can only be produced by living organisms, or at least, a mixture of organic molecules similar in composition as what could produce life is likely to have been produced by life.

Thus, it could be concluded that it is more likely that living organisms are involved in the production of the pyrite spherules from the TAG site given their size, morphology, microtexture and organic content (both its value and nature). In other words, the pyrite spherules observed in these very specific environments could be used as biosignatures, even though they do not constitute perfect biosignatures *per se*. Still, to be properly tackled, the question of what kind of bio these pyrite spherules could be used as the signatures of will require a better characterization of the temperature conditions of the sampling zone. It thus appears of primary importance to make

additional measurements and observations on chimneys of black smokers, from the core to the outer portions.

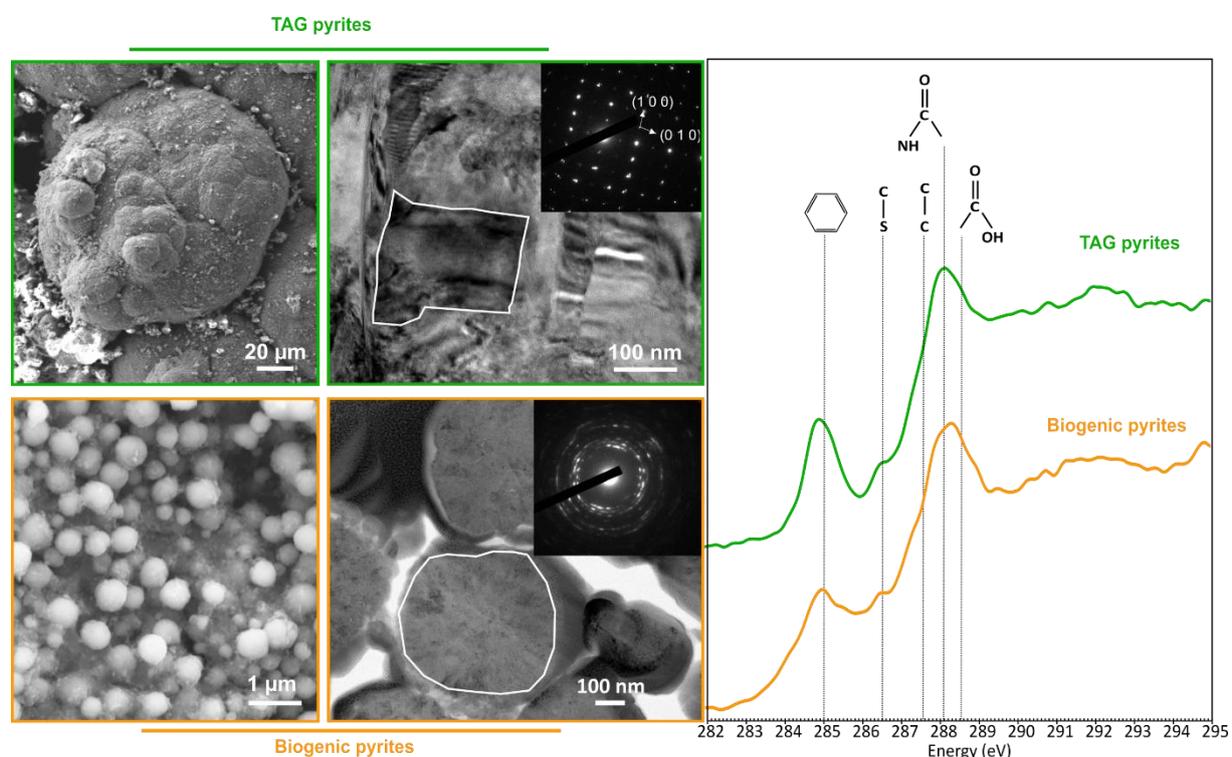


Figure 1 | SEM, TEM and STXM characterization of rounded pyrite aggregate isolated from TAG hydrothermal field, Mid-Atlantic Ridge (in green), compared to biogenic pyrites (in orange) (Truong et al., 2023).

Table 1 | Summary of the production of pyrites and their carbon content for a variety of abiotic synthesis with different types of organic matter, incubated at 85°C for 96h, compared to biogenic pyrites (i.e.KOD1) and TAG pyrites.

Samples	TAG	KOD1	Lysates KOD1	Membranes KOD1	Supernatants KOD1	YE + tryptone	Graphite	Negativ control
Organic matter	Unkown	KOD1 10 ⁷ cells/mL	- KOD1 lysates from 100mL culture with S(0) at 10 ⁷ cells/mL.	- KOD1 membranes from 100mL culture with S(0) at 10 ⁷ cells/mL.	- KOD1 supernatants from 100mL culture with S(0) at 10 ⁷ cells/mL.	- Yeast extract 1g/L - Tryptone 1g/L	Graphitic carbon 2g/L	None
Pyrite	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No
[C] _{STXM}	3.58	4.65	4.45	2.12	na	1.86	2.08	na

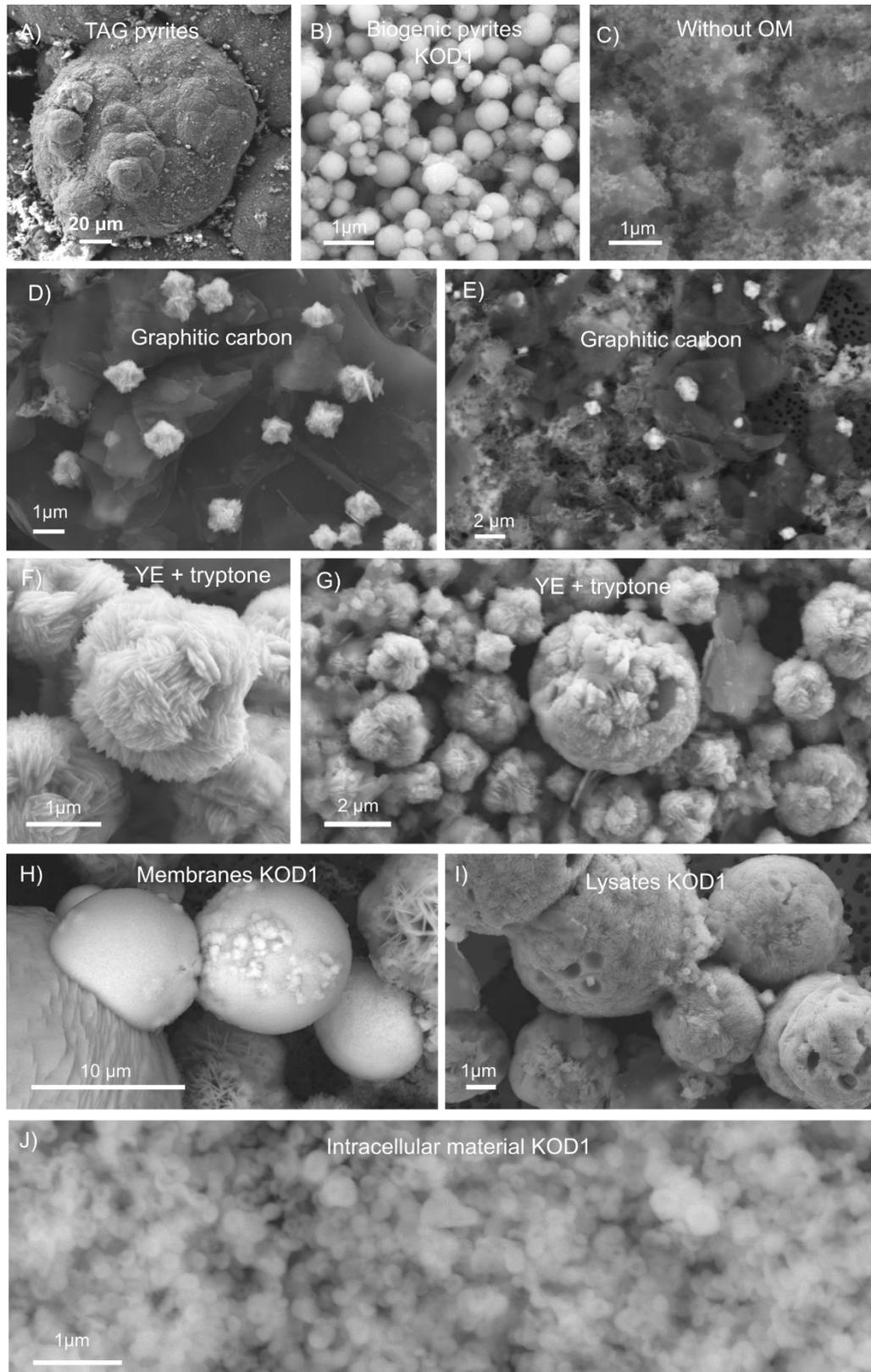


Figure 2 | SEM investigations of pyrites produced at 85°C for 96h in a colloidal sulfur and Fe²⁺ rich medium. **A)** No pyrite produced in a medium devoid of organic matter. **B)** Pyrite spherules produced in presence of TKOD1 strain (Truong et al., 2023). **C-D)** Pyrites produced in presence of yeast extract and tryptone. **E)** Rounded pyrites produced in presence of TKOD1 lysates. **F)** More massive pyrite spherules, measuring 10µm, produced in presence of TKOD1 membranes. **G)** No pyrite formed in presence of supernatant from TKOD1 cultures. **H)** Micrometric pyrite crystals produced in presence of graphitic carbon.

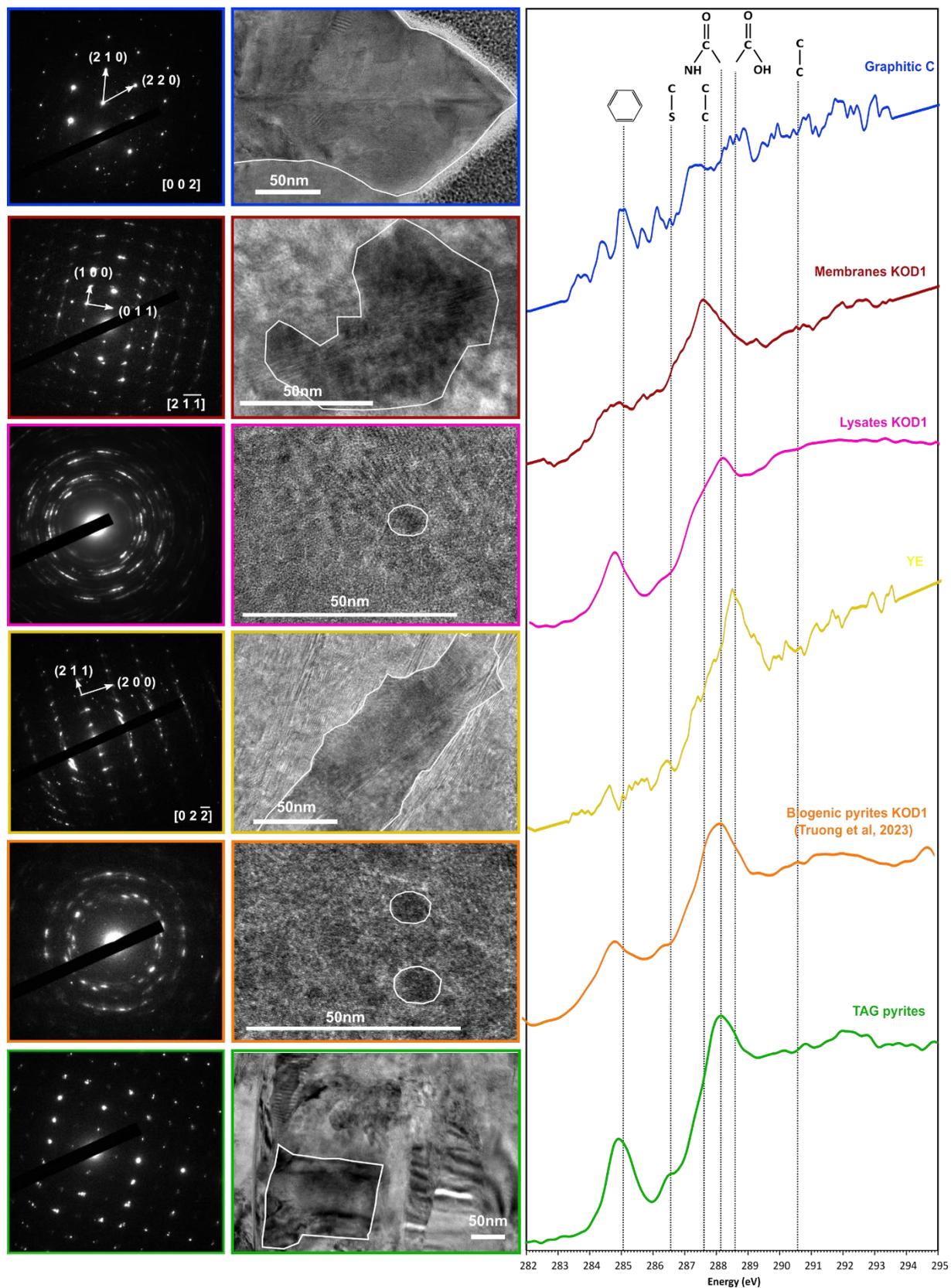


Figure 3 | TEM, associated SAED patterns and STXM characterization of TAG rounded pyrites (in green), biogenic pyrites (in orange) and abiotic counterparts produced at 85°C for 96h in a colloidal sulfur and Fe²⁺ rich medium: yeast extract and tryptone (in yellow), TKOD1 lysates (in pink), TKOD1 membranes (in red) and graphitic carbo (in blue).

III. Discussion et implications des résultats

1. Sur l'utilisation des sphérules de pyrite en tant que biosignatures

Aucune pyrite n'a été observée dans le contrôle négatif sans matière organique, ce qui signifie que les trois réactifs initiaux (soufre colloïdal, fer ferreux et sulfures) ne conduisent pas à eux seuls à la formation de pyrite, du moins aux concentrations étudiées ici. La matière organique est donc nécessaire à la précipitation de pyrite dans ce système, que ce soit sous forme de carbone soluble, comme les lysats cellulaires, ou sous forme de carbone insoluble, comme le carbone graphitique. Le soufre colloïdal est également nécessaire car, comme nous l'avons vu dans le chapitre IV, la présence de matière organique (extrait de levure et tryptone) avec du soufre particulaire ne conduit pas à la formation de pyrite non plus. Ces deux réactifs, matière organique et soufre colloïdal, sont donc essentiels à la formation de pyrite.

Les pyrites formées au cours des synthèses diffèrent en taille et en morphologie. En présence de carbone graphitique, les pyrites sont micrométriques et se présentent sous la forme de « roses des sables ». En présence d'extrait de levure et de tryptone, les pyrites ont également une forme de « rose des sables », mais mesurent entre 2 et 10 μm . En présence de membranes de KOD1, les pyrites précipitent sous forme de sphérules lisses ; leur morphologie est très similaire à celle des sphérules formées avec des cellules de KOD1. Elles présentent toutefois une gamme de taille supérieure et mesurent environ 10 μm de diamètre. À l'inverse, on remarque qu'aucune pyrite ne se forme dans les synthèses réalisées en présence de matériel cellulaire de KOD1, duquel les membranes ont été retirées. Cela suggère que les composés intracellulaires seuls (métabolites, molécules aminées) n'offrent pas de surface réactive suffisante pour la formation de pyrite dans les conditions des synthèses. Enfin, les pyrites formées en présence de lysats cellulaires (membranes et contenu intracellulaire) de KOD1 sont des sphérules non lisses et mesurent 2 à 10 μm de diamètre. D'après la morphologie et la gamme de taille, les pyrites produites en présence de KOD1 vivantes sont plus proches des pyrites formées abiotiquement en présence de matière organique d'origine biologique.

Analysées à l'échelle nanométrique (caractérisation MET et STXM), les pyrites formées en présence de carbone graphitique présentent des différences significatives par rapport à celles formées en présence de KOD1 vivantes. Elles sont composées de domaines cristallins mesurant 200 à 300nm et séquestrent une faible quantité de matériel carboné. Le spectre d'absorption au seuil du carbone ne présente aucune bande d'absorption spécifique. Les pyrites formées en présence d'extrait de levure et de tryptone sont également assez différentes de celles formées en présence de KOD1 vivantes. Les domaines cristallins mesurent plusieurs centaines de nanomètres et seule une faible quantité de matière organique est piégée à l'intérieur. Le spectre d'absorption est dominé par les liaisons COOH (les groupements carboxyliques). Enfin, les pyrites formées en présence de membranes cellulaires de KOD1 présentent des caractéristiques très différentes de celles formées en présence de KOD1 vivantes, malgré leur ressemblance au premier ordre. Elles sont constituées de domaines cristallins mesurant entre 50 et 100nm, mais le contenu en matériel organique est faible, et le spectre d'absorption indique que ce matériel organique est dominé par des carbones aliphatiques (ce qui n'est pas illogique puisque seuls des lipides ont été ajoutés au système). Finalement, seules les pyrites produites en présence de lysats cellulaires de KOD1 (membranes et contenu intracellulaire) présentent à la fois une morphologie globale, une microtexture et un contenu en matériel organique proche des pyrites formées en présence de

KOD1 vivantes. Les domaines cristallins sont de l'ordre de la dizaine de nanomètres, la quantité de carbone séquestrée est similaire, et le spectre d'absorption du carbone présente les mêmes bandes d'absorption. En réalité, cette synthèse est un contrôle, la seule différence avec le système dans lequel les KOD1 sont vivantes est que, dans ce cas, elles sont mortes. Cette synthèse démontre donc avant tout que la biominéralisation de pyrites par les KOD1 est plus induite que contrôlée. Il démontre également que ces composés cellulaires sont indispensables à la formation de ces sphérules, au même titre que le soufre colloïdal.

Etant données les conditions expérimentales que nous avons explorées, si de telles sphérules venaient à être retrouvées dans des fumeurs noirs il est donc vraisemblable qu'elles aient été formées en présence de procaryotes (vivants ou non). La probabilité que ces objets soient des biosignatures d'hyperthermophiles plutôt que des biosignatures de procaryotes de plus basse température dépend surtout de la corrélation entre la zone de prélèvement et le gradient de température, d'où la nécessité d'effectuer des analyses comparatives sur plusieurs portions d'un fumeur noir, du cœur jusqu'aux portions externes, afin de déterminer dans quelles zones – et donc jusqu'à quelle température – ces objets sont présents.

2. Formation de sulfures de fer : qu'en est-il de la greigite ?

Des analyses DRX ont été réalisées sur les témoins contenant du carbone graphitique et des lysats cellulaires afin d'identifier si d'autres phases minérales sont présentes dans ces échantillons. Comparé à l'échantillon contenant des cultures de *T. kodakarensis*, on remarque qu'ils ne contiennent pas de greigite (Fig 1). Le soufre colloïdal n'est donc pas impliqué dans la précipitation de greigite. Celle-ci ne se forme, dans les conditions étudiées, qu'en présence de cellules vivantes. Dans le chapitre précédent, nous avons mentionné la nécessité d'un précurseur contenant du Fe(III) pour la précipitation de greigite, qui pourrait provenir en particulier de phosphates de fer (III) amorphes (e.g. Duverger et al., 2020) et/ou de l'oxydation du fer (II) de la nano-mackinawite (e.g. Lennie et al., 1997).

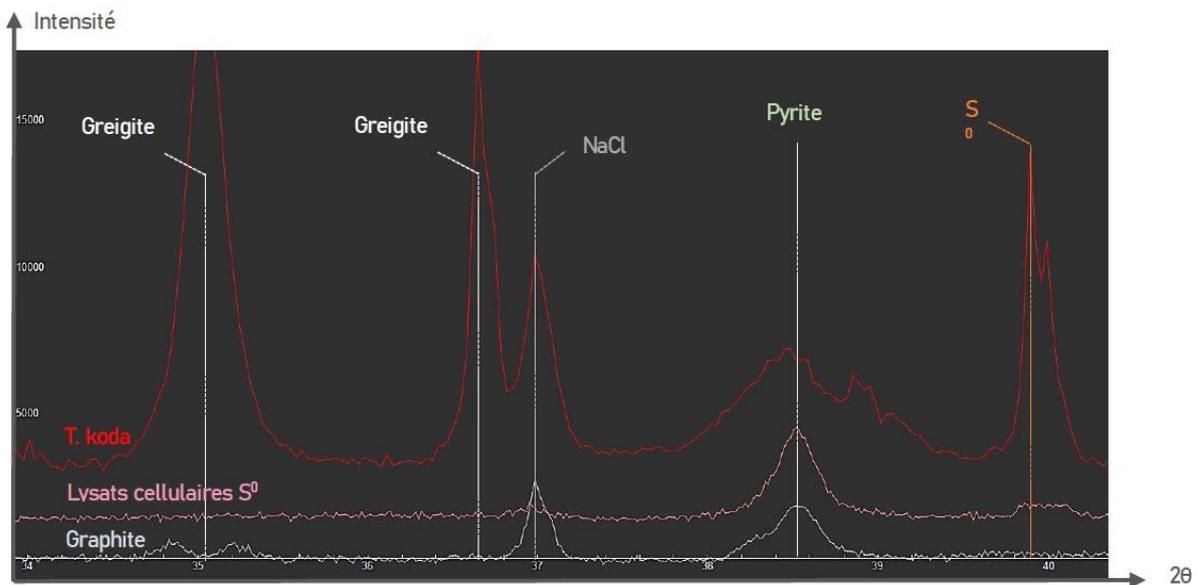


Figure 1 | Extrait de diffractogrammes des cultures de *T. kodakarensis* et des témoins lysats cellulaires et carbone graphitique incubés pendant 96h dans un milieu contenant du soufre colloïdal et du Fe^{2+} , à 85°C (2θ : $34 - 40^\circ$). Les pics correspondant à une ligne d'intensité significative sont étiquetés par la phase minérale concernée.

Il faut donc, à un moment donné, que l'oxydation du fer se produise pour conduire à la précipitation de greigite, et cette oxydation n'a pas lieu sans la présence de cellules vivantes. Gorlas et al. (2018) ont proposé que les cellules produisent des phosphates de fer (III) suite au stress lié à la concentration en fer. La greigite se formerait ensuite par sulfuration de ces phosphates de fer (III). Etant donné qu'aucune greigite n'est détectée dans le témoin réalisé avec des lysats cellulaires, la production des phosphates de fer en réponse au stress apparaît comme un processus actif réalisé par les cellules vivantes. La greigite pourrait donc possiblement être vue comme une biosignature indiquant la présence de microorganismes vivants. Pour s'en assurer, il conviendrait de réaliser des synthèses abiotiques en présence de phosphates de fer (III) amorphes, la production abiotique de greigite n'étant pas invraisemblable. Qui plus est, il convient de mentionner que la greigite n'a jamais été observée dans les cheminées hydrothermales : peu stable, elle serait rapidement remplacée par la pyrite dans ces environnements.

Références

- Bada J. L., Miller S. L., Zhao, M. (1995), The stability of amino acids at submarine hydrothermal vent temperatures. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 25, 111-118.
- Benzerara K., Menguy N., López-García P., Brown G. Jr. (2006), Nanoscale detection of organic signatures in carbonate microbialites, *PNAS*, 103 (25): 9440-9445
- Blöchl E., Rachel R., Burggraf S., Hafenbradl D., Jannasch H. W., Stetter K. O. (1997), *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 C. *Extremophiles*, 1, 14-21.
- Blumenberg M., Seifert R., Petersen S., Michaelis W. (2007), Biosignatures present in a hydrothermal massive sulfide from the Mid-Atlantic Ridge, *Geobiology* 5, 435-450.
- Brock T. D. and Freeze H. (1969), *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of bacteriology*, 98(1), 289-297.
- Cowan D.A. and Tow L. A. (2004), Endangered antarctic environments. *Annual Reviews in Microbiology*, 58, 649-690.
- Dick G. J., Tebo B. M. (2010), Microbial diversity and biogeochemistry of the Guaymas Basin deep-sea hydrothermal plume. *Environmental Microbiology* 12(5), 1334–1347.
- Duverger A., Berg J.S., Busigny V., Guyot F., Bernard S., Miot J. (2020), Mechanisms of pyrite formation promoted by sulfate-reducing bacteria in pure culture, *Frontiers in Earth Science* 8, 588310.
- Findlay A. J., Gartman A., MacDonald D. J., Hanson T. E., Shaw T. J., Luther III G. W. (2014), Distribution and size fractionation of elemental sulfur in aqueous environments: The Chesapeake Bay and Mid-Atlantic Ridge. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 142, 334-348.
- Findlay A.J., (2016), Microbial impact on polysulfide dynamics in the environment, *FEMS Microbiology Letters* 363(11), fnw103.
- Gartman A., Yücel M., Madison A., Chu D., Ma S., Janzen C., Becker E., Beinart R., Girguis P., Luther G. (2011), Sulfide oxidation across diffuse flow zones of hydrothermal vents. *Aquatic Geochemistry* 17, 583–601.
- Giggenbach W. (1974), Equilibria involving polysulfide ions in aqueous sulfide solutions up to 240°C. *Inorganic Chemistry* 13, 1724-1730.
- Gorlas A., Marguet E., Gill S., Geslin C., Guigner J.-M., Guyot F., Forterre P. (2015), Sulfur vesicles from Thermococcales: A possible role in sulfur detoxifying mechanisms. *Biochimie*, 118, 356-364.
- Gorlas A., Jacquemot P., Guigner J.M., Gill S., Forterre P., Guyot F. (2018), Greigite nanocrystals produced by hyperthermophilic archaea of Thermococcales order. *PLoS One* 13: e0201549.
- Gorlas A., Mariotte T., Morey L., Truong C., Bernard S., Guigner J.-M., Oberto J., Baudin F., Landrot G., Baya C., Le Pape P., Morin G., Forterre P., Guyot F. (2022), Precipitation of greigite and pyrite induced by Thermococcales: an advantage to live in Fe- and S-rich environments? *Environmental Microbiology*.
- Hu S.-Y., Barnes S. J., Glenn M. A., Pagès A., Parr J., MacRae C., Binns R. (2019), Growth history of sphalerite in a modern sea floor hydrothermal chimney revealed by electron backscattered diffraction. *Economic Geology* 114(1), 165–176.

- Kamyshny A., Goifman A., Gun J., Rizkov D., Lev O. (2004), Equilibrium distribution of polysulfide ions in aqueous solutions at 25°C: a new approach for the study of polysulfides' equilibria. *Environmental Science & Technology* 38, 6633-6644.
- Kashefi K. and Lovley D. R. (2003), Extending the upper temperature limit for life. *Science*, 301(5635), 934-934.
- Le Guillou C., Bernard S., De la Peña F., Le Brech Y. (2018), XANES-Based Quantification of Carbon Functional Group Concentrations, *Analytical Chemistry* 90(14), 8379-8386.
- Lennie A. R., Redfern S. A., Champness P. E., Stoddart C. P., Schofield P. F., Vaughan D. J. (1997), Transformation of mackinawite to greigite; an in situ X-ray powder diffraction and transmission electron microscope study. *American Mineralogist*, 82(3-4), 302-309.
- Li J. H., Bernard S., Benzerara K., Beyssac O., Allard T., Cosmidis J., Moussou J. (2014), Impact of biomineralization on the preservation of microorganisms during fossilization: An experimental perspective, *Earth and Planetary Science Letters*, 400: 113-122.
- Lin T., Ver Eecke H., Breves E., Dyar M., Jamieson J., Hannington M., Dahle H., Bishop J., Lane M., Butterfield D., Kelley D., Lilley M., Baross J., Holden J. (2016), Linkages between mineralogy, fluid chemistry, and microbial communities within hydrothermal chimneys from the Endeavour segment, Juan de Fuca ridge. *Geochemistry Geophysics Geosystems* 17, 300–323.
- Luther G.W., Church T.M., Scudlark J.R., Cosman M. (1986), Inorganic and organic sulfur cycling in salt-marsh pore- waters. *Science* 232, 746-749.
- Maruyama A., Mita N., Higashihara T., (1993), Particulate materials and microbial assemblages around the Izena black smoking vent in the Okinawa Trough. *Journal of Oceanography* 49 (3), 353–367.
- Merino N., Aronson H. S., Bojanova D. P., Feyhl-Buska J., Wong M. L., Zhang S., Giovannelli D. (2019), Living at the extremes: extremophiles and the limits of life in a planetary context. *Frontiers in microbiology*, 10, 780.
- Miot J., Benzerara K., Obst M., Kappler A., Hegler F., Schädler S., Bouchez C., Guyot F., Morin G. (2009), Extracellular iron biomineralization by photoautotrophic iron-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 75(17): 5586-91.
- Nabeh N., Brokaw C., Picard A. (2022), Quantification of Organic Carbon Sequestered by Biogenic Iron Sulfide Minerals in Long-Term Anoxic Laboratory Incubations. *Frontiers in Microbiology* 13, 662219.
- Nercessian O., Reysenbach A.L., Prieur D., Jeanthon C. (2003), Archaeal diversity associated with in situ samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise (13 degrees N). *Environmental Microbiology* 5, 492-502.
- Schrenk M., Kelley D., Delaney J., Baross J. (2003), Incidence and diversity of microorganisms within the walls of an active deep-sea sulfide chimney, *Applied and Environmental Microbiology* 69 (6), 3580–3592.
- Schwarzenbach G. et Fischer A. (1960), Die acidität der Sulfane und die Zusammensetzung wässriger Polysulfidlösungen. *Helvetica Chimica Acta* 169, 1365-1390.
- Stetter K. O. (1999), Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS letters*, 452(1-2), 22-25.
- Stuedel R. (1996), Mechanism for the formation of elemental sulfur from aqueous sulfide in chemical and microbiological desulfurization processes. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 35, 1417-1423.
- Takai K., Komatsu T., Inagaki F., Horikoshi K. (2001), Distribution of Archaea in a black smoker chimney structure. *Applied Environmental Microbiology* 67, 3618-3629.

- Takai K., Nakamura K., Toki T., Tsunogai U., Miyazaki M., Miyazaki, J., Horikoshi K. (2008), Cell proliferation at 122 C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(31), 10949-10954.
- Tivey M.A., Bradley A. M., Joyce T. M., Kadko D. (2002), Insights into tide-related variability at seafloor hydrothermal vents from time-series temperature measurements. *Earth and Planetary Science Letters* 202, 693-707.
- Truong C., Bernard S., Le Pape P., Morin G., Baya C., Merrot P., Gorlas A., Guoyt F. (2023), Production of carbon-containing pyrite spherules induced by hyperthermophilic Thermococcales: a biosignature? *Frontiers in Microbiology* 14.

Chapitre VII.

Conclusions et perspectives

I. Conclusions générales

1. Le soufre élémentaire : effet stimulant sur la croissance et détoxification du H₂

T. kodakarensis présente deux voies métaboliques majeures régulées par la présence ou l'absence de soufre. Les Thermococcales possèdent un régulateur transcriptionnel SurR qui active la transcription des gènes codant l'hydrogénase membranaire Mbh et, en absence de soufre, réprime l'expression des gènes impliqués dans la réduction du soufre, tels que le complexe Mbs-NSR et TK1481. L'activité des hydrogénases membranaires Mbh et Mbs est directement dépendante de la réduction de la ferrédoxine, réduite grâce à l'étape de glycolyse.

En condition pyruvate, SurR réprime donc Mbs-NSR et TK1481, la voie métabolique passe uniquement par Mbh au niveau membranaire et Hyh au niveau du cytoplasme. Mbh est impliquée dans la production de H₂ tandis que Hyh absorbe cet H₂ pour la régénération de NADPH. Il s'agit d'une voie métabolique avec un faible rendement énergétique car la ferrédoxine n'est pas réduite efficacement.

En condition soufre, SuR ne réprime pas les gènes impliqués dans la réduction du soufre : Mbs-NSR et TK1481 vont pouvoir s'exprimer. En parallèle, les hydrogénases Mbh et Hyh sont toujours actives. On observe donc toujours la production de H₂, corrélée à la production de H₂S. Le H₂S est produit massivement par Mbs et NSR, ainsi que par la NADPH-oxidase TK1481. Cette dernière protéine permet non seulement de détoxifier le H₂ et les polysulfures via la production de H₂S, mais oxide également le NADPH, directement impliqué dans la glycolyse et donc dans le processus d'oxydo-réduction de la ferrédoxine. Elle permet de contourner la limitation énergétique imposée par la voie métabolique en absence de soufre. Le soufre élémentaire S(0) a donc un effet stimulant sur la croissance cellulaire, en plus de permettre une détoxification efficace du H₂.

En condition cystine, la voie métabolique est intermédiaire. La concentration en polysulfures est insuffisante, SuR réprime au moins partiellement les gènes impliqués dans la réduction du soufre ce qui limite leur activité. La cellule dépend donc de la voie métabolique Mbh et Hyh, énergétiquement limitée.

2. Processus de formation des sphérules de pyrite

En condition soufre, l'activité métabolique des Thermococcales mène à la formation de sulfures de fer. Ils sont impliqués dans une dynamique soufre-fer-phosphore qui permet la libération de phosphates biodisponibles dans un milieu minéralisant pourtant non favorable à la

croissance cellulaire. Les phosphates libérés par une première génération de cellules sont utilisés par une deuxième génération de cellules qui se développe de façon concomitante à l'éclaircissement du milieu. Les nanophases minérales disparaissent au profit de phases à gros grains, ce qui suggère que la précipitation de sulfures de fer intervient dans une stratégie de survie aux milieux minéralisants à l'échelle de la population de cellules.

D'une part, les cellules réalisent une fermentation anaérobie assistée par la réduction du soufre élémentaire qui entraîne la production de sulfures (S^2), impliqués dans la formation de monosulfures de fer (FeS) amorphe. D'autre part, les Thermococcales accumulent du soufre dans leur cytoplasme par le biais d'une enzyme NAD(P)H sulfur-oxydoréductase (NSR). Ce soufre prend la forme de polysulfures ou de nanoclusters de soufre qui réagissent avec les monosulfures de fer amorphe pour former de la pyrite (FeS_2). Il est vraisemblable que la nucléation commence à l'intérieur des cellules, du fait de l'accumulation de nanoclusters de soufre dans leur cytoplasme.

Les sphérules de pyrite se forment donc grâce à l'activité métabolique des Thermococcales. Elles mesurent environ $1\mu m$ de diamètre et sont composées de domaines cristallins anisotropes de $15 \times 10 nm^2$. Les domaines partagent une orientation préférentielle commune au sein d'une même sphérule. Qui plus est, nous avons montré que ces pyrites à la morphologie particulière piègent des composés organiques cellulaires qui proviennent des cellules intactes et/ou du milieu suite à la lyse des Thermococcales.

3. Des sphérules de pyrite dans les cheminées hydrothermales

Nous avons étudié des échantillons naturels de cheminées provenant du site hydrothermal TAG (campagne Bicoise 2) afin d'y rechercher des sphérules de pyrite et de traquer la présence de micro-organismes hyperthermophiles. Nous avons réalisé une étude comparative de pyrites prélevées sur la paroi de la cheminée, de la partie interne la plus chaude à la partie externe la plus froide, afin de déterminer (1) si de tels minéraux peuvent être retrouvés et (1) si leur occurrence est cohérente avec le contexte physico-chimique de la portion de cheminée dans laquelle ils sont trouvés.

Les portions internes et intermédiaires présentent une majorité de pyrites cubiques, ce qui atteste d'une température élevée autour de $250^\circ C$. Des sphérules de pyrite ont été isolées dans les parties externes uniquement, piégées dans une matrice de sphalérite. L'interpénétration des grains irréguliers de sphalérite est significative de plusieurs épisodes de précipitation, marquée par des refroidissements et des recristallisations successives. Ceci serait dû à de fortes variations de températures, pouvant aller de $2^\circ C$ à $250^\circ C$.

Les sphérules de pyrite présentent des sous-joints de grains de plusieurs centaines de micromètres, ce qui pourrait être compatible avec une recristallisation de petits grains partageant initialement une orientation commune. Nous y avons détecté de la matière organique riche en groupes aromatiques, aliphatiques et carboxyliques, ce qui n'est pas incompatible avec la maturation thermique de composés organiques et la recristallisation observée. Le contexte environnemental et les caractéristiques de ces sphérules de pyrite suggèrent qu'il pourrait s'agir des biosignatures recherchées. Néanmoins, du fait de l'altération thermique, l'origine de la matière organique ainsi que la taille des domaines cristallins initiaux ne peuvent être déterminées.

4. Les sphérules de pyrite : des biosignatures ?

La présence de Thermococcales est nécessaire à la formation de sphérules de pyrite. Par conséquent, pouvons-nous les utiliser en tant que biosignatures ? Pour le vérifier, il convient de s'assurer qu'il est impossible de produire des pyrites avec des caractéristiques similaires *via* des processus abiotiques.

Des synthèses de pyrites en conditions abiotiques, faisant office de témoins, ont donc été réalisées. Différentes matières organiques (du carbone graphitique, de l'extrait de levure, des membranes cellulaires de KOD1 et des lysats cellulaires de KOD1) ont été mises en présence de soufre colloïdal dans le même milieu minéralisant que celui utilisé pour les cultures de KOD1.

Il s'avère que, sans matière organique, aucune pyrite ne se forme, ce qui démontre l'importance des composés organiques pour former cette phase dans les conditions. En présence de carbone graphitique et d'extraits de levures, les pyrites formées présentent des caractéristiques très différentes des sphérules formées en présence de KOD1. En présence de membranes cellulaires de KOD1, des sphérules de pyrites se forment dans une gamme de taille bien supérieure à celles formées en présence de KOD1. Ces « grosses » sphérules séquestrent, elles aussi, des composés organiques mais ces composés sont ceux présents dans le système, i.e. les composés constituant les membranes cellulaires, qui contiennent principalement des fonctions aliphatiques.

Seules les sphérules produites en présence de lysats cellulaires de KOD1 présentent des caractéristiques similaires à celles produites en présence de KOD1 vivantes : une forme de sphérule, des domaines cristallins de l'ordre de la dizaine de nanomètres, ainsi que la séquestration de composés organiques avec les mêmes groupements fonctionnels et en quantité comparable. La seule différence réside dans la gamme de taille, bien supérieure dans le cas des lysats cellulaires, ce qui suggère que les structures cellulaires intactes contraignent la taille des sphérules de pyrite à 1µm, au moins jusqu'à 96h de minéralisation. Toutefois, ce témoin particulier reproduit en tous points la configuration étudiée pour la formation de sphérule en présence de KOD1 vivantes, à savoir une matière organique identique et la présence de soufre colloïdal. Ces composants seraient donc indispensables à la formation de sphérules de pyrite. Cela montre qu'il n'est pas nécessaire d'avoir des cellules métaboliquement actives pour produire des sphérules de pyrite : des lysats cellulaires suffisent. La précipitation des sphérules semble donc résulter d'une biominéralisation induite et/ou d'un phénomène d'organo-minéralisation lié au matériel cellulaire, et non d'une biominéralisation contrôlée. D'après les témoins étudiés, les sphérules de pyrite pourraient donc être utilisées en tant que biosignatures pour attester de la présence d'archées hyperthermophiles, vivantes ou mortes.

Des expériences de fossilisation seront nécessaires afin de tester si les sphérules de pyrite produites en présence de KOD1 et leurs équivalents abiotiques peuvent, une fois soumises à de plus fortes conditions de pression et de température, évoluer vers des sphérules semblables à celles trouvées dans les échantillons du site TAG.

Cette étude révèle que les Thermococcales induisent la précipitation de phosphates de fer et de sulfures de fer, notamment de sphérules de pyrite qui fournissent une cible pertinente en tant que biosignature d'hyperthermophile. Les différentes voies de formation abiotiques que nous avons explorées ne permettent pas de produire des sphérules de pyrite présentant les mêmes caractéristiques, à l'exception des expériences réalisés avec des lysats cellulaires de Thermococcales. Le matériel cellulaire de ces archées – vivant ou mort – corrélé à la présence de soufre réactif est donc indispensable aux caractéristiques des sphérules de pyrite.

Des minéraux semblables peuvent être retrouvés dans les cheminées hydrothermales naturelles, dans un contexte cohérent avec la colonisation d'hyperthermophiles. Toutefois, il est encore trop tôt pour conclure si ceux-ci témoignent effectivement de leur présence. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour mieux appréhender l'impact de ces environnements complexes sur les biosignatures, en particulier l'effet de fortes variations de température sur les sphérules de pyrite et leurs équivalents abiotiques

II. Perspectives

1. Sur les cultures de microorganismes hydrothermaux en conditions non minéralisantes

Cette section traite des pistes envisagées pour apporter une compréhension encore plus fine du métabolisme et de l'activité cellulaire des Thermococcales dans un milieu non minéralisant. Ces deux aspects sont essentiels à la contrainte des processus de formation des biominéraux :

- Afin d'avoir une approche quantitative de l'activité cellulaire et de la biomasse, la quantification des ARN totaux pourrait être réalisée en complément des mesures d'ATP lors des suivis de croissance.
- La mesure des éléments dissous pourrait être effectuée en complément des mesures de gaz pour étudier les produits métaboliques en phase liquide, indispensables à la compréhension des métabolismes eux-mêmes, des processus de précipitation/dissolution des minéraux et de la dynamique soufre-fer-phosphore.
- Les produits gazeux – pour le moment mesurés de manière qualitative – devront être quantifiés afin de connaître précisément la pression partielle de chaque gaz produit en fonction du temps par les cultures de Thermococcales. En particulier, la production effective d'H₂ est une information importante quant à l'impact des cellules sur la production/dissolution des sulfures de fer.
- Enfin, il serait intéressant de réaliser des suivis de croissance dans d'autres gammes de température car les voies métaboliques empruntées (fermentation, fermentation assistée par la réduction du soufre, réduction des polysulfures) peuvent avoir un impact sur la résistance à leur environnement.

1.1. Quantification des ARN totaux en complément de l'ATP-métrie

L'ATP-métrie est une méthode intéressante pour démontrer s'il y a activité cellulaire ou non mais il est important de la considérer pour ce qu'elle est, i.e. un proxy, et non une mesure quantitative de l'activité cellulaire. Il est nécessaire de la corrélérer à d'autres méthodes de suivi de croissance comme nous l'avons fait avec le comptage cellulaire ou la mesure des gaz. Qui plus est, il sera important d'augmenter la robustesse des données avec d'autres méthodes de l'activité cellulaire dans des travaux futurs.

Les conclusions par rapport à la quantité d'ATP en fonction du temps sont hypothétiques car la mesure d'ATP ne fournit pas d'information quant au ratio consommation/production d'ATP. Ces niveaux de consommation/production peuvent énormément varier en fonction du niveau de maintenance que les cellules doivent appliquer et qui doit certainement varier en fonction des conditions métaboliques auxquelles elles sont soumises. Chez les bactéries, il existe des techniques fiables afin de mesurer l'état énergétique cellulaire comme quantifier la capacité d'excrétion par des mesures de fluorescence (Breeuwer et al., 1995 ; Bouix et al., 2022). Mais chez les archées hyperthermophiles, ces tests sont compliqués à mettre en place.

Il sera donc intéressant de coupler les mesures d'ATP à d'autres techniques telles que la quantification des ARN totaux comme indicateurs de biomasse, par exemple. Il a été montré que les contenus en ARN, ADN et protéines dépendent du taux de croissance cellulaire et que la concentration d'ARN augmente avec l'augmentation du taux de croissance (Bremer et Dennis, 2008).

Les ARN totaux comprennent les ARN ribosomiaux, i.e. les ARN majoritaires des cellules, les ARN messagers, les ARN de transfert et les petits ARN régulateurs. Des résultats préliminaires ont été obtenus dans le cadre du stage de M2 de Bouthaina Ben Adballah. Les ARN totaux ont été extraits à partir de cultures de KOD1 en présence de S(0) ou de L-cystine après 5h (phase exponentielle) de croissance à 85°C. Brièvement, les ARN totaux ont été extraits (kit NucleoSpin® RNA Set for NucleoZ OL par Macherey Nagel) puis analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose, ce qui permet de juger qualitativement de l'intégrité des ARN. En parallèle, des amplifications par PCR (en ciblant l'ADNr 16S) ont été réalisées afin de confirmer la non contamination par de l'ADN génomique (gel non montré).

Le profil électrophorétique réalisé ici a permis de distinguer trois bandes correspondantes aux trois types d'ARN ribosomiaux (23S,16S et 5S chez les procaryotes) (Fig 1). Les ARN ribosomiaux apparaissent intacts et non dégradés puisque l'on observe des bandes bien distinctes. La bande de plus haut poids moléculaire correspond à l'ARN 23S, la bande intermédiaire correspond à l'ARN 16S et celle de plus bas poids moléculaire correspond à l'ARN 5S. Cette dernière observation suggère que les autres ARNs, plus petits, tels que les ARNt et ARNm, non visibles sur le gel ne sont pas non plus dégradés, mais que la quasi-totalité des ARNs extraits est constituée par des ARN ribosomiaux intègres.

La mesure d'ARNs totaux permettrait donc de mesurer l'ARN ribosomal total qui, à ce jour, constitue une des meilleures approximations de biomasse active totale. Pour cela, des données qualitatives mais surtout quantitatives très précises des ARN totaux pourront être obtenues en utilisant la technologie des bioanalyseurs Agilent. La modélisation de ces données permettrait d'obtenir des indications fiables quant à l'état métabolique cellulaire.

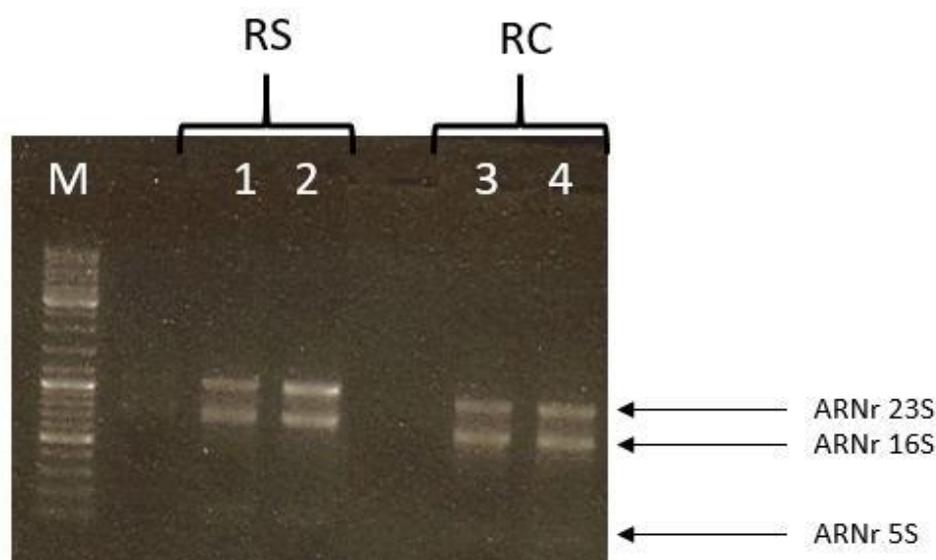


Figure 1 | Profil électrophorétique des extractions d'ARN totaux. M : marqueur de taille. Puits 1 et 2 = ARN extrait des cellules cultivées en Ravot + S(0) (RS), en phase exponentielle de croissance. Puits 3 et 4 = ARN extrait des cellules cultivées en Ravot + L-cystine (RC), en phase exponentielle de croissance. D'après le stage M2 de Bouthaina Ben-Adballah.

1.2. Mesure des éléments et composés en solution liés au métabolisme (phosphore, sulfures, sulfates, acétate)

La mobilisation du phosphore par le fer et sa libération par la précipitation de sulfures de fer se base sur l'observation des phases minérales. Afin de discuter plus avant de la dynamique soufre-fer-phosphore, il sera nécessaire de mesurer, au cours du temps, le phosphore en solution, qui peut être (1) sous forme soluble, inorganique (DIP pour *Dissolved Inorganic Phosphorous*) et biodisponible (ortho-phosphates et phosphore organique ou DOP pour *Dissolved Organic Phosphorous*) provenant de la dégradation de la matière organique ou de la lyse cellulaire, ou (2) sous forme solide. Il sera ensuite possible de corrélérer ces données à la précipitation des phases minérales et au modélisation géochimique.

Avoir une mesure quantitative précise des produits de départ (soufre élémentaire, L-cystine, pyruvate de sodium) et des produits métaboliques comme l'acétate à chaque étape du suivi de croissance pourrait permettre de réaliser des cinétiques chimiques du système pour chaque voie métabolique.

De la même façon, la concentration en ions HS^- n'a pour l'instant jamais été mesurée dans les cultures de Thermococcales, quelle que soit la condition. Connaître la concentration en sulfures présente un double intérêt. Concernant (1) le métabolisme cellulaire, cela permettra de mieux comprendre le chemin métabolique des cellules en condition cystine et de tester l'hypothèse présentée en Chapitre III sur la fermentation de composés organiques associé à la réduction de polysulfures plutôt que de protons, et pourra palier à l'absence d' H_2S en phase gazeuse. Concernant (2) la minéralisation des sulfures de fer eux-mêmes, connaître la concentration en ions sulfures pourrait permettre d'effectuer un nouveau type de témoin avec une concentration de sulfures similaire à celle produite par les cellules, afin de tester leur impact sur la précipitation de sulfures de fer.

Enfin, il serait également intéressant de mesurer les sulfates en solution, en raison de l'ajout de Na_2S . La réduction des sulfates n'a jamais été relevée chez les Thermococcales. Nous avons pourtant noté la présence de sulfates dans les témoins abiotiques tandis que ceux-ci étaient indétectables en présence de cellules (Truong et al., 2023). Il serait donc important de vérifier ces données en mesurant directement les sulfates en solution au cours du temps.

1.3. Quantification des gaz produits par les Thermococcales

La quantification des produits gazeux pourra permettre de connaître précisément la pression partielle de chaque gaz produit en fonction du temps par les cultures de Thermococcales – en conditions optimales de croissance et en conditions de minéralisations.

Pour le moment, la pression partielle des gaz est connue dans la boucle de chargement du GC-TCD mais n'a pas été calculée dans la bombe elle-même. Les gaz se décompressent dans la ligne externe allant de la bombe à la boucle de chargement, par conséquent leurs concentrations absolues sont inférieures aux concentrations de l'échantillon. Connaître la concentration des gaz dans la bombe implique de quantifier précisément la décompression, et donc de connaître les volumes qu'occupent les différents gaz dans la bombe, les volumes allant de la bombe aux différentes étapes du circuit, ainsi que le volume de la boucle de chargement. Une relation linéaire telle que celle explicitée dans le Chapitre II, partie 5.2, permettrait de calculer les coefficients à appliquer pour connaître la concentration absolue de chaque gaz dans les échantillons.

Un suivi dynamique des gaz (5h, 96h, 192h et 35j) pourrait alors être réalisé en conditions de minéralisation. Nos modélisations géochimiques réalisées sur Chess montrent que la production d'H₂ peut avoir une influence sur la dissolution de pyrite (cf Chapitre IV) à partir d'une fugacité de 1.1 bar (à 85°C, pH 7). Connaître la production effective d'H₂ par les Thermococcales dans l'ensemble des conditions métaboliques étudiées (soufre, cystine, pyruvate), ainsi qu'en conditions de minéralisation, est une information importante pour comprendre l'impact des cellules sur la production/dissolution des sulfures de fer. Qui plus est, la formation de ces minéraux fait partie intégrante d'une dynamique soufre-fer-phosphore qui influence la mobilisation du phosphore par le fer. La production de H₂ et la libération de phosphore biodisponible pourraient faire partie d'une boucle rétroactive permettant la survie de la population cellulaire en conditions fortement minéralisantes.

1.4. Limite thermique de KOD1 en fonction des conditions métaboliques

Un autre aspect sous-jacent à ce travail de thèse réside dans la frontière thermique du vivant. Etant donné que les microorganismes hyperthermophiles n'ont jamais été observés *in situ* dans leur milieu naturel et que leurs températures maximales et minimales sont estimées de manière culture-dépendante en laboratoire, la limite thermique du vivant demeure une question ouverte. En particulier, la question se pose de savoir si les archées peuvent vivre dans des portions de cheminées qui ne descendent jamais sous une certaine température limite. Tandis que les études théoriques et environnementales actuelles suggèrent que la température maximale à laquelle la vie peut exister se situe entre 113°C et 150°C (Stetter, 1999 ; Cowan et Tow, 2004 ; Merino et al., 2019), les études en condition de laboratoire suggèrent un record de température maximale de croissance – fortement débattu – de 122°C à une pression hydrostatique de 40 MPa pour la méthanogène *Methanopyrus kandleri* (Takai et al., 2008).

Dans un premier temps, il serait intéressant de tester si la voie métabolique (conditions soufre, L-cystine, pyruvate) a un impact sur la limite en température des Thermococcales. En effet, le métabolisme lui-même implique des niveaux de maintenance cellulaire différent, à travers la détoxification des polysulfures dans le cas de la réduction du soufre élémentaire, ou à travers la détoxification de l'H₂ qui peut s'avérer toxique à une certaine concentration. Quel impact ces différents niveaux de maintenance ont-ils sur la limite maximale de température de croissance cellulaire ?

Pour ce faire, il s'agirait de réaliser des suivis de croissance avec les méthodes utilisées lors de cette thèse, à savoir coupler l'ATP-métrie – et y corrélérer la mesure des ARN totaux –, le comptage cellulaire et la mesure des gaz, additionné avec la mesure des éléments dissous. Ces suivis de croissance pourraient être réalisés à partir de 65°C, la limite basse en température, et des températures supérieures à 100°C. Une fois caractérisée en conditions optimales, l'impact de ces températures minimales et maximales pourrait être testé en milieu minéralisant. Est-ce qu'un paramètre extrinsèque à la cellule tel qu'un contexte géochimique particulier, comme la présence de fer ou la pression, facilite ou au contraire limite la croissance cellulaire à des températures supérieures à 100°C ?

2. Sur la production de minéraux en présence de Thermococcales

Cette section se concentre sur les travaux complémentaires à effectuer quant aux processus de formation des minéraux en présence de Thermococcales :

- L'hypothèse sur la précipitation des sphérules de pyrite s'est basée sur la détoxification de polysulfures ou de nanoclusters de soufre par les vésicules de soufre, support de nucléation (avec les cellules). Il serait donc intéressant de tester directement la minéralisation de vésicules de soufre.
- Au cours de cette thèse, une attention particulière a été portée aux phases cristallines. Afin de mieux cerner leur processus de formation, il faudrait se concentrer sur les phases amorphes qui dominent aux temps courts (entre 1h et 96h d'incubation) et sur leur interaction avec les cellules. Pour cela, des suivis en direct pourraient être réalisés ainsi que des expériences à des concentrations en fer plus basses.
- Comme dans tous travaux expérimentaux, il est essentiel d'explorer d'autres conditions expérimentales afin de mieux cerner les processus qui peuvent se produire dans les milieux naturels. Ici, il serait intéressant de tester d'autres métaux, de faire varier la température, et notamment d'utiliser des systèmes ouverts tels que les bioréacteurs ou les systèmes microfluidiques.

2.1. Purification et minéralisation de vésicules

Les Thermococcales produisent des vésicules extracellulaires dont certaines contiennent du soufre (Gorlas et al., 2015) (Fig 2). Durant cette thèse, nous avons axé l'hypothèse centrale de la formation des sphérules de pyrite sur l'accumulation de polysulfures ou de nanoclusters de soufre dans le cytoplasme et sur la détoxification de ces composés par les vésicules extracellulaires, qui servent de support de nucléation. Il serait donc intéressant de tester directement la minéralisation de vésicules extracellulaires riches en nanoclusters de soufre.

Pour ce faire, il est indispensable de séparer les vésicules de soufre des cellules, i.e. de purifier les vésicules de soufre tout en conservant le soufre contenu à l'intérieur. Des tests de purifications de vésicules ont été réalisés à l'I2BC, mais il s'avère pour le moment impossible de conserver le soufre à l'intérieur des vésicules. Les techniques de purification de vésicules classiques qui nécessitent des étapes d'ultracentrifugation ne sont pas adaptées à la purification des vésicules de soufre car ces dernières semblent être plus fragiles que les vésicules membranaires. Il existe d'autres techniques « plus douces », telles que l'utilisation de colonnes de purification de protéines ou l'utilisation du système de tri d'un cytomètre de flux, mis en place à l'I2BC. Lorsque ces méthodes seront au point, il sera possible de purifier les vésicules de soufre et de réaliser des expériences de minéralisation sans les cellules.

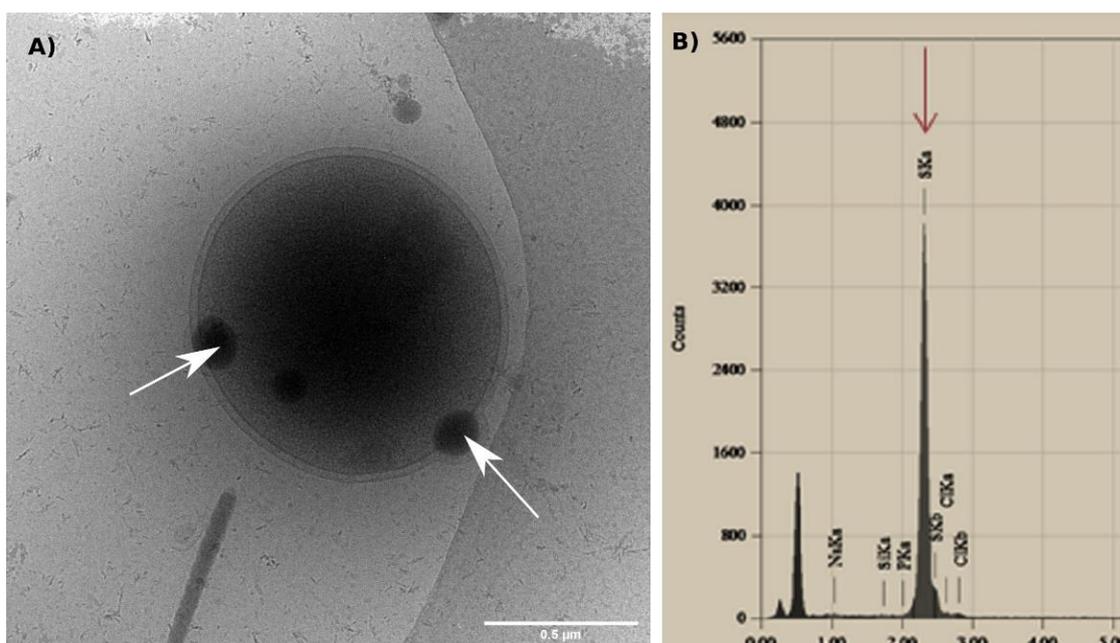


Figure 2 | A) Cellule de TKOD1 observée en cryo-microscopie. Les flèches blanches indiquent des vésicules riches en soufre, comme attesté par **B)** l'analyse EDXS des vésicules. © Aurore Gorlas

2.2. Processus de nucléation à temps très courts (de 1h à 96h)

Durant cette thèse, une attention particulière a été portée aux phases cristallines, en dont la pyrite en particulier. Afin de mieux cerner les processus de formation des sulfures de fer cristallins et des phosphates de fer observés à 192h, il serait intéressant de se concentrer sur les phases amorphes qui dominent le système avant 96h. D'une part, une partie de la dynamique soufre-fer-phosphore a lieu avant la précipitation des phases cristallines, notamment la sulfuration des phosphates de fer amorphes qui participent à la formation de greigite. D'autre part, les processus de nucléation sur les membranes cellulaires et/ou les vésicules extracellulaires n'ont pour l'instant pas été observés car les analyses ont essentiellement porté sur le produit fini de la nucléation. Les interactions entre minéraux et membranes cellulaires et/ou vésicules extracellulaires pourraient être observées à des temps très courts, typiquement de 1h à 24h, jusqu'à 96h. Ces deux aspects, i.e. dynamique soufre-fer-phosphore et nucléation, ne sont d'ailleurs pas indissociables étant donnée l'importance de la sulfuration des phosphates de fer dans les processus de formation des sulfures de fer.

La première solution serait de réaliser des suivis en direct en couplant les techniques utilisées durant cette thèse à des techniques dynamiques telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN). Cela permettrait de suivre *in situ* la spéciation du soufre (^{33}S) et du phosphore (^{31}P) au niveau des interfaces cellulaires, ce qui offrirait des informations essentielles quant à l'interaction cellules-minéraux. Il serait également possible de caractériser les matériaux amorphes ou peu cristallisés détectés aux temps courts ($< 96\text{h}$).

Le deuxième solution – qui n'est pas incompatible avec la première – serait de travailler à des concentrations en fer inférieures à 5mM, i.e. la concentration testée durant cette thèse, ce qui permettrait de ralentir le processus de minéralisation et de mieux détailler les phases minérales avant la formation des phases cristallines. Il serait également envisageable d'utiliser d'autres techniques de caractérisation à l'échelle nanométrique telles que la cryo-microscopie ou la spectrométrie infrarouge à l'échelle nanométrique (AFM-IR) qui permettraient une caractérisation fine des processus de nucléation au niveau de la cellule.

2.3. Complexification du milieu de minéralisation : vers des systèmes ouverts ?

Les fluides des cheminées hydrothermales sont riches d'une diversité de métaux. Le fer est parmi les plus abondants et se retrouve dans une grande partie de la fraction solide $>0.2\mu\text{m}$, mais d'autres éléments tels que le cuivre, le zinc, le cadmium, le plomb ou encore le cobalt se retrouvent dans le fluide majoritairement sous forme de nanoparticules (Findlay et al., 2015). Durant cette thèse, en plus du fer, le cuivre et le zinc ont été observés dans des phases minérales non particulières ($> 0.2\mu\text{m}$) sous forme de chalcopyrite (CuFeS_2) et de sphalérite (ZnS), respectivement. En particulier, la sphalérite a été observée dans des échantillons de portions externes des cheminées, et souvent associée avec des sphérules de pyrite, piégées dans la matrice de sphalérite.

La perspective de complexifier le milieu de minéralisation peut se faire de trois façons : (1) ajouter d'autres métaux sous forme dissoute, telle que la solution de FeSO_4 , et tester leur effet sur les cellules et sur la production des phases minérales, (2) ajouter des phases minérales avec une taille $> 0.2\mu\text{m}$, produites en amont et (3) travailler en système ouvert.

Le deuxième cas permettrait de tester non pas l'influence de la concentration en métaux sur les cellules, mais la colonisation des minéraux par les cellules. Dans ce cas, il serait question de sortir du modèle pour simuler au plus proche le système naturel. Il serait donc plus réaliste d'utiliser un consortium de souches parmi celles les plus couramment identifiées lors d'analyses moléculaire, i.e. Thermococcales, Archaeoglobales, Methanopyrales et Methanococcales (e.g. Takai et al., 2001 ; Nercessian et al., 2003 ; Schrenk et al., 2003).

Enfin, réaliser ces expériences dans des systèmes ouverts permettant de recréer l'aspect dynamique des cheminées hydrothermales, soit en reprenant le système des bombes réactionnelles, soit en utilisant des bioréacteurs ou des systèmes microfluidiques. Les bioréacteurs sont, entre autres, utilisés en industrie pour le traitement de minéraux par des bactéries (Norris et al., 2000) et permettent un contrôle dynamique de la température, du pH ou encore du niveau d'oxygène. Ils peuvent être couplés à divers instruments, par exemple des chromatographes en phase gazeuse et/ou liquide, et permettent de récolter des données en temps réel. Les systèmes microfluidiques présentent des avantages équivalents en termes de contrôle dynamique des conditions de culture mais à une échelle différente. Ils peuvent être couplés à de la microscopie optique, des mesures de densité optique ou encore de la spectrométrie de masse. Ces deux types de système sont donc complémentaires et se révèlent particulièrement intéressants pour l'étude des interactions microbes-minéraux.

3. Sur l'utilisation des sphérules de pyrite en tant que biosignature

Cette section développe des pistes à explorer pour renforcer la robustesse des pyrites en tant que biosignature :

- Des analyses isotopiques du carbone et du soufre seraient pertinentes, non seulement dans les processus de formation des pyrites, mais aussi dans leur utilisation en tant que biosignature. La composition en isotopes stables peut être un outil puissant pour déterminer une implication biologique dans la formation des minéraux.
- Il est également nécessaire d'explorer d'autres voies abiotiques de formation de la pyrite en présence de matière organique et la séquestration préférentielle de ces composés. Il faudrait, d'une part, étudier le rôle de la structure chimique des molécules en utilisant des molécules organiques simples, et d'autre part l'impact d'une matière organique dissoute *versus* particulaire. Nabeh et al. (2022) ont mis en évidence un piégeage préférentiel de la matière organique par les sulfures de fer en fonction des composés organiques présents dans le milieu. Il serait pertinent de réaliser des analyses élémentaires (carbone total et azote total) sur les sphérules de pyrite et leurs équivalents abiotiques afin de confronter les données.

3.1. Isotopie du carbone et du soufre

L'activité microbienne entraîne un fractionnement des isotopes stables et conduit à une différence des rapports isotopiques entre les réactifs et les produits (Hoefs, 2021). Les produits, avec leurs rapports isotopiques spécifiques, peuvent ensuite être impliqués dans la précipitation de minéraux qui, à leur tour, vont enregistrer ces rapports isotopiques spécifiques. Ils peuvent donc être utilisés en tant que traceurs des processus métaboliques effectifs dans un environnement. Etant donnée la présence de matière organique dans les pyrites, il serait intéressant de tester deux types de composition isotopique dans les sphérules de pyrites et leurs équivalents abiotiques : les compositions isotopiques en ^{12}C et ^{13}C et en ^{33}S et ^{34}S .

La composition isotopique du carbone est largement utilisée pour tester le caractère biogénique de la matière organique. La matière organique biologique est appauvrie en isotopes lourds ^{13}C par rapport au pool de carbone inorganique, ce qui s'exprime généralement par des valeurs $\delta^{13}\text{C}_{\text{org}}$ négatives comprises entre -20‰ et -30‰ (Hayes, 2001 ; Schidlowski, 2001 ; Eigenbrode et Freeman, 2006 ; Hoefs, 2021). Certaines souches méthanogènes sont même capables d'induire des valeurs jusqu'à -80‰ (Penger et al., 2012).

Une excursion négative du $\delta^{13}\text{C}_{\text{org}}$ ne représente cependant pas une preuve à elle seule quant au caractère biogénique de la matière organique, car des valeurs similaires de $\delta^{13}\text{C}_{\text{org}}$, comprises entre -21‰ et -38.7‰, ont été trouvées dans de la matière organique abiotique terrestre et dans des composés organiques provenant de météorites carbonées (Sephton et al., 2003 ; Sephton et Gilmour, 2001). Des valeurs encore plus négatives peuvent être atteintes, notamment via la synthèse abiotique de méthane (CH_4) et de composés organiques en conditions hydrothermales (Horita et al., 1999 ; 2005 ; McCollom et Seewald, 2001). Toutefois, ces synthèses abiotiques en conditions hydrothermales mènent à une variation bien plus grande entre le $\delta^{13}\text{C}_{\text{org}}$ et $\delta^{13}\text{C}_{\text{inorg}}$ comparé aux processus biologiques (McCollom et Seewald, 2006).

La combinaison de ces deux facteurs, à savoir des valeurs négatives à partir de -20‰ et peu variables en $\delta^{13}\text{C}_{\text{org}}$ et $\delta^{13}\text{C}_{\text{inorg}}$, a été proposée comme un biomarqueur dans les dépôts hydrothermaux (Schidlowski, 2001 ; Runge et al., 2022). On pourrait donc s'attendre à trouver ce type de composition isotopique dans toute pyrite formée en présence de matière organique d'origine biologique, qu'il s'agisse des cellules de KOD1, de leurs lysats cellulaires ou des extraits de levure. Il serait intéressant de réaliser ces analyses sur les pyrites isolées des cheminées hydrothermales naturelles en parallèle de mesure de la composition isotopique du soufre.

Les isotopes stables du soufre sont évidemment d'intérêt dans l'étude des pyrites (^{32}S , ^{33}S , ^{34}S , ^{36}S). Le ratio $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ est le plus étudié car, lorsqu'il est induit par l'activité microbienne, présente des valeurs jusqu'à -70‰ comparées au sulfate de départ (Brunner et al., 2005 ; Canfield et al., 2010 ; Jørgensen et al., 2019). Les processus métaboliques les plus impliqués dans ce fractionnement du $\delta^{34}\text{S}$ sont la sulfato-réduction et la disproportionation du soufre élémentaire (Böttcher et al., 2001 ; Canfield et Thamdrup, 1994 ; Habicht et Canfield, 1997 ; Sim et al., 2011).

Tandis que la diagenèse tardive peut modifier à la fois la cristallinité de la pyrite et la composition isotopique en S (Williford et al., 2011 ; Gomes et al., 2018 ; Marin-Carbone et al., 2020), la diagenèse précoce ne pourrait avoir qu'un effet limité sur la composition isotopique en S dans les pyrites (Marin-Carbone et al., 2022). D'autres processus peuvent modifier le fractionnement isotopique initial, tels que la concentration en sulfates du réservoir (Crowe et al., 2014 ; Gomes et Hurtgen, 2013). Qui plus est, les pyrites se forment à partir de sulfures de fer (FeS) et parfois à partir de greigite (Fe_3S_4) en tant que phase intermédiaire, ce qui induit d'autant plus de réservoirs de sulfures différents qui peuvent intervenir à chaque étape de la formation des pyrites.

Il est donc nécessaire de caractériser le réservoir de sulfures en présence et en absence de Thermococcales, et ce à différentes étapes de la minéralisation pour suivre son évolution. Le $\delta^{34}\text{S}$ n'a jamais été étudié chez les Thermococcales, il est donc compliqué de préciser à quelle valeur nous pourrions nous attendre étant donné que cela est grandement influencé par les taux de réduction spécifiques à la souche, au moins chez les microorganismes sulfato-réducteurs (Bradley et al., 2016). Nous pourrions seulement nous attendre à un $\delta^{34}\text{S}$ négatif jusqu'à -70‰ dans les sulfures produits – impliqués dans la formation de FeS –, similaire au fractionnement réalisé lors de la sulfato-réduction car il s'agit de deux réactions de dissimilation. Néanmoins, des études montrent que la pyrite formée par la voie des polysulfures hérite d'une composition isotopique dominée par le réservoir de polysulfures (Butler et al., 2004). Il faudrait donc analyser la composition isotopique des polysulfures ou des nanoclusters de soufre contenus dans le cytoplasme des cellules et les vésicules de soufre, impliqués dans la dernière étape de formation des sphérules de pyrite biogéniques (cf. Chapitre IV).

Etant donné que les polysulfures s'accumulent dans le cytoplasme (Schut et al., 2007) par le biais de l'enzyme NAD(P)H sulfur-oxydoréductase (NSR) impliquée dans la réduction du soufre élémentaire (Kobori et al., 2010 ; Bridger et al., 2011 ; Herwald et al., 2013), ils seraient également issus d'une réaction de dissimilation. On pourrait donc s'attendre à un fractionnement similaire à celui induit par la fermentation assistée par le soufre. Pour le vérifier, des expériences préliminaires pourraient être réalisées sur la composition isotopique des produits intracellulaires des Thermococcales. Il faudrait débarrasser le surnageant des cultures après centrifugation, puis lyser les cellules après rinçage pour retirer tout résidu de sulfures extracellulaires pour ne garder que le contenu intracellulaire, i.e. les polysulfures accumulés dans le cytoplasme.

3.2. Précipitation de pyrite en présence de différents types de matière organique

Les témoins abiotiques ont été produits en présence de matière organique complexe, telle que des lysats cellulaires ou de l'extrait de levure, et de soufre colloïdal. En absence de matière organique, aucune pyrite ne s'est formée. La matière organique semble donc offrir une surface réactive pour la nucléation de pyrite, qu'il s'agisse de carbone graphitique ou de lysats cellulaires. Cependant, le processus de formation de la pyrite induite par la présence de matière organique reste indéterminé. La matière organique utilisée étant complexe, elle comprend plusieurs groupements fonctionnels qui sont susceptibles d'interagir avec le Fe^{2+} et le soufre colloïdal.

Afin de mieux contraindre les processus de formation de la pyrite, il serait intéressant d'utiliser des molécules organiques simples, telles que des acides aminés (fonction amide $-\text{NH}_2$), des acides acétiques (fonction carboxyle $-\text{OH}$) ou encore des lipides (fonction aliphatique $-\text{C}$). Des pyrites se forment-elles dans toutes ces conditions ? Présentent-elles des caractéristiques proches des sphérules produites en présence de KOD1 ?

Il faudrait aussi tester la précipitation de pyrite et l'impact sur leur morphologie en utilisant de la matière organique dissoute *versus* particulaire. Par exemple, nous avons montré qu'en présence de carbone graphitique – insoluble – les pyrites formées séquestrent peu de matière organique et se présentent sous la forme de gros cristaux automorphes, tandis que les pyrites formées en présence de KOD1 séquestrent plus de matière organique et présentent une cristallisation fine.

Il serait donc intéressant de quantifier la matière organique piégée par la phase solide en fonction de la nature et de la solubilité de la matière organique initialement présente dans le système. En effet, Nabeh et al. (2022) ont mis en évidence un piégeage préférentiel de la matière organique par les sulfures de fer. Même si les sulfures de fer s'avèrent efficaces pour piéger toutes sortes de composés organiques, certains sont piégés en plus grande quantité que d'autres. En particulier, les composés issus directement de cultures cellulaires sont piégés en plus grande quantité par la phase solide, tandis que les composés simples tels que les acides aminés ou la tryptone sont piégés en plus faible quantité (Nabeh et al., 2022). Cette étude suppose que la présence de cellules ou de structures cellulaires peut jouer un rôle dans la séquestration de la matière organique par le biais d'associations organo-minérales, en préservant des cellules entières et leurs composés plutôt qu'en liant des molécules de carbone individuelles à des minéraux.

En se basant sur le protocole de Nabeh et al. (2022), il serait pertinent de réaliser des analyses élémentaires sur le carbone total et l'azote total, afin de les confronter aux données obtenues en XANES au seuil du carbone. Pour cela, il s'agirait de mesurer le carbone introduit initialement dans le milieu, de filtrer après le processus de minéralisation pour ne conserver que les pyrites et y mesurer le carbone total, ce pour chaque type de matière organique testé. Au premier ordre, il serait question de mesurer le carbone total et l'azote total dans l'entièreté de la phase solide – i.e. principalement pyrite, greigite et matériel organique à 96h.

4. Fossilisation expérimentale et échantillons naturels

Cette section présente des travaux préliminaires que nous avons menés au cours de cette thèse. Ces résultats offrent une première compréhension de ce que deviennent les sphérules de pyrite et leurs équivalents abiotiques une fois soumis à de forts épisodes de températures, i.e. à la diagenèse, qui devra être confirmée et affinée par des travaux futurs. L'étude d'échantillons naturels – actuels et anciens – provenant de divers sites est également présentée et devra faire l'objet d'analyses plus approfondies.

- Des études d'altération thermique ont été réalisées sur les sphérules de pyrite et leurs équivalents abiotiques (150°C – 10 jours). Au premier ordre, les sphérules de pyrite sont peu reconnaissables mais la matière organique qu'elles contiennent a été relativement préservée. Des analyses complémentaires et des expériences à des températures et des pressions plus élevées devront être menées, notamment en système ouvert permettant des variations brutales de température – similaires à celles auxquelles sont soumises les cheminées hydrothermales.
- Des échantillons provenant d'autres sites naturels actuels ont été analysés afin d'y rechercher des sphérules de pyrite. Une recherche plus approfondie et l'étude d'autres sites hydrothermaux seront nécessaires afin de tester si les sphérules de pyrite sont retrouvées dans des portions équivalentes – en terme de gradient de température – à celles observées dans cette étude.
- Enfin, nous avons également étudié un échantillon datant de 2.9Ga. Nous y avons détecté un filament enrichi en soufre contenant une matière organique cohérente avec de la matière organique biologique. L'interprétation de ces données nécessite une meilleure compréhension des expériences d'altération thermique et l'étude d'échantillons subactuels.

4.1. Fossilisation expérimentale des sphérules de pyrite et des équivalents abiotiques

Une question essentielle réside dans l'évolution des sphérules de pyrite une fois celles-ci soumises à l'effet de la diagenèse et/ou des conditions de pression et de température plus élevées que celles étudiées. Pouvons-nous toujours les identifier et donc les utiliser en tant que biosignatures ?

Dans les échantillons naturels du site hydrothermale TAG, des sphérules de pyrite contenant de la matière organique ont été observées mais des interrogations subsistent quant à leur caractère biogénique. Du fait d'épisodes de haute température, la recristallisation des sulfures et l'altération thermique du contenu en matière organique perturbent les caractéristiques de départ et les rendent difficilement identifiables. Des expériences d'altération thermique des sphérules biogéniques et d'équivalents abiotiques sont donc essentielles afin de comprendre leur évolution dans ces conditions.

Table 1 | Conditions expérimentales pour l'évolution des pyrites biogéniques et abiotiques à 150°C pendant 10j.

Echantillon	Contrôle négatif	Levure + tryptone	Carbone graphitique	KOD1
Milieu de base	- S(0) colloïdal 20mM - Na ₂ S 0.05% - FeSO ₄ 5mM - Acétate de sodium 0.83g/L	- S(0) colloïdal 20mM - Na ₂ S 0.05% - FeSO ₄ 5mM - Acétate de sodium 0.83g/L	- S(0) colloïdal 20mM - Na ₂ S 0.05% - FeSO ₄ 5mM - Acétate de sodium 0.83g/L	- S(0) colloïdal 20mM - Na ₂ S 0.05% - FeSO ₄ 5mM - Acétate de sodium 0.83g/L
Matière organique ajoutée		- Levure 1g/L - Tryptone 1g/L	- Carbone graphitique 2g/L	- Culture de TKOD1 10 ⁷ cellules/mL
Pyrite	Oui	Oui	Oui	Oui

Des résultats préliminaires ont été obtenus en soumettant les sphérules et les équivalents abiotiques à 150°C pendant 10 jours. Dans un premier temps, les pyrites ont été produites en bombes réactionnelles à 85°C pendant 96h selon les conditions décrites dans le Chapitre V, puis directement soumises à une température de 150°C pendant 10 jours – toujours en présence du milieu minéralisant. Les conditions et résultats sont récapitulés en Table 1.

A 150°C, on constate que des pyrites se forment dans le témoin négatif (Fig 3). Le milieu de culture des cellules contient de l'acétate de sodium à 0.83g/L, en plus de l'extrait de levure et de la tryptone ajoutés dans un second temps. Dans les expériences à 85°C, cette quantité d'acétate présente dans le milieu n'influence pas la précipitation de pyrite (cf Chapitre V). La solubilité augmentant avec la température, il est possible que cette quantité ait été suffisante pour induire la précipitation de pyrite à 150°C. Les pyrites formées en présence d'acétate de sodium se présentent sous forme de sphérules semblables à des framboïdes. Leur taille varie de <1µm à 5µm. Le spectre d'absorption au seuil K du carbone ne présente pas de pics d'absorption spécifiques (Fig 4).

Les pyrites formées en présence de carbone graphitique à 150°C – 10j sont reproductibles entre les deux répliques et présentent certaines caractéristiques semblables aux pyrites formées à 85°C – 96h. La gamme de taille est similaire, de submicrométrique à 1µm, et les cristaux automorphes sont reconnaissables bien que des phénomènes de recristallisation aient visiblement entraîné une augmentation de la taille des cristallites (Fig 3).

La morphologie en « rose des sables » avec des cristallites en plaquettes des pyrites produites à 85°C – 96h en présence de levure et de tryptone devient méconnaissable à 150°C – 10j (Fig 3). Après altération, les pyrites ressemblent fortement aux sphérules formées en présence de cultures de KOD1 (Chapitre IV, Chapitre V). Ces sphérules sont très abondantes dans le duplicat 1 et beaucoup plus rares dans le duplicat 2, quand bien même les quantités de levure et de tryptone sont identiques. Il est possible qu'il s'agisse d'une contamination de KOD1 dans ces deux duplicats. D'autres répliques sont nécessaires afin de tester l'évolution des pyrites formées en présence de levure et de tryptone.

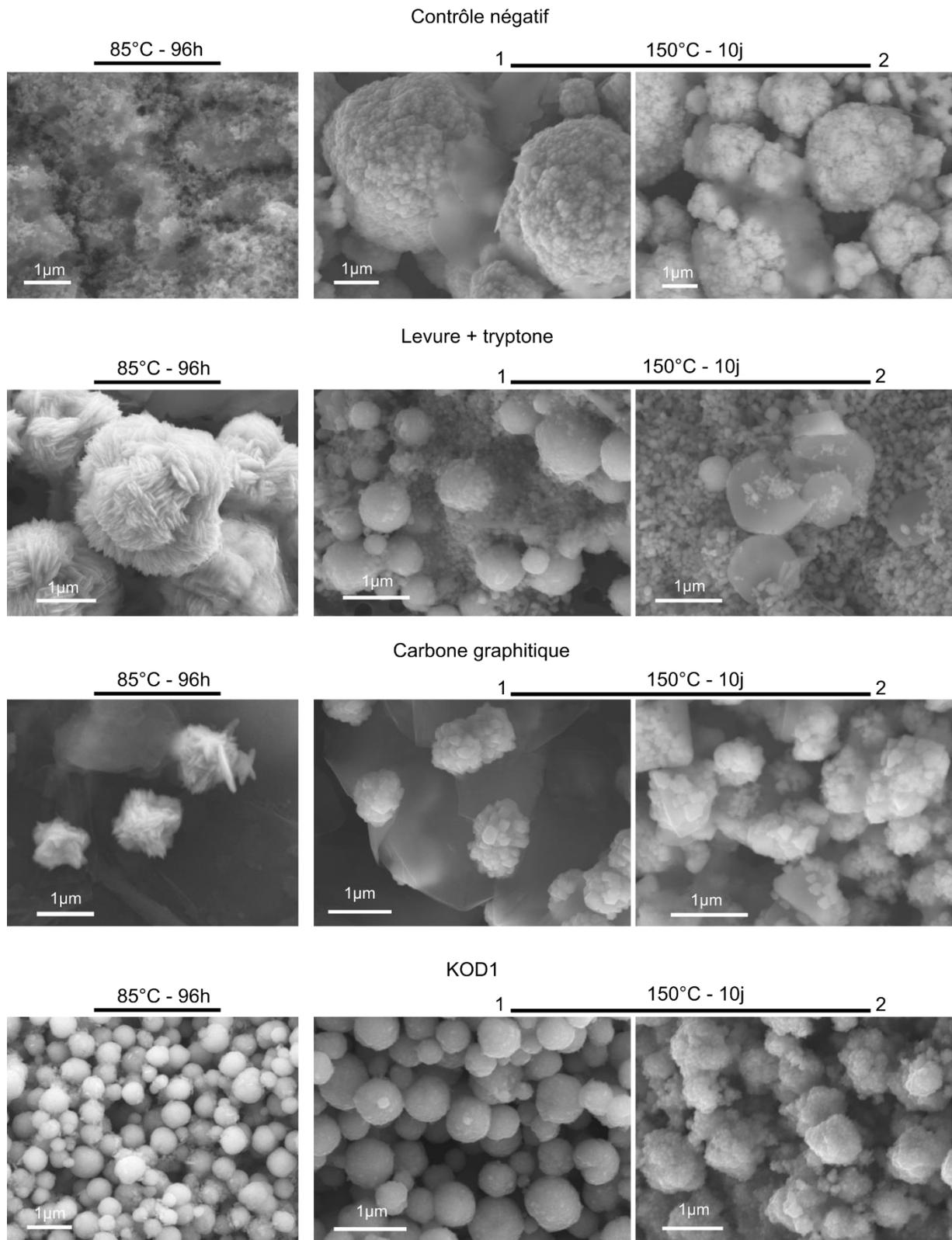


Figure 3 | Observations MEB des pyrites après altération à 150°C – 10 jours pour les conditions contrôle abiotique, levure + tryptone, carbone graphitique et KOD1, réalisées en duplicats notés 1 et 2 pour chaque condition, et comparés avec leurs équivalents à 85°C – 96h.

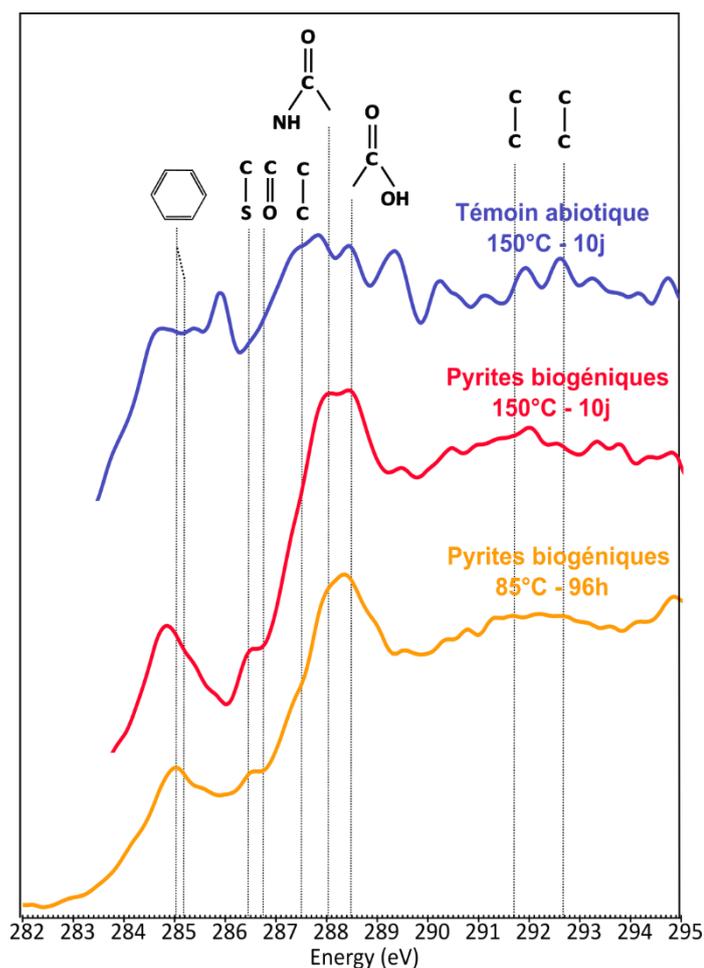


Figure 4 | Analyses XANES - STM au seuil du carbone sur des pyrites formées dans le contrôle abiotique en présence d'acétate ainsi que sur des pyrites biogéniques formées en présence de cultures de TKOD1 à 150°C - 10j et 85°C - 96h.

Enfin, l'altération des sphérules de pyrite formées en présence de cultures de TKOD1 donne des résultats différents entre les duplicats. Le premier présente des sphérules identiques à celles formées à 85°C - 96h, tandis que le deuxième présente des signes d'altération et de recristallisation. Les pyrites perdent leur forme de sphère bien définie et recristallisent, ce qui les rend peu reconnaissables (Fig 3). Toutefois, ces pyrites contiennent des composés organiques contenant des groupements aromatiques, amides, carboxyliques, ainsi que composés présentant des liaisons organo-soufrés, i.e. des composés organiques similaires à ceux détectés dans les pyrites biogéniques formées à 85°C - 96h, à l'exception des groupements aliphatiques (Fig 4). Il serait essentiel de réaliser d'autres répliqués et de caractériser ces pyrites au MET afin de tester si les caractéristiques cristallographiques sont reconnaissables après altération, malgré la recristallisation.

Pour aller plus loin dans l'altération des biosignatures, des analyses complémentaires et des expériences à des températures et des pressions plus élevées devront être menées, notamment en système ouvert. Cela permettrait de réaliser des variations brutales de température, similaires à celles des cheminées hydrothermales.

4.2. Analyses sur d'autres sites de cheminées hydrothermales actuelles

Durant cette thèse, nous avons principalement étudié des échantillons provenant du site hydrothermal TAG prélevés lors la campagne Bicose 2. D'autres échantillons de cheminées modernes ont été analysés de manière préliminaire, tels que des échantillons issus du site hydrothermal Snake Pit, exploré lors de la même campagne, analysés par DRX (Fig 5 et 6). Nous avons aussi étudié des transects horizontaux de cheminées localisées sur le 21^e parallèle de la dorsale est-Pacifique, prélevés lors de la campagne PHARE. Ces transects ont été inclus dans de la résine époxy, ce qui ne permet pas de réaliser des analyses XAS sur ces échantillons. Néanmoins, ils s'avèrent particulièrement intéressants pour observer la structure minéralogique des cheminées et la distribution des minéraux (Fig 7).

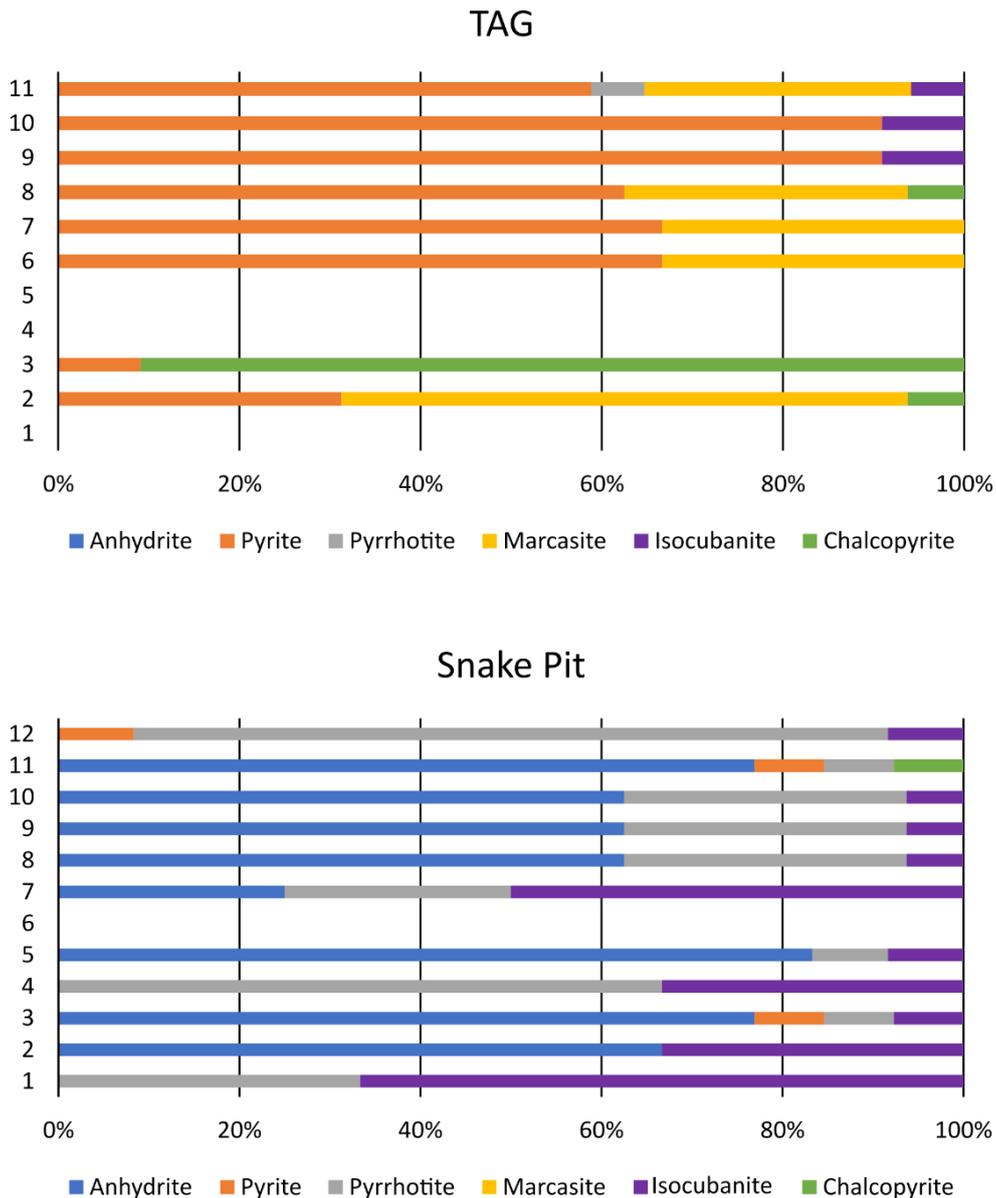


Figure 5 | Estimation de l'abondance relative des phases minérales basée sur les analyses DRX des échantillons issus des sites TAG et Snake Pit (campagne Bicose 2).

Des analyses DRX ont été réalisées sur les échantillons de la campagne Bicose 2 fournis par l'IFREMER, issus du site TAG et du site Snake Pit (les diffractogrammes de certains échantillons provenant du site hydrothermal TAG sont présentés en Chapitre VI). Basée sur ces analyses DRX, une estimation de l'abondance relative des phases minérales a été réalisée pour chacun des sites (Fig 5). *Nota bene*, ces données ne sont pas issues d'un affinement Rietveld mais d'un pourcentage estimé par le logiciel HighScore Plus. De ce fait, l'aspect quantitatif des données reste discutable, mais elles permettent d'avoir une vision qualitative de l'assemblage minéralogique global pour chacun des sites.

Bien que les deux sites hydrothermaux soient riches en soufre, on note une dominance de pyrite, de marcassite et de chalcopyrite dans les échantillons issus du site TAG, tandis que le site Snake Pit est dominé par l'anhydrite, la pyrrhotite et l'isocubanite (Fig 5). Cela pourrait s'expliquer par des différences dans la composition chimique du fluide hydrothermal, qui influe grandement la précipitation des phases minérales. Par exemple, le fluide du site TAG est bien plus riche en H₂ et H₂S tandis que celui du site Snake Pit est bien plus riche en CO₂ (Flores et al., 2011). Les analyses CHNS que nous avons réalisées sur des échantillons de Snake Pit, en parallèle de celles sur les échantillons de TAG, révèlent également un pourcentage plus bas de soufre (Fig 6). Or, la précipitation de pyrite/marcassite/pyrrhotite est influencée non seulement par la température, mais également par le pH, la concentration des réactifs et les conditions redox (Qian et al., 2011 ; Truche et al., 2010).

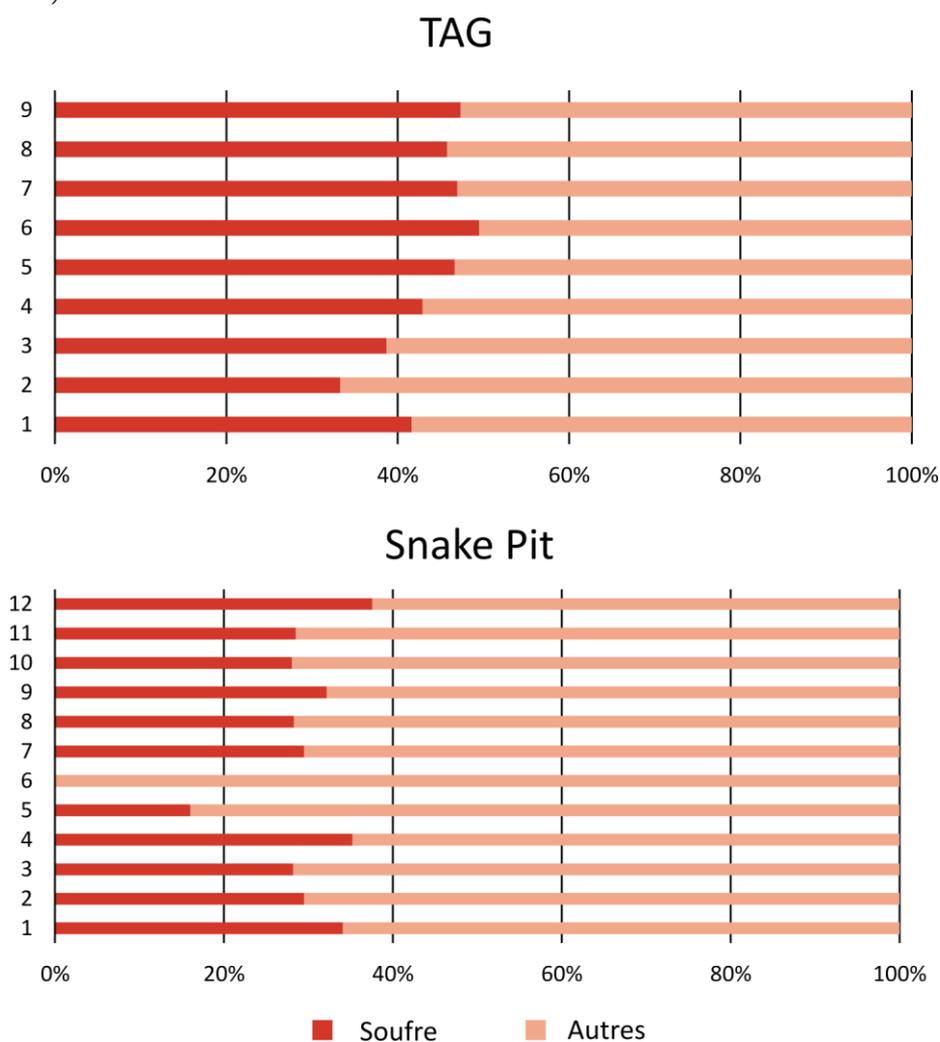


Figure 6 | Fraction massique du soufre basée sur des analyses CHNS des échantillons provenant des sites TAG et Snake Pit (campagne Bicose 2).

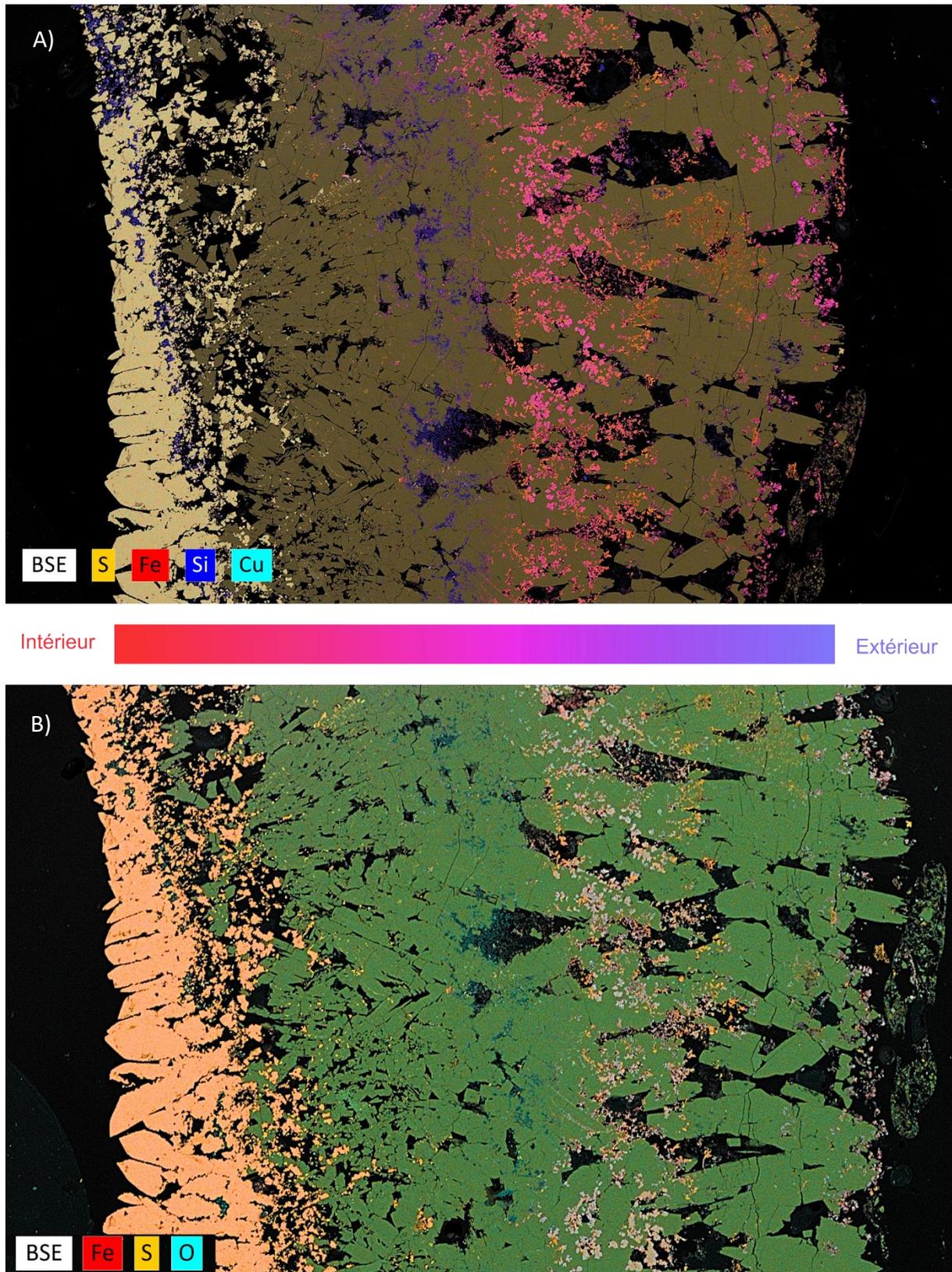


Figure 7 | Cartographie MEB-EDXS d'une section transversale de cheminée hydrothermale échantillonnée lors de la campagne PHARE (2002). **A)** Portions internes : dominance de chalcopyrites (jaune), quelques pyrites (orange) et de silicates (bleu). Portions intermédiaires et externes : dominance de silicates (bleu et rose) et de pyrites (orange). **B)** Le corps de la cheminée est dominé par les sulfates, i.e. anhydrite (vert). Des phases oxydées sont localisées sur les portions intermédiaires et externes, notamment des oxydes de fer (bleu).

Des observations MEB-EDXS ont été réalisées sur des coupes de cheminée issue de la campagne PHARE afin d'observer la distribution des minéraux et de localiser les pyrites dans la cheminée. On note une dominance de chalcopyrites dans la portion la plus interne de la structure, associée à quelques rares pyrites et à des silicates d'aluminium (Fig 7A). L'anhydrite domine dans les portions intermédiaires à externes (Fig 7B). Dans les portions intermédiaires, les silicates sont majoritaires, avec une zonation des silicates d'aluminium dans les zones les plus chaudes tandis que les silicates de fer et les oxydes de fer dominent dans les portions les plus externes (Fig 7A et B). Quelques pyrites ont été observées dans chacune des portions de la cheminée mais restent minoritaires.

Il y a donc une disparité dans l'abondance des pyrites en fonction du site hydrothermal. Les pyrites sont majoritaires que ce soit dans les portions internes, intermédiaires ou externes sur le site hydrothermal TAG, tandis qu'elles sont minoritaires sur le site Snake Pit et le site du 21^e parallèle de la dorsale est-Pacifique. Malgré ces disparités, une recherche plus approfondie devra être menée afin de vérifier si des sphérules de pyrite peuvent tout de même être trouvées.

4.3. Analyses sur des échantillons naturels anciens

Ces biosignatures offrirait également des perspectives quant à l'étude de la biosphère hyperthermophile dans des roches anciennes. Des preuves géologiques de l'existence des systèmes hydrothermaux remontent à environ 3.5Ga (e.g. Hofmann, 2011 ; Dodd et al., 2017), jusqu'à 4.2Ga pour certaines estimations (Russel et al, 1994). Mais la vie microbienne dans ces environnements anciens est peu connue. Runge et al. (2022) l'expliquent par (1) le faible potentiel de conservation des dépôts en eaux profondes, (2) l'oblitération des biosignatures au cours des temps géologiques et (3) la difficulté de distinguer les caractéristiques biogéniques des caractéristiques abiotiques.

De manière générale et dans tous les types d'environnements anciens, les biosignatures sont masquées, déformées par divers processus à l'échelle des temps géologiques. L'altération et la destruction des biosignatures commencent dans l'environnement lui-même puis se poursuivent tout au long de la diagenèse (e.g. Westall, 2005). Les signatures primaires préservées dans les roches peuvent également être obscurcies par la formation de minéraux secondaires ou l'intrusion de matière organique à des stades beaucoup plus avancés (e.g. Westall et Folk, 2003 ; Rasmussen et al., 2008 ; Summons et al., 2021). A cela s'ajoutent les biomorphes, qui ressemblent à des microfossiles mais dont l'origine est abiotique et qui, dans certains cas, peuvent même être mieux conservés dans les roches anciennes que des microorganismes (Nims et al., 2021). Par conséquent, à ce jour, aucune observation non ambiguë de microfossiles et/ou de biosignatures n'a été faite dans les roches hydrothermales anciennes (e.g. Dodd et al., 2017).

Seuls des échantillons modernes ont été présentés dans ce manuscrit de thèse, mais des échantillons anciens ont également été analysés au cours de ce travail afin d'avoir une première idée de ce que l'on peut observer dans des roches anciennes. Ces observations devront ensuite être affinées à la lumière des expériences de fossilisation expérimentale et d'analyses d'échantillons subactuels. Un travail préliminaire a été effectué sur des associations pyrite/matière organique d'un échantillon datant de 2.9 Ga et provenant du camp minier de Red Lake, Ontario, en collaboration avec Pierre Sans-Jofre, responsable de la collection de roches du MNHN.

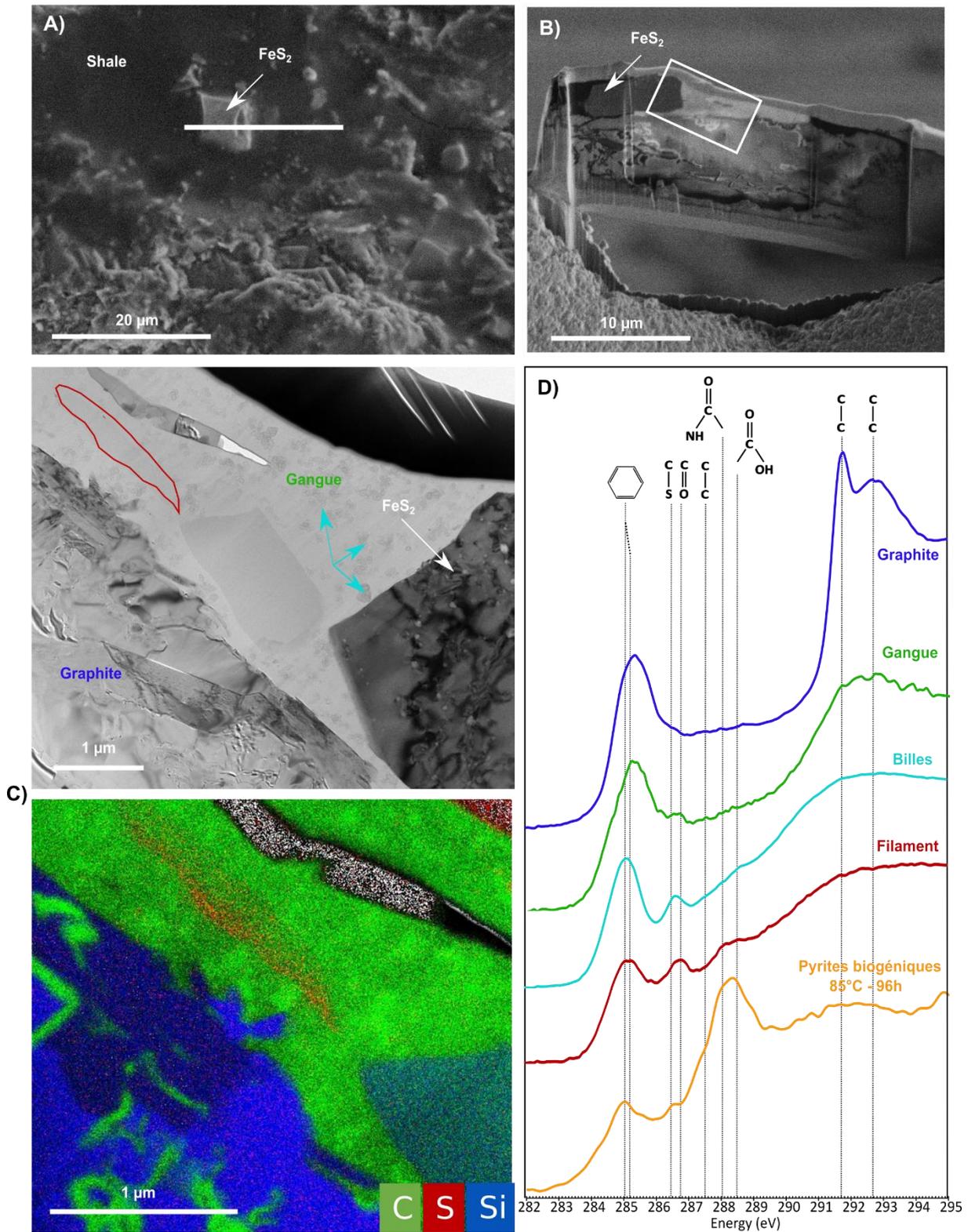


Figure 8 | A) Localisation MEB pour la réalisation de la lame FIB. **B)** Observation MEB de la lame FIB réalisée sur une pyrite se trouvant au milieu de matière organique. **C)** Observation MET-EDXS de la lame FIB, avec un filament enrichi en soufre (en rouge) pris dans une gangue de matière organique (vert) dans laquelle se trouve des amas de billes (flèches bleu clair). Les veines de graphite sont localisées dans des silicates **D)** Analyses STXM-XANES des différents composés comparés au spectre XANES de pyrites biogéniques formées à 85°C – 96h : le filament (rouge), les billes (bleu clair), la gangue (vert), le graphite (bleu).

La roche provient de mines aurifères qui présentent des gisements de fer rubanés riches en sulfures de fer (SFBIF pour *Sulphide Facies Iron Banded Formation*), notamment en pyrites, datant de l'Archéen (Tarnocai et Hattori, 1997). Il s'agit d'une zone qui présente majoritairement un métamorphisme de faible intensité (Kowalski, 1983). La roche est constituée d'alternances de pyrites et de shales. La présence d'une telle quantité de matière organique à 2.9 Ga, corrélée à celle de pyrites, constitue logiquement une cible d'intérêt, bien qu'il ne s'agisse à priori pas d'un échantillon de cheminée hydrothermale.

Des analyses MET et STXM-XANES au seuil du carbone ont été réalisées sur une lame FIB extraite d'une pyrite localisée au milieu d'un amas de matière organique (Fig 8A et B). Aux abords de la pyrite, un filament enrichi en soufre a été détecté dans une gangue de matière organique (Fig 8C). Les composés organiques présents dans ce filament contiennent des groupes fonctionnels aromatiques, des liaisons C-S, des carbonyles, des aliphatiques, des amides et des carboxyliques (Fig 8D). Étonnamment, la matière organique du filament est peu aromatisée par rapport aux autres composés organiques du shale, plus riches en groupes aromatiques et en aliphatiques typiques des composés graphitiques (Fig 8D). Bien que présentant des signes d'altération thermique – abondance de groupements aromatiques – le filament riche en soufre contient des groupements caractéristiques de ceux détectés dans les expériences de minéralisation de procaryotes, dont des groupements amides. De telles observations sont prometteuses pour la recherche de traces de vie anciennes car elles suggèrent que certaines caractéristiques, ici la signature chimique du carbone, pourraient être conservées à l'échelle des temps géologiques.

Pour aller plus loin, il sera évidemment essentiel d'analyser des échantillons de cheminées hydrothermales anciennes. En premier lieu, il est surtout nécessaire d'étudier des échantillons subactuels, intermédiaires des roches anciennes et des fumeurs noirs modernes. Le site hydrothermal TAG offre une cible de choix car il est constitué d'un champ de cheminées inactives qui forment une plateforme externe autour du mont central actif (cf Chapitre VI). Les cheminées inactives localisées à l'extérieur sont âgées de quelques dizaines de milliers d'années, ce qui peut offrir une première approche quant au devenir des sphérules de pyrite détectées dans les cheminées modernes du même site. En collaboration avec l'IFREMER, une prochaine campagne est prévue en octobre 2023 et permettra d'aller récolter des échantillons de cheminées fossiles du site hydrothermal TAG, qui seront au centre de futures recherches sur les biosignatures dans les fumeurs noirs.

De nombreuses pistes sont encore à explorer, que ce soit au niveau des mécanismes de formation des biosignatures, de leur caractérisation en elle-même, de la possibilité de former des équivalents abiotiques, ou encore de l'étude des échantillons naturels, actuels et anciens.

Bien loin d'apporter une réponse définitive quant à la présence de vivant à l'intérieur des cheminées hydrothermales, ce travail permet toutefois de poser des bases pour la recherche de traces de vie dans ces environnements. Adopter une approche aussi bien expérimentale que naturaliste et des méthodes interdisciplinaires, tout en s'interrogeant sur les concepts que nous utilisons, offre des perspectives prometteuses sur lesquelles de futurs travaux pourront s'appuyer.

Références

- Böttcher M. E., Thamdrup B., Vennemann T. W. (2001), Oxygen and sulfur isotope fractionation during anaerobic bacterial disproportionation of elemental sulfur. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65, 1601–1609.
- Bouix M., Ghorbal S., Picque D., Perret B., Saulou-Bérion C. (2022), A rapid method for the assessment of the vitality of microorganisms using flow cytometry. *Cytometry Part A* 101(7), 577-587.
- Bradley A. S., Leavitt W. D., Schmidt M., Knoll A. H., Girguis P. R., Johnston D. T. (2016), Patterns of sulfur isotope fractionation during microbial sulfate reduction. *Geobiology*, 14(1), 91-101.
- Breeuwer P., Drocourt J.-L., Bunschoten N., Zwietering M.H., Rombouts F.M., Abee T. (1995), Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Applied Environmental Microbiology* 61, 1614–9.
- Bremer H. et Dennis P.P. (2008), Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell at Different Exponential Growth Rates. *EcoSal Plus* 3(1).
- Bridger S., Clarkson S., Stirrett K., DeBarry M., Lipscomb G., Schut G., Westpheling J., Scott R., Adams M. (2011), Deletion strains reveal metabolic roles for key elemental sulfur-responsive proteins in *Pyrococcus furiosus*, *Journal of Bacteriology* 193(23), 6498–6504.
- Brunner B., Bernasconi S. M., Kleikemper J., Schroth M. H. (2005). A model for oxygen and sulfur isotope fractionation in sulfate during bacterial sulfate reduction processes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69, 4773–4785.
- Butler I. B., Böttcher M. E., Rickard D., Oldroyd A. (2004), Sulfur isotope partitioning during experimental formation of pyrite via the polysulfide and hydrogen sulfide pathways: implications for the interpretation of sedimentary and hydrothermal pyrite isotope records. *Earth and Planetary Science Letters*, 228(3-4), 495-509.
- Canfield D. E., Thamdrup B. (1994). The production of ^{34}S -depleted sulfide during bacterial disproportionation of elemental sulfur. *Science*, 266, 1973–1975.
- Canfield D. E., Farquhar J., Zerkle A. L. (2010). High isotope fractionations during sulfate reduction in a low-sulfate euxinic ocean analog. *Geology*, 38, 415–418.
- Cowan D.A. et Tow L.H. (2004), Endangered Antarctic Environments. *Annual Review of Microbiology* 58, 649-690.
- Crowe S. A., Paris G., Katsev S., Jones C., Kim S.-T., Zerkle A., Nomosatryo S., Fowle D., Adkins J., Sessions A., Farquhar J., Canfield, D. E. (2014). Sulfate was a trace constituent of Archean seawater. *Science*, 346, 735–739.
- Dodd M., Papineau D., Grenne T. et al. (2017), Evidence for early life in Earth's oldest hydrothermal vent precipitates. *Nature* 543, 60–64.
- Eigenbrode J. L., Freeman K. H. (2006). Late Archean rise of aerobic microbial ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 15759–15764.
- Findlay A., Gartman A., Shaw T., Luther G. (2015), Trace metal concentration and partitioning in the first 1.5m of hydrothermal vent plumes along the Mid-Atlantic Ridge: TAG, Snakepit, and Rainbow, *Chemical Geology* 412, 117-131.

- Flores G., Campbell J., Kirshtein J., Meneghin J., Seewald J., Tivey M., Voytek M., Yang Z., Reysenbach A-L. (2011), Microbial community structure of hydrothermal deposits from geochemically different vent fields along the Mid-Atlantic Ridge, *Environmental Microbiology* 13(8), 2158–2171.
- Gomes M. L., Hurtgen M. T. (2013). Sulfur isotope systematics of a euxinic, low-sulfate lake: Evaluating the importance of the reservoir effect in modern and ancient oceans. *Geology*, 41, 663–666.
- Gomes M. L., Klatt J. M., Dick G. J., Grim S. L., Rico K. I., Medina M., Fike D. A. (2022), Sedimentary pyrite sulfur isotope compositions preserve signatures of the surface microbial mat environment in sediments underlying low-oxygen cyanobacterial mats. *Geobiology*, 20(1), 60-78.
- Gorlas A., Marguet E., Gill S., Geslin C., Guigner J.-M., Guyot F., Forterre P. (2015), Sulfur vesicles from Thermococcales: A possible role in sulfur detoxifying mechanisms. *Biochimie*, 118, 356-364.
- Habicht K. S., Canfield D. E. (1997). Sulfur isotope fractionation during bacterial sulfate reduction in organic-rich sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61, 5351–5361.
- Hayes J. M. (2001), Fractionation of the isotopes of carbon and hydrogen in biosynthetic processes. In J. W. Valley & D. R. Cole (Eds.), *Stable Isotope Geochemistry, Reviews in Mineralogy and Geochemistry* (pp. 225–277). Mineralogical Society of America, Geochemical Society.
- Herwald S., Liu A., Zhu B., Sea K., Lopez K., Sazinsky M., Crane E. (2013) Structure and substrate specificity of the pyrococcal coenzyme A disulphide reductases/polysulfide reductases (CoADR/Psr): implications for S(0)-based respiration and a sulfur-dependent antioxidant system in *Pyrococcus*, *Biochemistry* 52(16), 2764–2773.
- Hoefs J. (2021), *Stable isotope geochemistry*. Springer textbooks in earth sciences, geography and environment. Springer International Publishing.
- Hofmann A. (2011), Archaean hydrothermal Systems in the Barberton Greenstone belt and their significance as a habitat for early life. In S. D. Golding & M. Glikson (Eds.), *Earliest life on earth: Habitats, environments and methods of detection* (pp. 51–78). Springer.
- Horita J. et Berndt M. E. (1999), Abiogenic methane formation and isotopic fractionation under hydrothermal conditions. *Science* 285(5430), 1055-1057.
- Horita J. (2005), Stable isotope thermometry: there is more to it than temperature. *Geochemical Journal* 39(6), 481-496.
- Jørgensen, B. B., Findlay, A. J., & Pellerin, A. (2019). The biogeochemical sulfur cycle of marine sediments. *Frontiers in Microbiology*, 10, 849.
- Kobori H., Ogino M., Orita I., Nakamura S., Imanaka T., Fukui T. (2010), Characterization of NADH oxidase/NADPH polysulfide oxidoreductase and its unexpected participation in oxygen sensitivity in an anaerobic hyperthermophilic archaeon, *Journal of Bacteriology* 192(19), 5192–5202.
- Kowalski B. (1983), Cobalt and Nickel Content in Pyrite from Gold Mineralization and Sulphide Facies Banded Iron Formation, Dickenson Mine, Red Lake, Ontario; Implication for Ore Genesis. McMaster University, Hamilton, Ontario, 88p.
- Marin-Carbonne J., Busigny V., Miot J., Rollion-Bard C., Muller E., Drabon N., Philippot P. (2020), In Situ Fe and S isotope analyses in pyrite from the 3.2 Ga Mendon Formation (Barberton Greenstone Belt, South Africa): Evidence for early microbial iron reduction. *Geobiology*, 18(3), 306-325.

- Marin-Carbonne J., Decraene M. N., Havas R., Remusat L., Pasquier V., Alléon J., Thomazo C. (2022), Early precipitated micropyrrite in microbialites: a time capsule of microbial sulfur cycling. *Geochemical Perspectives Letters* 21, 7-12.
- McCullom T. M. et Seewald J. S. (2001), A reassessment of the potential for reduction of dissolved CO₂ to hydrocarbons during serpentinization of olivine. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65(21), 3769-3778.
- McCullom T. M. et Seewald J. S. (2006). Carbon isotope composition of organic compounds produced by abiotic synthesis under hydrothermal conditions. *Earth and Planetary Science Letters*, 243, 74–84.
- Merino N., Aronson H.S., Bojanova D.P., Feyhl-Buska J., Wong M.L., Zhang S., Giovannelli D. (2019), Living at the Extremes: Extremophiles and the Limits of Life in a Planetary Context. *Frontiers in Microbiology* 10, 780.
- Nabeh N., Brokaw C., Picard A. (2022), Quantification of Organic Carbon Sequestered by Biogenic Iron Sulfide Minerals in Long-Term Anoxic Laboratory Incubations. *Frontiers in Microbiology* 13, 662219.
- Nercessian O., Reysenbach A.L., Prieur D., Jeanthon C. (2003), Archaeal diversity associated with in situ samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise (13 degrees N). *Environmental Microbiology* 5, 492-502.
- Nims C., Lafond J., Alleon J., Templeton A.S., Cosmidis J. (2021), Organic biomorphs may be better preserved than microorganisms in early Earth sediments. *Geology* 49 (6), 629–634.
- Norris P., Burton N., Foulis N. (2000), Acidophiles in bioreactor mineral processing. *Extremophiles* 4, 71–76.
- Penger J., Conrad R., Blaser M. (2012), Stable carbon isotope fractionation by methylotrophic methanogenic archaea. *Applied and environmental microbiology*, 78(21), 7596-7602.
- Qian G., Xia F., Brugger J., Skinner W. M., Bei J., Chen G., Pring A. (2011), Replacement of pyrrhotite by pyrite and marcasite under hydrothermal conditions up to 220 C: An experimental study of reaction textures and mechanisms. *American Mineralogist*, 96(11-12), 1878-1893.
- Rasmussen B., Fletcher I. R., Brocks J. J., Kilburn M. R. (2008), Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria. *Nature* 455, 1101–1104.
- Runge E. A., Mansor M., Kappler A., Duda J.-P. (2022), Microbial biosignatures in ancient deep-sea hydrothermal sulfides. *Geobiology* 21, 355–377.
- Russell M. J., Daniel R. M., Hall A. J., Sherringham J. A. (1994), A hydrothermally precipitated catalytic iron sulphide membrane as a first step toward life. *Journal of Molecular Evolution* 39, 231–243.
- Schidlowski, M. (2001). Carbon isotopes as biogeochemical recorders of life over 3.8 Ga of Earth history: Evolution of a concept. *Precambrian Research*, 106, 117–134.
- Schrenk M., Kelley D., Delaney J., Baross J. (2003), Incidence and diversity of microorganisms within the walls of an active deep-sea sulfide chimney, *Applied and Environmental Microbiology* 69 (6), 3580–3592.
- Schut G. J., Bridger S. L., Adams M. W. W. (2007). Insights into the metabolism of elemental sulfur by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: characterization of a coenzyme A-dependent NAD(P)H sulfur oxidoreductase. *Journal of Bacteriology* 189, 4431–4441.
- Sephton M. A. et Gilmour I. (2001), Compound-specific isotope analysis of the organic constituents in carbonaceous chondrites. *Mass Spectrometry Reviews*, 20, 111–120.

- Sephton M. A., Verchovsky A. B., Bland P. A., Gilmour I., Grady M. M., Wright I. P. (2003), Investigating the variations in carbon and nitrogen isotopes in carbonaceous chondrites. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67, 2093–2108.
- Sim M. S., Bosak T., Ono S. (2011). Large sulfur isotope fractionation does not require disproportionation. *Science*, 333, 74–77.
- Stetter K.O. (1999), Extremophiles and their adaptation to hot environments, *FEBS Letters* 452(1–2), 22-25.
- Summons R. E., Welander P. V., Gold D. A. (2021), Lipid biomarkers: Molecular tools for illuminating the history of microbial life. *Nature Reviews Microbiology* 20, 174–185.
- Takai K., Komatsu T., Inagaki F., Horikoshi, K. (2001), Distribution of archaea in a black smoker 785 chimney structure. *Applied Environmental Microbiology* 67, 3618–3629.
- Takai K., Nakamura K., Toki T., Tsunogai U., Miyazaki M., Miyazaki J., Hirayama H., Nagakawa S., Nunoura T., Horikoshi K. (2008), Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *PNAS* 105 (31), 10949-10954.
- Tarnocai C., Hattori K., (1997), « Invisible » gold in sulfides from the Campbell Mine, Red Lake Greenstone belt, Ontario : Evidence for mineralization during the peak of metamorphism. *The Canadian Mineralogist* 35, 805-815.
- Truche L., Berger G., Destrigneville C., Guillaume D., Giffaut E. (2010), Kinetics of pyrite to pyrrhotite reduction by hydrogen in calcite buffered solutions between 90 and 180 C: Implications for nuclear waste disposal. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74(10), 2894-2914.
- Truong C., Bernard S., Le Pape P., Morin G., Baya C., Merrot P., Gorlas A., Guyot F. (2023), Production of carbon-containing pyrite spherules induced by hyperthermophilic Thermococcales: a biosignature? *Frontiers in Microbiology* 14, 1145781.
- Westall F. et Folk R. L. (2003), Exogenous carbonaceous microstructures in Early Archaean cherts and BIFs from the Isua Greenstone Belt: Implications for the search for life in ancient rocks. *Precambrian Research* 126, 313–330.
- Westall F. (2005), Life on the early Earth: A sedimentary view. *Science* 308, 366–367.
- Williford K. H., Van Kranendonk M. J., Ushikubo T., Kozdon R., Valley J. W. (2011), Constraining atmospheric oxygen and seawater sulfate concentrations during Paleoproterozoic glaciation: In situ sulfur three-isotope microanalysis of pyrite from the Turee Creek Group, Western Australia. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(19), 5686-5705.

Références

- Abreu F., Martins J.L., Silveira T.S., Keim C.N., de Barros H.G.P.L., Filho F.J.G., Lins U. (2007), 'Candidatus Magnetoglobus multicellularis', a multicellular, magnetotactic prokaryote from a hypersaline environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1318–1322.
- Abreu F., Silva K. T., Farina M., Keim C. N., Lins U. (2008), Greigite magnetosome membrane ultrastructure in 'Candidatus Magnetoglobus multicellularis'. *International Microbiology*, 11(2), 75-80.
- Adams M. W., Holden J. F., Menon A. L., Schut G. J., Grunden A. M., Hou C., Hutchins A. M., Jenney F. E. Jr., Kim C., Ma K., Pan G., Roy R., Sapro R., Story S. V., Verhagen M. F. (2001), Key role for sulfur in peptide metabolism and in regulation of three hydrogenases in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Bacteriology* 183, 716–724.
- Amend J.P., McCollom T.M., Hentscher M., Bach W. (2011), Catabolic and anabolic energy for chemolithoautotrophs in deep-sea hydrothermal systems hosted in different rock types. *Geochimica Cosmochimica Acta* 75 (19), 5736–5748.
- Anantharaman K., Breier J.A. Sheik C. S., Dick G.J. (2013), Evidence for hydrogen oxidation and metabolic plasticity in widespread deep-sea sulfur-oxidizing bacteria. *PNAS USA* 110, 330–335.
- Anon (1895), Eozoon: Requiescat in Pace. *Natural Sciences* 6, 75-76.
- Arató B., Szányi Z., Flies C., Schüler D., Frankel R.B., Buseck P.R., Pósfai M. (2005), Crystal-size and shape distributions of magnetite from uncultured magnetotactic bacteria as a potential biomarker. *American Mineralogist* 90, 1233-1241.
- Arrhenius G., J.L. Bada, G.F. Joyce, A. Lazcano, S. Miller, L.E. Orgel. (1999), Origin and ancestor: separate environments. *Science* 283, 792.
- Atomi H., Fukui T., Kanai T., Morikawa M., Imanaka T. (2004), Description of *Thermococcus kodakaraensis* sp. nov., a well-studied hyperthermophilic archaeon previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1. *Archaea* 1, 263 – 267.
- Atomi H. and Reeve J. (2019), Microbe Profile: *Thermococcus kodakarensis*: the model hyperthermophilic archaeon. *Microbiology* 165, 1166–1168.
- Awramik S.M., Schopf J.W., Walter M.R (1983), Filamentous Fossil Bacteria from the Archean of Western Australia, eds B. Nagy, R. Weber, J.C. Guerrero, M. Schidlowski, *Developments in Precambrian Geology*, Elsevier 7, 249-266.
- Awramik S. M. et Grey K. (2005), Stromatolites: biogenicity, biosignatures, and bioconfusion. In *Astrobiology and Planetary Missions SPIE 5906*, pp. 227-235.
- Bada J. L., Miller S. L., Zhao, M. (1995), The stability of amino acids at submarine hydrothermal vent temperatures. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 25, 111-118.
- Baker E. T., German C. R., Elderfield H. (1995), Hydrothermal plumes over spreading-center axes: Global distributions and geological inferences. *Geophysical Monograph-American Geophysical Union* 91, 47-47.
- Baker M.C., Ramirez-Llodra E.Z., Tyler P.A., German C.R., Boetius A., Cordes E.E., Dubilier N., Fisher C.R., Levin L.A., Metaxas A., Rowden A.A., Santos R.S., Shank T.M., VanDover C.L., Young C.M., Warén A. (2010). Biogeography, ecology and vulnerability of chemosynthetic ecosystems in the deep sea. In: McIntyre, A.D.(Ed.), *Life in the World's Oceans*. Wiley-Blackwell, Chichester, WestSussex, U.K.,161–182.

- Baker B.J., Lesniewski R.A., Dick G.J. (2012), Genome-enabled transcriptomics reveals archaeal populations that drive nitrification in a deep-sea hydrothermal plume. *ISME Journal* 6, 2269–2279.
- Balkwill D.L., Maratea D., Blakemore R.P. (1980), Ultrastructure of a magnetic spirillum. *Journal of Bacteriology* 141, 1399-1408.
- Bandy A.R., Maroulis P.J., Wilner L.A., Torres A.L. (1982), Estimates of the fluxes of nitric oxide, sulfur dioxide, hydrogen sulfide, carbon disulfide, and carbonyl sulfide from Mt. St. Helens deduced from in situ plume concentration measurements. *Geophysical Research Letters* 9, 1097–1100.
- Banfield J., Zhang H. (2001), Nanoparticles in the environment. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 44, 1-58.
- Baross J. A. et Deming J. W. (1985), *Bulletin of the Biological Society of Washington* 6, 355-371.
- Baross J. A. et Hoffman S. E. (1985), Submarine hydrothermal vents and associated gradient environments as sites for the origin and evolution of life. *Origins Life Evol. B* 15, 327–345.
- Barton P. B. Jr., Skinner B.J. (1979), Sulfide mineral stabilities. In: *Geochemistry of hydrothermal ore deposits*, 2nd edn. J. Wiley, New York, 278-403.
- Barton C., (2002), Marie Tharp, oceanographic cartographer, and her contributions to the revolution in the Earth sciences. *Geological Society, London, Special Publications* 192, 215 – 228.
- Bäuerlein E. (2003), Biomineralization of unicellular organisms: An unusual membrane biochemistry for the production of inorganic nano- and microstructures, *Angewandte Chemie International Edition* 42, 614-641.
- Baya C., Le Pape P., Baptiste B., Brest J., Landrot G., Elkaim E., Noël V., Blanchard M., Ona-Nguema G., Juillot F. and Morin G. (2021), Influence of trace level As or Ni on pyrite formation kinetics at low temperature. *Geochimica Cosmochimica Acta* 300, 333–353.
- Bayliss P. (1977), Crystal structure refinement of a weakly anisotropic pyrite. *American Mineralogist*, 62(11-12), 1168–1172.
- Bazylinski D. (1995), Structure and function of the bacterial magnetosome. *ASM News* 61, 337-343.
- Bazylinski D., Frankel R., Heywood B.R., Mann S., King J.W., Donaghay P.L., Hanson A.K. (1995), Controlled biomineralization of magnetite (Fe₃O₄) and greigite (Fe₃S₄) in a magnetotactic bacterium. *Applied Environmental Microbiology* 61, 3232-3239.
- Bazylinski D. et Frankel R. (2000a) Magnetic iron oxide and iron sulfide minerals within organisms. In : *Biomineralization: From Biology to Biotechnology and Medical Application*. Bäuerlein E (ed) Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 25-46.
- Bazylinski D. et Frankel R. (2000b) Biologically controlled mineralization of magnetic iron minerals by magnetotactic bacteria. In: *Environmental Microbe-Mineral Interactions*. Lovley DR (ed) ASM Press, Washington, DC, 109-144.
- Bazylinski D, Frankel R. (2003), Biologically Controlled Mineralization in Prokaryotes. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 54 (1), 217–247.
- Beaulieu S. E., Baker E. T., German C. R. (2015), Where are the undiscovered hydrothermal vents on oceanic spreading ridges? *Deep-Sea Research II* 121, 202–212.
- Beaulieu S. E. et Szafranski K. (2018), *InterRidge Global Database of Active Submarine Hydrothermal Vent Fields*, Version 3.4. World Wide Web Electronic Publication.

- Bebié J. et Schoonen M.A.A. (2000), Pyrite surface interaction with selected organic aqueous species under anoxic conditions. *Geochemical Transactions* 1, 47,
- Becker K. and von Herzen, R.P. (1996). Pre-drilling observations of conductive heat flow at the TAG active mound using ALVIN. In: Humphris, S.E., Herzig, P.M., Miller, D.J. (Eds.), *Proc. ODP Init. Repts.*, 158. College Station, TX (Ocean Drilling Program), 23–29.
- Belkhou R., Stanescu S., Swaraj S., Besson A., Ledoux M., Hajlaoui M., Dalle D. (2015), HERMES: a soft X-ray beamline dedicated to X-ray microscopy, *Journal of Synchrotron Radiation*, 22(4), 968-979.
- Benning L., Wilkin R., Barnes H. (2000), Reaction pathways in the Fe–S system below 100°C. *Chemical Geology*, 167, 25–51.
- Benzerara K., Menguy N., López-García P., Brown G. Jr. (2006), Nanoscale detection of organic signatures in carbonate microbialites, *PNAS*, 103 (25), 9440-9445.
- Benzerara K. et Menguy N. (2009), Looking for traces of life in minerals. *Comptes Rendus Palevol* 8(7), 617-628
- Benzerara, K. (2011), Biomineralization. In *Encyclopedia of Astrobiology*; Gargaud, M., Irvine, W.M., Amils, R., James, H., Cleaves, J., II, Pinti, D.L., Quintanilla, J.C., Rouan, D., Spohn, T., Tirard, S., et al., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany.
- Berar J.-F. et Baldinozzi G. (1998), XND code: From X-ray laboratory data to incommensurately modulated phases. *Rietveld modeling of complex materials. CPD Newsletter* 20, 3–5.
- Berg J., Duverger A., Cordier L., Laberty-Robert C., Guyot F., Miot J. (2020), Rapid pyritization in the presence of a sulfur/sulfate-reducing bacterial consortium. *Scientific Reports* 10, 8264.
- Bergh S. V. (1928), Fossilifierade svavelbakterier uti alunskiffern på Kinnekulle. *Geologiska Föreningen i Stockholm Förhandlingar* 50(3), 413–418.
- Bernard S., Benzerara K., Beyssac O., Brown G.E., Grauvogel Stamm L., Düringer P. (2009), Ultrastructural and chemical study of modern and fossil sporoderms by Scanning Transmission X517 ray Microscopy (STXM), *Review of Palaeobotany and Palynology* (1–2), 248-261.
- Bernard S., Benzerara K., Beyssac O., Brown G. E. (2010), Multiscale characterization of pyritized plant tissues in blueschist facies metamorphic rocks. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74(17), 5054–5068.
- Bernard S., Jacquemot P., Criouet I., Viennet J. C., Jaber M. (2021), Experimental fossilization of the RNA World in the presence of clay minerals. *Goldschmidt 2021*, 4-9 July.
- Berner R.A. (1982), Burial of organic carbon and pyrite sulfur in the modern ocean: its geochemical and environmental significance. *American Journal of Science* 282, 451-473.
- Berner R.A. et Raiswell R. (1983), Burial of organic carbon and pyrite sulfur in sediments over Phanerozoic time: a new theory. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 47, 855-862.
- Bessière M. (1996), Introduction au rayonnement synchrotron et à ses avantages. *Le Journal de Physique IV* 06, C4-511-C4-535.
- Beveridge T.J. (1989), Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization, *Annual Review of Microbiology* 43, 147-171.
- Bish D. et Post J. E. (1993), Quantitative mineralogical analysis using the rietveld full-pattern fitting method. *American Mineralogist* 789, 932–940.
- Blakemore R.P. (1975), Magnetotactic bacteria. *Science* 190, 377-379.

- Blakemore R.P. (1982), Magnetotactic bacteria. *Annual Review of Microbiology* 36, 217-238.
- Blöch E., Rachel R., Burggraf S., Hafenbradl D., Jannasch H., Setter K., (1997), *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. Nov., represents a novel group of archaea, extending the upper limit for life at 113°C. *Extremophiles* 1, 14-21.
- Blumenberg M., Seifert R., Petersen S., Michaelis W. (2007), Biosignatures present in a hydrothermal massive sulfide from the Mid-Atlantic Ridge, *Geobiology* 5, 435-450.
- Bouix M., Ghorbal S., Picque D., Perret B., Saulou-Bérion C. (2022), A rapid method for the assessment of the vitality of microorganisms using flow cytometry. *Cytometry Part A* 101(7), 577-587.
- Bragg W. L. (1913), The structure of some crystals as indicated by their diffraction of X-rays. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 89(610), 248-277.
- Brasier M., Green O., Jephcoat A. P., Kleppe A. K., Van Kranendonk M. J., Lindsay J., Steele A., Grassineau N. V. (2002), Questioning the evidence for Earth's oldest fossils. *Nature* 416, 76-81.
- Brasier M., Green O., Lindsay J. et al. (2004), Earth's Oldest (~ 3.5 Ga) Fossils and the 'Early Eden Hypothesis': Questioning the Evidence. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 34, 257-269.
- Brasier M., Green O., Lindsay J., McLoughlin N., Steele A., Stoakes C. (2005), Critical testing of Earth's oldest putative fossil assemblage from the ~3.5Ga Apex chert, Chinaman Creek, Western Australia. *Precambrian Research* 140, 55-102.
- Brasier M., McLoughlin N., Green O., Wacey D. (2006), A fresh look at the fossil evidence for early Archaean cellular life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361, 887-902.
- Brasier M., Antcliffe J., Saunders M., Wacey D. (2015), Changing the picture of Earth's earliest fossils (3.5-1.9 Ga) with new approaches and new discoveries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 4859-4864.
- Braun D., Goddard N.L., Libchaber A. (2003), Exponential DNA replication by laminar convection. *Physical Review Letters* 91, 158103.
- Breeuwer P., Drocourt J.-L., Bunschoten N., Zwietering M.H., Rombouts F.M., Abee T. (1995), Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Applied Environmental Microbiology* 61, 1614-9.
- Bremer H. et Dennis P.P. (2008), Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell at Different Exponential Growth Rates. *EcoSal Plus* 3(1).
- Bridger S., Clarkson S., Stirrett K., DeBarry M., Lipscomb G., Schut G., Westpheling J., Scott R., Adams M. (2011), Deletion strains reveal metabolic roles for key elemental sulfur-responsive proteins in *Pyrococcus furiosus*, *Journal of Bacteriology* 193(23), 6498-6504.
- Brunner B., Bernasconi S. M., Kleikemper J., Schroth M. H. (2005). A model for oxygen and sulfur isotope fractionation in sulfate during bacterial sulfate reduction processes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69, 4773-4785.
- Bodin P., Burnstock G. Purinergic signalling: aTP release. (2001), *Neurochemistry Research* 26, 959-969.
- Bonev I. K., Reiche M., Marinov M. (1985), Morphology, perfection and growth of natural pyrite whiskers and thin platelets. *Physics and Chemistry of Minerals*, 12, 223-232.

- Böttcher, M. E., Thamdrup, B., & Vennemann, T. W. (2001). Oxygen and sulfur isotope fractionation during anaerobic bacterial disproportionation of elemental sulfur. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65, 1601–1609.
- Bradley A. S., Leavitt W. D., Schmidt M., Knoll A. H., Girguis P. R., Johnston D. T. (2016), Patterns of sulfur isotope fractionation during microbial sulfate reduction. *Geobiology*, 14(1), 91-101.
- Brady R. C. et Pettit R. J. (1981), Mechanism of the Fischer-Tropsch reaction. The chain propagation step. *Journal of the American Chemical Society*, 103(5), 1287-1289.
- Brock T. D. and Freeze H. (1969), *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of bacteriology*, 98(1), 289-297.
- Bryant F. O., Adams M. W. W. (1989), Characterization of hydrogenase from the hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Biological Chemistry* 264, 5070–5079.
- Buseck P.R., Dunin-Borkowski R.E., Devouard B., Frankel R., McCartney M.R., Midgley P.A., Pósfai M., Weyland M. (2001), Magnetite morphology and life on Mars. *PNAS USA* 98, 13490-13495.
- Busigny V., Jézéquel D., Cosmidis J., Viollier E., Benzerara K., Planavsky N. J., Albéric P., Lebeau O., Sarazin, G., Michard G. (2016), The Iron Wheel in Lac Pavin : Interaction with Phosphorus Cycle. In Sime-Ngando, T., Boivin, P., Chapron, E., Jezequel, D. et Meybeck, M., éditeurs : *Lake Pavin*, pages 205–220. Springer International Publishing, Cham.
- Butler I. B., Böttcher M. E., Rickard D., Oldroyd A. (2004), Sulfur isotope partitioning during experimental formation of pyrite via the polysulfide and hydrogen sulfide pathways: implications for the interpretation of sedimentary and hydrothermal pyrite isotope records. *Earth and Planetary Science Letters*, 228(3-4), 495-509.
- Cambon-Bonavita M.-A. Marie-Anne (2014) BICOSE cruise, RV Pourquoi pas ?, <https://doi.org/10.17600/14000100>
- Cambon-Bonavita, M.-A. (2018) BICOSE 2 cruise, RV Pourquoi pas? <https://doi.org/10.17600/18000004>
- Canales J.P., Sohn R.A., deMartin B.J. (2007), Crustal structure of the Trans-Atlantic Geotraverse (TAG) segment (Mid-Atlantic Ridge, 26°10'N): Implications for the nature of hydrothermal circulation and detachment faulting at slow spreading ridges. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 8(8).
- Canfield D. E., Thamdrup B. (1994). The production of 34 S-depleted sulfide during bacterial disproportionation of elemental sulfur. *Science*, 266, 1973–1975.
- Canfield D. E., Farquhar J., Zerkle A. L. (2010). High isotope fractionations during sulfate reduction in a low-sulfate euxinic ocean analog. *Geology*, 38, 415–418.
- Carpenter W.B. (1865), Additional note on the structure and affinities of *Eozoon canadense*. *The Quarterly journal of the Geological Society of London* 21, 59-66.
- Carter H.F. (1874), On the structure called *Eozoon canadense* in the Laurentian limestone of Canada. *The Annals and magazine of natural history* 4(13), 189-193.
- Chan C.S., Fakra S.C., Emerson D., Fleming E.J., Edwards K.J. (2011), Lithotrophic iron-oxidizing bacteria produce organic stalks to control mineral growth: implications for biosignature formation. *ISME Journal* 5, 717–727.

- Chan C.S., McAllister S.M., Leavitt A.H., Glazer B.T., Krepski S.T., Emerson D. (2016), The architecture of iron microbial mats reflects the adaptation of chemolithotrophic iron oxidation in freshwater and marine environments. *Frontiers in Microbiology* 7, 796.
- Charlou J., Donval J., Fouquet Y., Jean-Baptiste P., Holm N. (2002), Geochemistry of high H₂ and CH₄ vent fluids issuing from ultramafic rocks at the Rainbow hydrothermal field (36 degrees 14'N, MAR). *Chemical Geology* 191, 345–359.
- Chasteen N.D. et Harrison P.M. (1999), Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *Journal of Structural Biology* 126, 182-194.
- Christie D. M. and Fisher C. R., (2006). Geological, biological, chemical, and physical interactions in back-arc spreading systems – an introduction. In Christie, D. M., et al. (eds.), *Back-Arc Spreading Centers: Geological, Biological, Chemical, and Physical Interactions*. Washington, DC: American Geophysical Union, 1–4.
- Cleaves H.J. (2012), Prebiotic Chemistry: What We Know, What We Don't. *Evolution: Education and Outreach* 5, 342–360.
- Cloud P. (1972), Working model of primitive Earth. *American Journal of Science*, 272 (6), 537.
- Cody G.D., Botto R.E., Ade H., et al (1995), Inner-Shell Spectroscopy and Imaging of a Subbituminous Coal: In-Situ Analysis of Organic and Inorganic Microstructure Using C(1s)-,Ca(2p)-,and C1(2s)-NEXAFSt. *Energy & Fuels* 9, 525–533.
- Coffey J.M., Flannery D.T., Walter M.R., George S.C. Sedimentology, stratigraphy and geochemistry of a stromatolite biofacies in the 2.72 Ga Tumbiana Formation, Fortescue Group, Western Australia. *Precambrian Research* 236, 282–296.
- Corliss J. B., Dymond J., Gordon L. I., Edmond J. M., von Herzen R. P., Ballard R. D., Green K., Williams D., Bainbridge A., Crane K., van Andel T. H. (1979). Submarine Thermal Springs on the Galápagos Rift. *Science* 203,1073-1083.
- Corliss J.B., Baross J.A., Hoffman S.E. (1981), An hypothesis concerning the relationship between submarine hot springs and the origin of life on Earth: *Oceanologica Acta*, Supplement, 59-69.
- Cosmidis J. et Templeton A. (2016), Self-assembly of biomorphic carbon/sulfur microstructures in sulfidic environments. *Nature Communications* 7, 12812.
- Cosmidis J., Nims C.W., Diercks D., Templeton A.S. (2019), Formation and stabilization of elemental sulfur through organomineralization. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 247, 59–82.
- Coutant M., Lepot K., Fadel A., Addad A., Richard E., Troadec D., Javaux E. J. (2022), Distinguishing cellular from abiotic spheroidal microstructures in the ca. 3.4 Ga Strelley Pool Formation. *Geobiology*, 20(5), 599-622.
- Cowan D.A. et Tow L.H. (2004), Endangered Antarctic Environments. *Annual Review of Microbiology* 58, 649-690.
- Cowen J.P., Massoth G.J., Baker E.T. (1986), Bacterial scavenging of Mn and Fe in a mid- to far-field hydrothermal particle plume. *Nature* 322 (6075), 169–171.
- Criouet I., Viennet J.-C., Jacquemot P., Jaber M., Bernard S. (2021), Abiotic formation of organic biomorphs under diagenetic conditions. *Geochemical Perspectives Letters* 16, 40 - 46.

- Crowe S. A., Paris G., Katsev S., Jones C., Kim S.-T., Zerkle A., Nomosatryo S., Fowle D., Adkins J., Sessions A., Farquhar J., Canfield, D. E. (2014). Sulfate was a trace constituent of Archean seawater. *Science*, 346, 735–739.
- Crowell B.W., Lowell R.P., Von Damm K.L. (2008), A model for the production of sulfur flocc and “snowblower” events at mid-ocean ridges. *Geochemistry Geophysics Geosystems* 9, Q10T02.
- Cruse A. M. and Seewald S.S. (2006), Geochemistry of low-molecular weight hydrocarbons in hydrothermal fluids from Middle Valley, northern Juan de Fuca Ridge. *Geochimica et cosmochimica acta* 70(8), 2073-2092.
- Dando P.R., Aliani S., Arab H., Bianchi C.N., Brehmer M., Cocito S., Fowlers S.W., Gundersen J., Hooper L.E., Kölbl R., Kuever J., Linke P., Makropoulos K.C., Meloni R., Miquel J.-C., Morri C., Müller S., Robinson C., Schlesner H., Sieverts S., Störr R., Stüben D., Thormm M., Varnavas S.P., Ziebiss W. (2000), Hydrothermal studies in the aegean sea, *Physics and Chemistry of the Earth, Part B: Hydrology, Oceans and Atmosphere* 25 (1), 1-8.
- Dawson J.W. (1865), On the structure of certain organic remains in the Laurentian limestones of Canada. *The Quarterly journal of the Geological Society of London* 21, 51-59.
- Dawson J.W. (1879), *Mobius on Eozoon Canadense*; *Canadian Naturalist* 9, 105-112.
- Défarage C. (2011), Organomineralization. Reitner, J., & Thiel, V. (eds.). *Encyclopedia of Geobiology*, Springer Verlag, 697-701.
- De la Peña F., Ostasevicius T., Fauske V.T., Burdet P., Prestat E., Jokubauskas P., Nord M., MacArthur K.E., Sarahan M., Johnstone D.N., Taillon J., Eljarrat A., Migunov V., Caron J., Furnival T., Mazzucco S., Aarholt T., Walls M., Slater T., Winkler F., Martineau B., Donval G., McLeod R., Hoglund E.R., Alxneit I., Hjorth I., Henninen T., Zagonel L.F., Garmannslund A. (2018), *HyperSpy v1. 4*.
- DeMartin B.J., Sohn R.A., Canales J.P., Humphris S.E. (2007), Kinematics and geometry of active detachment faulting beneath the Trans-Atlantic Geotraverse (TAG) hydrothermal field on the Mid-Atlantic Ridge. *Geology*, 35(8), 711-714.
- deRonde C., Faure K., Bray C., Chappell D., Wright I. (2003), Hydrothermal fluids associated with seafloor mineralization at two southern Kermadec arc volcanoes, offshore New Zealand. *Mineralium Deposita* 38, 217–233.
- Devouard B., Pósfai M., Hua X., Bazylinski D.A., Frankel R.B., Buseck P.R. (1998), Magnetite from magnetotactic bacteria: size distributions and twinning. *American Mineralogist* 83, 1387-1398.
- De Yoreo J. J., Gilbert P., Sommerdijk N., Penn L., Whitlam S., Joester D., Zhang H., Rimer J., Narvotsky A., Banfield J., Wallace A., Michel M., Meldrum F., Cölfen H., Dove P. (2015), Crystallization by particle attachment in synthetic, biogenic, and geologic environments. *Science* 349, aaa6760.
- Dick G. J., Tebo B. M. (2010), Microbial diversity and biogeochemistry of the Guaymas Basin deep-sea hydrothermal plume. *Environmental Microbiology* 12(5), 1334–1347.
- Dick G.J., Anantharaman K., Baker B.J., Li M., Reed D.C., Sheik C.S. (2013), The microbiology of deep-sea hydrothermal vent plumes: ecological and biogeographic linkages to seafloor and water column habitats. *Frontiers in Microbiology* 4, 124.
- Dodd M., Papineau D., Grenne T. et al. (2017), Evidence for early life in Earth’s oldest hydrothermal vent precipitates. *Nature* 543, 60–64.
- Dolan J. R. (2022), The saga of the false fossil foram Eozoon. *European Journal of Protistology*, 12595.

- Donald R. et Southam G. (1999), Low temperature anaerobic bacterial diagenesis of ferrous monosulfide to pyrite. *Geochimica Cosmochimica Acta* 63, 2019–2023.
- Duperron S., Bergin C., Zielinski F., Blazejak A., Pernthaler A., McKiness Z.P. DeChaine E., Cavanaugh C.M., Dubilier N. (2006). A dual symbiosis shared by two mussel species: *Bathymodiolus azoricus* and *Bathymodiolus puteoserpentis* (Bivalvia: Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology* 8(8), 1441–1447.
- Duverger A., Berg J.S., Busigny V., Guyot F., Bernard S., Miot J. (2020), Mechanisms of pyrite formation promoted by sulfate-reducing bacteria in pure culture, *Frontiers in Earth Science* 8, 588310.
- Duverger (2021), Biominéralisation et diagenèse des sulfures de fer produits par les bactéries sulfato-réductrices : approches expérimentales. Thèse, 275p.
- Edmond J., Measures C. McDuff, Chan L., Collier R., Grant B. (1979), Ridge crest hydrothermal activity and the balances of the major and minor element in the ocean: the Galapagos data, *Earth and Planetary Science Letters* 46, 1-18.
- Edmonds H., German C., Green D., Huh Y., Gamo T., Edmond J. (1996), Continuation of the hydrothermal fluid chemistry time series at TAG and the effects of ODP drilling. *Geophysical Research Letters* 23, 3487-3489.
- Edwards K. J., Rogers D. R., Wirsén C. O., McCollom T. M., (2003a). Isolation and characterization of novel psychrophilic, neutrophilic, Fe-oxidizing, chemolithoautotrophic α - and γ -Proteobacteria from the deep sea. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2906–2913.
- Edwards K. J., McCollom T. M., Konishi H., Buseck, P. R., (2003b). Seafloor bioalteration of sulfide minerals: results from in situ incubation studies. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67, 2843–2856.
- Edwards K. J., (2004). Formation and degradation of seafloor hydrothermal sulfide deposits. In Amend, J. P., et al. (eds.), *Sulfur Biogeochemistry: Past and Present*. Boulder, CO: The Geological Society of America, 83–96.
- Edwards K. J., Bach W., McCollom T. M., (2005). Geomicrobiology in oceanography: microbe-mineral interactions at and below the seafloor. *Trends in Microbiology* 13, 449–456.
- Ehrlich H., Bailey E., Wysokowski M., Jesionowski T. (2021), Forced Biomineralization: A Review. *Biomimetics* 6(3), 46.
- Eigenbrode J. L., Freeman K. H. (2006). Late Archean rise of aerobic microbial ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 15759–15764.
- Elderfield H. and Schultz A. (1996), Mid-ocean ridge hydrothermal fluxes and the chemical composition of the ocean, *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 24,191–224.
- Emerson D., Rentz J. A., Lilburn T. G., Davis R. E., Aldrich H., Chan C., Moyer C. L. (2007), A novel lineage of proteobacteria involved in formation of marine Fe-oxidizing microbial mat communities. *PloS one*, 2(8), e667.
- Emerson D., Fleming E. J., McBeth J. M. (2010), Iron-oxidizing bacteria: an environmental and genomic perspective. *Annual review of microbiology*, 64, 561-583.
- Emerson D. (2016), The irony of iron–biogenic iron oxides as an iron source to the ocean. *Frontiers in microbiology*, 6, 1502.
- Esther J., Sukla L.B., Pradhan N. et al. (2015), Fe (III) reduction strategies of dissimilatory iron reducing bacteria. *Korean Journal of Chemical Engineering* 32, 1–14.

- Etique M., Romaine A., Bihannic I., Gley R., Carteret C., Abdelmoula M., Ruby C., Jeannin M., Sabot R., Refait P., Jorand F. (2018), Abiotically or microbially mediated transformations of magnetite by sulphide species: The unforeseen role of nitrate-reducing bacteria, *Corrosion Science*, 142, 31-44.
- Farina M., Esquivel D., de Barros H. (1990), Magnetic iron-sulphur crystals from a magnetotactic microorganism. *Nature* 343, 256–258.
- Farrell U.C., Briggs D.E.G., Gaines R.R. (2011), Paleocology of the Olenid Trilobite *Triarthrus*: New evidence from Beecher's trilobite bed and site of pyritization. *PALAIOS* 26 (11), 730–742.
- Feely R., Massoth G., Trefry J., Baker E., Paulson A., Lebon G. (1994), Composition and sedimentation of hydrothermal plume particles from north Cleft segment, Juan de Fuca Ridge. *Journal of Geophysical Research* 99, 4985–5006.
- Ferris F., Fyfe W., Beveridge T. (1987), Bacteria as nucleation sites for authigenic minerals in a metal-contaminated lake sediment. *Chemical Geology*, 63(3-4), 225–232.
- Fiala G., Stetter K.O. (1986), *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. *Archaeal Microbiology* 145, 56–61.
- Fiala-Médioni A., McKiness Z.P., Dando P., Boulegue J., Mariotti A., Alayse-Danet A.M. et al. (2002), Ultrastructural, biochemical, and immunological characterization of two populations of the mytilid mussel *Bathymodiolus azoricus* from the Mid-Atlantic Ridge: evidence for a dual symbiosis. *Marine Biology* 141, 1035–1043.
- Findlay A. J., Gartman A., MacDonald D. J., Hanson T. E., Shaw T. J., Luther III G. W. (2014), Distribution and size fractionation of elemental sulfur in aqueous environments: The Chesapeake Bay and Mid-Atlantic Ridge. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 142, 334-348.
- Findlay A., Gartman A., Shaw T., Luther G. (2015), Trace metal concentration and partitioning in the first 1.5m of hydrothermal vent plumes along the Mid-Atlantic Ridge: TAG, Snakepit, and Rainbow, *Chemical Geology* 412, 117-131.
- Findlay A.J., (2016), Microbial impact on polysulfide dynamics in the environment, *FEMS Microbiology Letters* 363(11), fnw103.
- Fischer F. et Tropsch H. (1926), The Synthesis of Petroleum at Atmospheric Pressures from Gasification Products of Coal. *Brennstoff-Chemie* 7, 97-104.
- Flores G.E (2011), Microbial Ecology of Active Marine Hydrothermal Vents Deposits: The Influence of Geologic Setting on Microbial Communities. *Dissertations and Theses*. Paper 250.
- Flores G.E. et Reysenbach (2011), Hydrothermal Environments, Marine. In: Reitner, J., Thiel, V. (eds) *Encyclopedia of Geobiology*. *Encyclopedia of Earth Sciences Series*. Springer, Dordrecht.
- Flores G., Campbell J., Kirshtein J., Meneghin J., Seewald J., Tivey M., Voytek M., Yang Z., Reysenbach A-L. (2011), Microbial community structure of hydrothermal deposits from geochemically different vent fields along the Mid-Atlantic Ridge, *Environmental Microbiology* 13(8), 2158–2171.
- Folsome C. E., Allen R. D., Ichinose N. K. (1975), Organic microstructures as products of Miller-Urey electrical discharges. *Precambrian Research*, 2(3), 263-275.
- Fortin D., Southam G., Beveridge, T. J. (1994), Nickel sulfide, iron-nickel sulfide and iron sulfide precipitation by a newly isolated *Desulfotomaculum* species and its relation to nickel resistance. *FEMS Microbiology Ecology* 14, 121–132.

- Fortunato C., Butterfield D.A., Larson B., Lawrence-Slavas N., Algar C.K., Zeigler Allen L., Holden J.F. (2021), Seafloor Incubation Experiment with Deep-Sea Hydrothermal Vent Fluid Reveals Effect of Pressure and Lag Time on Autotrophic Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 87 (9), e00078-21.
- Fouquet Y., Henry K., Knott R., Cambon P. (1998), Geochemical section of the TAG hydrothermal mound, *Oceanographic Literature Review* 45 (8), 1356.
- Fouquet Y., Pelleter E. (2017), HERMINE cruise, RV Pourquoi pas ?, <https://doi.org/10.17600/17000200>
- Fox S. W. et Yuyama S. (1963), Abiotic production of primitive protein and formed microparticles. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 108(2), 487-494.
- Frankel R., Blakemore R.P., Wolfe R.S. (1979), Magnetite in freshwater magnetotactic bacteria. *Science* 203, 1355-1356.
- Frankel R. et Bazylinski D. (2003), Biologically Induced Mineralization by Bacteria, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 54 (1), 95–114.
- Fukui T., Atomi H., Kanai T., Mastumi R., Fujiwara S., Imanaka T. (2005), Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes. *Genome Research* 15, 352-363.
- Garcia-Ruiz J. M., Carnerup A., Christy A.G., Welham N.J., Hyde S.T. (2002), Morphology: an ambiguous indicator of biogenicity. *Astrobiology* 2, 353–369.
- Garcia-Ruiz J. M., Hyde S.T., Carnerup A., Christy A.G., Van Kranendonk M., Welham N.J. (2003), Self-assembled silica-carbonate structures and detection of ancient microfossils. *Science* 302, 1194–1197.
- García-Ruiz J. M., Melero-García E., Hyde S. T. (2009), Morphogenesis of self-assembled nanocrystalline materials of barium carbonate and silica. *Science*, 323(5912), 362-365.
- Gartman A., Yücel M., Madison A., Chu D., Ma S., Janzen C., Becker E., Beinart R., Girguis P., Luther G. (2011), Sulfide oxidation across diffuse flow zones of hydrothermal vents. *Aquatic Geochemistry* 17, 583–601.
- Gartman A., Findlay A. J., Luther G.W. (2014), Nanoparticulate pyrite and other nanoparticles are a widespread component of hydrothermal vent black smoker emissions, *Chemical Geology* 366, 32-41.
- Gates-Rector S. et Blanton T. (2019), “The powder diffraction file: a quality materials characterization database.” *Powder Diffraction* 34(4), 352-360.
- German C.R., Seyfried Jr W.E. (2014). Hydrothermal processes. In: Holland, H.D., Turekian, K.K. (Eds.), *Treatise on Geochemistry*. Elsevier, Oxford, 191–233.
- Giggenbach W. (1974), Equilibria involving polysulfide ions in aqueous sulfide solutions up to 240°C. *Inorganic Chemistry* 13, 1724-1730.
- Gomes M. L., Hurtgen M. T. (2013). Sulfur isotope systematics of a euxinic, low-sulfate lake: Evaluating the importance of the reservoir effect in modern and ancient oceans. *Geology*, 41, 663–666.
- Gomes M. L., Klatt J. M., Dick G. J., Grim S. L., Rico K. I., Medina M., Fike D. A. (2022), Sedimentary pyrite sulfur isotope compositions preserve signatures of the surface microbial mat environment in sediments underlying low-oxygen cyanobacterial mats. *Geobiology*, 20(1), 60-78.
- Gorby Y.A., Beveridge T.J., Blakemore R.P. (1988), Characterization of the bacterial magnetosome membrane. *Journal of Bacteriology* 170, 834-841.

- Gorlas A., Croce O., Oberto J., Gaudiard E., Forterre P., Marguet E. (2014), *Thermococcus nautili* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a hydrothermal deep-sea vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, 1802–1810.
- Gorlas A., Marguet E., Gill S., Geslin C., Guigner J.-M., Guyot F., Forterre P. (2015), Sulfur vesicles from Thermococcales: A possible role in sulfur detoxifying mechanisms. *Biochimie*, 118, 356-364.
- Gorlas A., Jacquemot P., Guigner J.M., Gill S., Forterre P., Guyot F. (2018), Greigite nanocrystals produced by hyperthermophilic archaea of Thermococcales order. *PLoS One* 13: e0201549.
- Gorlas A., Mariotte T., Morey L., Truong C., Bernard S., Guigner J.-M., Oberto J., Baudin F., Landrot G., Baya C., Le Pape P., Morin G., Forterre P., Guyot F. (2022), Precipitation of greigite and pyrite induced by Thermococcales: an advantage to live in Fe- and S-rich environments? *Environmental Microbiology*.
- Gould S.J. (1980), *The Panda's Thumb: More Reflections on Natural History*. Norton & Company, New York, 343.
- Gower L. A. et Tirrell D. A. (1998), Calcium carbonate films and helices grown in solutions of poly (aspartate). *Journal of Crystal Growth*, 191(1-2), 153-160.
- Ghosh B., Bose R., Tang D. (2021), Can coacervation unify disparate hypotheses in the origin of cellular life? *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 52, 101415.
- Gottschalk G. (1979), *Bacterial metabolism*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Gramp J. P., Wang H. M., Bigham J. M., Jones F. S., Tuovinen O. H. (2009), Biogenic synthesis and reduction of Fe(III)-hydroxysulfates. *Geomicrobiology Journal* 26, 275–280.
- Grant H. L.J., Hannington M. D., Petersen S., Frische M., Fuchs S. H. (2018), Constraints on the behavior of trace elements in the actively-forming TAG deposit, Mid-Atlantic Ridge, based on LA-ICP-MS analyses of pyrite. *Chemical Geology* 498, 45-71.
- Gražulis S., Daškevič A., Merkys A., Chateigner D., Lutterotti L., Quirós M., Serebryanaya N. R., Moeck P., Downs, R. T. et Le Bail, A. (2012). Crystallography Open Database (COD) : An open-access collection of crystal structures and platform for world-wide collaboration. *Nucleic Acids Research*, 40(D1):D420–D427.
- Habicht K. S., Canfield D. E. (1997). Sulfur isotope fractionation during bacterial sulfate reduction in organic-rich sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61, 5351–5361.
- Hannington M., Jamieson J., Monecke T., Petersen S., Beaulieu S. (2011), The abundance of seafloor massive sulfide deposits, *Geology* 39 (12), 1155–1158.
- Hao X. et Li Y. (2015), Hexagonal plate-like magnetite nanocrystals produced in komatiite–H₂O–CO₂ reaction system at 450°C. *International Journal of Astrobiology*, 14(4).
- Harnvoravongchai P., Kobori H., Orita I. et al. (2014), Characterization and gene deletion analysis of four homologues of group 3 pyridine nucleotide disulfide oxidoreductases from *Thermococcus kodakarensis*. *Extremophiles* 18, 603–616.
- Hayes, J. M. (2001). Fractionation of the isotopes of carbon and hydrogen in biosynthetic processes. In J. W. Valley & D. R. Cole (Eds.), *Stable Isotope Geochemistry, Reviews in Mineralogy and Geochemistry* (pp. 225–277). Mineralogical Society of America, Geochemical Society.
- Haymon R. M (1983), Growth history of hydrothermal black smoker chimneys, *Nature* 301 (24), 695-698.
- Heams T. (2019), *Infravies. Le vivant sans frontières*. Editions du seuil.

- Heezen B., Tharp M., Ewing M., (1959), The Floors of the Oceans: I. The North Atlantic, Volume 65 de Geological Society of America Special Paper, 122 p.
- Hekinian R., Fevrier M., Bischoff J. L., Picot P., Shanks W. C. (1980), Sulfide deposits from the East Pacific Rise near 21°N, *Science* 207, 1433-1444.
- Hemingway J.D., Rothman D.H., Grant K.E., et al. (2019), Mineral protection regulates long-term global preservation of natural organic carbon. *Nature* 570, 228–231.
- Herwald S., Liu A., Zhu B., Sea K., Lopez K., Sazinsky M., Crane E. (2013) Structure and substrate specificity of the pyrococcal coenzyme A disulphide reductases/polysulfide reductases (CoADR/Psr): implications for S(0)-based respiration and a sulfur-dependent antioxidant system in *Pyrococcus*, *Biochemistry* 52(16), 2764–2773.
- Hess H. H., (1962). History of Ocean Basins, Geological Society of America, Petrologic Studies, eds. E. J. Engel, Harold L. James, B. F. Leonard.
- Heywood B.R., Bazylinski D., Garratt-Reed A.J., Mann S., Frankel R. (1990), Controlled biosynthesis of greigite (Fe₃S₄) in magnetotactic bacteria. *Naturwiss* 77, 536-538.
- Hidese R., Inoue, T., Imanaka, T., Fujiwara, S. (2014), Cysteine desulphurase plays an important role in environmental adaptation of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *Molecular Microbiology* 93, 331–345.
- Hironaka I., Iwase T., Sugimoto S., Okuda K., Tajima A., Yanaga K., Mizunoe Y. (2013), Glucose triggers ATP secretion from bacteria in a growth-phase dependent manner. *Applied Environmental Microbiology* 79(7), 2328–2335.
- Hitchcock A.P., Koprinarov I., Tyliczszak T., et al (2001), Optimization of scanning transmission X-ray microscopy for the identification and quantitation of reinforcing particles in polyurethanes. *Ultramicroscopy* 88, 33–49.
- Hoefs, J. (2021). Stable isotope geochemistry. Springer textbooks in earth sciences, geography and environment. Springer International Publishing.
- Hofmann A. (2011), Archaeal hydrothermal Systems in the Barberton Greenstone belt and their significance as a habitat for early life. In S. D. Golding & M. Glikson (Eds.), *Earliest life on earth: Habitats, environments and methods of detection* (pp. 51–78). Springer.
- Holden J.F. et Adams M. (2003), Microbe-metal interactions in marine hydrothermal environments. *Current Opinion in Chemical Biology* 7, 160–165.
- Holden J.F., Breier J.A., Rogers K.L., Schulte M.D., Toner B.M. (2012), Biogeochemical processes at hydrothermal vents: microbes and minerals, bioenergetics, and carbon fluxes. *Oceanography* 25: 196–208.
- Horita J. et Berndt M. E. (1999), Abiogenic methane formation and isotopic fractionation under hydrothermal conditions. *Science* 285(5430), 1055-1057.
- Horita J. (2005), Stable isotope thermometry: there is more to it than temperature. *Geochemical Journal* 39(6), 481-496.
- Houghton J. et Seyfried Jr. (2010), An experimental and theoretical approach to determining linkages between geochemical variability and microbial diversity in sea floor hydrothermal chimneys. *Geobiology* 8, 457–470.

- Hu S.-Y., Barnes S. J., Glenn M. A., Pagès A., Parr J., MacRae C., Binns R. (2019), Growth history of sphalerite in a modern sea floor hydrothermal chimney revealed by electron backscattered diffraction. *Economic Geology* 114(1), 165–176.
- Huber C., Wächtershäuser G. (1997), Activated acetic acid by carbon fixation on (Fe, Ni)S under primordial conditions. *Science* 276, 245–247.
- Huber R. and Stetter K.O. (2001), Discovery of hyperthermophilic microorganisms. *Methods in Enzymology* 330, 11–24.
- Humphris S. E., Kleinrock M. C. (1996), Detailed morphology of the TAG active hydrothermal mound: Insights into its formation and growth, *Geophysical Research Letters* 23(23), 3443–3446.
- Hunger S. and Benning L.G. (2007), Greigite: a true intermediate on the polysulfide pathway to pyrite. *Geochemical Transactions* 8, 1.
- Ijjaali M., Malaman B., Gleitzer C., Warner J., Hriljac J., Cheetham A. (1990), Stability, Structure Refinement, and Magnetic Properties of α -Fe₂PO₄O. *Journal of Solid State Chemistry* 86, 195–205.
- Ikogou M., Ona-Nguema G., Juillot F., Le Pape P., Menguy N., Richeux N., Guigner J.-M., Noël V., Brest J., Baptiste B. and Morin G. (2017) Long-term sequestration of nickel in mackinawite formed by *Desulfovibrio capillatus* upon Fe(III)-citrate reduction in the presence of thiosulfate. *Applied Geochemistry* 80, 143–154.
- Isidorov V.A., Zenkevich I.G., Ioffe B.V. (1990), Volatile organic compounds in solfatic gases. *Journal of Atmospheric Chemistry* 10, 329–340.
- Itoh T. (2003), Taxonomy of nonmethanogenic hyperthermophilic and related thermophilic archaea. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96, 203–212.
- Jannasch H. W. (1995), Microbial Interactions with Hydrothermal Fluids. Dans Humphris, S. E., et al. (eds.), *Seafloor Hydrothermal Systems: Physical, Chemical, Biological, and Geological Interactions*. Washington, DC: American Geophysical Union, 273–296.
- Javaux E.J. (2019), Challenges in evidencing the earliest traces of life. *Nature* 572, 451–460.
- Jenney Jr. et Adams M. W. W. (2008), Hydrogenases of the model hyperthermophiles. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125, 252–266.
- Jiang J. et Kappler A. (2008), Kinetics of Microbial and Chemical Reduction of Humic Substances : Implications for Electron Shuttling. *Environmental Science & Technology*, 42(10), 3563–3569.
- Johnston-Lavis H.J. et Gregory, J.W. (1894), Eozoonal structure of the ejected blocks of Monte Somma. *Royal Dublin Society* 5, 259–286.
- Jordan S. F., Ramm H., Zheludev I. N., Hartley A. M., Maréchal A., Lane N. (2019), Promotion of protocell self-assembly from mixed amphiphiles at the origin of life. *Nature ecology & evolution*, 3(12), 1705–1714.
- Jørgensen, B. B., Findlay, A. J., & Pellerin, A. (2019). The biogeochemical sulfur cycle of marine sediments. *Frontiers in Microbiology*, 10, 849.
- Judd A. et Hoyland M. (2009), *Seabed Fluid Flow: The Impact On Geology, Biology and The Marine Environment*. Cambridge University Press, New York.
- Juniper S.K. et Fouquet Y. (1988), Filamentous iron-silica deposits from modern and ancient hydrothermal sites. *The Canadian Mineralogist* 26, 859–869.

- Juniper S. K. et Tebo B. M. (1995), Microbe-metal interactions and mineral deposition at hydrothermal vents. in “The microbiology of deep-sea hydrothermal vents”, D. Karl, ed. CRC, Boca Raton, 219–253.
- Juniper S.K., Bird D.F., Summit M., Vong M.P., Baker E. T. (1998), Bacterial and viral abundances in hydrothermal event plumes over northern Gorda Ridge, Deep Sea Research Part II Topical Studies in Oceanography 45, 2739–2749.
- Kadko D.C., Rosenberg N.D., Lupton J.E., Collier R.W., Lilley M. D. (1990), Chemical-reaction rates and entrainment within the Endeavor Ridge hydrothermal plume. Earth Planetary Science Letter 99, 315–335.
- Kamysny A., Goifman A., Gun J., Rizkov D., Lev O. (2004), Equilibrium distribution of polysulfide ions in aqueous solutions at 25°C: a new approach for the study of polysulfides’ equilibria. Environmental Science & Technology 38, 6633-6644.
- Kanai K., Imanaka H., Nakajima A., Uwamori K., Omori Y., Fukui T., Atomi H., Imanaka T. (2005), Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. Journal of Biotechnology 116 (3), 271-282.
- Kanai T., Matsuoka R., Beppu H., Nakajima A., Okada Y., Atomi H., Imanaka T. (2011), Distinct Physiological Roles of the Three [NiFe]-Hydrogenase Orthologs in the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakarensis*. Journal of Bacteriology 193(12), 3109–3116.
- Kanai T., Imanaka T., Atomi H. (2013), Hydrogen Production by the Hyperthermophilic Archeon *Thermococcus kodakaraensis*. Journal of the Japan Petroleum Institute 56 (5), 267 – 279.
- Karl D. M., (1995). The Microbiology of Deep-Sea Hydrothermal Vents. New York: CRC Press.
- Karpov G.A., Miller Yu.M., Zavarzin G.A. (1983), Composition of the air and spontaneous gases in Death Valley on Kamchatka. Vulkanologiya i Seismologiya 4, 107–110.
- Kashyap S., Sklute E.C., Dyar M.D., Holden, J.F. (2018), Reduction and morphological transformation of synthetic nanophase iron oxide minerals by hyperthermophilic archaea. Frontiers in Microbiology 9, 1550.
- Kasting J. F. (2013), What caused the rise of atmospheric O₂? Chemical Geology 362, 13-25.
- Keefe A.D., Newton G.L., Miller S.L. (1995), A possible prebiotic synthesis of pantetheine, a precursor to coenzyme A. Nature 373, 683–685
- Keil R.G. et Mayer L.M. (2014), Mineral matrices and organic matter. In: Treatise on Geochemistry, 2nd edition, edited by HD Holland and KK Turekian, Elsevier, 337–359.
- King W. et Rowney T. H. (1866), On Eozoon Canadense. Proceedings of the Royal Irish Academy (1836-1869) 10, 506-551.
- Kish A., Miot J., Lombard C., Guigner J-M., Bernard S., Zirah S., Guyot F. (2016), Preservation of archaeal surface layer structure during mineralization, Scientific Report 6, 26152.
- Koonin E.V. (2014), The origins of cellular life. Antonie van Leeuwenhoek 106, 27–41.
- Knoll M. et Ruska E. (1932), Das Elektronenmikroskop. Z. Physik 78, 318–339.
- Knoll P. et Steinbock O. (2018), Inorganic Reactions Self-organize Life-like Microstructures Far from Equilibrium. Chemical Reaction Engineering, Special Issue: Nonlinear Dynamics 58(6-7), 682-692.
- Kobori H., Ogino M., Orita I., Nakamura S., Imanaka T., Fukui T. (2010), Characterization of NADH oxidase/NADPH polysulfide oxidoreductase and its unexpected participation in oxygen sensitivity in an anaerobic hyperthermophilic archaeon, Journal of Bacteriology 192(19), 5192–5202.

- Köksal E.S., Liese S., Xue L., Ryskulov R., Viitala L., Carlson A., Gözen I. (2020), Rapid Growth and Fusion of Protocells in Surface-Adhered Membrane Networks. *Nano Micro Small* 16(38), 2002529.
- Konhauser K.O. (1998), Diversity of bacterial iron mineralization, *Earth-Science Reviews* 43, 91-121.
- Konn C., Donval J. P., Guyader V., Germain Y., Alix A.-S., Roussel E., Rouxel O., (2022), Extending the dataset of fluid geochemistry of the Menez Gwen, Lucky Strike, Rainbow, TAG and Snake Pit hydrothermal vent fields: investigation of temporal stability and organic contribution, *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 179.
- Kormas L., Tivey M., Von Damm K., Teske A. (2006), Bacterial and archaeal phylotypes associated with distinct mineralogical layers of a white smoker spire from a deep-sea hydrothermal vent site (9°N, East Pacific Rise), *Environmental Microbiology* 8(5), 909–920.
- Kowalski B. (1983), Cobalt and Nickel Content in Pyrite from Gold Mineralization and Sulphide Facies Banded Iron Formation, Dickenson Mine, Red Lake, Ontario; Implication for Ore Genesis. McMaster University, Hamilton, Ontario, 88p.
- Kremer B. et Kaźmierczak J. (2017), Cellularly preserved microbial fossils from ~ 3.4 Ga deposits of South Africa: A testimony of early appearance of oxygenic life?. *Precambrian Research*, 295, 117-129.
- Krishnan M., Ugaz V.M., Burns M.A. (2002), PCR in a Rayleigh–Bernard convection cell. *Science* 298, 793.
- Kvenvolden K., Rapp J. B., Hostettler F. D., Morton J. L., King J. D., Claypool G. F. (1986), Petroleum associated with polymetallic sulfide in sediment from Gorda Ridge, *Science* 234, 1231-1234.
- Kvenvolden K., Simoneit B. (1990), Hydrothermally Derived Petroleum: Examples from Guaymas Basin, Gulf of California, and Escanaba Trough, Northeast Pacific Ocean. *AAPG Bulletin* 74 (3), 223–237.
- Labrenz M. et Banfield J. F. (2004), Sulfate-reducing bacteria-dominated biofilms that precipitate ZnS in a subsurface circumneutral-pH mine drainage system. *Microbiology Ecology* 47, 205–217.
- Lafitte M. (1980), Variation de stoechiométrie des sulfures naturels et de synthèse du système Cu-Fe-S. Thèse 36ème cycle, Paris.
- Lafitte M., Maury R., Perseil E. A. (1984), Analyse Minéralogique de Cheminées à Sulfures de la Dorsale Est Pacifique (13 °N), *Mineralium Deposita* 19, 274-282.
- Lalou C., Thompson G., Rona P. A., Bricchet E., Jehanno C. (1986), Chronology of selected hydrothermal Mn oxide deposits from the transatlantic geotraverse “TAG” area, Mid-Atlantic Ridge 26°N. *Geochimica and Cosmochimica Acta* 50(8), 1737–1743.
- Lalou C., Reyss J.-L., Bricchet E., Arnold M., Thompson G., Fouquet Y., Rona P.A. (1993), New Age Data for Mid-Atlantic Ridge Hydrothermal Sites' TAG and Snakepit Chronology Revisited, *Journal of Geophysical Research* 98(B6), 9705-9713.
- Lalou C., Reyss J.-L., Bricchet E. (1995), Hydrothermal activity on a 10S-year scale at a slow-spreading ridge, TAG hydrothermal field, Mid-Atlantic Ridge 26°N, *Journal of Geophysical Research* 100(B9), 17855-17862.
- Lam P., Cowen J.P., Jones R.D. (2004), Autotrophic ammonia oxidation in a deep-sea hydrothermal plume. *FEMS Microbiology Ecology* 47, 191–206.
- Lam P., Cowen J.P., Popp B.N., Jones R.D. (2008), Microbial ammonia oxidation and enhanced nitrogen cycling in the Endeavour hydrothermal plume. *Geochimica Cosmochimica Acta* 72, 2268–2286.

- Langmuir C., Humphris S., Fornari D., VanDover C., VonDamm K., Tivey, M., Colodner D., Charlou J.-L., Desonie D., Wilson C., Fouquet Y., Klinkhammer G., Bougault H. (1997), Hydrothermal vents near a mantle hot spot: the Lucky Strike vent field at 37 degrees N on the Mid-Atlantic Ridge. *Earth Planet Science Letter* 148, 69–91.
- Lazcano A. et S.L. Miller. (1996). The origin and early evolution of life: prebiotic chemistry, the pre-RNA world, and time. *Cell* 85, 793–798.
- Le Bris N. et Gaill F. (2007), How does the annelid *Alvinella pompejana* deal with an extreme hydrothermal environment? *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 6, 197–221.
- Lecasble M. (2023), Evolution moléculaire et isotopique de la matière organique en condition d'altération hydrothermale au sein des astéroïdes carbonés. Thèse, 174p.
- Lefevre C.T., Bazylinski D.A. (2013), Ecology, diversity, and evolution of magnetotactic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77.
- Le Guillou C., Bernard S., De la Peña F., Le Brech Y. (2018), XANES-Based Quantification of Carbon Functional Group Concentrations, *Analytical Chemistry* 90(14), 8379-8386.
- Lennie A. R., Redfern S. A. T., Schofield P. F., Vaughan D. J. (1995), Synthesis and Rietveld crystal structure refinement of mackinawite, tetragonal FeS. *Mineralogical Magazine* 59, 677–683.
- Lennie A. R., Redfern S. A., Champness P. E., Stoddart C. P., Schofield P. F., Vaughan D. J. (1997), Transformation of mackinawite to greigite; an in situ X-ray powder diffraction and transmission electron microscope study. *American Mineralogist*, 82(3-4), 302-309.
- Lesniewski R.A., Jain S., Anantharaman K., Schloss P.D., Dick G. J. (2012), The metatranscriptome of a deep-sea hydrothermal plume is dominated by water column methanotrophs and lithotrophs. *ISME Journal* 6, 2257–2268.
- Li J. H., Benzerara K., Bernard S., Beyssac O. (2013), The link between biomineralization and fossilization of bacteria: Insights from field and experimental studies, *Chemical Geology*, 359: 49-69.
- Li J. H., Bernard S., Benzerara K., Beyssac O., Allard T., Cosmidis J., Moussou J. (2014), Impact of biomineralization on the preservation of microorganisms during fossilization: An experimental perspective, *Earth and Planetary Science Letters*, 400: 113-122.
- Li J., Cui J., Yang Q., Cui G., Wei B., Wu Z., et al. (2017). Oxidative weathering and microbial diversity of an inactive seafloor hydrothermal sulfide chimney. *Frontiers in Microbiology* 8, 1–21.
- Li M-L., Yao Q-Z., Zhou G-T., Qu X-F., Mu C-F., Fu S-Q. (2013), Microwave-assisted controlled synthesis of monodisperse pyrite microspherulites. *CrystEngComm* 13, 5936.
- Li Y.-L. (2012), Hexagonal platelet-like magnetite as a biosignature of thermophilic iron-reducing bacteria and its applications to the exploration of the modern deep, hot biosphere and the emergence of iron-reducing bacteria in early precambrian oceans. *Astrobiology* 12.
- Lilley M., Butterfield D., Olson E. et al. (1993), Anomalous CH₄ and NH₄⁺ concentrations at an unsedimented mid-ocean-ridge hydrothermal system. *Nature* 364, 45–47.
- Lin T., Breves E., Dyar, M.D., Ver Eecke H.C., Jamieson J.W., Holden J.F. (2014), Magnetite formation from ferrihydrite by hyperthermophilic archaea from Endeavour segment, Juan de Fuca ridge hydrothermal vent chimneys. *Geobiology* 12, 200–211.

- Lin T., Ver Eecke H., Breves E., Dyar M., Jamieson J., Hannington M., Dahle H., Bishop J., Lane M., Butterfield D., Kelley D., Lilley M., Baross J., Holden J. (2016), Linkages between mineralogy, fluid chemistry, and microbial communities within hydrothermal chimneys from the Endeavour segment, Juan de Fuca ridge. *Geochemistry Geophysics Geosystems* 17, 300–323.
- Liu J., Soler N., Gorlas A., Krupovic V., Krupovic M., Forterre P. (2021), Extracellular membrane vesicles and nanotubes in Archaea. *MicroLife* 2, uqab007.
- Liu Y., Beer L., Whitman W. (2012), Sulfur metabolism in archaea reveals novel processes, *Environmental Microbiology* 14(10), 2632-2644.
- Lipscomb G. L., Keese A. M., Cowart D. M., Schut G. J., Thomm M., Adams M. W., Scott R. A. (2009), SurR: a transcriptional activator and repressor controlling hydrogen and elemental sulphur metabolism in *Pyrococcus furiosus*. *Molecular microbiology*, 71(2), 332-349.
- Logan W.E. (1864), On organic remains in the Laurentian Rocks of Canada. *American Journal of Science* 37, 272-273.
- López-García P., Gaill F., Moreira D. (2002), Wide bacterial diversity associated with tubes of the vent worm *Riftia pachytila*. *Environmental Microbiology* 4, 204–215.
- Love L.G. (1957), Micro-organisms and the Presence of Syngenetic Pyrite. *The Quarterly Journal of the Geological Society of London* 113, 429 – 440.
- Lowell R. P. et L. N. Germanovich (2004), Seafloor hydrothermal processes: Results from scale analysis and single-pass models, in *Mid-Ocean Ridges: Hydrothermal Interactions Between the Lithosphere and Oceans*, Geophysical Monograph Series (148), edited by C. R. German, J. Lin, and L. M. Parson, pp. 219–244.
- Lowell R.P., Seewald J.S., Metaxas A. Perfit M.R. (2008), Modeling hydrothermal processes at ocean spreading centers: Magma to microbe—An overview. In *Magma to Microbe: Modeling Hydrothermal Processes at Ocean Spreading Centers*, Geophysical Monograph Series (178).
- Lowenstam H.A. (1981), Minerals formed by organisms *Science*, 211 (4487), 1126-1131.
- Lowenstam H. A. et Weiner S. (1989). *On Biomineralization*. Oxford: Oxford University Press.
- Ludford E., Palmer M., German C., Klinkhammer, G. (1996), The geochemistry of Atlantic hydrothermal particles. *Geophysical Research Letter* 23, 3503–3506.
- Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP related assays of biomass, enzymes and metabolites. *Methods in Enzymology* 305, 346-370.
- Luther G.W., Church T.M., Scudlark J.R., Cosman M. (1986), Inorganic and organic sulfur cycling in salt-marsh pore- waters. *Science* 232, 746-749.
- Luther G.W. (1991), Pyrite synthesis via polysulfide compounds. *Geochimica Cosmochimica Acta* 55, 2839–2849.
- Luther G., Glazer B., Hohmann L., Popp J., Taillefert M., Rozan T., Brendel P., Theberge S., Nuzzio D., (2001) Sulfur speciation monitored in situ with solid state gold amalgam voltammetric micro-electrodes: polysulfides as a special case in sediments, microbial mats and hydrothermal vent waters. *Journal of Environmental Monitoring* 3, 61–66.
- Ma K., Schicho R. N., Kelly R. M., Adams M. W. W. (1993), Hydrogenase of the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* is an elemental sulfur reductase or sulfhydrogenase: evidence for a sulfur-reducing hydrogenase ancestor. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* 90, 5341–5344.

- Ma K., Adams M. W. W. (1994), Sulfide dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: a new multifunctional enzyme involved in the reduction of elemental sulfur. *Journal of Bacteriology* 176, 6509–6517.
- Ma K., Weiss R., Adams M. W. W. (2000), Characterization of hydrogenase II from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and assessment of its role in sulfur reduction. *Journal of Bacteriology* 182, 1864–1871.
- Ma K., Adams M. W. W. (2001), Hydrogenases I and II from *Pyrococcus furiosus*. *Methods in Enzymology* 331, 208–216.
- Mann S., Sparks N.H.C., Frankel R., Bazylinski D., Jannasch H.W. (1990), Biomineralization of ferromagnetic greigite (Fe₃S₄) and iron pyrite (FeS₂) in a magnetotactic bacterium. *Nature* 343, 258–261.
- Mansy S.S. et Szostak J.W. (2008), Thermostability of model protocell membranes. *PNAS* 105 (36), 13351-13355.
- Marin-Carbonne J., Remusat L., Sforza M. C., Thomazo C., Cartigny P., Philippot P. (2018), Sulfur isotope's signal of nanopyrrites enclosed in 2.7 Ga stromatolitic organic remains reveal microbial sulfate reduction. *Geobiology*, 16(2), 121–138.
- Marin-Carbonne J., Busigny V., Miot J., Rollion-Bard C., Muller E., Drabon N., Philippot P. (2020), In Situ Fe and S isotope analyses in pyrite from the 3.2 Ga Mendon Formation (Barberton Greenstone Belt, South Africa): Evidence for early microbial iron reduction. *Geobiology*, 18(3), 306-325.
- Marin-Carbonne J., Decraene M. N., Havas R., Remusat L., Pasquier V., Alléon J., Thomazo C. (2022), Early precipitated micropyrrite in microbialites: a time capsule of microbial sulfur cycling. *Geochemical Perspectives Letters* 21, 7-12.
- Marshall C.P. et Olcott Marshall A. (2013), Raman hyperspectral imaging of microfossils: potential pitfalls. *Astrobiology* 13, 920-931.
- Matamoros-Veloz A., Cespedes O., Johnson B.R.G., Stawski T.M., Terranova U., de Leeuw N.H., Benning L.G. (2018) A highly reactive precursor in the iron sulfide system. *Nature Communication* 9, 3125.
- Mateo-Martí E., Briones C., Rogero C., Gomez-Navarro C., Methivier C., Pradier C.M., Martin-Gago J.A. (2008), Nucleic acid interactions with pyrite surfaces. *Chemical Physics* 352, 11-18.
- Mathis C., Bhattacharya T., Walker S. I. (2017), The Emergence of Life as a First Order Phase Transition. *Astrobiology* 17, 266.
- Maury M.-F. (1855), *The Physical Geography of the Sea*, New York, Harper & Brothers.
- McCauley J. W. et Roy R. (1974), Controlled nucleation and crystal growth of various CaCO₃ phases by the silica gel technique. *American Mineralogist: Journal of Earth and Planetary Materials*, 59(9-10), 947-963.
- McCliment E.A., Voglesonger K.M., O'Day P.A., Dunn E.E., Holloway J.R., Cary S.C. (2006), Colonization of nascent, deep-sea hydrothermal vents by a novel Archaeal and Nanoarchaeal assemblage. *Environmental Microbiology* 8 114-125.
- McCullom T. M. et Seewald J. S. (2001), A reassessment of the potential for reduction of dissolved CO₂ to hydrocarbons during serpentinization of olivine. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65(21), 3769-3778.
- McCullom T. M. et Seewald J. S. (2006). Carbon isotope composition of organic compounds produced by abiotic synthesis under hydrothermal conditions. *Earth and Planetary Science Letters*, 243, 74–84.

- McCullom T.M. (2007), Geochemical constraints on sources of metabolic energy for chemolithoautotrophy in ultramafic-hosted deep-sea hydrothermal systems. *Astrobiology* 7, 933–950.
- McCullom T. M. et Seewald J. S. (2007), Abiotic Synthesis of Organic Compounds in Deep-Sea Hydrothermal Environments. *Chemical Review* 107, 382-401.
- McCullom T.M., Lollar B.S., Lacrampe-Couloume G., Seewald J.S. (2010), The influence of carbon source on abiotic organic synthesis and carbon isotope fractionation under hydrothermal conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74(9), 2717-2740.
- McLean L. C. W., Tylizczak T., Gilbert P., Zhou D., Pray T. J., Onstott T. C., Southam G. (2008), Blackwell Publishing Ltd A high-resolution chemical and structural study of framboidal pyrite formed within a low-temperature bacterial biofilm. *Geobiology* 6, 471–480.
- McLennan (2008), The supply of heat to mid-ocean ridges by crystallization and cooling of mantle melts. In *Magma to Microbe: Modeling Hydrothermal Processes at Ocean Spreading Centers* (178), eds Lowell, Robert P.; Seewald, Jeffrey S.; Metaxas, Anna; Perfit, Michael R. [Geophysical Monograph Series].
- McLeod F., Kindler G. S., Wong H. L., Chen R., Burns B. P. (2019), Asgard archaea: Diversity, function, and evolutionary implications in a range of microbiomes. *AIMS Microbiology* 5(1), 48-61.
- McLoughlin N. et Grosch E.G. (2015), A hierarchical system for evaluating the biogenicity of metavolcanic- and ultramafic-hosted microalteration textures in the search for extraterrestrial life. *Astrobiology* 15, 901–921.
- McMahon S., Ivarsson M., Wacey D., Saunders M., Belivanova V., Muirhead D., Frost D. A. (2021), Dubiofossils from a Mars-analogue subsurface palaeoenvironment: The limits of biogenicity criteria. *Geobiology*, 19(5), 473-488.
- McMahon S. et Cosmidis J. (2022), False biosignatures on Mars: anticipating ambiguity. *Journal of the Geological Society* 179, jgs2021-050.
- Meier D., Pjevac P., Bach W., Markert S., Schweder T., Jamieson J., Petersen S., Amann R., Meyerdierks A. (2019), Microbial metal-sulfide oxidation in inactive hydrothermal vent chimneys suggested by metagenomic and metaproteomic analyses. *Environmental Microbiology* 21(2), 682–701.
- Mempin R., Tran H., Chen C., Gong H., Kim K., Lu S. (2013), Release of extracellular ATP by bacteria during growth. *BMC Microbiology* 13, 301.
- Merino N., Aronson H.S., Bojanova D.P., Feyhl-Buska J., Wong M.L., Zhang S., Giovannelli D. (2019), Living at the Extremes: Extremophiles and the Limits of Life in a Planetary Context. *Frontiers in Microbiology* 10, 780.
- Mielke R.E., Robinson K.J., White L.M., et al. (2011), Iron-sulfide bearing chimneys as potential catalytic energy traps at life's emergence. *Astrobiology* 11, 933–950.
- Miot J., Benzerara K., Obst M., Kappler A., Hegler F., Schädler S., Bouchez C., Guyot F., Morin G. (2009), Extracellular iron biomineralization by photoautotrophic iron-oxidizing bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 75(17), 5586-5591.
- Miot J., Recham N., Larcher D., Guyot F., Brest J., Tarascon J.-M. (2014). Biomineralized α -Fe₂O₃: Texture and electrochemical reaction with Li Energy. *Environmental Science*, 7(1), 451–460.
- Möbius K. (1878), Der Bau des Eozoon canadense nach eigenen Untersuchungen verglichen mit dem Bau der Foraminifera. *Paleontographica* 35, 175-194.

- Morales G. P. et Delaye L. (2020), Was LUCA a hyperthermophilic prokaryote? The impact-bottleneck hypothesis revisited. *Astrobiology and Cuatro Ciénegas Basin as an Analog of Early Earth*, 75-88.
- Morikawa M., Izawa Y., Rashid N., Hoaki T., T. Imanaka T. (1994), Purification and characterization of a thermostable thiol protease from a newly isolated hyperthermophilic *Pyrococcus* sp., *Applied and Environmental Microbiology* 60, 4559–4566.
- Morin G., Juillot F., Casiot C., Bruneel O., Personné J.-C., Elbaz- Poulichet F., Leblanc M., Ildefonse P. and Calas G. (2003), Bacterial formation of tooeleite and mixed arsenic(III) or arsenic(V)-iron(III) gels in the Carnoulès acid mine drainage, France. A XANES, XRD, and SEM study. *Environ. Sci Technol* 37, 1705–1712.
- Mortimer R. J. G., Galsworthy A. M. J., Bottrell S. H., Wilmot L. E., Newton R. J. (2011), Experimental evidence for rapid biotic and abiotic reduction of Fe (III) at low temperatures in salt marsh sediments : A possible mechanism for formation of modern sedimentary siderite concretions : Iron reduction in salt marsh sediments. *Sedimentology*, 58(6), 1514–1529.
- Morton J.L. et Sleep N.H. (1985), A Mid-Ocean Ridge Thermal Model: Constraints on the volume of axial hydrothermal heat flux. *Journal of Geophysical Research* 90 (B13), 11345-11353.
- Murowchick J. B., Barnes H. L. (1987), Effects of temperature and degree of supersaturation on pyrite morphology. *American Mineralogist* 72 (11-12): 1241–1250.
- Nabeh N., Brokaw C., Picard A. (2022), Quantification of Organic Carbon Sequestered by Biogenic Iron Sulfide Minerals in Long-Term Anoxic Laboratory Incubations. *Frontiers in Microbiology* 13, 662219.
- Naganuma T., Otsuki A., Seki H. (1989), Abundance and growth-rate of bacterioplankton community in hydrothermal vent plumes of the North Fiji Basin. *Deep Sea Research, Oceanographic Research Paper* 36, 1379–1390.
- Nercessian O., Reysenbach A.L., Prieur D., Jeanthon C. (2003), Archaeal diversity associated with in situ samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise (13 degrees N). *Environmental Microbiology* 5, 492-502.
- Neveu M., Hays L.E., Voytek M.A., New M.H., Schulte M.D. (2018), The ladder of life detection. *Astrobiology*, 18, 1375–1402
- Nielsen M. H., Li D., Zhang H., Aloni S., Han Y-J., Frandsen C., Seto J., Banfield J. F., Cölfen H., De Yoreo J. J. (2014), Investigating processes of nanocrystal formation and transformation via liquid cell TEM. *Microscopy and Microanalysis* 20, 425–436.
- Nims C., Lafond J., Alleon J., Templeton A.S., Cosmidis J. (2021), Organic biomorphs may be better preserved than microorganisms in early Earth sediments. *Geology* 49 (6), 629–634.
- Norris P., Burton N., Foulis N. (2000), Acidophiles in bioreactor mineral processing. *Extremophiles* 4, 71–76.
- O'Brien C. F. (1970), Eozoön Canadense" The Dawn Animal of Canada". *Isis*, 61(2), 206-223.
- Oelkers E.H., Schott J. (1998), Does organic acid adsorption affect alkali-feldspar dissolution rates? *Chemical Geology* 151, 235-245.
- Ohfuji H. and Rickard D. (2005), Experimental syntheses of framboids—a review. *Earth-Science Reviews* 71(3-4), 147-170.
- Park Y. et Faivre D., (2022), Diversity of Microbial Metal Sulfide Biomineralization, *ChemPlusChem* 87(1), 20.

- Pasteris J.D. et Wopenka B. (2003), Necessary, but Not Sufficient: Raman Identification of Disordered Carbon as a Signature of Ancient Life. *Astrobiology* 4(3), 727-738.
- Payne D., Spietz R.L., Boyd E.S. (2021), Reductive dissolution of pyrite by methanogenic archaea. *ISME J* 15, 3498–3507.
- Pelleter E., Cathalot C. (2022), HERMINE2 cruise, RV Pourquoi pas?, <https://doi.org/10.17600/18001851>
- Penger J., Conrad R., Blaser M. (2012), Stable carbon isotope fractionation by methylotrophic methanogenic archaea. *Applied and environmental microbiology*, 78(21), 7596-7602.
- Pepe-Ranney C., Berelson W.M., Corsetti F.A., Treants M., Spear J.R. (2012), Cyanobacterial construction of hot spring siliceous stromatolites in Yellowstone National Park. *Environmental Microbiology* 14(5), 1182–1197.
- Péron F. (1804), Précis d'un mémoire lu à l'Institut national, sur la température de la mer soit à sa surface, soit à diverses profondeurs. *Annales du Muséum national d'histoire naturelle* 5, 123–148.
- Péton L. (2018). Penser les profondeurs marines au XIXe siècle : un abîme terrestre et anthropomorphique. *Cahiers François Viète, série III*, 4, 93-111.
- Picard A., Gartman A., Girguis P. R. (2016a). What Do We Really Know about the Role of Microorganisms in Iron Sulfide Mineral Formation ? *Frontiers in Earth Science* 4.
- Picard A., Obst M., Schmid G., Zeitvogel F., Kappler A. (2016b), Limited influence of Si on the preservation of Fe mineral-encrusted microbial cells during experimental diagenesis. *Geobiology* 14(3), 276-292.
- Picard A., Gartman A., Clarke D.R., Girguis P.R. (2018), Sulfate-reducing bacteria influence the nucleation and growth of mackinawite and greigite. *Geochimica Cosmochimica Acta* 220, 363–384.
- Picard A., Gartman A., Cosmidis J., Obst M., Vidoudez C., Clarke D.R., Girguis P.R. (2019), Authigenic metastable iron sulfide minerals preserve microbial organic carbon in anoxic environments. *Chemical Geology* 530, 1–13.
- Picard A., Gartman A., Girguis P. (2021), Interactions Between Iron Sulfide Minerals and Organic Carbon: Implications for Biosignature Preservation and Detection. *Astrobiology* 21(5), 587-604.
- Pinti D., Mineau R., Clement V. (2009), Hydrothermal alteration and microfossil artefacts of the 3,465-million-year-old Apex chert. *Nature Geoscience* 2, 640–643.
- Plekan O., Feyer V., Šutara F., Skála T., Švec M., Cháb V., Matolín V., Prince K.C. (2007), The adsorption of adenine on mineral surfaces: iron pyrite and silicon dioxide. *Surface Science* 601, 1973-1980.
- Pokrovsky O. S., Shirokova L. S., Bénézeth P., Schott J., Golubev S. V. (2009), Effect of organic ligands and heterotrophic bacteria on wollastonite dissolution kinetics. *American Journal of Science* 309 (8), 731-772.
- Pontbriand C.W. and Sohn R.A. (2014), Microearthquake evidence for reaction-driven cracking within the Trans-Atlantic Geotraverse active hydrothermal deposit. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 119(2), 822-839.
- Popa R., Kinkle B. K., Badescu A. (2004), Pyrite Framboids as Biomarkers for Iron-Sulfur Systems. *Geomicrobiology Journal* 21(3), 193–206.
- Posfai M., Buseck P. R., Bazylinski D. A., Frankel R. B. (1998a), Reaction sequence of iron sulfide minerals in bacteria and their use as biomarkers. *Science* 280, 880–883.
- Posfai M., Buseck P., Bazylinski D., Frankel R. (1998b), Iron sulfides from magnetotactic bacteria; structure, composition, and phase transitions, *American Mineralogist* 83 (11-12 Part 2), 1469–1481.

- Posfai M. et Dunin-Borkowski R.E. (2006), Sulfides in biosystems. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 61, 679-714
- Posfai M., Lefevre C.T., Trubitsyn D., Bazylinski D.A., Frankel R.B. (2013), Phylogenetic significance of composition and crystal morphology of magnetosome minerals. *Frontiers in Microbiology* 4.
- Prieur D., Erauso G., Geslin C., Lucas S., Gaillard M., Bidault A., Mattenet A.-C., Rouault K., Flament D., Forterre P., Le Romancer M. (2004), Genetic elements of Thermococcales. *Biochemical Society Transactions* 32, 184–187.
- Qian G., Xia F., Brugger J., Skinner W. M., Bei J., Chen G., Pring A. (2011), Replacement of pyrrhotite by pyrite and marcasite under hydrothermal conditions up to 220 C: An experimental study of reaction textures and mechanisms. *American Mineralogist*, 96(11-12), 1878-1893.
- Raiswell R. et Canfield D. E. (2011), The iron biogeochemical cycle past and present. *Geochemical Perspectives* 1, 1–2.
- Rasmussen B., Fletcher I. R., Brocks J. J., Kilburn M. R. (2008), Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria. *Nature* 455, 1101–1104.
- Ravel B. et Newville M. (2005), ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT, *Journal of Synchrotron Radiation* 12, 537–541.
- Rettig S. J. et Trotter J. (1987), Refinement of the structure of orthorhombic sulfur, α -S₈. *Acta Crystallographica Section C* 43, 2260–2262.
- Rickard D. (1969), The microbiological formation of iron sulphides. *Stockholm Contributions to Geology*, 20, 49–66.
- Rickard D. (1997), Kinetics of pyrite formation by the H₂S oxidation of iron (II) monosulfide in aqueous solutions between 25 and 125°C: the mechanism. *Geochimica Cosmochimica Acta* 61, 135–147.
- Rickard D. et Luther G.W. (2007), Chemistry of iron sulfides. *Chemical Reviews* 107, 514–562.7
- Rickard D. (2012a), Sulfidic sediments and sedimentary rocks. In *Developments in Sedimentology*, 65. Amsterdam: Elsevier.
- Rickard D. T. (2012b), Microbial sulfate reduction in sediments, in *Developments in Sedimentology*, ed D. T. Rickard (Oxford: Elsevier), 319–351.
- Rickard D., Mussmann M. et Steadman J. A. (2017), Sedimentary Sulfides. *Elements*, 13(2), 117–122.
- Rietveld H. M. (1969), A profile refinement method for nuclear and magnetic structures, *Journal of Applied Crystallography* 2(2), 65-71.
- Rona P. A. (1980). TAG Hydrothermal Field: Mid-Atlantic Ridge crest at latitude 26°N, *Journal of the Geological Society* 137, 385-402.
- Rona P. A., Thompson G., Mottl M. J., Karson J. A., Jenkins W. J., Graham D., Mallette M., Von Damm K., E2dmond J. M. (1984), Hydrothermal Activity at the Trans-Atlantic Geotraverse Hydrothermal Field, Mid-Atlantic Ridge Crest at 26°N, *Journal of Geophysical Research* 89(B13), 11365-11377.
- Rona P. A., Klinkhamert G., Nelsen T. A., Trefry J. H., Elderfield H. (1986), Black smokers, massive sulphides and vent biota at the Mid-Atlantic Ridge, *Nature* 321, 33-37.

- Rona P. A., Hannington M. D., Raman C. V., Thompson G., Tivey M. K., Humphris S. E., Lalou C., Petersen S. (1993), Active and relict seafloor hydrothermal mineralization at the TAG hydrothermal field Mid-Atlantic Ridge, *Economic Geology* 18, 1989–2017.
- Rouxel O., Fouquet Y., Ludden J.N. (2004), Subsurface processes at the Lucky Strike hydrothermal field, Mid-Atlantic Ridge: evidence from sulfur, selenium, and iron isotopes. *Geochimica Cosmochimica Acta* 68, 2295–2311.
- Runge E. A., Mansor M., Kappler A., Duda J.-P. (2022), Microbial biosignatures in ancient deep-sea hydrothermal sulfides. *Geobiology* 21, 355–377.
- Russell M. J., Daniel R. M., Hall A. J., Sherringham J. A. (1994), A hydrothermally precipitated catalytic iron sulphide membrane as a first step toward life. *Journal of Molecular Evolution* 39, 231–243.
- Sander S., Koschinsky A. (2011), Metal flux from hydrothermal vents increased by organic complexation. *Nature Geoscience* 4, 145–150.
- Santangelo T.J., Čuboňová L., Reeve J.N. (2011), Deletion of alternative pathways for reductant recycling in *Thermococcus kodakarensis* increases hydrogen production. *Molecular Biology* 81(4), 897-911.
- Sapra R., Bagramyan K., Adams M. W. W. (2003). A simple energy conserving system: proton reduction coupled to proton translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* 100, 7545–7550.
- Sato T., Fukui T., Atomi H., Imanaka T. (2003), Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Journal of Bacteriology* 185, 210–220.
- Schallreuter R. E. (1984), Framboidal Pyrite in Deep-Sea Sediments. In *Initial Reports of the Deep Sea Drilling Project U.S. Government Printing Office* 75, 875–891.
- Schicho R., Kesen M.A., Adams M. W. W., Kelly R. M. (1993), Bioenergetics of Sulfur Reduction in the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Bacteriology* 175(6), 1823-1830.
- Schidlowski M. (2001), Carbon isotopes as biogeochemical recorders of life over 3.8 Ga of Earth history: Evolution of a concept. *Precambrian Research*, 106, 117–134.
- Schiffbauer J. et Xiao S. (2009), Novel application of focused ion beam electron microscopy (FIB-EM) in preparation and analysis of microfossil ultrastructures: A new view of complexity in early Eukaryotic organisms. *PALAIOS* 24 (9), 616–626.
- Schmidt K., Koschinsky A., Garbe-Schonberg D., de Carvalho L.M., Seifert R. (2007), Geochemistry of hydrothermal fluids from the ultramafic-hosted Logatchev hydrothermal field, 15 degrees N on the Mid-Atlantic Ridge: temporal and spatial investigation. *Chemical Geology* 242, 1–21.
- Schneiderhöhn H. (1923), Chalkographische untersuchung des mansfelder kupferschiefers. *Neues Jahrbuch für Mineralogie. Geologie und Paläontologie* 47, 1–38.
- Schopf J. et Packer B. (1987). Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona group, *Australian Science* 237, 70–73.
- Schopf J. W. (1993), Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science* 260, 640–646.
- Schopf J. W., Kudryavtsev A.B., Agresti D. et al. (2002), Laser–Raman imagery of Earth's earliest fossils. *Nature* 416, 73–76.

- Schopf J.W. (2006), Fossil evidence of Archaean life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 361, 869-885.
- Schopf J.W., Kudryavtsev A.B., Czaja A.D., Tripathi A.B. (2007), Evidence of Archaean life: stromatolites and microfossils. *Precambrian Research* 158, 141-155.
- Schopf J. W. et Kudryavtsev A.B (2009), Confocal laser scanning microscopy and Raman imagery of ancient microscopic fossils. *Precambrian Research* 173(1-4), 39-49.
- Schrenk M., Kelley D., Delaney J., Baross J. (2003), Incidence and diversity of microorganisms within the walls of an active deep-sea sulfide chimney, *Applied and Environmental Microbiology* 69 (6), 3580-3592.
- Schut G. J., Bridger S. L., Adams M. W. W. (2007). Insights into the metabolism of elemental sulfur by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: characterization of a coenzyme A-dependent NAD(P)H sulfur oxidoreductase. *Journal of Bacteriology* 189, 4431-4441.
- Schut, G., Boyd, E., Peters, J. and Adams, M. (2013), The modular respiratory complexes involved in hydrogen and sulfur metabolism by heterotrophic hyperthermophilic archaea and their evolutionary implications. *FEMS Microbiology Reviews* 37, 182-203.
- Schwarzenbach G. et Fischer A. (1960), Die acidität der Sulfane und die Zusammensetzung wässriger Polysulfidlösungen. *Helvetica Chimica Acta* 169, 1365-1390.
- Scott R. B., Rona P. A., Mc Gregor B. A. and Scott M. R. (1974), The TAG Hydrothermal Field, *Nature* 251, 301-302.
- Scott S. (1997), Submarine hydrothermal systems and deposits. *Geochemistry of Hydrothermal Ore Deposits*, 797-875.
- Sephton M. A. et Gilmour, I. (2001). Compound-specific isotope analysis of the organic constituents in carbonaceous chondrites. *Mass Spectrometry Reviews*, 20, 111-120.
- Sephton M. A., Verchovsky, A. B., Bland, P. A., Gilmour, I., Grady, M. M., & Wright, I. P. (2003). Investigating the variations in carbon and nitrogen isotopes in carbonaceous chondrites. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67, 2093-2108.
- Seyfried W. E. Jr. and Mottl M. J., (1995). Geologic setting and chemistry of deep-sea hydrothermal vents. In Karl, D. M. (ed.), *The Microbiology of Deep-Sea Hydrothermal Vents*. New York: CRC Press, 1-34.
- Sheik C. S., Anantharaman K., Breier J.A., Sylvan J.B., Edwards K.J., Dick G.J. (2015), Spatially resolved sampling reveals dynamic microbial communities in rising hydrothermal plumes across a back-arc basin. *ISME J.* 9, 1434-1445.
- Silva P. J., van den Ban E., Wassink H., Haaker H., de Castro B., Robb F. T., Hagen W. R. (2000). Enzymes of hydrogen metabolism in *Pyrococcus furiosus*. *European Journal of Biochemistry* 267, 6541-6551.
- Sim M. S., Bosak T., Ono S. (2011). Large sulfur isotope fractionation does not require disproportionation. *Science*, 333, 74-77.
- Simoneit B. R. T. and Lonsdale P. F. (1982), Hydrothermal petroleum in mineralized mounds at the seabed of Guaymas Basin, *Nature* 295, 198-202.
- Simoneit B. R. T. (1993), Aqueous high-temperature and high-pressure organic geochemistry of hydrothermal vent systems. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 57.14, 3231-3243.

- Soler N., Krupovic M., Marguet E., Forterre P. (2008), Membrane vesicles in natural environments: a major challenge in viral ecology. *ISME Journal* 9, 793–796.
- Soler N., Krupovic M., Marguet E., Forterre P. (2015), Membrane vesicles in natural environments: a major challenge in viral ecology. *ISME Journal* 9, 793–796.
- Soliman M. et Goresy A. (2012), Framboidal and idiomorphic pyrite in the upper Maastrichtian sedimentary rocks at Gabal Oweina, Nile Valley, Egypt: Formation processes, oxidation products and genetic implications to the origin of framboidal pyrite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 90, 195–220.
- Söhnel O. et Garside J. (1992), *Precipitation: basic principles and industrial applications*.
- Spang A., Saw J. H., Jørgensen S. L., Zaremba-Niedzwiedzka K., Martijn J., Lind A. E., van Eijk R., Schleper C., Guy L., Ettema T. J. G. (2015), Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature* 521, 173–179.
- Spiess F. N., Macdonald K. C., Atwater T., Ballard R., Carranza A., Cordoba D., Cox C., Diaz Garcia V. M., Francheteau J., Guerrero J., Hawkins J., Haymon R., Hessler R., Juteau T., Kastner M., Larson R., Luyendyk B., Macdougall J. D., Miller S., Normark W., Orcutt J., Rangin C. (1980), East Pacific Rise: Hot Springs and Geophysical Experiments, *Science* 207 (4438), 1421-1433.
- Stanjek H., Schneider J. (2000), Anisotropic peak broadening analysis of a biogenic soil greigite (Fe₃S₄) with Rietveld analysis and single peak fitting, *American Mineralogist* 85(5-6), 839–846.
- Stanley W. and Southam G. (2018), The effect of grampositive (*Desulfosporosinus orientis*) and gram-negative (*Desulfovibrio desulfuricans*) sulfate-reducing bacteria on iron sulfide mineral precipitation. *Canadian Journal of Microbiology* 64, 629–637.
- Stein C. et Stein S. (1994), Constraints on hydrothermal Heat-Flux through the oceanic lithosphere from global heat-flow. *Journal of Geophysical Research* 99, 3081–3095.
- Stetter K. O. (1982), Ultrathin mycelia-forming organisms from submarine volcanic areas having an optimum growth temperature of 105 °C. *Nature* 300, 258-260.
- Stetter K. (1992), Life at the upper temperature border. In *Frontiers of Life*, ed. J.Trân Thanh Van, K.Trân Thanh Van, J.C.Mounolou, J.Schneider and C.McKay, pp. 195–219 (Gif-sur-Yvette: Editions Frontières)..
- Stetter K.O. (1996), Hyperthermophilic Prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 18, 149-158.
- Stetter K.O. (1999), Extremophiles and their adaptation to hot environments, *FEBS Letters* 452(1–2), 22-25.
- Steudel R. (1996), Mechanism for the formation of elemental sulfur from aqueous sulfide in chemical and microbiological desulfurization processes. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 35, 1417-1423.
- Sugitani K., Grey K., Allwood A., Nagaoka T., Mimura K., Minami M., Walter M. R. (2007), Diverse microstructures from Archaean chert from the Mount Goldsworthy–Mount Grant area, Pilbara Craton, Western Australia: microfossils, dubiofossils, or pseudofossils?. *Precambrian Research*, 158(3-4), 228-262.
- Summons R. E., Welander P. V., Gold D. A. (2021), Lipid biomarkers: Molecular tools for illuminating the history of microbial life. *Nature Reviews Microbiology* 20, 174–185.
- Swaraj S., Stanescu S., Rioult M., Besson A., Hitchcock A. P. (2017), Performance of the HERMES beamline at the carbon K-edge, *Journal of Physics: Conference Series*, 849, 012046.
- Szostak J., Bartel D., Luisi P. (2001), Synthesizing life. *Nature* 409, 387–390.

- Takai K., Horikoshi K. (1999), Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics* 152, 1285–1297.
- Takai, K., A. Sugai, T. Itoh and K. Horikoshi. (2000), *Palaeococcus ferrophilus* gen. nov., sp. nov., a barophilic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 489–500.
- Takai K., Komatsu T., Inagaki F., Horikoshi, K. (2001), Distribution of archaea in a black smoker 785 chimney structure. *Applied Environmental Microbiology* 67, 3618–3629.
- Takai K., Nakagawa T., Reysenbach A.L., Hoek J. (2006), Microbial ecology of Mid-Ocean Ridges and Back-Arc Basins. In *Back-Arc Spreading Systems: geological, biological, chemical, and physical interactions*. Christie D.M., Fisher C.R., Sang-Mook L., Givens S. (eds). Washington, DC: American Geophysical Union, 185-213.
- Takai K., Nakamura K., Toki T., Tsunogai U., Miyazaki M., Miyazaki J., Hirayama H., Nagakawa S., Nunoura T., Horikoshi K. (2008), Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *PNAS* 105 (31), 10949-10954.
- Tarnocai C., Hattori K., (1997), « Invisible » gold in sulfides from the Campbell Mine, Red Lake Greenstone belt, Ontario : Evidence for mineralization during the peak of metamorphism. *The Canadian Mineralogist* 35, 805-815.
- Taylor K.G. et Konhäuser K.O. (2011), Iron in earth surface systems: a major player in chemical and biological processes. *Elements* 7, 83–88.
- Templeton A., Knowles E., Eldridge D., Arey B., Dohnalkova A., Webb S., Bailey B., Tebo B., Staudigel H. (2009), A seafloor microbial biome hosted within incipient ferromanganese crusts. *Nature Geoscience* 2, 872–876.
- Thatje S., Marsh L., Roterman C. N., Mavrogordato M. N., Linse K. (2015), Adaptations to Hydrothermal Vent Life in *Kiwa tyleri*, a New Species of Yeti Crab from the East Scotia Ridge, Antarctica. *PLoS ONE* 10(6): e0127621.
- Thiel J., Byrne, J.M. Kappler, A. Schink, B., Pester M. (2019), Pyrite formation from FeS and H₂S is mediated through microbial redox activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 116, 6897–6902.
- Thomas-Keprta K.L., Clemett S.J., Bazylinski D., Kirschvink J.L., McKay D.S., Wentworth S.J., Vali H., Gibson Jr.E.K., McKay M.F., Romane C.S. (2000), Elongated prismatic magnetite (Fe₃O₄) crystals in ALH84001 carbonate globules: potential Martian magnetofossils. *Geochimica Cosmochimica Acta* 64, 4049-408.
- Thomas-Keprta K.L., Clemett S.J., Bazylinski D., Kirschvink J.L., McKay D.S., Wentworth S.J., Vali H., Gibson Jr.E.K., McKay M.F., Romane C.S. (2001), Truncated hexa-octahedral magnetite crystals in ALH84001: presumptive biosignatures. *PNAS USA* 98, 2164-2169.
- Thomas-Keprta K.L., Clemett S.J., Bazylinski D., Kirschvink J.L., McKay D.S., Wentworth S.J., Vali H., Gibson Jr.E.K., McKay M.F., Romane C.S. (2002), Magnetofossils from ancient Mars: a robust biosignature in the Martian meteorite ALH84001. *Applied Environmental Microbiology* 68, 3663-3672.
- Thompson G., Mottl M. J., Rona P. A. (1985), Morphology, Mineralogy and Chemistry of Hydrothermal Deposits from the TAG Area, 26°N Mid-Atlantic Ridge. *Chemical Geology* 49, 243-257.
- Thompson G., Humphris S. E., Schroeder B., Sulanowska M. (1988), Active Vents and Massive Sulfides at 26°N (TAG) and 23°N (Snake Pit) on the Mid-Atlantic Ridge. *Canadian Mineralogist* 26, 697-711.

- Tian L., Tong J., Algeo T.J., Song H., Song H., Chu D., Shi L., Bottjer D.J. (2014), Reconstruction of Early Triassic ocean redox conditions based on framboidal pyrite from the Nanpanjiang Basin, South China. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 412, 68-79.
- Tivey M. (1995), The influence of hydrothermal fluid composition and advection rates on black smoker chimney mineralogy: insights from modelling transport and reaction. *Geochimica Cosmochimica Acta* 59, 1933–1949.
- Tivey M.A., Bradley A. M., Joyce T. M., Kadko D. (2002), Insights into tide-related variability at seafloor hydrothermal vents from time-series temperature measurements. *Earth and Planetary Science Letters* 202, 693-707.
- Tivey M.A., Schouten H., Kleinrock M.C. (2003), A near-bottom magnetic survey of the Mid-Atlantic Ridge axis at 26°N: Implications for the tectonic evolution of the TAG segment. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 108(B5).
- Toner B. M., Fakra S. C., Manganini S. J., Santelli C. M., Marcus M. A., Moffett J. W., et al. (2009), Preservation of iron(II) by carbon-rich matrices in a hydrothermal plume. *Natural Geosciences* 2, 197–201.
- Truche L., Berger G., Destrigneville C., Guillaume D., Giffaut E. (2010), Kinetics of pyrite to pyrrhotite reduction by hydrogen in calcite buffered solutions between 90 and 180 C: Implications for nuclear waste disposal. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74(10), 2894-2914.
- Trudinger P. A., Chambers L. A., Smith J. W. (1985), Low-temperature sulphate reduction: biological versus abiological. *Can. J. Earth Sci.* 22, 1910–1918.
- Truong C., Bernard S., Le Pape P., Morin G., Baya C., Merrot P., Gorlas A., Guyot F. (2023), Production of carbon-containing pyrite spherules induced by hyperthermophilic Thermococcales: a biosignature? *Frontiers in Microbiology* 14, 1145781.
- Ueno Y., Isozaki Y., Yurimoto H., Maruyama S. (2001), Carbon isotopic signatures of individual Archean microfossils(?) from Western Australia. *International Geology Review* 43, 196–212.
- Urquhart S.G., Hitchcock A.P., Smith A.P., et al (1999), NEXAFS spectromicroscopy of polymers: overview and quantitative analysis of polyurethane polymers. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 100:119–135.
- Van Dover C. L. (2000), *The Ecology of Deep-Sea Hydrothermal Vents*. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Van Dover C.L., Arnaud-Haond S., Gianni M., Helmreich S., Huber J.A., Jaeckel A.L., Metaxas A., Pendleton L.H., Petersen S., Ramirez-Llodra E., Steinberg P.E., Tunnicliffe V., Yamamoto H. (2018), Scientific rationale and international obligations for protection of active hydrothermal vent ecosystems from deep-sea mining, *Marine Policy* 90, 20-28.
- Van Dover C. (2019), Inactive Sulfide Ecosystems in the Deep Sea: A Review. *Frontiers in Marine Sciences, Deep-Sea Environments and Ecology* 6, 461.
- Ver Eecke H.C., Kelley D.S., Holden J.F. (2009), Abundances of hyperthermophilic autotrophic Fe(III) oxide reducers and heterotrophs in hydrothermal sulfide chimneys of the northeastern Pacific Ocean. *Appl Environmental Microbiology* 75, 242–245.
- Verhees C. H., Kengen S. W. M., Tuininga J. E., Schut G. J., Adams M. W. W., De Vos W. M., Van Der Oost J. (2003), The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *Biochemical Journal* 375, 231-246.

- Vietti L. A., Bailey J. V., Fox D. L., Rogers R. R. (2015), Rapid formation of framboidal sulfides on bones surfaces from a simulated marine carcass fall. *PALAIOS* 30(4), 327–334.
- Von Damm K.L. (1995), Controls on the chemistry and temporal variability of seafloor hydrothermal fluids. In *Seafloor Hydrothermal Systems: Physical, Chemical, Biological, and Geological Interactions*. Humphris, S., Zierenberg, R., Mullineaux, L., Thomson, R. (eds). Washington DC, USA: American Geophysical Union, 222–247.
- Voorhees P. W. (1985), The theory of Ostwald ripening. *Journal of Statistical Physics* 38, 231–252.
- Wacey D., Saunders M., Kong C., Brasier A., Brasier M. (2016). 3.46 Ga Apex chert ‘microfossils’ reinterpreted as mineral artefacts produced during phyllosilicate exfoliation. *Gondwana Research* 36, 296–313.
- Wacey D., Eiloart K., Saunders M. (2019), Comparative multi-scale analysis of filamentous microfossils from the c. 850 Ma Bitter Springs Group and filaments from the c. 3460 Ma Apex chert. *Journal of the Geological Society* 176 (6): 1247–1260.
- Wächtershäuser G. (1988), Pyrite Formation, the First Energy Source for Life: a Hypothesis. *Systematic and Applied Microbiology* 10:207–210.
- Wächtershäuser G. (1990), Evolution of the first metabolic cycles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 200–204.
- Wächtershäuser G. (1992), Groundworks for an evolutionary biochemistry: The iron-sulphur world. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 58(2), 85–201.
- Wächtershäuser G. (1998), Origin of life in an iron–sulfur world. *The Molecular Origins of Life, assembling pieces of the puzzle*, Brack A. (ed), Cambridge, 206–218.
- Waite T., Moore T., Childress J., Hsu-Kim H., Mullaugh K., Nuzzio D., Amber P., Tsang J., Fisher C., Luther G. (2008), Variation in sulfur speciation with shellfish presence at a Lau Basin diffuse flow vent site. *Journal of Shellfish Research* 27, 163–168.
- Walker J.C.G. (1977), *Evolution of the Atmosphere*. Macmillan, New York.
- Wang J., Morin C., Li L., Hitchcock A.P., Scholl A., Doran A. (2009), Radiation damage in soft X-ray microscopy, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 170(1–3), 25–36.
- Watson J. H. P., Cressey B. A., Roberts A. P., Ellwood D. C., Charnock J. M., Soper A. K. (2000), Structural and magnetic studies on heavy-metal-adsorbing iron sulphide nanoparticles produced by sulphate-reducing bacteria. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 214, 13–30.
- Webb S. M. (2005), SIXpack: a graphical user interface for XAS analysis using IFEFFIT. *Physica Scripta*, 1011.
- Weiner S. et Dove P.M. (2003), An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 54, 1–29.
- Welch S.A., Ullman W.J. (1993), The effect of organic acids on plagioclase dissolution rates and stoichiometry *Geochimica Cosmochimica Acta*, 57, 2725–2736.
- Westall F. et Folk R. L. (2003), Exogenous carbonaceous microstructures in Early Archaean cherts and BIFs from the Isua Greenstone Belt: Implications for the search for life in ancient rocks. *Precambrian Research* 126, 313–330.
- Westall F. (2005), Life on the early Earth: A sedimentary view. *Science* 308, 366–367.

- Wheat C., Jannasch W., Plant, J., Moyer C, Sansone F., McMurtry G. (2000), Continuous sampling of hydrothermal fluids from Loihi Sea mount after the 1996 event, *Journal of Geophysical Research* 105, 19353–19367.
- White L.M., Bhartia R., Stucky G.D., et al. (2015), Mackinawite and greigite in ancient alkaline hydrothermal chimneys: identifying potential key catalysts for emergent life. *Earth and Planetary Science Letters* 430, 105–114.
- White S. N., Humphris S. E., Kleinrock M. C. (1998), New observations on the distribution of past and present hydrothermal activity in the TAG area of the Mid-Atlantic Ridge (26°08'N), *Marine Geophysical Research* 20, 41–56.
- Wilfert P., Meerdink J., Degaga B., Temmink H., Korving L., Witkamp G.J., Goubitz K., Van Loosdrecht M. (2020), Sulfide induced phosphate release from iron phosphates and its potential for phosphate recovery. *Water Research* 171, 115389.
- Williford K. H., Van Kranendonk M. J., Ushikubo T., Kozdon R., Valley J. W. (2011), Constraining atmospheric oxygen and seawater sulfate concentrations during Paleoproterozoic glaciation: In situ sulfur three-isotope microanalysis of pyrite from the Turee Creek Group, Western Australia. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(19), 5686-5705.
- Wilkin R. et Barnes H. (1996), Pyrite formation by reactions of iron monosulfides with dissolved inorganic and organic sulfur species, *Geochimica Cosmochimica Acta*, 60, 4167-4179.
- Winn C., Karl D., Massoth, G. (1986), Microorganisms in deep-sea hydrothermal plumes. *Nature* 320, 744–746.
- Wirth R. (2017), Colonization of black smokers by hyperthermophilic microorganisms. *Trends in microbiology*, 25(2), 92-99.
- Wirth R., Luckner M., Wanner G. (2018), Validation of a hypothesis: colonization of black smokers by hyperthermophilic microorganisms. *Frontiers in Microbiology* 9, 524.
- Woese C., Kandler O. Wheelis M. (1990), Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archae, Bacteria, and Eukarya. *Proc. Natl Sci. USA*, 87, 4576–4579.
- Wu J., Wells M. L., Rember R. (2011), Dissolved iron anomaly in the deep tropical–subtropical Pacific: evidence for long-range transport of hydrothermal iron. *Geochimica Cosmochimica Acta* 75, 460–468.
- Wu C-H., Schut G.J., Poole F.L., Haja D.K., Adams M.W. (2018), Characterization of membrane-bound sulfane reductase: A missing link in the evolution of modern day respiratory complexes. *Journal of Biological Chemistry* 293 (43), 16687-16696.
- Xiong Y., Guilbaud R., Peacock C.L., Cox R.P., Canfield D. E., Krom M.D., Poulton S.W. (2019) Phosphorus cycling in Lake Cadagno, Switzerland: a low sulfate euxinic ocean analogue. *Geochimica Cosmochimica Acta* 251, 116–135.
- Yuan Y., Wang L., Gao L. (2020), Nano-Sized Iron Sulfide: Structure, Synthesis, Properties, and Biomedical Applications, *Frontiers in Chemistry* 8 (818).
- Yücel M., Gartman A., Chan C.S., Luther G.W. (2011), Hydrothermal vents as a kinetically stable source of iron-sulphide-bearing nanoparticles to the ocean, *Natural Geoscience* 4, 367-371.
- Zeldovich K.B., Berezovsky I.N., Shakhnovich E.I. (2007), Protein and DNA sequence determinants of thermophilic adaptation. *PLoS Comput Biol* 3(1), e5.
- Zhou C., Vannela R., Hayes K. F., Rittmann B. E. (2014), Effect of growth conditions on microbial activity and iron-sulfide production by *Desulfovibrio vulgaris*. *Journal of Hazardous Materials* 272, 28–35.

Zhu W., Tivey M. K., Gittings, H., Craddock P. R. (2007), Permeability-porosity relationships in seafloor vent deposits: Dependence on pore evolution processes. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 112(B5).

Liste des figures

Introduction

Figure 1 Carte du plancher océanique par Tanguy de Rémur	1
Figure 2 Découverte des cheminées hydrothermales	3
Figure 3 Arbre phylogénétique universel simplifié	4

Chapitre I.

Figure 1 Distribution des sites hydrothermaux connus	9
Figure 2 Schéma de la circulation hydrothermale	10
Figure 3 Schéma de la croissance d'une cheminée hydrothermale	12
Figure 4 Chronologie des débuts de l'évolution de la vie sur Terre	14
Figure 5 Habitats et communautés microbiennes dans les fumeurs noirs	16
Figure 6 Macrofaune des cheminées hydrothermales	17
Figure 7 Exemples de biomorphes	21
Figure 8 Représentation d'une biosignature	23
Figure 9 Biomorphes de carbonate de calcium	24
Figure 10 Représentation schématique des deux formes de biominéralisation	26
Figure 11 Images illustrant les formes de biominéralisation	28
Figure 12 Autres images illustrant les formes de biominéralisation	31
Figure 13 Images de biominéraux en lien avec les cheminées hydrothermales	34
Figure 14 Pyrites framboïdales	36

Chapitre II.

Figure 1 Cellules de Thermococcales	55
Figure 2 Boîte à gants	56
Figure 3 Fioles de culture et bombes réactionnelles en titane	57
Figure 4 Cellule de Malassez	60
Figure 5 Protocole de mesure de l'ATP	61
Figure 6 Gamme de calibration de l'acétate (HPLC)	62
Figure 7 Schéma du GC-TCD avant l'analyse	63
Figure 8 Schéma du GC-TCD pendant l'analyse	64

Figure 9 Programme utilisé pour l'analyse des gaz au GC-TCD	65
Figure 10 Identification des gaz selon leur temps de rétention	65
Figure 11 Calibration du H ₂ S (GC-TCD)	66
Figure 12 Schéma illustrant le principe de la diffraction des rayons X	67
Figure 13 Schéma illustrant les principes d'interaction électrons-matière	70
Figure 14 Schéma représentant le fonctionnement d'un MET	71
Figure 15 Lames FIB réalisées sur des échantillons de pyrite	72
Figure 16 Structures électroniques des atomes de S et de C	74
Figure 17 Zones caractéristiques des signaux XANES et EXAFS	75

Chapitre III.

Figure 1 Courbes de croissance et mesures d'ATP	84
Figure 2 Suivis de gaz en condition soufre	86
Figure 3 Suivis de gaz en condition cystine	86
Figure 4 Suivis de gaz en condition pyruvate	87
Figure 5 Evolution de la pression partielle des gaz	88
Figure 6 Mesure de la production d'acétate	89
Figure 7 Modèle proposé pour les voies métaboliques de <i>T. kodakarensis</i>	94

Chapitre IV.

Truong et al. 2023 – Figure 1 Représentation schématique du protocole expérimental	101
Truong et al. 2023 – Figure 2 Spectres XANES au seuil K du soufre	103
Truong et al. 2023 – Figure 3 Diffractogrammes	105
Truong et al. 2023 – Figure 4 Observations MEB et analyses EDXS	106
Truong et al. 2023 – Figure 5 Diffractogrammes	107
Truong et al. 2023 – Figure 6 Proportions des espèces du soufre et du fer	109

Chapitre V.

Figure 1 Localisation du site hydrothermal TAG et de la zone d'échantillonnage	125
Truong et al. 202x – Figure 1	129
Truong et al. 202x – Figure 2	134
Truong et al. 202x – Figure 3	135
Truong et al. 202x – Figure 4	136

Truong et al. 202x – Figure 5	137
Truong et al. 202x – Figure 6	138
Truong et al. 202x – Figure 7	139
Truong et al. 202x – Figure 8	140

Chapitre VI.

Truong et al. 202x – Figure 1	164
Truong et al. 202x – Figure 2	165
Truong et al. 202x – Figure 3	166
Figure 1 Extrait de diffractogrammes	168

Chapitre VII.

Figure 1 Profil électrophorétique des extractions d'ARN totaux	178
Figure 2 Vésicules de soufre observées en cryo-microscopie et spectre EDXS Références	182
Figure 3 Observations MEB des pyrites après altération à 150°C – 10j	189
Figure 4 Spectres STXM sur des pyrites altérées	190
Figure 5 Estimation de l'abondance relative des phases minérales	191
Figure 6 Fraction massique du soufre basée sur des analyses CHNS	192
Figure 7 Cartographie d'une section transversale de cheminée hydrothermale	193
Figure 8 Caractérisation d'un échantillon provenant de Red Lake (-2.9Ga)	195

Liste des tableaux

Chapitre II.

Tableau 1 Coefficient directeur pour les gaz	66
--	----

Chapitre III.

Tableau 1 Résultats des comptages cellulaires et des mesures d'ATP	84
--	----

Tableau 2 Résultats de la quantification des gaz	87
--	----

Chapitre IV.

Truong et al. 2023 – Tableau 1	103
--------------------------------	-----

Truong et al. 2023 – Tableau 2	105
--------------------------------	-----

Truong et al. 2023 – Tableau 3	106
--------------------------------	-----

Chapitre V.

Tableau 1 Composition élémentaire	135
-------------------------------------	-----

Tableau 2 Valeurs $[C]_{STXM}$ pour estimation du carbone	139
---	-----

Chapitre VI.

Tableau 1 Conditions expérimentales pour tester la précipitation de pyrites	158
---	-----

Truong et al. 202x – Tableau 1	164
--------------------------------	-----

Chapitre VII.

Tableau 1 Conditions expérimentales pour tester l'altération des pyrites	188
--	-----

Precipitation of greigite and pyrite induced by Thermococcales: an advantage to live in Fe- and S-rich environments?

A. Gorlas ^{1,*}, T. Mariotte,¹ L. Morey,¹ C. Truong,² S. Bernard,² J.-M. Guigner,² J. Oberto,¹ F. Baudin,³ G. Landrot,⁴ C. Baya,² P. Le Pape,² G. Morin,² P. Forterre¹ and F. Guyot^{2,5}

¹Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Gif-sur-Yvette, 91198, France.

²Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, UMR 7590 - CNRS, Sorbonne Université, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris Cedex 05, 75252, France.

³Institut des Sciences de la Terre de Paris, UMR 7193 – Sorbonne Université - CNRS, Paris, 75005, France.

⁴Synchrotron SOLEIL - SAMBA beamline, Saint-Aubin, 91190, France.

⁵Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France.

Summary

Thermococcales, a major order of archaea inhabiting the iron- and sulfur-rich anaerobic parts of hydrothermal deep-sea vents, have been shown to rapidly produce abundant quantities of pyrite FeS₂ in iron-sulfur-rich fluids at 85°C, suggesting that they may contribute to the formation of ‘low temperature’ FeS₂ in their ecosystem. We show that this process operates in *Thermococcus kodakarensis* only when zero-valent sulfur is directly available as intracellular sulfur vesicles. Whether in the presence or absence of zero-valent sulfur, significant amounts of Fe₃S₄ greigite nanocrystals are formed extracellularly. We also show that mineralization of iron sulfides induces massive cell mortality but that concomitantly with the formation of greigite and/or pyrite, a new generation of cells can grow. This phenomenon is observed for Fe concentrations of 5 mM but not higher suggesting that above a threshold in the iron pulse all cells are lysed. We hypothesize that iron sulfides precipitation

on former cell materials might induce the release of nutrients in the mineralization medium further used by a fraction of surviving non-mineralized cells allowing production of new alive cells. This suggests that biologically induced mineralization of iron-sulfides could be part of a survival strategy employed by Thermococcales to cope with mineralizing high-temperature hydrothermal environments.

Introduction

Iron (Fe) is a cofactor of numerous important cellular processes and hence is an essential nutrient for living organisms (Lasocki *et al.*, 2014). Nevertheless, this chemical element can exert severe cell toxicity when present above critical concentrations (Frawley and Fang, 2014). Whereas it occurs at extremely low concentrations, in the nanomolar range, in most oceanic reservoirs (Turekian, 1968), it is found at much higher concentrations (up to ~25 mM) in one of the most metal-rich biotopes on Earth: the hydrothermal vent environments (e.g. Holden and Adams, 2003; Tivey, 2007; Holden *et al.*, 2012; Toner *et al.*, 2016). Acidic hydrothermal deep-sea vents, the most biologically active sites in the deep ocean, are sulfur-rich structures characterized by unique physical and chemical properties. The chemical speciations of iron and sulfur at hydrothermal vent environments have been investigated and it has been suggested that they control the habitats of numerous organisms (Luther *et al.*, 2001a, 2001b). Whereas in the surrounding aerobic seawater, iron is mainly in ferric form Fe(III) as iron (oxyhydr)oxide minerals, it is predominantly in relatively soluble ferrous form Fe(II) in the anaerobic and reducing hydrothermal fluid (Scholten *et al.*, 2019), in which dominant sulfur species are the sulfides S(-II) mainly H₂S, HS⁻ and lesser S²⁻ (Rickard and Luther, 2007; Gartman *et al.*, 2011; Rickard, 2012). In the cooling hydrothermal vent fluid, Fe(II) reacts with S(-II) to form inorganic iron sulfide deposits starting with mackinawite and pyrrhotite (close to an FeS stoichiometry), which are thermodynamically unstable and then evolve mostly into FeS₂ pyrite (Luther, 1991). Significant

Received 31 July, 2020; revised 5 January, 2022; accepted 17 January, 2022. *For correspondence. E-mail aureore.gorlas@i2bc.paris-saclay.fr; Tel. (+33) (0)1 69 82 62 36; Fax (+33) (0)1 69 15 37 15.

efforts have been made to understand the formation process and kinetics of pyrite under laboratory conditions (Benning *et al.*, 2000; Rickard & Luther, 2007; Rickard, 2012; Gartman *et al.*, 2014; Matamoros-Velozza *et al.*, 2018) and it has been demonstrated that greigite (Fe_3S_4) may be a possible intermediate phase in the process of pyrite formation (Hunger and Benning, 2007).

The cycling of iron in hydrothermal sources is not only mediated by geological processes; biological organisms indeed play a role in controlling iron dynamics (Raiswell and Canfield, 2011; Holden *et al.*, 2012; Emerson, 2016). It has been shown that microorganisms interact with their mineral environment by promoting mineral dissolution or precipitation. Thus, biologically induced mineralization of Fe is an important process in hydrothermal systems (Holden *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2019). For instance, chemolithoautotrophic Fe-oxidizing bacteria (FeOB) such as the mesophile *Mariprofundus ferrooxydans* (Emerson and Moyer, 2002; Emerson *et al.* 2007) are able to oxidize Fe(II) as energy source under microaerophilic conditions. The products of this oxidation consist of Fe(III) oxyhydroxide, in the form of filamentous stalk-like structures allowing the formation of extensive bacterial biofilms Fe-rich on the cool outer surfaces of certain active sulfide chimneys (<100°C) (Emerson *et al.*, 2007; Emerson *et al.*, 2010; Chan *et al.*, 2011; Holden *et al.*, 2012; Chan *et al.*, 2016). These biogenic minerals, together with abiotic iron oxyhydroxides, could upon heating become interesting substrates for hyperthermophilic Fe(III)-reducing microorganisms (Kashefi and Lovley, 2000; Slobodkin *et al.*, 2009; Ver Eecke *et al.*, 2009; Emerson *et al.*, 2010; Kashefi, 2012; Lin *et al.*, 2014; Kashyap *et al.*, 2018) such as the archaeon *Geoglobus ahangari* (Kashefi *et al.*, 2002). In those cases, cells and iron oxyhydroxides are in close association and the reduction of Fe(III) occurs via mechanisms involving either direct contact with the cells or electron shuttles between the cell and the mineral particles (Manzella *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014; Miot and Etique, 2016). The production of iron oxyhydroxides could occur preferentially as microbial communities change from hyperthermophiles to mesophiles, when hydrothermal fluid goes from the inner to the outer side of hydrothermal chimneys and/or during the transition from active to inactive hydrothermal vent (Sylvan *et al.*, 2012; Hou *et al.*, 2020).

In the interior of active sulfides chimney (>250°C), iron sulfide minerals, mainly pyrite and chalcopyrite, are predominant. The cooler middle layers of the chimneys (typically 80°C–150°C) harbour a population of hyperthermophilic microorganisms, and pyrite and marcasite also arise at these locations, often associated with calcium and magnesium sulfate minerals (Lin *et al.*, 2016). The causal relationships existing between

those 'low-temperature' FeS_2 iron di-sulfides and the hyperthermophilic microorganisms inhabiting the chimneys is an open question (Juniper and Fouquet, 1988; McCollom, 2007). As mentioned, sulfate from seawater is abundant in those mixing zones of chimneys and could be thought of as a source of those FeS_2 minerals. Sulfate-reducing bacteria (SRB) are known to produce mackinawite and greigite (Picard *et al.*, 2018) and genes of SRB metabolism have been found in the outer walls of chimneys (Kormas *et al.*, 2006). So far, however, these microorganisms have not been demonstrated to produce FeS_2 pyrites (Picard *et al.*, 2016) and further systematic studies using hyperthermophilic sulfate-reducing bacteria or archaea isolated from hydrothermal chimneys would be necessary to fully test their role. Alternatively, we recently demonstrated that the hyperthermophilic Thermococcales, which are predominant inhabitants of the hot parts of hydrothermal sources (Takai *et al.*, 2001; Prieur *et al.*, 2004), could be an important contributor to the formation of iron sulfides in their ecosystem (Gorlas *et al.*, 2018). To mimic more closely the conditions of a pulse of hydrothermal fluid (Tivey *et al.* 1990) and to study possible biological impact on the formation of iron minerals, Thermococcales cells were incubated with high concentration of dissolved Fe(II) as iron source, a major solute in the hydrothermal fluid (Taylor and Konhauser, 2011). These first mineralization experiments have shown that Thermococcales are able to rapidly produce pyrite (FeS_2) and greigite (Fe_3S_4) within former cells or vesicles and on cellular debris, respectively (Gorlas *et al.*, 2018). Cell lysis products are initially loaded with amorphous iron phosphates which provide substrates for greigite nucleation whereas sulfur-rich vesicles (SV) produced by Thermococcales during cell growth (Gorlas *et al.*, 2015) evolve mostly into pyrite (Gorlas *et al.*, 2018). Members of the order Thermococcales are anaerobes and sulfur reducers using either $\text{S}(0)$ or sulfur compounds as electron acceptors thus producing H_2S (Blumentals *et al.*, 1990; Adams, 1994; Adams *et al.*, 2001; Schut *et al.*, 2013); nonetheless, a few Thermococcales species (as *Thermococcus kodakarensis* KOD1) can grow without $\text{S}(0)$ and produce H_2 (Kanai *et al.*, 2005; Schut *et al.*, 2013). As detoxification mechanism, *Thermococcus kodakarensis* is able to produce zero-valent sulfur vesicles (SV) when cultivated in Ravot medium supplemented with elemental sulfur ($\text{S}(0)$) (Gorlas *et al.*, 2015). Alternatively, when grown in presence of L-cystine, which contains sulfur at -1 formal oxidation state, *T. kodakarensis* still produces vesicles but which do not contain any zero-valent sulfur in detectable amounts (Gorlas *et al.*, 2015).

In order to progress in the mechanistic elucidation of the high-temperature mineralization induced by Thermococcales cells, we have investigated, in the present

study, the mineralization by *Thermococcus kodakarensis* under conditions in which no SVs are produced, i.e. in presence of L-cystine, a condition that was never investigated before. This provided interesting mineralogical comparisons between conditions in which cells are mineralized in presence of zero-valent sulfur (Gorlas *et al.*, 2018 and this study) or in presence of L-cystine (this study). Furthermore, we have monitored the biological activity of *T. kodakarensis* under different mineralization conditions, i.e. with or without SVs. This allowed us to propose an original mechanism of survival/adaptation of the population of *Thermococcales* to strongly mineralizing high-temperature hydrothermal environments.

Results

Effects of S(0) and L-cystine on cell growth and metabolic state

We have analysed growth of *T. kodakarensis* cells in modified Ravot medium, containing 1 g of yeast extract and 1 g of tryptone which provide carbon source and electron donor, in presence of either S(0) or L-cystine. A control without S(0) or L-cystine was performed and no *T. kodakarensis* growth was observed in this condition. Cell growth and metabolic states of cells were monitored in both conditions by cell counting and ATP-metry assays in triplicates (Fig. 1). *T. kodakarensis* shows exponential growth during 6 h in the two media. The growth rate with S(0) as electron acceptor ($0.38 \text{ h}^{-1} \pm 0.019 \text{ h}^{-1}$, black curve in Fig. 1A) was not significantly different from the rate with added L-cystine ($0.36 \text{ h}^{-1} \pm 0.027 \text{ h}^{-1}$, red curve in Fig. 1A). The highest cell concentrations reached in both conditions were $1.5 \times 10^8 \text{ cells ml}^{-1}$ after 10 h of growth (Fig. 1A) indicating similar growth kinetics in presence of S(0) or L-cystine. ATP-metry assays indicated an initial intracellular amount of $3.86 \times 10^{-16} \text{ mmol ATP/cell}$ in S(0) condition (Fig. 1B) and $1.53 \times 10^{-16} \text{ mmol ATP/cell}$ in L-cystine condition before exponential phase begins (Fig. 1C). The highest amounts of ATP/cell were reached after 4 h of growth in both conditions. These values indicated that cells contain on average higher concentrations of ATP during the exponential phase (Fig. 1A–C) than in other physiological states, as already reported for several bacteria (Hironaka *et al.*, 2013). Interestingly, the average ATP/cell in S(0) condition ($\sim 2 \times 10^{-13} \text{ mmol ATP/cell}$), after 4 h of growth (Fig. 1B), was largely superior and approximately 100 times higher than the one in L-cystine condition ($4.7 \times 10^{-15} \text{ mmol ATP/cell}$) (Fig. 1C). When the cells enter in stationary phase, the average amount of ATP/cell decreased and returned to values close to those pre-dating the exponential phase ($\sim 10^{-16} \text{ mmol ATP/cell}$) for both conditions (Fig. 1B and C).

Furthermore, the intracellular elemental composition in *Thermococcales* cells was determined for the elements C, H, N and S after 16 h of growth in presence of S(0) (Supporting Information Fig. S1A) or L-cystine (Supporting Information Fig. S1B). The contents of carbon, hydrogen, nitrogen and sulfur (in weight %) measured in cells growing in S(0) condition were $58.1\% \pm 1.0\%$, $9.2\% \pm 0.2\%$, $16.9\% \pm 0.5\%$ and $15.8\% \pm 1.2\%$, respectively (Supporting Information Fig. S1A.1) whereas in L-cystine condition, they were of $68.4\% \pm 0.5\%$, $11.3\% \pm 0.2\%$ and $20.3\% \pm 0.2\%$ for total carbon, hydrogen and nitrogen, respectively (Supporting Information Fig. S1B.1). In the two growth conditions, the carbon-to-hydrogen ratio (ca 6:1 by weight) and the carbon-to-nitrogen ratio of the samples (ca 3:1 by weight) were similar and close to what is often reported in prokaryotes (Vrede *et al.*, 2002). The main difference concerned the presence of intracellular sulfur, which was measured at high level (15.8%) only when cells were cultivated in presence of S(0) (Supporting Information Fig. S1A.1) while *T. kodakarensis* produced sulfur vesicles (Supporting Information Fig. S1A.2) as previously reported (Gorlas *et al.*, 2015), whereas no detectable amount of sulfur was identified within cells cultivated in presence of L-cystine (Supporting Information Fig. S1B.1), a condition under which no sulfur vesicles were observed (Supporting Information Fig. S1B.2).

Relationship between the presence of S(0) in the growth medium and pyrite formation

The present study has been intended to further explore the consequences of the two sources of sulfur (S(0) or L-cystine) in terms of biologically induced mineralization. After *Thermococcales* growth in modified Ravot medium supplemented with either α -sulfur (S(0)) or L-cystine, cells in early stationary phase were incubated with an anoxic solution of ferrous sulfate (5 mM of FeSO_4) as iron source at 85°C. In all experiments, sodium sulfide (Na_2S) was used to maintain reducing conditions in the medium. In parallel, abiotic controls (without cells) were incubated with FeSO_4 solution (5 mM). We report here the mineralogical analyses of the mineralized samples and the characterization of iron sulfide minerals produced by *Thermococcus kodakarensis*, for both conditions at different mineralization times, determined using scanning and transmission electron microscopies, energy dispersive X-ray (EDX) analyses and synchrotron-based X-ray absorption near edge structure spectroscopy (XANES) at the Fe K-edge.

In the case of cells grown in presence of S(0), after 24 h of incubation in mineralization medium (short-term experiments) at 85°C, amorphous or poorly ordered FeS was the dominant phase as shown by XANES

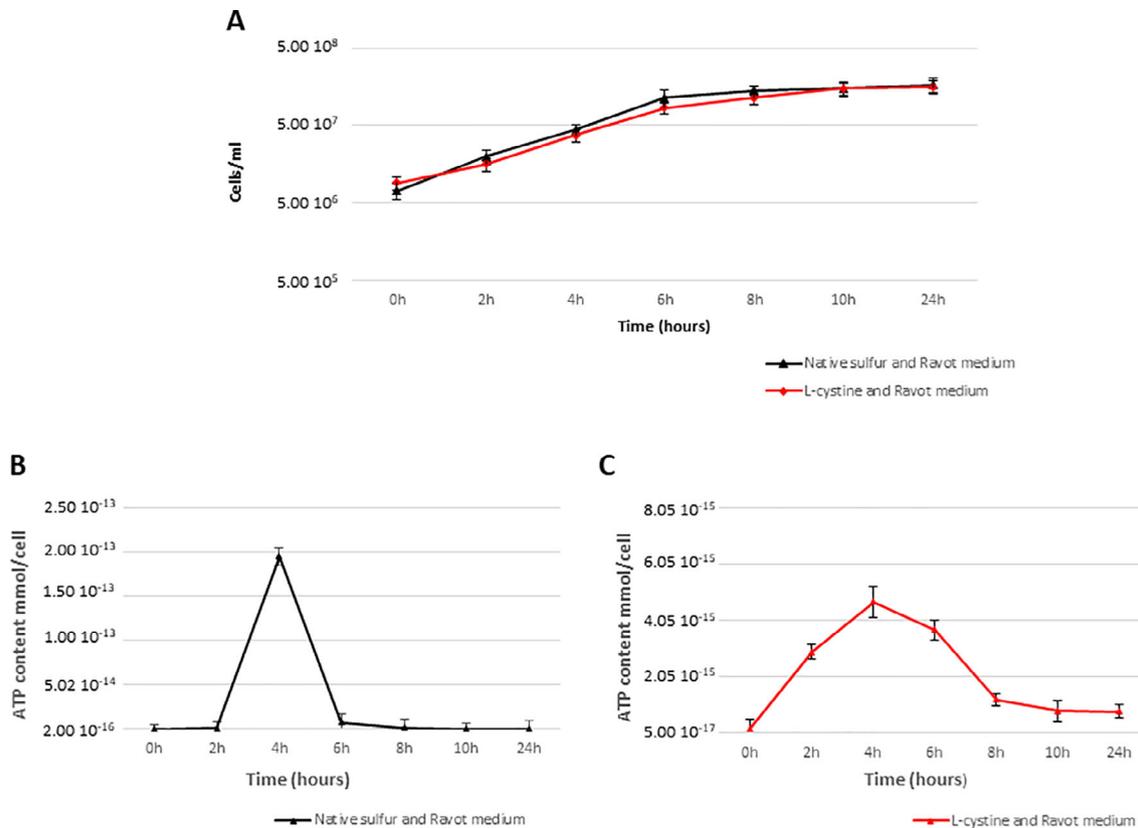


Fig. 1. *T. kodakarensis* cells growth (A) and ATP content (B, C) when cells were grown in the presence of native sulfur (black curves) or in the presence of L-cystine (red curves).

(85% ± 2%) (Fig. 2C, Table 1). Iron phosphates modelled as vivianite [Fe(II) endmember, 8% ± 2%] and amorphous iron phosphates [Fe(III) endmember, 11% ± 2%] were identified. Amorphous iron phosphates were always closely associated with cells as previously described by Gorlas *et al.* (2018). In long-term experiments (after 144 h of incubation in mineralization medium), we observed aggregated spherules cemented together by a matrix containing numerous euhedral nanocrystals (Supporting Information Fig. S2A and B) both composed of iron and sulfur (Supporting Information Fig. S2C, sulfur and iron panels). As verified here by selected area electron diffraction (SAED) in transmission electron microscopy (TEM), the spherules contained FeS₂ pyrite (Supporting Information Fig. S3) and were sometimes associated with S(0) as previously described by Gorlas *et al.* (2018). The nanocrystals located on cellular debris and produced in the immediate vicinity of cells and vesicles, were Fe₃S₄ greigite (indicated by red arrows in the Supporting Information Fig. S2A and B) as previously identified in the study by Gorlas *et al.* (2018). Spherules and matrix accumulated to constitute an entirely mineralized iron and sulfur-rich (Supporting Information Fig. S2C), three-dimensional (3D) structure that

displayed interstitial voids (Supporting Information Fig. S2A). The presence of FeS₂ pyrite (Supporting Information Fig. S3) was detected within few tens of hours (after 96 h in the study by Gorlas *et al.* 2018) of mineralization in the form of spherules. Considering their size distribution (~0.4 μm ± 0.11), they could correspond to former vesicles that were expelled from cells and possibly to former entire cells, whose size was reduced upon the loss of cytoplasmic materials. After 160 h of incubation in mineralization medium, the cell culture displayed bulk Fe K-edge XANES spectra indicating, by linear combination fitting (LCF) analysis, contributions of FeS₂ pyrite (49% ± 13%) and Fe₃S₄ greigite (41% ± 9%). A small remaining proportion of FeS (11 ± 14%) was also present (Fig. 2D, Table 1).

In the case of cells grown in presence of L-cystine, after 5 h of incubation in mineralization medium at 85°C, scanning transmission electron microscopy (STEM) showed that cells or former cells were surrounded by a matrix mainly composed of iron, carbon, phosphorous and oxygen (Supporting Information Fig. S4A) physically separated from the FeS matrix. According to EDX spectra, the Fe/P elemental ratio in the Fe, P, C, O matrix was close to 1 (Supporting Information Fig. S4B) suggesting that the

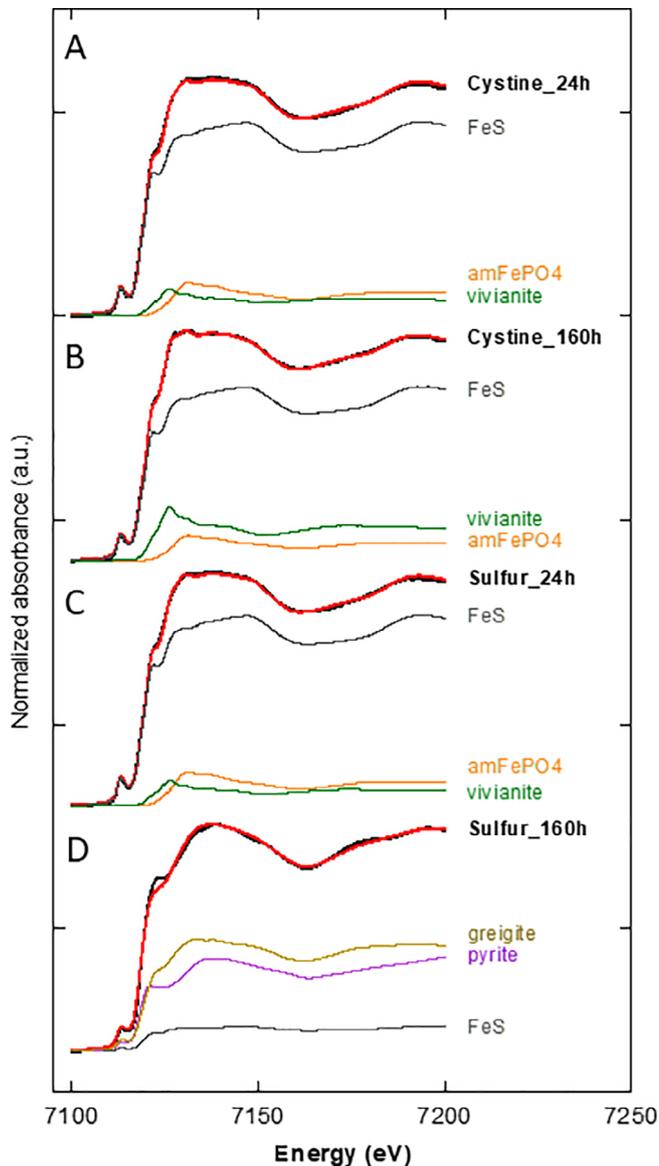


Fig. 2. Normalized Fe *K*-edge XANES spectra for mineralized cells (black lines), grown in the presence of *L*-cystine (cystine) or S(0) (sulfur), and incubated for 24 h (short-term experiments) or 160 h (long-term experiments) in mineralization medium. A linear combination fitting procedure using synthetic reference compounds has been applied (red lines), and weighted contributions of reference species used in the fits are also plotted. Parameters relative to the LCF procedure are listed in Table 1.

- A. Fe *K*-edge XANES spectra for mineralized cells grown in the presence of *L*-cystine incubated for 24 h (A).
 B. Fe *K*-edge XANES spectra for mineralized cells grown in the presence of *L*-cystine incubated for 160 h.
 C. Fe *K*-edge XANES spectra for mineralized cells grown in the presence of S(0) incubated for 24 h.
 D. Fe *K*-edge XANES spectra for mineralized cells grown in the presence of S(0) incubated for 160 h.

dominant Fe-bearing phase, associated with biological materials and detected at the first stage of biomineralization, is an amorphous iron phosphate. LCF analysis of the

iron *K*-edge XANES spectra obtained for the 24 h-mineralized sample showed that amorphous FeS ($86\% \pm 2\%$) was dominant, together with both Fe(III)- and Fe(II)-bearing iron phosphates ($11\% \pm 1\%$ amFePO₄ and $8\% \pm 2\%$ vivianite) (Fig. 2A, Table 1). We observed after 144 h an abundant, compact and opaque matrix (Fig. 3A) mainly composed of iron and sulfur as revealed by EDX (Fig. 3B) and mostly yielding amorphous or poorly crystallized materials. LCF analysis of the Fe *K*-edge XANES spectra of the 160 h-mineralized sample revealed that the matrix was mainly composed of FeS ($78\% \pm 2\%$), accompanied by a mix of Fe(II)- and Fe(III)-iron phosphates, containing this time more Fe(II) ($16\% \pm 1\%$ vivianite and $8\% \pm 1\%$ amFePO₄) (Fig. 2B, Table 1). Cells and vesicles were not observed by TEM, probably because of their weak contrast, whereas some euhedral nanocrystals, easily distinguishable by their cuboidal structure, were observed in the matrix (Fig. 3C). The nanocrystals were clearly visible at boundary edges of the matrix and logically less discernible in depth within the matrix (indicated by red arrows in Fig. 3C). These regular nanocrystals (Fig. 3D) of c.a. 70 nm in size were characterized by electron diffraction (Fig. 3E and F) as Fe₃S₄ greigite. Pyrite was not detected in those samples. Whereas Fe₃S₄ greigite nanocrystals were unambiguously identified by electron diffraction, they were not detected by Fe *K*-edge XANES analysis, probably because of their low abundance (typical detection limit of 5% for XANES) within the FeS matrix (Fig. 2B, Table 1). Few non-mineralized single cells (indicated by black circle in the Supporting Information Fig. S5) were observed with scanning electron microscopy (SEM). Those cells are mainly composed of carbon (panel carbon Supporting Information Fig. S5), contain nitrogen (panel nitrogen Supporting Information Fig. S5) and are close but clearly out of the FeS matrix (panel sulfur and iron Supporting Information Fig. S5). The analyses of abiotic controls, containing S(0) or *L*-cystine, have revealed the presence of FeS amorphous matrix but neither pyrite nor greigite were observed (Supporting Information Fig. S6).

To sum up, the mineral products formed by *Thermococcales* during the mineralization experiments varied according to the presence of S(0) or *L*-cystine, used for growth. Minor amounts of iron phosphates were detected, in similar relative amounts, in all experiments except for long-term experiments in presence of S(0) and were associated with biological materials at least at short mineralization times. Amorphous or poorly ordered FeS was the predominant precipitated phase in all experiments except for long mineralization times in S(0) condition where greigite associated with extracellular materials, and pyrite, encrusting former cells or vesicles, became the two major phases. In long time experiments in *L*-cystine condition, small amounts of greigite were found scattered in the FeS matrix and pyrite was not observed.

Table 1. Results of LCF analysis of Fe K-edge XANES data using reference compounds (see Material and Methods).

Sample	FeS %	amFePO ₄ %	vivianite %	greigite %	pyrite %	Sum	$\chi^2_r \cdot 10^{-4}$	R _{factor} 10^{-5}
Cystine_24h	86 (2)	11 (1)	8 (2)	-	-	105	11.3	9.5
Cystine_160h	78 (2)	8 (1)	16 (1)	-	-	102	3.7	3.3
Sulfur_24h	85 (2)	11 (2)	8 (2)	-	-	104	7.7	6.7
Sulfur_160h	11 (14)	-	-	41 (9)	49 (13)	101	21.2	19.9

Uncertainties on the reported values are given with 98% confidence interval (see Material and Methods). Fit quality is estimated by a reduced chi-squares and a R-factor (see Material and Methods).

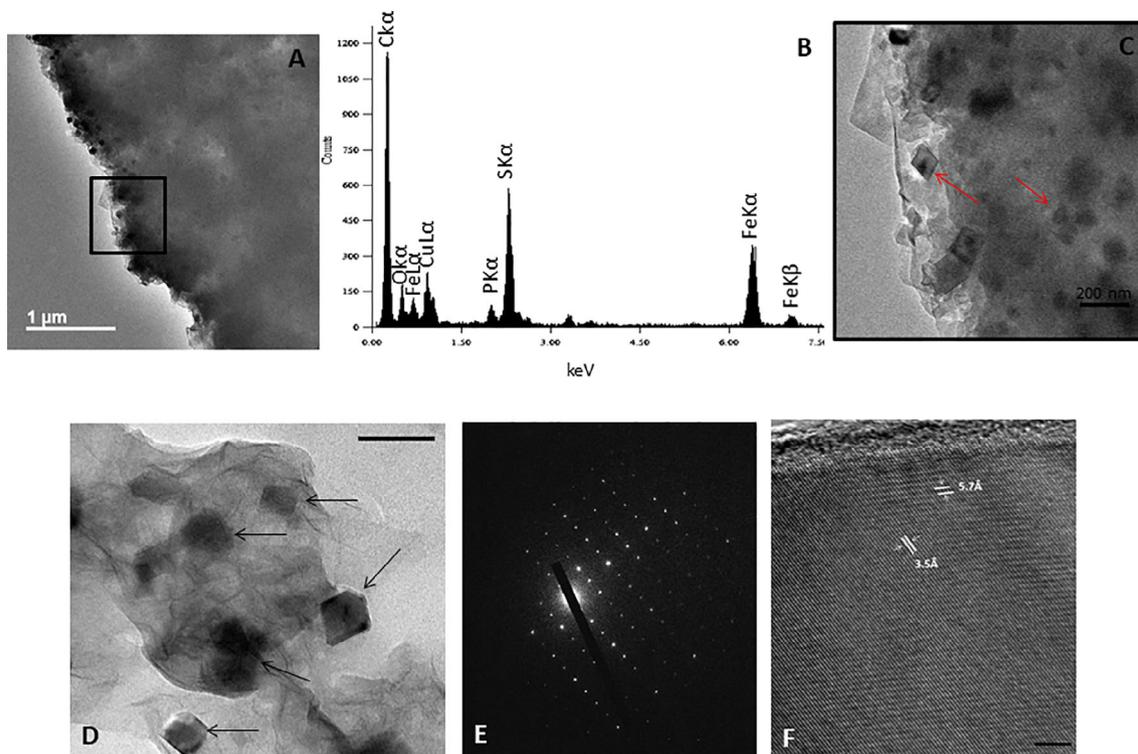


Fig. 3. Production of iron sulfide minerals by *T. kodakarensis* in L-cystine condition after 144 h of incubation in mineralization medium. Transmission electron microscopy image (A, C) of mineralized samples incubated for 144 h with mineralization medium and elemental analysis by EDX (B). The red arrows indicate the presence of iron sulfide nanocrystals. Transmission electron microscopy image of regular nanocrystals of greigite (indicated by black arrows) disposed on/in the matrix, scale bar = 100 nm (D). Electron diffraction of a greigite nanocrystal (E). High-resolution transmission electron microscopy image of a greigite nanocrystal, scale bar = 5 nm (F).

Restoration of cell growth in long-term mineralization experiments in presence of S(0) in the initial growth medium

The incubation of Thermococcales cells in a medium containing FeSO₄ generated rapidly a black precipitate in the flasks (Fig. 4A1) and many black aggregates were observed under optical microscope (Fig. 4A2 and A3). Interestingly, a partial clarification of the medium was observed in long-term mineralization experiments only in S(0) condition (Fig. 4B1). Many motile single cells and dividing cells surrounded the mineralized matrix were then clearly visible under optical microscope (Fig. 4B2 and B3), whereas they were never observed for shorter mineralization times (Fig. 4A3). The observation of

dividing cells is a strong evidence confirming the restoration of cell growth in long-term mineralization experiments (Fig. 4B2 and B3). Electron microscopy observations indeed showed non-mineralized cells containing carbon and nitrogen (Fig. 5A) within the iron–sulfur-bearing matrix. More non-mineralized cells were likely present within the mineralized iron sulfide matrix but the contrast due to this mineralized matrix did not allow to identify them. The iron sulfide 3D-structure (Fig. 5B) was mainly composed of pyrite-containing spherules with an intercellular/intervesicular matrix containing greigite nanocrystals (Supporting Information Fig. S7A) as previously described (Gorlas *et al.*, 2018). Non-mineralized cells were dispersed and were not affected by iron sulfide mineralization (Fig. 5C, Supporting Information Fig. S7B). To

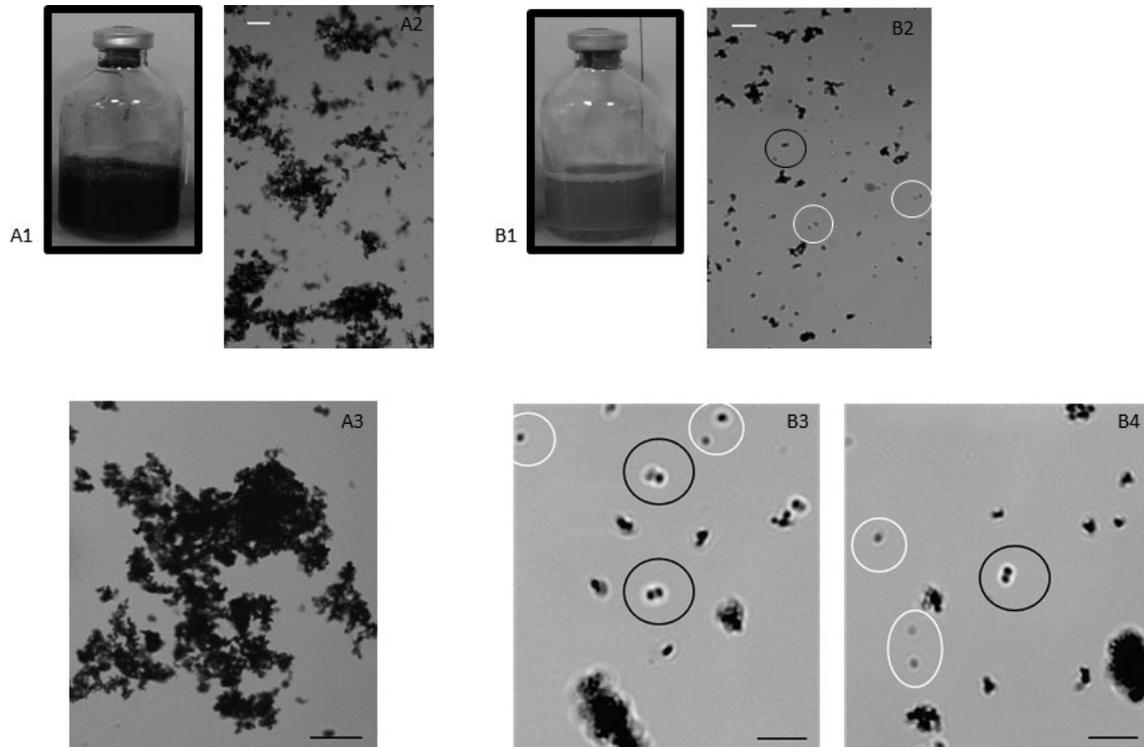


Fig. 4. Observations of mineralization media and cells grown in S(0) incubated after 24 h (A), and 192 h (B) in FeSO_4 solution (5 mM). The incubation of grown cells in FeSO_4 solution rapidly generated black precipitates in the flask (A1). The optical observation shows dense and large black precipitates (A2, scale bar: 10 μm ; A3, scale bar: 5 μm). After 192 h of mineralization, the medium is clarified in the flask since it became grey-coloured (B1) and the black precipitates, previously observed, are smaller in size (B2, scale bar: 10 μm ; B3, scale bar: 5 μm). The white circles indicate the presence of motile single cell and the black circles indicate the presence of dividing cells.

discount the possibility of contamination, DNA from samples containing this non-mineralized cell population was extracted and sequenced. A BLAST search against the GenBank database revealed 100% of similarity with *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 sequence confirming absence of contamination.

ATP concentrations in the mineralizing media were also measured in order to determine the presence of active cells during the mineralization experiments (Fig. 6). The measurements of ATP concentration were consistent with the observations under optical microscope. In S(0) condition (yellow curve in Fig. 6), we observed a rapid decrease of the ATP concentration to undetectable levels within a few minutes after inoculation of cells in the mineralization medium. The ATP concentration then remained undetectable until 96 h of mineralization. Interestingly, after 120 h of incubation in S(0) condition, ATP was again detected in the medium and its concentration gradually increased, to reach a high value of 6.0×10^{-5} mM after 192 h of incubation indicating the presence of metabolically active cells.

In L-cystine conditions, such a restoration of cells population was never observed in the mineralization medium. On the other hand, alive cells persisted in long-term

experiments (Supporting Information Fig. S5). The concentration of ATP (blue curve in Fig. 6) in samples decreased progressively to ≈ 0 after incubation of cells in the mineralization medium and remained undetectable in long time experiments (from 120 h to 216 h of incubation in mineralization medium). This suggests that cells remain metabolically active for a while but that metabolic activity is undetectable beyond 120 h of mineralization.

Such late cellular growth was never observed at very high iron concentration in the mineralization medium (as shown, e.g. in S(0) condition with 25 mM of FeSO_4 corresponding to the green curve in Fig. 6). We indeed always observed a rapid and irreversible ATP decrease upon inoculation of cells in mineralization media both in S(0) or L-cystine conditions at iron concentrations of 10, 25 or 50 mM (Supporting Information Fig. S8A and B).

Discussion

Comparison of T. kodakaraensis growth and viability between S(0) and L-cystine conditions

We have shown that *T. kodakaraensis* has equivalent growth rates in modified Ravot medium in presence of

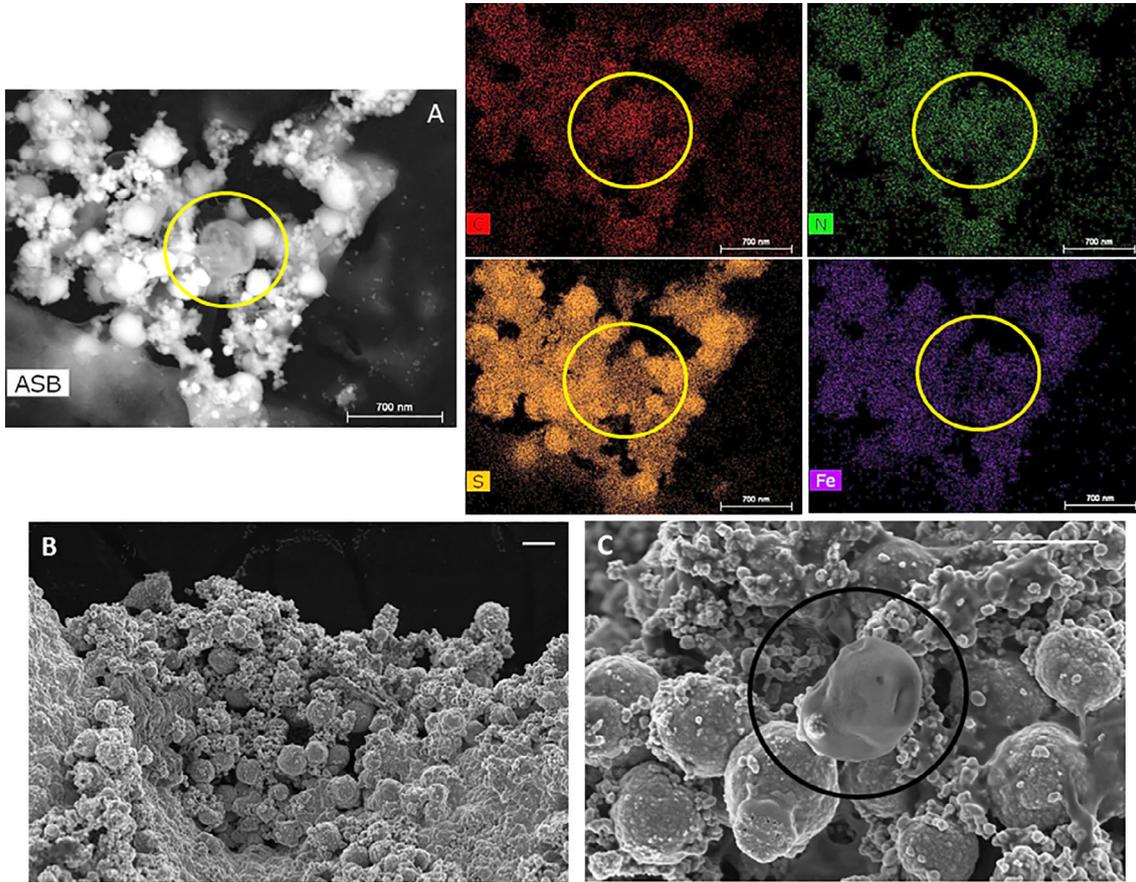


Fig. 5. Presence of living cells after long time experiments in S(0) condition. Scanning transmission electron microscopy of mineralized cells after 192 h of incubation in mineralization medium and associated C (carbon panel), N (nitrogen panel), S (sulfur panel) and Fe (iron panel), scale bar = 700 nm. The yellow circle indicates the presence of non-mineralized cell. SEM images of mineralized and aggregated cells/vesicles incubated for 192 h with mineralization medium. Scale bar = 1 μ m. The overall of the mineral-biofilm (A) is mainly composed of pyrite-mineralized cells/vesicles and an intercellular/interventricular matrix. The black circle indicates the presence of non-mineralized cell which separate itself from the biofilm (B).

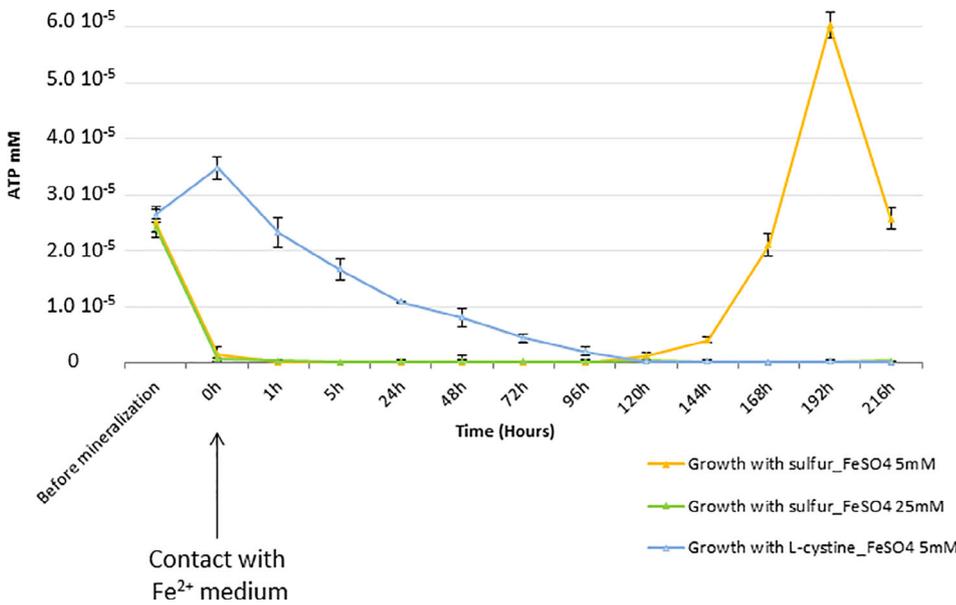


Fig. 6. ATPmetry analyses during biom mineralization process. The data represent the ATP content (mM) in the sample when grown cells in L-cystine (blue curve) or in S(0) (yellow curve) are incubated with 5 mM of FeSO₄. The green curve represents the ATP level in S(0) condition when cells are incubated with 25 mM of FeSO₄.

either S(0) or L-cystine (Fig. 1A). If elemental sulfur S(0) is provided as electron acceptor, respiration of S(0) or fermentation assisted by S(0) explains H₂S formation (Adams *et al.*, 2001; Schut *et al.*, 2013) as well as abundant precipitation of FeS in the mineralization medium (Gorlas *et al.*, 2018 and Fig. 2). Inoculation in a medium containing small amounts of Na₂S (always added to maintain reducing conditions) does not explain significant H₂S formation since we have observed that in the absence of S(0) or L-cystine, no detectable H₂S was formed. In the absence of S(0), *T. kodakarensis* is able to ferment a wide variety of organic compounds mainly peptides and carbohydrates as carbon and energy sources leading to the formation of acetate, CO₂ and H₂. In the L-cystine condition that we investigated, the still detected H₂S and FeS formation might result either from respiration of S(-I) in L-cystine or from fermentation assisted by S(-I) or by H₂-producing fermentation then interacting with L-cystine or initial Na₂S. The kinetics of production of sulfides is obviously much slower in L-cystine than in S(0) condition thus resulting in less rapid iron sulfide mineralization and cell mortality in the former than in the latter condition.

As shown by ATP measurements in rich culture media (Fig. 1B), the metabolic pathways in both conditions result in highly different ATP levels. Interestingly, it has been reported that under a certain level of S(0) in the growth medium, *Thermococcales* undergo a metabolic shift and thus exclusively produce H₂, whereas with still limited but higher S(0) condition (c.a. 15 mM of elemental sulfur in the medium), *Thermococcales* are able to simultaneously use both H₂ and S(0) metabolisms (Schut *et al.*, 2013). In L-cystine condition (with only ~4 mM of sulfur atoms in the medium), *Thermococcales* could thus have switched from a sulfur-based metabolism to H₂ production. Even in the case of S(0), one might speculate that after a while, a switch to fermentation may occur. Such a shift in metabolic pathways could explain the smaller concentrations of ATP measured in L-cystine condition than in S(0) condition. Schicho *et al.* (1993) have demonstrated that sulfur respiration is more thermodynamically efficient to produce energy than H₂ production (Schicho *et al.*, 1993). This suggests that sulfur respiration mainly occurs when elemental sulfur is present in the growth medium, whereas in the presence of L-cystine, fermentation is the main process employed by *T. kodakarensis*.

Such differences in ATP measurements are further reflected during mineralization incubation. In S(0) condition, the ATP content strongly and immediately decreases when cells are incubated with Fe(II) (Fig. 6). Most cells are rapidly lysed and the cellular material is spread in the medium. In L-cystine condition, ATP decrease is much slower (Fig. 6) suggesting that most living cells are present and decay progressively until ca

100 h. In that case and as suggested by XANES analyses, most cellular materials including phosphates are trapped in a FeS-rich matrix. This matrix is formed in both conditions after inoculation in mineralization medium, as a result of the contact between the H₂S-containing medium and Fe(II) from the mineralization medium, but likely at different rates between the two conditions (Fig. 2, Table 1).

Pyrite mineralization by Thermococcus kodakarensis

Mineralization of pyrite (FeS₂) in connection to the activity of microorganisms has recently been reported in the literature (Gorlas *et al.*, 2018; Picard *et al.*, 2018; Stanley and Southam, 2018; Thiel *et al.*, 2019; Berg *et al.*, 2020; Duverger *et al.*, 2020) usually requiring quite long incubation times. Here, we show that *Thermococcales* can indirectly produce FeS₂ pyrite within hours in a simplified synthetic hydrothermal fluid at 85°C, but only when S(0) is present in the initial growth medium. We propose that pyrite mineralization is induced by biological activity of *Thermococcales* through mediation by biological sulfur vesicles, and probably occurs during or after cell death upon contact between Fe²⁺ and the sulfur vesicles. Although all *Thermococcales* can use elemental sulfur (S(0)) or L-cystine for yielding H₂S as a by-product (Blumentals *et al.*, 1990; Adams *et al.*, 2001; Schut *et al.*, 2013), the incubation of *Thermococcales* at pH of ≈ 7 in a Fe(II)-S(-II)-containing medium is not sufficient for producing pyrite (Figs. 2 and 3, Table 1). During cell growth, S(0) (transported as polysulfides or colloidal elemental sulfur) (Schauder and Müller, 1993) is rapidly internalized and stored in *Thermococcales* cells yielding an high intracellular sulfur concentration (~16% as measured by CHNS in the Supporting Information Fig. S1A). These high sulfur concentrations result in the production of sulfur vesicles, which allow S(0) to be exposed at the surface of the cells (Gorlas *et al.*, 2015 and Supporting Information Fig. S1A) and have been interpreted as a sulfur/polysulfide detoxification mechanism (Gorlas *et al.*, 2015). In the present study, pyrite was only observed in S(0) experiments where sulfur vesicles were present (Gorlas *et al.*, 2015, 2018 and Supporting Information Fig. S1A) and was not observed in L-cystine experiments where sulfur vesicles were absent (Gorlas *et al.*, 2015 and Supporting Information Fig. S1B). As previously demonstrated in the study by Gorlas *et al.* (2018), pyrite corresponds closely to the location of the sulfur vesicles. This pyritization process thus occurs in close association with cells and vesicles (Fig. S2). It has been reported that the precipitation of sulfides from hot metal-enriched fluids in hydrothermal chimneys can indeed fossilize organisms, mainly in pyrite, which enables the preservation of organic tissues (Georgieva *et al.*, 2015). But these fossils are all from macro-organisms that actually live at lower

temperatures; neither direct nor indirect traces of the hyperthermophilic biosphere living at temperatures exceeding 80°C have been reported. As shown in the present study, biomineralization of Thermococcales in S(0) condition allows the production of numerous spherules containing pyrites, associated with former intracellular sulfur vesicles. Such spherules might be searched for in hydrothermal chimney samples as possible biosignatures of former Thermococcales cells and vesicles.

Pyrite was never observed in L-cystine experiments, indicating that interaction of Fe(II) with disulfide (S(-I)) from L-cystine did not yield pyrite (Fig. 3). This reinforces the suggestion of an essential role for intracellular S(0) and/or S(0) present in sulfur vesicles for pyrite formation. H₂S, produced by Thermococcales during growth in presence of S(0) or L-cystine, and FeS (Fig. 2, Table 1) could in principle yield pyrite according to the H₂S pathway: $\text{FeS} + \text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{FeS}_2 + \text{H}_2$ (Rickard, 1997; Rickard and Luther, 2007). The experimental results of the present study suggest that the polysulfide pathway: $\text{FeS} + \text{S}_n^{2-} \rightarrow \text{FeS}_2 + \text{S}_{n-1}^{2-}$ (Rickard, 1997; Rickard and Luther, 2007) is far more efficient under those conditions than the H₂S pathway for pyrite formation. Although, in strictly anoxic environments, the H₂S pathway will tend to be thermodynamically strongly favoured (Rickard, 1997), the polysulfide pathway may become important in environments with limited but significant oxygen level (Rickard, 1997). Wilkin and Barnes pointed to some conditions where pyrite could be formed from FeS with S(0) but not with H₂S (Wilkin and Barnes, 1996). In our proposed model, we suggest that the production of pyrite is associated with sulfur droplets, and Thermococcales cells are demonstrably a good way to produce such droplets as sulfur vesicles. Then, sulfur vesicles (Supporting Information Fig. S1B) and/or S(0) accumulated in Thermococcales (Supporting Information Fig. S1A) could act as a source of polysulfides and as a precursor for pyrite formation, most likely after cell death. In hydrothermal vents fluids, the presence of polysulfides is very likely (Luther et al., 2001b; Waite et al., 2008; Gartman et al., 2011) and we hypothesize that Thermococcales detoxify them by making S(0) vesicles as they do in the laboratory (Gorlas et al., 2015) thus inducing the low-temperature formation of pyrite in hydrothermal chimneys. Recently, Thiel et al. (2019) have shown that methanogenic archaea are excellent producers of FeS₂ (Thiel et al., 2019). Methanogenic archaea are definitely present in chimney walls (Takai et al., 2001) and their relationships to 'low-temperatures' FeS₂ production in those chimneys deserve further investigations.

Greigite mineralization by Thermococcus kodakarensis

Microbial mineralization of greigite has been known for a long time: whereas magnetotactic bacteria produce it

intracellularly (Mann et al., 1990), extracellular greigites have been reported in cultures of sulfate-reducing bacteria (Bertel et al., 2012; Picard et al., 2018; Picard et al., 2019). Biominerals of greigite produced by sulfate-reducing bacteria are detected after several months of incubation in Fe-bearing media (Picard et al., 2019). In the present study, both in S(0) and L-cystine growth media conditions, greigite is produced by Thermococcales within few days (Figs. 2 and 3D–F, Fig. S2, Table 1). In S(0) conditions, greigite is produced where SVs are absent, i.e., on the extracellular materials presumably liberated in the medium by cell lysis in response to FeS precipitation. In L-cystine conditions, where no SVs are available and cell lysis is much less extensive than in S(0) conditions (Supporting Information Fig. S1B; Fig. 6), the mineralization medium is dominated by amorphous or quasi amorphous FeS with only few greigite nanocrystals (Figs. 2 and 3A and B, Table 1). In the study by Gorlas et al. (2018), iron phosphate minerals have been shown to be closely associated with greigite formation. The present study confirms that greigite occurs by sulfurization of amorphous iron phosphates (Supporting Information Fig. S2 for S(0) condition; Fig. 3 and Fig. S4 for L-cystine condition). In both S(0) and L-cystine conditions, greigite nucleation starts outside of cells on cellular debris loaded with iron phosphates (Fig. 2, Table 1, Fig. S4). We suggest that precipitation of greigite on phosphate-loaded cell lysis products might release dissolved phosphates (not measured in this study) in the aqueous phase and presumably other nutrients and molecules. Since greigite precipitation is much more intense in S(0) conditions, release of phosphates could likely more efficient in S(0) than in L-cystine condition. Further studies are required to determine the amount of dissolved phosphates and other molecules during stages of mineralization induced by Thermococcales.

Thermococcales survival strategy in hydrothermal ecosystem

The most remarkable effect observed in the mineralization experiments was the cell revival observed in S(0) condition (Figs. 4–6, Fig. S7). At 5 mM of Fe, we observed the unexpected emergence of *T. kodakarensis* cells after most cells had been lysed upon initial Fe addition (Figs. 4 and 6). This phenomenon was not observed at higher Fe concentrations suggesting that above a certain iron threshold, all cells were indeed lysed and killed (Fig. S8). The cellular multiplication in a mineralization medium normally not suitable for growth suggests that cells used cellular materials that were made available by cellular lysis. In particular, such a mineralization medium is not suitable to cell growth because of the low solubility of phosphates: dissolved phosphates can abiotically precipitate with Fe(II), preferentially forming Fe(II) phosphates such as vivianite, mainly

dominant in anoxic conditions (Cosmidis *et al.*, 2014). This could explain the presence of vivianite identified in shortest time experiments for both conditions and in prolonged time experiments in L-cystine condition (Fig. 2, Table 1). Moreover, precipitation of highly insoluble iron (III) phosphates occurs in the vicinity of cells. The remobilization of phosphates by precipitation of greigites from iron phosphates has recently been reported as an ecological strategy of phosphate recycling in natural environments (Xiong *et al.*, 2019; Wilfert *et al.*, 2020). The new generation of *Thermococcus kodakarensis* cells appeared after 192 h of mineralization diluting the mineralized phases (Figs. 4 and 5, Fig. S7), progressive decrease of the FeS matrix for its transformation into pyrite, and possibly dissolving pyrite from the mineralized spherules thus contributing to the partial clarification of the medium (Fig. 4). Pyrite dissolution by iron- and sulfur-oxidizing microorganisms has been reported (Edwards *et al.*, 1998; Fowler *et al.*, 1999; McGuire *et al.*, 2001; Druschel *et al.*, 2004). Interestingly, archaea with Fe and/or S assimilatory metabolisms have also been shown to dissolve iron sulfide compounds (Clarkson *et al.*, 2021; Payne *et al.*, 2021). Mesophilic methanogens are able to catalyse the reductive dissolution of pyrite allowing the liberation of Fe and S, which can be used for cellular biosynthesis (Payne *et al.*, 2021). The hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* is involved in the dissolution of mackinawite producing FeS complexes, which can then be re-used by *P. furiosus* (Clarkson *et al.*, 2021). Further research is needed to identify the exact mechanisms of interactions between iron sulfides and *T. kodakarensis*.

As already observed for other organisms (Little and Vrijenhoek, 2003; Georgieva *et al.*, 2015), the elevated initial iron concentrations (here 5 mM in mineralization media) have induced mortality of most of *Thermococcales* cells. Contrastingly, the cell revival observed in these conditions after few days might indicate a population-scale adaptation to the hydrothermal conditions. The rapid mineralization of cells and vesicles into pyrite within few hours in S(0) condition allows the formation of 3D structures composed of pyrite-mineralized cells/vesicles and an intercellular/interventricular matrix containing first iron phosphates and FeS and then greigite nanocrystals (Figs. 2 and 5, Table 1, Fig. S2). The formation of greigite in this mineral-biofilm structure is facilitated by the cellular debris, loaded with iron phosphates. These cellular debris are released by cell lysis during the early stages of biomineralization and act as templates for the nucleation of the greigite nanocrystals. We suggest that, during the early stages of mineralization, few non-mineralized cells can be trapped into the forming 3D structure. We speculate that instead of lysis, the non-mineralized *Thermococcales* cells could enter in quiescent state (i.e. with no metabolic activity). While

those cells cannot divide because they have no access to growth resources, the interior of this mineralized biofilm could present an ecological benefit by protecting the non-mineralized cells against constraints imposed by metal-loaded hydrothermal fluids. Iron minerals in hydrothermal vents are known to scavenge phosphates (Dick *et al.*, 2013) that may become a limited nutrient in this ecosystem. Interestingly, some archaeal microorganisms are reported to accumulate polyphosphate into storage granules (Remonsellez *et al.*, 2006; Toso *et al.*, 2011; Toso *et al.*, 2016). Such polyphosphates bodies (PPBs) could help living cells to overcome environmental stresses. It has been suggested that these phosphate-reserves could be employed to resynthesize ATP therefore allowing cells to find new substrates (Toso *et al.*, 2011). Whereas we have never observed PPBs within *Thermococcales* cells, we hypothesize that the amorphous iron phosphates formed during the early stages of mineralization, might efficiently release phosphates upon greigite precipitation. In the S(0) case, the associated release of bioavailable phosphate would be strong enough to allow new cells to grow (Figs. 4–6, Fig. S7). Phosphate release coupled to iron sulfide precipitation has recently been discussed (Xiong *et al.*, 2019; Berg *et al.*, 2020; Duverger *et al.*, 2020; Wilfert *et al.*, 2020). Berg *et al.* (2020) demonstrated that pyrite can be produced by sulfate-reducing bacteria (SRB) from Fe(III)phosphate and that this pyritization process is regulated by the SRB activities allowing thus the phosphate release into the aqueous phase. In our study, the released phosphates would be used by the few non-mineralized cells to fuel essential cell functions, including cell division. The absence of cell revival observed in L-cystine conditions over the experimental intervals of this study is in agreement with this model since greigite precipitation is much less efficient in L-cystine conditions than in S(0) experiments and pyrite precipitation is absent (Table 1). However, since precipitation of greigite replacing iron phosphates also occurs in L-cystine experiments, albeit at slower rate, we propose that the cell revival might occur later in time in these conditions.

Conclusion

In this study, we suggest a new mechanism employed by *Thermococcales* to survive in their harsh environments. We may hypothesize that pulses of hot hydrothermal fluid (i.e. rich in Fe²⁺ and H₂S) common in these environments (Tivey *et al.*, 1990; Butterfield *et al.*, 1997) in a first round kill most of the cells that then release their phosphate-loaded cellular materials and cell lysis products. Then greigite and pyrite nucleate and grow on those biological materials. In this process, they might release phosphates and organic compounds allowing new cells

to thrive there by fermenting organic matter in presence or in absence of S(0). The diverse metabolic pathways and biologically induced mineralization mechanisms employed by Thermococcales would thus help them to survive in a broad range of extreme environments characterized by the high temperatures and high iron and sulfide contents.

Experimental procedures

Strain, growth and experimental conditions

T. kodakarensis KOD1 (JCM 12380) was cultivated at 85°C with shaking, in modified Ravot medium (contained, per litre of distilled water: 1 g NH₄Cl, 0.2 g MgCl₂ · 6H₂O, 0.1 g CaCl₂ · 2H₂O, 0.1 g KCl, 0.83 g CH₃COONa · 2H₂O, 20 g NaCl, 1 g yeast extract, 1 g tryptone, 3.45 g piperazine-*N,N*-bis (2-ethanesulfonic acid) (PIPES buffer) and 0.001 g resazurin). The pH was adjusted to 7 before autoclaving. After autoclaving, 5 ml of 6% (w/v) K₂HPO₄ and 5 ml of 6% (w/v) KH₂PO₄ sterile solutions were added aseptically. The medium was dispensed (50 ml) into 100 ml sterile flasks and supplemented with elemental sulfur (S(0) condition) or L-cystine (L-cystine condition) in separate incubations at 1 g/L. Anaerobiosis was obtained by applying a vacuum to the medium and saturating it with dinitrogen. Finally, a sterile solution of Na₂S · 9H₂O [final concentration 0.05% (w/v)] was added to reduce the medium. Growth screening and kinetic experiments were performed in serum bottles in triplicate for each condition. At various time points (0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h and 24 h), aliquots were collected to determine cell concentration by direct cell counting using a phase-contrast microscope (Olympus) and a modified Thoma chamber. The metabolic state of cells was monitored by using ATP-metry assays. Total and intracellular ATP were monitored using luciferin/luciferase luminescence reaction by using the microbial ATP kit HS (BioThema) and a Kikkoman luminometer. With this method, the luminescence produced is established in relative luminescence units (RLU). Extracellular ATP was directly measured from extracellular medium. Intracellular ATP is measured after using the ATP Eliminating Reagent for degrading extracellular ATP, the extractant BS for making the intracellular ATP accessible to luciferase, the ATP reagent HS containing luciferase/luciferin and an ATP standard. Light is measured before and after adding the ATP standard to calibrate each assay. This compensates for all types of analytical interference (pH, temperature, presence of minerals) (Lundin, 2000). Light measured for controls (without cells) was always inferior to 300 RLU. A baseline value of 300 RLU was always removed to the light value of the samples containing cells.

CHNS elemental analyses

To determine the intracellular elemental composition of cells, *T. kodakarensis* cells were cultivated as previously described. The 10 ml of cells in stationary phase ($2 \cdot 10^8$ cells ml⁻¹) was centrifuged at 5000g for 20 min. Pellets of cells were washed three times with 5 ml of TN buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM NaCl). The pellets containing 3 mg of material were dried at 70°C and were kept at -20°C. Samples were analysed by using the elemental analyser Flash 2000 (Thermo Fischer).

Biom mineralization experiments

T. kodakarensis cells were grown in modified Ravot medium either in presence of S(0) or L-cystine (as previously described) to reach the early stationary phase, with concentrations of $5 \cdot 10^7$ cells ml⁻¹. Then an anoxic solution of ferrous sulfate (FeSO₄) at a final concentration of 5 mM was transferred to grown cells. The modified Ravot medium in presence of FeSO₄ is named mineralization medium in this study. In parallel, controls (without cells) were performed in the same conditions as previously described.

Moreover, mineralization experiments were also carried out with higher concentrations of FeSO₄ (10, 25 and 50 mM). Cultures and controls were then incubated at 85°C with shaking and were regularly sampled over 216 h. The short-term experiments corresponded to cultures incubated with mineralization medium up to 120 h and the long-time experiments corresponded to cell incubations in the mineralization medium from 120 h to 216 h. The metabolic state of cells during biom mineralization experiments was monitored by ATP-metry assays. To determine the composition of the mineralized cells and the mineral end products, we used a combination of SEM, scanning transmission electron microscopy (STEM), TEM, high-resolution transmission electron microscopy (HRTEM), and energy dispersive X-ray spectroscopy analysis (EDXS analysis).

Transmission electron microscopy, high-resolution TEM, scanning transmission electron microscopy and scanning electron microscopy

To prepare samples for TEM, HRTEM and STEM, 2 ml of cultures (at different times of mineralization: 5 h, 144 h and 192 h) was centrifuged at 5000g for 20 min. The pellets were washed with 1 ml of TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) and were centrifuged at 1500g for 5 min to remove cellular debris. Supernatants were subsequently centrifuged at 5000g for 10 min. The pellets were then resuspended in 200 µl of TE. A 20 µl droplets of samples were adsorbed onto a carbon-coated copper grid for

1 min. After removing the excess liquid, the grids were rinsed with sterile water. To prepare samples for SEM, cells were fixed in 2% glutaraldehyde in TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) for 4 h at 4°C, washed overnight TE. The cells were then post-fixed for 1 h at room temperature with 1% osmium tetroxide in TE. The cells were dehydrated in a graded ethanol series and dried by critical point drying with a Leica EM CPD300 instrument. For TEM, HRTEM and STEM, specimens were respectively examined using a JEOL JEM-100 CX II, operating at 120 kV and a JEOL JEM-2100F, equipped with a field emission gun (FEG) operating at 200 kV; for SEM, specimens were observed with a Zeiss Gemini 1550VP field-emission scanning electron microscope (Ultra55) equipped with Everhart-Thornley secondary electron detectors, in-lens and backscattered electron detectors.

Cryo-electron microscopy

To prepare samples for Cryo-EM, 10 ml of cultures was centrifuged at 5000g for 20 min. The pellets were resuspended with 50 µl of buffer (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂). The 5 µl droplets of preparations were adsorbed onto a holey carbon-coated TEM support grid (QUANTIFOIL[®]) typically used for Cryo-EM. After removing the excess liquid with Whatman[®] paper, the grids were quickly immersed in liquid ethane and transferred into the microscope using a side entry nitrogen-cooled cryoholder (Gatan, 626-DH cryotransfer system). The observations were performed with a Cryo-EM JEOL 2100 LaB6 TEM with an accelerating voltage of 200 kV, at the nominal magnification of 10 000. Images were recorded under low dose conditions with ultra-scan 1000 camera (Gatan, 2 k × 2 k pixels CCD).

Energy dispersive x-ray spectroscopy analysis

EDXS (JEOL, resolution: 140 eV/channel) was carried out to detect compounds that were either adsorbed to the cell surface or entrapped in the vesicles. EDXS analyses have been coupled with TEM and Cryo-EM.

X-ray absorption near-edge structure spectroscopy at the Fe K-edge

Fe K-edge X-ray absorption spectra of the biotic samples were collected at 20 K in transmission detection mode on the SAMBA beamline (SOLEIL, Saint-Aubin, France). Incident beam energy was monitored by using a Si(220) double-crystal monochromator, equipped with dynamic sagittal focusing of the second crystal. Samples were prepared by filtering 5 ml of the mineralized archaea cells, grown in presence of S(0) or L-cystine and incubated for 24 h and 160 h in mineralization medium,

through 0.2 µm polycarbonate filters that were then vacuum-dried for 10 min in an evacuator placed in an anoxic Jacomex[™] glove box (<1 ppm O₂) at IMPMC. The dry filters were then folded once and sealed under Kapton[™] tape, which yielded absorption edge step height in the range of 0.1–0.3 at the Fe K-edge. Samples were transferred in strictly anoxic vials and mounted on the cryostat sample holder in a similar glove box at SOLEIL. Sample holders were then immediately plunged into a liquid nitrogen-filled Dewar before being inserted into the liquid He cryostat (TBT) for XAS measurements. Data were then collected in continuous quick-scan mode using a scan-speed of 2 eV s⁻¹ and a resulting 0.2 eV step.

Bulk iron speciation in the samples was then determined by linear combination least-squares (LC-LS) fitting of the XANES spectra using model compounds spectra selected on the basis of our electron microscopy observations and by comparison with a large database of already published spectra for iron sulfides (Wang *et al.*, 2014; Noël *et al.*, 2014, 2017; Morin *et al.*, 2017; Merrot *et al.*, 2019), phosphates (Cosmidis *et al.*, 2014; Muehe *et al.*, 2016) and oxyhydroxides (Maillot *et al.*, 2011; Hohmann *et al.*, 2010; Baumgartner *et al.*, 2016; Zeyen *et al.*, 2019). Best LC-LS fits of the XANES spectra for the biotic samples studied here were obtained using the spectra of the following four model compounds: poorly ordered FeS, pyrite [FeS₂], greigite [Fe₃S₄], amorphous iron phosphate [am-Fe^{III}PO₄·nH₂O], and vivianite [(Fe^{II}₃PO₄)₂·8H₂O]. LC-LS fitting of the XANES spectra was performed using a classical Levenberg–Marquardt minimization algorithm implemented in a custom-built program (Morin *et al.*, 2003). According to Ravel and Newville (2005), fit quality was estimated by a R-factor: $R_f = \frac{\sum [\mu_{\text{exp}} - \mu_{\text{calc}}]^2}{\sum \mu_{\text{exp}}^2}$ where μ is the normalized absorbance, and by a reduced chi-squares (χ^2_R). According to Stetten *et al.* (2018) and Seder-Colomina *et al.* (2018), this reduced chi-squares for XANES spectra was calculated as, $\chi^2_R = \frac{N}{(N-N_p)} \sum [\mu_{\text{exp}} - \mu_{\text{calc}}]^2$, where N_p is the number of fitting components and N is the number of independent parameters corresponding to the energy range divided by the natural width of the Fe K-level reported by Krause and Oliver (1979). The uncertainty on the fitting components was estimated to 99.7% confidence (3 sigma) by $3 \times \sqrt{\text{VAR}(p)} \chi^2_R$, where VAR(p) is the variance of component p returned by the minimization routine for the lowest χ^2_R value (Stetten *et al.*, 2018; Seder-Colomina *et al.*, 2018).

Acknowledgements

The authors acknowledge the SOLEIL synchrotron for providing beamtime and we thank the staff of the SAMBA beamline

for their assistance during XAS measurements. Aurore Gorlas was supported by the Agence Nationale de la Recherche, project HYPERBIOMIN (ANR-20-CE02-0001-01). François Guyot was supported by Institut Universitaire de France. Patrick Forterre was supported by Institut Universitaire de France and by the European Research council, project EVOMOBIL (FP/2007-2013) – ERC Grant Agreement no. 340440 to PF.

References

- Adams, M.W.W. (1994) Biochemical diversity among sulfur-dependent, hyperthermophilic microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* **15**: 261–277.
- Adams, M.W.W., Holden, J.F., Menon, A.L., Schut, G.J., Grunden, A.M., Hou, C., et al. (2001) Key role for sulfur in peptide metabolism and in regulation of three hydrogenases in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol* **183**: 716–724.
- Baumgartner, J., Menguy, N., Gonzalez, T.P., Morin, G., Widdrat, M., and Faivre, D. (2016) Elongated magnetite nanoparticle formation from a solid ferrous precursor in a magnetotactic bacterium. *J R Soc Interface* **13**: 20160665.
- Benning, L.G., Wilkin, R.T., and Barnes, H.L. (2000) Reaction pathways in the Fe–S system below 100°C. *Chem Geol* **167**: 25–51.
- Berg, J.S., Duverger, A., Cordier, L., Laberty-Robert, C., Guyot, F., and Miot, J. (2020) Rapid pyritization in the presence of a sulfur/sulfate-reducing bacterial consortium. *Sci Rep* **10**: 8264.
- Bertel, D., Peck, J., Quick, T.J., and Senko, J.M. (2012) Iron transformations induced by an acid-tolerant *Desulfosporosinus* species. *Appl Environ Microbiol* **78**: 81–88.
- Blumentals, I.I., Itoh, M., Olson, G.J., and Kelly, R.M. (1990) Role of polysulfides in reduction of elemental sulfur by the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *Appl Environ Microbiol* **56**: 1255–1262.
- Butterfield, D.A., Jonasson, I.R., Massoth, G.J., Feely, R.A., Roe, K.K., Embley, R.E., et al. (1997) Seafloor eruptions and evolution of hydrothermal fluid chemistry. *Philos Trans Roy Soc London A* **355**: 369–386.
- Chan, C.S., Fakra, S.C., Emerson, D., Fleming, E.J., and Edwards, K.J. (2011) Lithotrophic iron-oxidizing bacteria produce organic stalks to control mineral growth: implications for biosignature formation. *ISME J* **5**: 717–727.
- Chan, C.S., McAllister, S.M., Leavitt, A.H., Glazer, B.T., Krepeski, S.T., and Emerson, D. (2016) The architecture of iron microbial mats reflects the adaptation of chemolithotrophic iron oxidation in freshwater and marine environments. *Front Microbiol* **7**: 796.
- Clarkson, S.M., Haja, D.K., and Adams, M.W.W. (2021) The hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* utilizes environmental iron sulfide cluster complexes as an iron source. *Extremophiles* **25**: 249–256.
- Cosmidis, J., Benzerara, K., Morin, G., Busigny, V., Lebeau, O., Othmane, G., et al. (2014) Biomineralization of iron-phosphates in the water column of Lake Pavin (Massif Central, France). *Geochim Cosmochim Acta* **126**: 78–96.
- 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**: 124.
- Duverger, A., Berg, J.S., Busigny, V., Guyot, F., Bernard, S., and Miot, J. (2020) Mechanisms of pyrite formation promoted by sulfate-reducing bacteria in pure culture. *Front Earth Sci* **8**: 588310.
- Druschel, G.K., Baker, B.J., Gihring, T.M., and Banfield, J.F. (2004) Acid mine drainage biogeochemistry at iron mountain California. *Geochem Trans* **5**: 13.
- Edwards, K.J., Schrenk, M.O., Hamers, R., and Banfield, J. F. (1998) Microbial oxidation of pyrite: experiments using microorganisms from an extreme acidic environment. *Am Miner* **83**: 1444–1453.
- Emerson, D., and Moyer, C.L. (2002) Neutrophilic Fe-oxidizing bacteria are abundant at the Loihi seamount hydrothermal vents and play a major role in Fe oxide deposition. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3085–3093.
- 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* **8**: e667.
- Emerson, D., Fleming, E.J., and Mcbeth, J.M. (2010) Iron-oxidizing bacteria: an environmental and genomic perspective. *Annu Rev Microbiol* **64**: 561–583.
- Emerson, D. (2016) The irony of iron - biogenic iron oxides as an iron source to the ocean. *Front Microbiol* **6**: 1502.
- Fowler, T.A., Holmes, P.R., and Crundwell, F.K. (1999) Mechanism of pyrite dissolution in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2987–2993.
- Frawley, E.R., and Fang, F.C. (2014) The ins and outs of bacterial iron metabolism. *Mol Microbiol* **93**: 609–616.
- Gartman, A., Yücel, M., Madison, A.S., Chu, D.W., Ma, S., Janzen, C.P., et al. (2011) Sulfide oxidation across diffuse flow zones of hydrothermal vents. *Aquat Geochem* **17**: 583–601.
- Gartman, A., Findlay, A.J., and Luther, G.W. (2014) Nanoparticulate pyrite and other nanoparticles are a widespread component of hydrothermal vent black smoker emissions. *Chem Geol* **366**: 32–41.
- Georgieva, M.N., Little, C.T., Ball, A.D., and Glover, A.G. (2015) Mineralization of *Alvinella* polychaete tubes at hydrothermal vents. *Geobiology* **13**: 152–169.
- 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.
- Hironaka, I., Iwase, T., Sugimoto, S., Okuda, K., Tajima, A., Yanaga, K., and Mizunoe, Y. (2013) Glucose triggers ATP secretion from bacteria in a growth-phase-dependent manner. *Appl Environ Microbiol* **79**: 2328–2335.
- Hohmann, C., Winkler, E., Morin, G., and Kappler, A. (2010) Anaerobic Fe(II)-oxidizing bacteria show as resistance

- and immobilize as during Fe(III) mineral precipitation. *Environ Sci Technol* **44**: 94–101.
- Holden, J.F., and Adams, M.W. (2003) Microbe-metal interactions in marine hydrothermal environments. *Curr Opin Chem Biol* **7**: 160–165.
- Holden, J.F., Breier, J.A., Rogers, K.L., Schulte, M.D., and Toner, B.M. (2012) Biogeochemical processes at hydrothermal vents: microbes and minerals, bioenergetics, and carbon fluxes. *Oceanography* **25**: 196–208.
- Hou, J., Sievert, S.M., Wang, Y., Seewald, J.S., Natarajan, V.P., Wang, F., and Xiao, X. (2020) Microbial succession during the transition from active to inactive stages of deep-sea hydrothermal vent sulfide chimneys. *Microbiome* **8**: 102.
- Hunger, S., and Benning, L.G. (2007) Greigite: a true intermediate on the polysulfide pathway to pyrite. *Geochem Trans* **8**: 1.
- Juniper, S.K., and Fouquet, Y. (1988) Filamentous iron-silica deposits from modern and ancient hydrothermal sites. *Can Mineral* **26**: 859–869.
- Kanai, T., Imanaka, H., Nakajima, A., Uwamori, K., Omori, Y., Fukui, T., *et al.* (2005) Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J Biotechnol* **116**: 271–282.
- Kashefi, K., and Lovley, D.R. (2000) Reduction of Fe(III), Mn(IV), and toxic metals at 100 degrees C by *Pyrobaculum islandicum*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1050–1056.
- Kashefi, K., Tor, J.M., Holmes, D.E., Gaw Van Praagh, C.V., Reysenbach, A.L., and Lovley, D.R. (2002) *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon capable of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe(III) serving as the sole electron acceptor. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 719–728.
- Kashefi, K. (2012) Hyperthermophiles: metabolic diversity and biotechnological applications. In *Extremophiles: Microbiology and Biotechnology*, Anitori, R.P. (ed). Norfolk, UK: Caister Academic Press, pp. 183–231.
- Kashyap, S., Sklute, E.C., Dyar, M.D., and Holden, J.F. (2018) Reduction and morphological transformation of synthetic nanophase iron oxide minerals by hyperthermophilic archaea. *Front Microbiol* **9**: 1550.
- Kormas, K.A., Tivey, M.K., Von Damm, K., and Teske, A. (2006) Bacterial and archaeal phylotypes associated with distinct mineralogical layers of a white smoker spire from a deep-sea hydrothermal vent site (9°N, East Pacific rise). *Environ Microbiol* **8**: 909–920.
- Krause, M.O., and Oliver, J.H. (1979) Natural widths of atomic K and L levels, K α X-ray lines and several KLL auger lines. *J Phys Chem Ref Data Monogr* **8**: 329–338.
- Lasocki, S., Gaillard, T., and Rineau, E. (2014) Iron is essential for living! *Crit Care* **18**: 678.
- Lin, T.J., Breves, E.A., Dyar, M.D., Ver Eecke, H.C., Jamieson, J.W., and Holden, J.F. (2014) Magnetite formation from ferrihydrite by hyperthermophilic archaea from Endeavour segment, Juan de Fuca ridge hydrothermal vent chimneys. *Geobiology* **12**: 200–211.
- Lin, T.J., Ver Eecke, H.C., Breves, E.A., Dyar, M.D., Jamieson, J.W., Hannington, M.D., *et al.* (2016) Linkages between mineralogy, fluid chemistry, and microbial communities within hydrothermal chimneys from the Endeavour segment, Juan de Fuca ridge. *Geochem Geophys Geosyst* **17**: 300–323.
- Little, C.T.S., and Vrijenhoek, R.C. (2003) Are hydrothermal vent animals living fossils? *Trends Ecol Evol* **18**: 582–588.
- Lundin, A. (2000) Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Methods Enzymol* **305**: 346–370.
- Luther, G.W. (1991) Pyrite synthesis via polysulfide compounds. *Geochim Cosmochim Acta* **55**: 2839–2849.
- Luther, G.W., Rozan, T.F., Tallefert, M., Nuzzio, D.B., Di Meo, C., Shank, T.M., *et al.* (2001a) Chemical speciation drives hydrothermal vent ecology. *Nature* **410**: 813–816.
- Luther, G.W., Glazer, B.T., Hohmann, L., Popp, J.I., Tallefert, M., Rozan, T.F., *et al.* (2001b) Sulfur speciation monitored in situ with solid state gold amalgam voltammetric micro-electrodes: polysulfides as a special case in sediments, microbial mats and hydrothermal vent waters. *J Environ Monit* **3**: 61–66.
- Maillet, F., Morin, G., Wang, Y., Bonnin, D., Ildefonse, P., Chaneac, C., and Calas, G. (2011) New insight into the structure of nanocrystalline ferrihydrite: EXAFS evidence for tetrahedrally coordinated iron(III). *Geochim Cosmochim Acta* **75**: 2708–2720.
- Mann, S., Sparks, N.H.C., Frankel, R.B., Bazylinski, D.A., and Jannasch, H.W. (1990) Biomineralization of ferromagnetic greigite (Fe₃S₄) and iron pyrite (FeS₂) in a magnetotactic bacterium. *Nature* **343**: 258–261.
- 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.
- Matamoros-Veloza, A., Cespedes, O., Johnson, B.R.G., Stawski, T.M., Terranova, U., de Leeuw, N.H., and Benning, L.G. (2018) A highly reactive precursor in the iron sulfide system. *Nat Commun* **9**: 3125.
- McCollom, T.M. (2007) Geochemical constraints on sources of metabolic energy for chemolithoautotrophy in ultramafic-hosted deep-sea hydrothermal systems. *Astrobiology* **7**: 933–950.
- McGuire, M.M., Edwards, K.J., Banfield, J.F., and Hamers, R.J. (2001) Kinetics, surface chemistry, and structural evolution of microbially mediated sulfide mineral dissolution. *Geochim Cosmochim Acta* **65**: 1243–1258.
- Merrot, P., Juillot, F., Noël, V., Lefebvre, P., Brest, J., Menguy, N., *et al.* (2019) Nickel and iron partitioning between clay minerals, Fe-oxides and Fe-sulfides in lagoon sediments from New Caledonia. *Sci Total Environ* **689**: 1212–1227.
- Miot, J., and Etique, M. (2016) Formation and transformation of iron-bearing minerals by iron(II)-oxidizing and iron(III)-reducing bacteria. In *Iron Oxides*, Faivre, D. (ed). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Morin, G., Juillot, F., Casiot, C., Bruneel, O., Personné, J.-C., Elbaz-Poulichet, F., *et al.* (2003) Bacterial formation of tooeite and mixed arsenic(III) or arsenic(V)-iron(III) gels in the Carnoulès acid mine drainage, France. A XANES, XRD and SEM study. *Environ Sci Tech* **37**: 1705–1712.

- Morin, G., Noël, V., Menguy, N., Brest, J., Baptiste, B., Tharaud, M., et al. (2017) Nickel accelerates pyrite nucleation at ambient temperature. *Geochem Perspect Lett* **5**: 6–11.
- Muehe, E.M., Morin, G., Scheer, L., Le Pape, P., Esteve, I., Daus, B., and Kappler, A. (2016) Arsenic(V) incorporation in vivianite during microbial reduction of arsenic(V)-bearing biogenic Fe(III) (oxyhydr)oxides. *Environ Sci Tech* **50**: 2281–2291.
- Noël, V., Marchand, C., Juillot, F., Ona-Nguema, G., Viollier, E., Marakovic, G., et al. (2014) EXAFS analysis of iron cycling in mangrove sediments downstream of a lateritized ultramafic watershed (Vavouto Bay, New Caledonia). *Geoch Cosmochim Acta* **136**: 211–228.
- Noël, V., Juillot, F., Morin, G., Marchand, C., Ona-Nguema, G., Viollier, E., et al. (2017) Oxidation of Ni-rich mangrove sediments after isolation from the sea. In *Fe and Ni Behavior and Environmental Implications*. Dumba Bay, New Caledonia: ACS Earth and Space Chemistry. <https://doi.org/10.1021/acsearthspacechem.7b00005>.
- Payne, D., Spietz, R.L., and Boyd, E.S. (2021) Reductive dissolution of pyrite by methanogenic archaea. *ISME J* **15**: 3498–3507. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01028-3>.
- Picard, A., Gartman, A., and Girguis, P.R. (2016) What do we really know about the role of microorganisms in iron sulfide mineral formation? *Front Earth Sci* **4**: 68.
- Picard, A., Gartman, A., Clarke, D.R., and Girguis, P.R. (2018) Sulfate-reducing bacteria influence the nucleation and growth of mackinawite and greigite. *Geoch Cosmochim Acta* **220**: 363–384.
- Picard, A., Gartman, A., Cosmidis, J., Obst, M., Vidoudez, C., Clarke, D.R., and Girguis, P.R. (2019) Authigenic metastable iron sulfide minerals preserve microbial organic carbon in anoxic environments. *Chem Geol* **530**: 1–13.
- Prieur, D., Erauso, G., Geslin, C., Lucas, S., Gaillard, M., Bidault, A., et al. (2004) Genetic elements of Thermococcales. *Biochem Soc Trans* **32**: 184–187.
- Raiswell, R., and Canfield, D.E. (2011) The iron biogeochemical cycle past and present. *Geochem Perspect* **1**: 1–2.
- Ravel, B., and Newville, M. (2005) ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *J Synch Rad* **12**: 537–541.
- Remonsellez, F., Orell, A., and Jerez, C.A. (2006) Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism. *Microbiology* **152**: 59–66.
- Rickard, D. (1997) Kinetics of pyrite formation by the H₂S oxidation of iron (II) monosulfide in aqueous solutions between 25 and 125°C: the mechanism. *Geochim Cosmochim Acta* **61**: 135–147.
- Rickard, D., and Luther, G.W., III. (2007) Chemistry of iron sulfides. *Chem Rev* **107**: 514–562.
- Rickard, D. (2012) Sulfidic sediments and sedimentary rocks. In *Developments in Sedimentology*, Vol. **65**. Amsterdam: Elsevier. <https://doi.org/10.1126/science.207.4437.1355>.
- Schauder, R., and Müller, E. (1993) Polysulfide as a possible substrate for sulfur-reducing bacteria. *Arch Microbiol* **160**: 377–382.
- Schicho, R.N., Ma, K., Adams, M.W.W., and Kelly, R.M. (1993) Bioenergetics of sulfur reduction in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol* **175**: 1823–1830.
- Scholten, L., Schmidt, C., Lecumberri-Sanchez, P., Newville, M., Lanzirrotti, A., Sirbescu, M.L.C., and MacInnis, M.S. (2019) Solubility and speciation of iron in hydrothermal fluids. *Geoch Cosmo Acta* **252**: 126–143.
- Schut, G.J., Boyd, E.S., Peters, J.W., and Adams, M.W. (2013) The modular respiratory complexes involved in hydrogen and sulfur metabolism by heterotrophic hyperthermophilic archaea and their evolutionary implications. *FEMS Microbiol Rev* **37**: 182–203.
- Seder-Colomina, M., Mangeret, A., Stetten, L., Merrot, P., Diez, O., Julien, A., et al. (2018) Carbonate facilitated mobilization of uranium from lacustrine sediments under anoxic conditions. *Environ Sci Tech* **52**: 9615–9624.
- Slobodkin, G.B., Kolganova, T.V., Querellou, J., Bonch-Osmolovskaya, E.A., and Slobodkin, A.I. (2009) *Geoglobus acetivorans* sp. nov., an iron(III)-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *IJSEM* **59**: 2880–2883.
- Stanley, W., and Southam, G. (2018) The effect of gram-positive (*Desulfosporosinus orientis*) and gram-negative (*Desulfovibrio desulfuricans*) sulfate-reducing bacteria on iron sulfide mineral precipitation. *Can J Microbiol* **64**: 629–637.
- Stetten, L., Mangeret, A., Brest, J., Seder-Colomina, M., Le Pape, P., Ikogou, M., et al. (2018) Geochemical control on the reduction of U(VI) to mononuclear U(IV) species in lacustrine sediment. *Geoch Cosmochim Acta* **222**: 171–186.
- 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–e00211.
- 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.
- Taylor, K.G., and Konhauser, K.O. (2011) Iron in earth surface systems: a major player in chemical and biological processes. *Elements* **7**: 83–88.
- Thiel, J., Byrne, J.M., Kappler, A., Schink, B., and Pester, M. (2019) Pyrite formation from FeS and H₂S is mediated through microbial redox activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**: 6897–6902.
- Tivey, M.K. (2007) Generation of seafloor hydrothermal vent fluids and associated mineral deposits. *Oceanography* **20**: 50–65.
- Tivey, M.K., Olson, L.O., Miller, V.W., and Light, R.D. (1990) Temperature measurements during initiation and growth of a black smoker chimney. *Nature* **346**: 51–54.
- Toner, B.M., Rouxel, O.J., Santelli, C.M., Bach, W., and Edwards, K.J. (2016) Iron transformation pathways and redox micro-environments in seafloor sulfide-mineral deposits: spatially resolved Fe XAS and $\delta^{57/54}\text{Fe}$ observations. *Front Microbiol* **7**: 648.
- Toso, D.B., Henstra, A.M., Gunsalus, R.P., and Zhou, Z.H. (2011) Structural, mass and elemental analyses of storage granules in methanogenic archaeal cells. *Environ Microbiol* **13**: 2587–2599.
- Toso, D.B., Javed, M.M., Czornyj, E., Gunsalus, R.P., and Zhou, Z.H. (2016) Discovery and characterization of iron

- sulfide and polyphosphate bodies coexisting in *Archaeoglobus fulgidus* cells. *Archaea* **2016**: 1–11.
- Turekian, K.K. (1968) *Oceans*. Prentice-Hall, Englewood: Foundations of Earth Science Series, p. 120.
- Ver Eecke, H.C., Kelley, D.S., and Holden, J.F. (2009) Abundances of hyperthermophilic autotrophic Fe(III) oxide reducers and heterotrophs in hydrothermal sulfide chimneys of the northeastern Pacific Ocean. *Appl Environ Microbiol* **75**: 242–245.
- Vrede, K., Heldal, M., Norland, S., and Bratbak, G. (2002) Elemental composition (C, N, P) and cell volume of exponentially growing and nutrient-limited Bacterioplankton. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2965–2971.
- Waite, T.J., Moore, T.S., Childress, J.J., Hsu-Kim, H., Mullaugh, K.M., Nuzzio, D.B., *et al.* (2008) Variation in sulfur speciation with shellfish presence at a Lau Basin diffuseflow vent site. *J Shellfish Res* **27**: 163–168.
- Wang, Y.H., Morin, G., Ona-Nguema, G., and Brown, G.E. Jr. (2014) Arsenic(III) and Arsenic(V) Speciation during Transformation of Lepidocrocite to Magnetite. *Environ Sci Technol* **48**: 14282–14290.
- Wilfert, P., Meerdink, J., Degaga, B., Temmink, H., Korving, L., Witkamp, G.J., *et al.* (2020) Sulfide induced phosphate release from iron phosphates and its potential for phosphate recovery. *Water Res* **171**: 115389.
- Wilkin, R.T., and Barnes, H.L. (1996) Pyrite formation by reactions of iron monosulfides with dissolved inorganic and organic sulfur species. *Geochim Cosmochim Acta* **60**: 4167–4179.
- Xiong, Y., Guilbaud, R., Peacock, C.L., Cox, R.P., Canfield, D. E., Krom, M.D., and Poulton, S.W. (2019) Phosphorus cycling in Lake Cadagno, Switzerland: a low sulfate euxinic ocean analogue. *Geoch Cosmochim Acta* **251**: 116–135.
- Zeyen, N., Benzerara, K., Menguy, N., Brest, J., Templeton, A.S., Webb, S.M., *et al.* (2019) Fe-bearing phases in modern lacustrine microbialites from Mexico. *Geoch Cosmochim Acta* **253**: 201–230.
- Zhang, L., Sun, Z.L., Geng, W., Cao, H., Qin, Y.C., Xu, C.L., *et al.* (2019) Advances in the microbial mineralization of seafloor hydrothermal systems. *China Geol* **2**: 227–237.

Supporting Information

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

Fig S1. Intracellular composition in *Thermococcales* cells. Intracellular composition (1) and cell observation with Cryo-EM (2) when cells are grown in medium containing native

sulfur S(0) (A) or L-cystine (B). The percentages are given in weight %.

Fig S2. Production of iron sulfide minerals in S(0) condition. Scanning (A) and transmission (B, C) electron microscopy images of mineralized and aggregated cells and vesicles incubated for 144 h with mineralization medium. Scale bar: 1 μm . Cells are associated with Fe and S maps (C). The red arrows indicate the presence of greigite nanocrystals. The entirely mineralized cell labelled a, in Fig. S2B, provided the SAED pattern of pyrite of Fig. S3.

Fig S3. Electron diffraction pattern of the minerals of the cell surfaces and/or filling (providing from the cell labelled a in Fig. S2B) corresponding to pyrite. This is a polycrystalline pattern with strong preferred orientations toward a common 2–11 zone axis.

Fig S4. First stages of iron sulfides mineralization of *Thermococcales* in L-cystine condition. Scanning transmission electron microscopy image of the cell lysis products after 5 h of incubation in mineralization medium (A) and associated C (upper panel), P (middle panel) and Fe (lower panel). Elemental analysis by EDXS (B).

Fig S5. Presence of few non-mineralized cells after 144 h of incubation in mineralization medium in L-cystine condition. Scanning transmission electron microscopy image of single cell (indicated by black circle) close to the iron sulfide matrix (scale bar = 1 μm) and associated C (carbon panel), Fe and S maps (iron and sulfur panels).

Fig S6. Scanning electron microscopy images of abiotic controls (modified Ravot medium without cells) after 70 h of incubation in anoxic FeSO_4 solution (at 5 mM) in S(0) condition (A) and elemental analysis by EDX (B). Scale bar: 1 μm .

Fig S7. Scanning electron microscopy images of mineralized and aggregated cells/vesicles incubated for 192 h with mineralization medium. Scale bar = 1 μm . The intercellular/interventricular matrix contains many greigite nanocrystals indicated by red arrows (A). The black circles indicate the presence of non-mineralized cell which separate itself from the biofilm (B).

Fig S8. ATPmetry analyses during biomineralization process. The data represent the ATP content (mM) in the sample when grown cells in sulfur (A) or in L-cystine (B) are incubated with high concentration of FeSO_4 . For both conditions, the red curves represent the ATP level when cells are incubated with 10 mM of FeSO_4 ; the grey curves represent the ATP level when cells are incubated with 50 mM of FeSO_4 . For L-cystine condition, the green curve represents the ATP level when cells are incubated with 25 mM of FeSO_4 .

Appendix S1. Supporting Information