

LES CONDITIONS DE VIE EXTRÊMES SUR LA PLANÈTE ET EXOBIOLOGIE

JEAN-LUC CAYOL*, BERNARD OLLIVIER*, DIDIER ALAZARD, RICARDO AMILS, ANNE GODFROY,
DANIELLE MARTY, FLORENCE PIETTE & DANIEL PRIEUR

10.1. INTRODUCTION

À notre connaissance, la Terre est la seule planète habitable, et habitée, dans le système solaire et même l'Univers. Tous ses habitants, du plus simple au plus complexe, du plus petit au plus grand, sont contraints par un grand nombre de paramètres physico-chimiques environnementaux. En fonction du temps et de l'espace, les valeurs atteintes par ces paramètres comme la température, la salinité, le pH, la pression varient considérablement. Les combinaisons des valeurs atteintes (minimales et maximales) par ces différents paramètres dans une zone géographique donnée définissent des biotopes, ou des ensembles de conditions environnementales, convenant à une espèce donnée.

Pour la plupart des paramètres majeurs tels que ceux cités plus haut, des limites spécifiques ont été établies (pas toujours définitivement) au delà desquelles aucun organisme connu ne peut accomplir la totalité de son cycle vital. Un environnement dans lequel un ou plusieurs paramètres présente en permanence des valeurs proches de ces limites inférieures ou supérieures connues pour la vie est alors qualifié d'environnement extrême : pH inférieur à 3, température supérieure à 80°C, pression supérieure à 20 MPa, etc. Les sources géothermales, les abysses océaniques, les sources acides, les marais salants, le per-

mafrost sont autant d'environnements qualifiés d'extrêmes. Concernant les organismes que l'on peut y rencontrer, il est possible de distinguer plusieurs catégories physiologiques.

Certains organismes, soumis à un paramètre particulier dont la valeur est incompatible avec leur cycle vital, se modifient de manière à résister à cette agression environnementale. Ainsi certaines bactéries forment des spores, résistantes à la chaleur, pouvant une fois formées, demeurer sous cette forme quasi inerte pendant de très longues périodes (une durée de 250 millions d'années a même été avancée).

D'autres sont capables de mettre en œuvre des mécanismes cellulaires et moléculaires complexes et variés, leur permettant de résister par exemple à des concentrations toxiques de métaux lourds, ou de réparer leur ADN rompu sous l'effet de radiations ionisantes.

Pour ces deux catégories, les conditions extrêmes ne sont pas requises pour l'accomplissement du cycle vital, mais certains organismes qui y sont confrontés ont « appris » au cours de l'évolution à se mettre à l'abri ou à réparer les dégâts.

Une troisième catégorie d'organismes ne peut accomplir leurs cycles vitaux que si les conditions envi-

ronnementales sont en permanence extrêmes. Ainsi un hyperthermophile (cf. Chapitre 10.2) ne pourra se diviser pour une température inférieure à 65°C, qui pourtant serait létale pour un psychrophile (cf. Chapitre 10.1). Ou encore un piézophile (cf. Chapitre 10.4) cessera de croître à la pression atmosphérique. Tous ces organismes méritent réellement le qualificatif d'extrémophile. Tous sont des micro-organismes, parfois des Eucarya, mais le plus souvent des bactéries et des archées. Dans tous les cas, leur étude relève de l'écologie microbienne, d'où la place qui leur est consacrée dans cet ouvrage.

10.2. LES BACTERIES PSYCHROPHILES

10.2.1. INTRODUCTION



Figure 10-1 : Un écosystème froid typique de l'Antarctique.

Les bactéries psychrophiles sont des micro-organismes adaptés au froid (littéralement, qui aiment le froid). Elles constituent une biomasse considérable car les environnements froids représentent la partie la plus importante de la planète terre : il faut en effet tenir compte non seulement des régions polaires, arctiques et antarctiques (**Figure 10-1**), mais aussi, des régions de haute montagne, des glaciers, des zones de per-

mafrost ainsi que des océans au sein desquels, en dessous de 1 000 mètres de profondeur, la température est inférieure à 5°C quelle que soit la latitude. La gamme des températures dans laquelle se développent ces organismes est très large ; dans l'eau libre des océans elle varie de -1,9°C, correspondant en moyenne à la température de congélation de l'eau de mer, à environ 5°C ; au sein de la glace de mer les températures pour lesquelles des activités bactériennes ont été décelées s'étendent jusqu'à -20°C et peut-être moins encore. Les concentrations cellulaires peuvent y atteindre 10⁵ bactéries mL⁻¹. Les limites de température pour lesquelles la vie bactérienne semble encore possible au sein du permafrost sont sans doute encore inférieures à cette valeur car on a pu démontrer que même à des températures aussi basses que 170°K (-60°C), des zones d'eau liquide pouvaient subsister sous forme de solutions salines associées à des sédiments ou de la bentonite, suggérant que ces zones pourraient servir d'habitats à des micro-organismes. Cela nous rapproche aussi des températures rencontrées sur Mars (en moyenne 225°K ou -5°C) et rend plausible l'hypothèse que des micro-organismes anaérobies aient pu subsister jusqu'à aujourd'hui sur cette planète dans la glace (Price, 2007). L'importance de l'étude détaillée de ces micro-organismes apparaît donc considérable non seulement en raison de leur abondance mais aussi parce qu'ils constituent la base d'une théorie alternative plausible qui propose que le premier représentant de la vie sur terre était un psychrophile (Last Universal Common Ancestor-LUCA).

10.2.2. TERMINOLOGIE

Dans la littérature scientifique consacrée aux organismes adaptés au froid, on rencontre différents termes constituant autant de tentatives de sub-divisions de ces micro-organismes particuliers, curieusement définis en fonction de leur température optimale apparente de croissance et leur température maximale de multiplication. Ainsi selon la classification la plus répandue (D'Amico *et al.*, 2006), les micro-organismes psychrophiles auraient un optimum de croissance ≤15°C et une température maximale de croissance ≤20°C. Ils se distingueraient ainsi des micro-organismes psychrotolérants dont l'optimum serait ≤20°C et le maximum ≤35°C. Le terme psychrotrophe se rencontre également et correspondrait à peu de chose près au terme psychrotolérant. Nous pensons que ces termes sont inutiles et prêtent à confusion. En effet les expériences de culture de ces micro-organismes indiquent :

- (i) qu'il existe un continuum dans l'adaptation au froid,
- (ii) que toute classification s'avère restrictive,

- (iii) que le terme psychrophile est le seul correct puisqu'il indique sans ambiguïté que la bactérie est adaptée au froid
- (iv) que le terme psychrotolérant est basé sur le concept erroné qu'une bactérie se développe particulièrement bien à ce que l'on appelle la température optimale de croissance obtenue à partir du taux de croissance ($x \text{ h}^{-1}$) ou temps de doublement ($x \text{ h}$) du micro-organisme mesuré en fonction de la température de culture. En réalité cette température est une température critique qui résulte du croisement de deux courbes : l'une exponentielle correspond à l'augmentation du taux de croissance en fonction de la température par effet cinétique répondant à la loi d'Arrhenius et l'autre décroissante correspond à l'effet délétère de la température sur des composants cellulaires comme les protéines. La température optimale de croissance réelle est en fait souvent très éloignée de celle définie ci-dessus, elle est sans doute proche de la température de l'environnement pour des espèces endémiques. Ceci peut facilement être démontré en considérant la densité cellulaire obtenue en fonction de la température à la fin de la phase exponentielle de croissance. On constate en effet chez *Pseudoalteromonas haloplanktis* (**Figure 10-2**) qu'à la température optimale apparente, la densité cellulaire est bien inférieure à celles obtenues à plus basses températures. Les cellules sont alors en état de détresse métabolique. Le terme psychrotolérant est d'autant plus inapproprié que beaucoup d'espèces appartenant à cette catégorie présentent des temps de doublement plus courts que ceux d'espèces psychrophiles provenant du même environnement. Il serait dès lors plus judicieux de réserver ce terme, pour autant qu'il soit d'une utilité quelconque, à des espèces mésophiles capables de survivre dans des

environnements froids. Le terme psychrotrophe, introduit en 1960, est souvent utilisé dans l'industrie alimentaire pour désigner des micro-organismes susceptibles de dégrader des aliments congelés ; il n'apparaît pas plus approprié en raison de son inadéquation avec une quelconque caractéristique bactérienne. Les termes sténopsychrophile (psychrophile) et eurypsychrophile (psychro-tolérant) ont également été proposés pour désigner des organismes capables respectivement de se multiplier dans des zones étroites ou larges de basses températures (D'Amico *et al.*, 2006). Dans cette revue de synthèse nous avons décidé d'utiliser uniquement le terme psychrophile pour désigner toute bactérie vivant en permanence dans des environnements de basse température et dès lors écologiquement bien adaptée à ce type d'habitats.

10.2.3. ENVIRONNEMENTS ET BIODIVERSITÉ

L'inventaire sera limité aux eaux de surfaces et aux eaux profondes, aux glaces de mer, aux zones de permafrost, aux neiges et glaciers ainsi qu'aux lacs sous-glaciaire.

L'évaluation des populations bactériennes reste un problème difficile en raison du fait que seulement 1 à 10 % des espèces microbiennes apparaissent cultivables. Des techniques indépendantes des cultures ont été développées, elles sont basées soit sur la détermination de la séquence de gènes de la petite sous-unité 16S du RNA ribosomal, soit sur l'hybridation *in situ* à l'aide de sondes appropriées. Plus récentes encore, les techniques de métagénomique ont ouvert des perspectives considérables dans ce domaine puisqu'elles envisagent ni plus ni moins de déterminer, à partir de l'ADN global isolé des échantillons bruts et cloné dans des vecteurs adéquats, la séquence de tous les génomes présents. On peut se rendre compte de l'amplitude de la tâche en considérant qu'un millier de génomes bactériens pourrait être présent dans l'échantillon naturel prélevé, ce qui porterait le nombre de paires de bases à environ $3\text{-}5 \cdot 10^9$. De grands centres de séquençage se sont déjà attelés à ce type d'entreprise et les résultats s'avèrent prometteurs.

Les océans arctiques et antarctiques

On peut sans doute considérer que dans ces environnements, en dessous de 60° de latitude sud, la température de l'eau oscille entre $-1,9^\circ\text{C}$ et 5°C . La pression de sélection est donc maximale en raison de la relative constance de ces températures par rapport aux environnements terrestres de même latitude. Dans

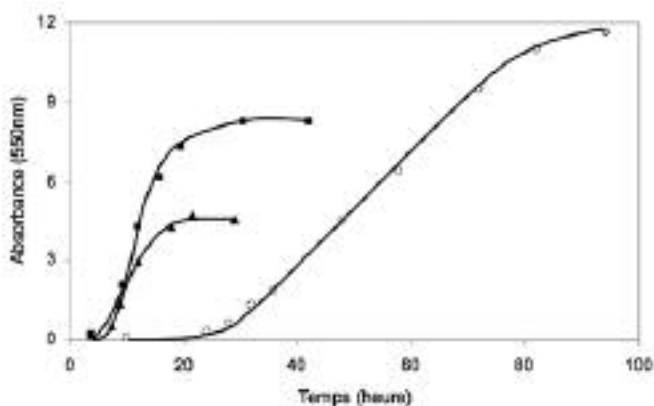


Figure 10-2 : Croissance de *Pseudoalteromonas haloplanktis* à 4°C (○), 18°C (△) et 25°C (□) (A_{550} absorbance à 550 nm).

l'océan arctique, en dessous de la glace permanente, des densités de 10^2 ml^{-1} de bactéries hétérotrophes ont été rapportées. Les populations n'apparaissent pas très différentes si l'on compare l'Arctique à l'Antarctique; ainsi, aux deux pôles, les Alpha et Gamma protéobactéries ainsi que les cytophages-flavobactéries dominent avec 97 % des phylotypes répertoriés communs à l'Arctique et à l'Antarctique. En Antarctique on observe une large fluctuation de la biomasse marine en fonction de la saison, ce qui reflète les changements de température et de lumière. De larges populations de flavobactéries dont l'abondance liée aux concentrations en chlorophylle et en nutriments se rencontrent en surface. Les archées sont également abondantes et représentent environ 30 % de la biomasse des procaryotes. Les genres de bactéries les plus communs rencontrés dans les eaux de mer arctique et antarctique sont : *Alteromonas*, *Colwellia*, *Glacieola*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella* et *Polaribacter*.

Les eaux profondes

60 % de la surface terrestre est couverte par des mers de profondeur supérieure à 1000 m. La pression hydrostatique de ces environnements est de plus de 110 MPa et les températures souvent inférieures à 4°C (à l'exception des sources hydrothermales où la température peut atteindre 370°C). Les micro-organismes capables de supporter ces pressions et températures extrêmes sont nommés psychropiezophiles. La première bactérie de ce type fut découverte en 1979, il s'agit d'une bactérie de type spirillum (souche CNPT-3) qui a un temps de doublement rapide à 50 MPa et qui est incapable de pousser à pression atmosphérique. De nombreuses bactéries psychropiezophiles ont été isolées et caractérisées, il s'avère qu'elles appartiennent toutes au groupe des Gamma protéobactéries selon la classification basée sur les séquences des ARN ribosomiques 5S et 16S. Ces bactéries se répartissent dans 5 genres prédominants : *Photobacterium*, *Colwellia*, *Moritella*, *Shewanella* et *Psychromonas*. Quelque soit le genre auquel appartiennent ces bactéries, leurs membranes présentent un taux important d'acides gras insaturés afin que celle-ci garde une certaine fluidité à basse température et haute pression. Suivant le genre auquel appartiennent les bactéries, elles produisent en plus des acides gras poly-insaturés à longues chaînes dont l'acide éicosa-pentaénoïque et/ou l'acide décosahexanoïque. La proportion de ces acides gras poly-insaturés dans la membrane varie entre 50 et 70 %. Néanmoins, la production de ces acides gras poly-insaturés ne semble pas être obligatoire pour la croissance des psychropiezophiles, ainsi *Psychromonas profunda* SS9 ne produit que des acides gras mono-insaturés.

Glace de mer

La glace de mer représente un habitat particulier (**Figure 10-1**) en raison de sa température qui peut descendre jusqu'à -35°C et son caractère semi-solide. Sa formation entraîne l'expulsion des sels dissous de la matrice solide mais aussi, au sein de celle-ci, la formation d'un labyrinthe de veines liquides dont la salinité varie en fonction de la température. Cette salinité peut atteindre la valeur de 14,5 % à -10°C comparée à la valeur de 3,4 % observée à -1,9°C. On y enregistre aussi une concentration très importante de matières organiques dissoutes (MOD) qui transforme ces veines en habitats où prolifèrent de nombreux micro-organismes. La composition de ces veines n'est pas constante, la gravité entraînant une désalinisation progressive en fonction de l'âge de la glace. Des gradients de température existent aussi en son sein, de la surface vers l'interface eau-glace, ce qui rend cet environnement particulièrement hétérogène. Les surfaces totales de ces veines liquides sont de l'ordre de 0,6-4,0 m²/kg de glace. Les bactéries hétérotrophes constituent le groupe principal des procaryotes que l'on y trouve, elles sont évidemment psychrophiles mais aussi halotolérantes ; des cyanobactéries sont aussi présentes. Contrairement aux eaux libres, les archées sont peu représentées, environ 0-3 % du total des cellules. La présence d'exopolysaccharides, produits par les micro-organismes et pouvant agir non seulement comme cryoprotecteurs mais aussi comme trappes à nutriments (voir plus loin) favorisent la colonisation du milieu. Plus de 100 souches, appartenant à 5 groupes phylogénétiques : Alpha et Gamma protéobactéries, groupe des *Bacillus-Clostridium*, ordre des Actinobactéries et phylum des *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (CFB) ont été mises en évidence dans de la glace de mer du Spitzberg ; les Gamma protéobactéries dominent cet écosystème. Toutes les souches sont psychrophiles (sens large) avec une production maximale d'enzymes extracellulaires entre 4 et 10°C. Des bactéries en activité jusqu'à -20°C ont été mises en évidence dans de la glace de mer de l'Arctique. En Antarctique, 100 phylotypes distincts ont été mis en évidence avec une distribution proche de celle rencontrée dans la glace de l'Arctique : Alpha et Gamma protéobactéries, le groupe CFB, les bactéries à Gram positif et les ordres des *Chlamydiales* et des *Verrucomicrobiales*.

Neiges et glaciers

La neige et les glaciers sont des écosystèmes inter-reliés puisque la glace des glaciers se forme à partir de la neige par compression naturelle. La majorité des glaciers se trouvent au Groenland et en An-

tarctique et renferme près de 80 % de l'eau douce de la planète, leur épaisseur varie de quelques dizaines de mètres à 4 km. Bien que la faible salinité de l'eau douce ne favorise pas la formation de veines liquides, celles-ci existent cependant et leurs diamètres varient d'environ 1 µm à -50°C à 10 µm à -2°C (Price, 2007). D'autres films liquides se forment à la surface de grains minéraux insolubles et forment autant d'inclusions liquides, hôtes d'une vie bactérienne abondante. Le nombre de cellules se situe en moyenne entre 10²-10⁴/ml de glace mais dans la région basale en contact avec le sol, fortement chargée en minéraux, les densités cellulaires peuvent atteindre 10⁹ mL⁻¹. On a également calculé que l'approvisionnement en carbone organique des veines liquides permettrait de maintenir une population de 10-100 cellules mL⁻¹ pendant 400 000 ans (Price, 2007) avec des flux métaboliques possibles sans limite apparente de température (Price, 2007). La conservation des espèces serait donc possible dans des glaces très anciennes; ainsi des espèces survivantes ont été isolées d'un glacier tibétain à partir d'échantillons de glace vieux de 750 000 ans. L'analyse des populations apparaît très difficile en raison de la faible densité moyenne, 10²-10⁴ mL⁻¹, qui complique l'extraction de l'ADN, tandis que les méthodes de culture font appel à des milieux pauvres et des temps d'incubation de plusieurs mois à basses températures. Il apparaît qu'en raison de l'étroitesse des veines liquides et de la variation de leur diamètre en fonction de la température, une distribution très sélective est observée avec les cellules les plus larges >2 µm immobilisées dans les cristaux de glace et les plus étroites, <1 µm, libres dans les veines liquides, prenant la forme de coques ou de petits bâtonnets. Les espèces dominantes sont des Protéobactéries suivies en nombre des *Cytophaga/Flavoproteobacterium/Bacteroides*. Les genres *Thermus*, *Bacteroides*, *Eubacterium* et *Clostridium* ont également été également mis en évidence. Les espèces à Gram positif dominant largement ce type d'écosystèmes et ceci est certainement lié à la faculté de certaines de ces bactéries à former des spores.

Permafrost

Les zones de permafrost occupent plus de 20 % des terres de surface ; elles sont définies comme des sols dont la température reste à ou en dessous de 0°C pendant au moins deux années consécutives. Longtemps considérées comme un réservoir d'une vie microbienne ancienne, des expériences récentes ont, au contraire, montré une vie microbienne active à des températures se situant entre 0 et -20°C. Dans ces en-

vironnements les interfaces glace-eau sont de première importance et le terme "eutectophiles" a été proposé pour désigner des micro-organismes psychrophiles caractéristiques de ces interfaces critiques (D'Amico *et al.*, 2006). Très récemment des activités d'oxydation de composés organiques ainsi que la fixation de ¹⁴CO₂ ont été démontrées en Alaska dans des zones de permafrost jusqu'à des températures de -40°C. Les techniques très spéciales d'enrichissement en phase solide à partir d'échantillons de permafrost ont été décrites ; elles utilisent principalement de la cellulose micro-cristalline, des nutriments à base minérale et de l'éthanol comme substrat (1/1000). Des mesures de production de CO₂ pour estimer la croissance à différentes températures ont été faites. Les enrichissements en phase liquide permettent d'identifier des bactéries à des températures variant de -1°C (*Polaromonas*) à -17°C (*Pseudomonas* et *Arthrobacter*) proches des micro-organismes isolés de glaciers ou de glace de mer polaire. L'enrichissement en phase solide permet l'isolement préférentiel d'eucaryotes comme des levures unicellulaires et des ascomycètes mycéliens. Pour souligner, encore une fois, l'incohérence de la distinction entre espèces psychrophiles et psychrotolérantes, des souches de ce dernier type montrent encore une croissance à -17°C ! Pour fixer les idées, au-dessus de températures situées entre -18 et -20°C les micro-organismes conservent toutes leurs caractéristiques ; ils se multiplient de manière exponentielle, consomment l'éthanol et le transforment en CO₂ par moitié tandis que l'autre moitié est utilisée pour l'expansion cellulaire. Le temps de doublement des moins performants est de l'ordre de 14-35 jours à -8°C. En dessous de -20°C le stress est plus important avec une phase d'activation transitoire qui prépare sans doute les organismes à la survie prolongée grâce à la biosynthèse de composants intra- ou et extra-cellulaires permettant la dormance. Des densités de populations bactériennes viables de 10² à 10⁸ cellules par gramme de permafrost vieux de 1 à 3 millions d'années, ont été observées dans l'Arctique et dans l'Antarctique et le rapport entre bactéries aérobies et anaérobies varie avec le passé géologique du sol. Dans des échantillons de Sibérie présentant une température de -10°C, on a démontré que la proportion d'eau non congelée était de ± 3 % et que ce permafrost contenait 10⁸ cellules g⁻¹. L'incorporation de lipides d'acétate marqués au ¹⁴C a permis de mesurer les temps de doublement à différentes températures et comme ci-dessus, ceux-ci s'établissent à 8 jours à -10°C et à environ 200 jours à -20°C. Ceci suggère que des écosystèmes fonctionnels existent dans le permafrost et que la fonte de ces environnements pourrait

provoquer un effet de serre très important car ces sols contiennent 30 % du carbone total contenu dans les sols. Ils intéressent au plus haut point les scientifiques à cause de leur parenté avec des environnements glaciaires que l'on a notamment découverts sur Mars. En ce qui concerne la biodiversité présente, des déterminations récentes ont montré que dans des échantillons de permafrost de l'Arctique canadien (80°N), prélevés à une profondeur de 9 m à une température d'environ -15°C, les espèces sont, en majorité, psychrotolérantes selon la définition de Morita (1975), 50 % d'entre-elles sont halotolérantes et les bactéries cultivables appartiennent aux phyla, *Firmicutes*, *Actinobacteria* et *Proteobacteria*, ce dernier groupe est cependant moins représenté que dans les sols sibériens. Au total 42 phylotypes bactériens ont été mis en évidence ainsi que 11 phylotypes d'archées.

Lacs sous-glaciaires antarctiques

Dans les années 1950, la modélisation des flux géothermiques a permis de prédire qu'au-delà d'une certaine épaisseur de glace, l'interface entre la glace et la roche sous-jacente pouvait être à l'état liquide. En 1973, des radio-sondages décelèrent la présence de 17 lacs sous-glaciaires dans l'est antarctique, puis ces dix dernières années, différentes techniques mirent en évidence près de 150 de ces lacs sur le continent Antarctique. Le plus célèbre d'entre eux est le lac Vostok du nom de la station antarctique russe en dessous de laquelle ce lac fut découvert. Sa surface est de 14 000 km² avec une profondeur variant de 500 m au nord à 800 m au sud. L'épaisseur de glace est de l'ordre de 4 km et en raison de la différence d'épaisseur de glace entre la partie sud et nord, ± 300 m, la partie nord est plus chaude (+0,3°C). Cela crée une fonte de la glace du nord au sud qui se recongèle au niveau de la glace basale de la partie sud formant ce que l'on appelle de la glace d'accrétion entre -3540 et -3743 m. L'origine du lac peut être située au miocène et l'âge de l'eau entre 10⁶ et 15.10⁶ années. Le forage de la glace fut entrepris en 1989 par une équipe internationale composée de chercheurs venant de Russie, d'Angleterre, de France et de Belgique et arrêté en 1998 à une profondeur de 3623 m, au sein de la glace d'accrétion, à environ 120 m de la surface de l'eau. En 2006, un forage supplémentaire réalisé par une équipe russe porta cette distance à 3651 m. Des échantillons de glace prélevés à différentes profondeurs entre 3540 et 3623 m prédisent que, dans le lac, les concentrations en carbone organique se situeraient entre 86 et 160 μ M, les densités cellulaires entre 150 et 460 cellules/ml et les solutés entre 1,5 et 34 mM. La concentration en gaz dissous et notamment en O₂ devrait être 50 fois

plus élevée qu'à l'équilibre eau/air de surface en raison de la pression et de la forte concentration en gaz présent dans la glace sous forme de clathrates (hydrates complexes de gaz). Des échantillons de glace d'accrétion fondue ont été analysés et les micro-organismes présents identifiés après culture des isolats ainsi que par séquençage de l'ARNr 16S. On y retrouve des représentants des groupes de protéobactéries (sub-divisions α , β , γ et δ), *Firmicutes*, *Actinobactéries* et *Bacteroidetes*. L'investigation des eaux sous-jacentes et l'échantillonnage direct demandera cependant la mise en œuvre d'une logistique considérable en raison du risque de contamination extérieure de cette nappe d'eau gigantesque capable de recouvrir l'Antarctique d'une couche d'eau de 1 m de profondeur. De plus, il apparaît maintenant que ces habitats longtemps considérés comme isolés sont en fait reliés par des réseaux très étendus de canaux souterrains qui pourraient provoquer des décharges à la côte. Le transfert rapide de masses d'eaux d'un endroit à l'autre par voies souterraines entraînerait aussi une redistribution importante des solutés et des micro-organismes.

10.2.4. ADAPTATIONS MOLÉCULAIRES

À basse température, les bactéries font face à plusieurs contraintes comme : une diminution de la fluidité de la membrane, une diminution de la vitesse des réactions enzymatiques, une stabilisation des structures secondaires des acides nucléiques entraînant une diminution de l'efficacité de la transcription et de la traduction, un ralentissement du processus de repliement des protéines. En réponse à ces contraintes, plusieurs adaptations sont constatées et sont décrites ci-dessous.

Les membranes

Les basses températures induisent une diminution de la fluidité de la membrane. En réponse à ce phénomène, on constate que la synthèse des acides gras insaturés, poly-insaturés et acides gras branchés est favorisée. Une diminution de la longueur des chaînes hydrocarbonées est également constatée. Ces changements visent à introduire une contrainte stérique et à diminuer le nombre d'interactions au sein de la membrane, augmentant la fluidité de celle-ci (D'Amico *et al.*, 2006).

Chez les bactéries anaérobies, l'acide gras synthase est capable de synthétiser des acides gras saturés et insaturés. Ce phénomène est dû à un système d'élongation conduisant à un intermédiaire pouvant être déshydraté afin de synthétiser un acide gras in-

saturé. Chez les bactéries aérobies, l'acide gras synthase ne fabrique pas d'acides gras insaturés. Elles possèdent donc une enzyme supplémentaire : la désaturase capable de désaturer les acides gras. Cet enzyme forme des complexes avec d'autres protéines et cofacteurs au niveau des membranes et agit comme une petite chaîne respiratoire en transférant des protons provenant des acides gras vers un accepteur, par exemple l'oxygène. Lorsque la température augmente, il y a induction d'une nouvelle enzyme (désaturase) chez les bactéries aérobies, alors que chez les anaérobies, les enzymes présentes changent de fonction.

Il existe deux types d'acides gras branchés, les iso-branchés et les antéi-iso-branchés, provenant respectivement de l'utilisation d'un dérivé de leucine et d'isoleucine comme première molécule lors de la synthèse de l'acide gras. La température régule l'acyl-CoA : transacyclase responsable de la conversion des dérivés d'acides aminés (kéto-acides) en ACP (acyl carrier protein)-thioester. Ces molécules sont ensuite utilisées par l'acide gras synthase lors de la fabrication des acides gras branchés. Certaines bactéries montrent un nombre plus élevé d'acides gras à courtes chaînes. C'est le cas de *Micrococcus cryophilus*, bactérie psychrophile qui présente un ratio acide oléique/acide palmitoléique quatre fois plus élevé à 25°C qu'à 4°C. Le passage de l'acide oléique (18 carbones) vers l'acide palmitoléique (16 carbones) et inversement, est catalysé par une élongase liée à la membrane. Chez d'autres bactéries, il y a synthèse de nouveaux acides gras à chaîne courte par l'acide gras synthase.

Les enzymes

La plupart des réactions enzymatiques obéissent à la loi d'Arrhenius, loi qui rend compte de la variation de vitesse d'une réaction en fonction de la température : $k = A \exp(-E_a/RT)$ où k est la constante de vitesse, A est un facteur pré-exponentiel, E_a est l'énergie d'activation, R est la constante des gaz parfaits et T la température en Kelvin. D'après cette loi, une diminution de la température induit une diminution exponentielle de la vitesse de réaction. Afin de garder un taux de réaction approprié à basse température, les enzymes des organismes psychrophiles ont dû s'adapter. Beaucoup d'enzymes psychrophiles ont été étudiées et on connaît la structure tridimensionnelle de plus de 20 de ces enzymes. Ces études montrent que :

- l'activité spécifique des enzymes psychrophiles est plus élevée à basse et moyenne température que celle de leurs homologues mésophiles.
- la température optimale apparente d'activité des enzymes psychrophiles est significativement déplacée vers les basses températures.

- l'activité spécifique des enzymes psychrophiles au niveau de leur température de vie est généralement moins élevée que celle de leurs homologues mésophiles. Ceci laisse supposer que l'adaptation au froid n'est pas tout à fait complète (D'Amico *et al.*, 2006) (**Figure 10-3**).

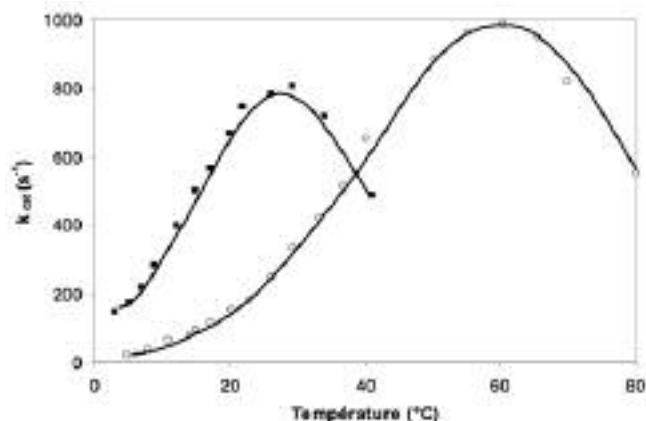


Figure 10-3 : Comparaison de l'effet de la température sur l'activité de deux enzymes homologues. Les courbes représentent l'activité en fonction de la température pour une alpha-amylase psychrophile provenant de *Pseudoalteromonas haloplanktis* (λ) et une alpha-amylase mésophile provenant de *Bacillus amyloliquefasciens* (γ).

L'adaptation de ces enzymes à leur environnement est expliquée par la relation « activité-stabilité-flexibilité ». Celle-ci suggère que les enzymes psychrophiles augmentent leur flexibilité globale ou celui de leur site actif afin de compenser la rigidification induite par le froid. De ce fait, elles perdent de leur stabilité mais gagnent en activité (D'Amico *et al.*, 2006). Si on compare les paramètres thermodynamiques de ces enzymes avec ceux de leurs homologues mésophiles, on constate que les premières ont une constante catalytique (k_{cat}), (constante de vitesse désignant le nombre de molécules de substrats converti en produit par molécule d'enzyme et par unité de temps) élevée à basse température grâce à une diminution de l'enthalpie d'activation. Beaucoup d'enzymes froides ont aussi une constante de Michaelis (k_M) (représentant l'affinité de l'enzyme pour le substrat) élevée à mettre en relation avec la flexibilité importante de ces protéines (D'Amico *et al.*, 2006).

Facteurs divers

Séquences génomiques

Trois génomes de bactéries psychrophiles ont été complètement séquencés, il s'agit des génomes de

Desulfotalea psychrophyla (D'Amico *et al.*, 2006), de *Colwellia psychrerythraea* (D'Amico *et al.*, 2006) et de *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 (D'Amico *et al.*, 2006). Dans ces génomes, plusieurs gènes de cold-shock proteins (CSP) ont été identifiés ainsi que des gènes de protéines impliquées dans la désaturation des acides gras. Parmi ces derniers, on retrouve, chez *Pseudoalteromonas haloplanktis*, la lipide-désaturase ainsi que deux groupes de gènes probablement impliqués dans la régulation de la fluidité de la membrane. Chez *Colwellia psychrerythraea*, on a identifié une beta-keto-acyl-CoA synthase ainsi qu'une acide-gras cis/trans isomérase, enzymes qui pourraient être impliquées dans l'augmentation de la fluidité de la membrane. En plus de l'adaptation au froid, les bactéries psychrophiles doivent se protéger de l'augmentation de la concentration en oxygène. En effet, la solubilité des gaz dans l'eau augmente avec la diminution de température. *P. haloplanktis* a supprimé la voie métabolique dépendante du molybdène produisant des ROS (reactive oxygen species), toxiques pour elle. Les lipide-désaturases protègent la bactérie contre l'oxygène et synthétisent des acides gras poly-insaturés qui rendent la membrane plus fluide. Chez *C. psychrerythraea* et *D. psychrophila*, des gènes codant des catalases et des superoxydes dismutases ont été identifiés augmentant ainsi leur capacité antioxydante. Au niveau du contenu en acides aminés des protéines, *P. haloplanktis* montre une utilisation plus fréquente de l'asparagine que les bactéries mésophiles et thermophiles. Ce résidu est thermolabile et est donc sujet à une déamination à température élevée. Une étude comparant les archées psychrophiles et thermophiles a montré que les psychrophiles utilisent plus fréquemment la leucine et rarement la glutamine et la thréonine (D'Amico *et al.*, 2006). En général, toutes les études ne vont pas dans le même sens, on ne peut donc pas tirer de conclusion quant à l'utilisation préférentielle de certains acides aminés chez les psychrophiles.

Exopolysaccharides

Les polysaccharides sont des polymères formés de glucides similaires. Chez les bactéries, ils sont présents soit au niveau de la paroi cellulaire, constituant l'essentiel des lipopolysaccharides (LPS), soit à l'extérieur de la cellule, liés à cette même cellule (exopolysaccharide capsulaire) soit encore relargués dans le milieu de culture sous forme d'exopolysaccharides (EPS). La production de polysaccharides semble être majoritairement le fait de souches appartenant aux genres *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella* et *Vibrio*. Des études menées en Arctique et en An-

tartique sur les organismes vivant dans la glace suggèrent que les EPS produits par le phytoplancton et les bactéries contribuent de manière importante à la présence de carbone organique à l'interface eau-glace (D'Amico *et al.*, 2006). Les EPS servent à la fixation des bactéries sur des supports conduisant parfois à la formation de biofilms, à l'emprisonnement et la concentration des nutriments, à la protection de la bactérie vis-à-vis du milieu extérieur ou encore à la rétention d'eau afin d'éviter la dessiccation. Chez CAM025, une bactérie psychrotrophe du genre *Pseudoalteromonas*, il y a une augmentation de la production d'EPS poly-anioniques de haut poids moléculaire à des températures inférieures à la température optimale de croissance de la bactérie. On peut alors supposer que les EPS ont un rôle de cryoprotection dans les habitats froids tels que les veines liquides de glace de mer. Chez cette même bactérie, on constate que les EPS produits à basses températures contiennent plus d'acide uronique (ayant une charge négative) que ceux produits à une température plus élevée. Grâce à leur propriété poly-anionique, les EPS pourraient complexer des métaux tels que le fer qui est peu disponible en Antarctique (D'Amico *et al.*, 2006). Chez *Lactobacillus sakei* 0-1, les basses températures combinées avec le glucose comme source de carbone augmentent la production d'EPS.

Protéines de nucléation

La formation de glace intra ou extracellulaire est dommageable pour les cellules. En effet les cristaux peuvent lyser les cellules de manière mécanique. De plus la formation de glace provoque la concentration des solutés entraînant un choc osmotique et la déshydratation de la cellule. Certaines bactéries sont capables de résister à la congélation grâce à plusieurs types de protéines et glycoprotéines. Les protéines de nucléation permettent la formation de cristaux de glace à une température supérieure au point de congélation de l'eau. Ces protéines sont sécrétées à l'extérieur de la bactérie. De cette manière, lorsque la température diminue, de petits cristaux de glace se forment à l'extérieur de la cellule et celle-ci se déshydrate progressivement en concentrant le liquide intracellulaire et diminue donc le point de congélation de ce dernier. En plus des protéines de nucléation, il existe des protéines antigels qui sont intra ou extracellulaires et qui inhibent la croissance des cristaux de glace en se fixant à eux par complémentarité. De cette façon, les molécules d'eau ne peuvent pas venir grossir le cristal existant. Grâce à cette capacité de liaison aux cristaux, les protéines antigels sont 500 fois plus efficaces que le NaCl en même concentration pour dimi-

nuer le point de congélation de l'eau. Les protéines antigels étaient connues chez les poissons essentiellement, mais elles ont été récemment découvertes chez une bactérie antarctique *Marinomonas primoryensis* (D'Amico *et al.*, 2006). La rhizobactérie *Pseudomonas putida* GR 12-2 sécrète une protéine antigel ayant une activité de nucléation. C'est la première fois qu'on rapporte une protéine antigel ayant ces deux activités opposées, phénomène qui reste d'ailleurs à élucider (D'Amico *et al.*, 2006).

Protéines du choc froid (*cold-shock*)

Lorsque des bactéries sont transférées brutalement vers une température plus froide, elles entrent généralement en phase de latence durant laquelle il n'y a plus de multiplication cellulaire. Durant cette période, la synthèse de la plupart des protéines est inhibée. Néanmoins, quelques protéines appelées protéines du choc froid (*cold-shock proteins*) ou Csp sont synthétisées et contribueraient à diminuer les effets néfastes dus à la chute de température.

Le phénomène de cold-shock a été largement étudié chez *E. coli* où la Csp la plus abondante est CspA qui fonctionnerait comme une chaperonne déstabilisant les structures secondaires des ARN et améliorant ainsi l'efficacité de la traduction. D'autres protéines sont impliquées dans le repliement des protéines, la régulation de la fluidité des membranes, la transcription et la traduction (D'Amico *et al.*, 2006).

Chez les bactéries psychrophiles, les effets d'un cold-shock sont différents de ceux constatés chez les mésophiles. En plus des Csp produites durant la phase de latence, il y a synthèse des protéines d'acclimation au froid (*cold-acclimation proteins*) ou Cap non seulement durant la phase de latence suivant la chute de température mais également après, alors que la multiplication cellulaire a repris (**Figure 10-4**).

Chez *Arthrobacter globiformis* SI55, une bactérie psychrotrophe, certaines Cap pourraient jouer le rôle de protéases éliminant les protéines dénaturées (Hébraud et Potier, 2000). Chez une autre bactérie psychrotrophe, *Pseudomonas fragi*, des protéines homologues à CspA ont été identifiées parmi les Cap et pourraient réguler la synthèse d'autres protéines (Hébraud et Potier, 2000).

10.2.5. CONCLUSIONS

Malgré les conditions de froid extrême rencontrées dans certains environnements terrestres, les bactéries psychrophiles ont su coloniser la plupart de ces lieux et s'y sont bien adaptées, en dépit du ralentissement des réactions biochimiques et de l'augmenta-

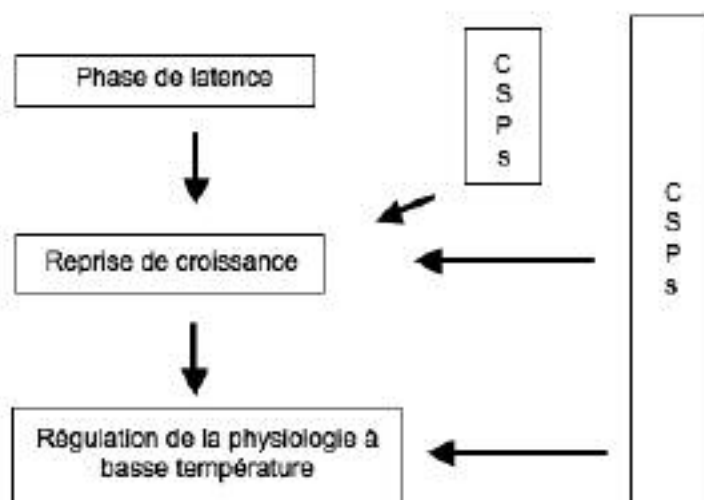


Figure 10-4 : Représentation schématique des interactions hypothétiques entre les protéines induites par le froid et l'acclimation au froid chez les bactéries psychrophiles (Hébraud and Potier, 2000).

tion de la viscosité de l'eau. La majeure partie de ces adaptations se fait au niveau des protéines qui interviennent dans toute la machinerie cellulaire : métabolisme, régulation de la fluidité des membranes, entrée de nutriments, sécrétion des produits, assemblage des macromolécules, traduction, transcription, repliement des protéines, etc. La grande flexibilité des enzymes froides joue un rôle très important au niveau de leur activité, mais en contre partie, ces enzymes perdent en stabilité. Une autre adaptation au froid est due à l'induction de protéines du choc froid et de protéines d'acclimation au froid impliquées dans le repliement des protéines, la déstabilisation des structures secondaires des acides nucléiques, la transcription et la traduction. L'induction de ces protéines par le froid permet aux bactéries une réaction rapide et efficace face aux diminutions soudaines de températures. Les stratégies utilisées par les bactéries psychrophiles pour résister au froid sont fascinantes. Les études à venir sur les mécanismes cellulaires et moléculaires autorisant la survie à basse température permettront de mieux comprendre les relations « structure-fonction » intervenant dans ces mécanismes. De plus, ces études donneront l'opportunité d'identifier de futures applications en biotechnologie comme c'est déjà le cas pour l'utilisation des enzymes froides dans les détergents, l'industrie alimentaire, la décontamination des milieux pollués, etc.

10.3. LES MICRO-ORGANISMES PROCARYOTES THERMOPHILES ET HYPERTHERMOPHILES

En fonction de leur comportement vis à vis de la température les micro-organismes sont répartis en trois catégories : Les psychrophiles (cf. [paragraphe précédent](#)), les mésophiles et les thermophiles. Il y a quelques décennies, un micro-organisme était qualifié de thermophile quand sa température optimale de croissance était supérieure à 45-50°C (**Figure.10-5**). La découverte, dans les années 70, de micro-organismes capables de se développer à des températures bien supérieures à cette limite a conduit à redéfinir et à étendre la notion de thermophilie. Ainsi de nos jours, le terme « thermophile » s'applique à tout micro-organisme dont la température optimale de croissance est supérieure à 60°C et celui d'hyperthermophile à tout procaryote dont la température optimale de croissance est supérieure à 80°C. Il existe des micro-organismes, nommés par certains auteurs thermophiles extrêmes, qui possèdent des températures de croissance supérieures à 105°C.

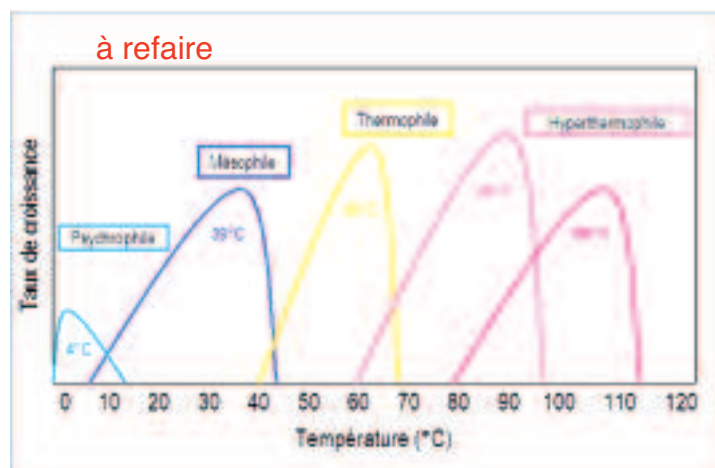


Figure 10-5 : Classifications des procaryotes en fonction de leur comportement vis à vis de la température (d'après Madigan and Martinko, 2007).

10.3.1. HABITATS DES MICRO-ORGANISMES THERMOPHILES

Les habitats géothermiques naturels sont largement répandus sur notre planète et généralement associés à des zones tectoniquement actives. Il existe également des habitats chauds générés par les activités humaines.

Les écosystèmes géothermiques terrestres

Les écosystèmes géothermiques terrestres sont généralement associés à une activité volcanique. De façon générale, l'eau de ruissellement pénètre en profondeur et est chauffée, quand la température du fluide percolant atteint une température suffisante, la pression engendrée le fait remonter vers la surface où il émerge sous forme de source chaude ou de geyser. Lors de son passage dans la croûte terrestre, il se charge en éléments minéraux et en gaz. La composition des eaux thermales va donc dépendre de la nature des roches traversées ainsi que de la température et donc du type d'activité volcanique à laquelle elles sont associées. Dans les sites où le volcanisme est très actif, la source de chaleur (chambre magmatique) est située entre 2 et 5 km de profondeur. La température de l'eau atteint des valeurs comprises entre 150 et 350°C suivant la profondeur. L'eau émerge en surface sous forme de vapeurs, appelées fumeroles, chargées en gaz volcaniques (N_2 et CO_2 principalement mais également H_2 , H_2S , CH_4 , CO et NH_3). Ces sources sont généralement acides en raison de l'oxydation de l'hydrogène sulfuré (H_2S) en soufre élémentaire puis en acide sulfurique. Cette oxydation est liée à la présence d'oxygène qui réagit chimiquement avec les sulfures dans les couches superficielles du sol mais également aux activités biologiques. Les mares de boues acides résultant de l'altération des roches environnantes par l'eau acidifiée et chauffée par les fumeroles représentent un deuxième type de sources thermales acides. Les sources thermales neutres sont généralement situées à la périphérie des zones actives et ne se forment qu'en présence d'un flux d'eau important à faible profondeur.

Les sources chaudes alcalines sont situées à l'extérieur des champs volcaniques actifs. L'eau y atteint des températures inférieures à 150°C, elle est chauffée par la lave qui s'écoule en profondeur puis remonte en surface très minéralisée (silicates), riche en CO_2 et pauvre en H_2S . Dans les couches superficielles, l'oxydation de surface n'a pas d'effet sur le pH qui reste voisin de la neutralité, par contre la libération de CO_2 et la précipitation des silicates entraînent une augmentation du pH qui se stabilise entre 9 et 10. Ces différents types de systèmes géothermiques se rencontrent dans les zones tectoniquement actives dont certaines ont été plus particulièrement étudiées par les microbiologistes. On peut citer les sources d'Islande, ce pays étant traversé par la seule partie émergée de la dorsale médio atlantique mais également, les Açores, la région de Naples et les îles Eoliennes ainsi que les fa-



Figure 10-6 : Quelques habitats des procaryotes hyperthermophiles ; **(a)** Sources thermales continentales, Furnas, Sao Miguel, Açores ; **(b)** Geiser, Geysir, Islande ; **(c)** Cheminée hydrothermale, Site Rainbow, (dorsale médio-atlantique, 2700m de profondeur) ; **(d)** Prélèvement d'un fragment de cheminée hydrothermale par le robot télé-opéré Victor 6000 sur le site hydrothermal TAG (dorsale médio-atlantique, 3500 m de profondeur).

Photo 10.6. a : J. Quérellou, Ifremer, Brest. Photo 10.6. b : J. Briffotiaux, Ifremer, Brest. Photo 10.6. c et d : Ifremer, Campagne océanographique EXOMAR.

meuses sources chaudes du Parc de Yellowstone aux Etats Unis (**Figures 10-6 a et b**).

Les écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds

Les phénomènes hydrothermaux océaniques sont une conséquence indirecte des phénomènes d'extension et d'accrétion des plaques tectoniques. Au niveau des zones d'accrétions océaniques que sont les dorsales, le magma (1200°C) remonte et forme des poches ou chambres magmatiques à quelques kilomètres de profondeur. En se refroidissant, il se rétracte et génère des anfractuosités au niveau de la croûte océanique. L'eau de mer froide (2°C) s'infiltré jusqu'à une profondeur de plusieurs kilomètres et s'échauffe

à proximité du magma. Sous l'effet de fortes températures et fortes pressions, le pouvoir de solubilisation de l'eau est augmenté. Le fluide chaud, de faible densité, remonte vers le plancher océanique. Il lessive alors les roches environnantes, s'acidifie et s'enrichit en éléments métalliques. La composition des fluides émis est fonction de la température et de la nature des roches traversées. Le fluide hydrothermal ainsi formé rejaille au niveau du plancher océanique en des points focalisés constituant les sources hydrothermales. Selon la nature des roches traversées et selon le degré de mélange du fluide hydrothermal avec l'eau de mer avant son émission, la composition, la température et le débit du fluide en sortie peuvent varier d'un site à l'autre, et même selon les points d'émission, sur un même site. Les fluides se distinguent nettement de

l'eau de mer environnante par leur température pouvant atteindre 400°C, par un pH généralement acide, un caractère anoxique, et de fortes concentrations en gaz dissous (H_2S , CH_4 , CO , CO_2 , H_2) et ions métalliques (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Si^+ , Zn^{2+}). Les caractéristiques physico-chimiques du fluide hydrothermal contrastent fortement avec celles de l'eau de mer (froide, légèrement alcaline et oxygénée), et lorsque le fluide entre en contact avec l'eau de mer, les minéraux précipitent successivement, en fonction de leur stabilité dans les conditions physico-chimiques du milieu, pour former des édifices minéraux riches en métaux. Les fumeurs noirs qui sont formés lorsque le fluide hydrothermal ne subit pas de dilution et les fumeurs blancs ou diffuseurs qui se forment lorsque le fluide hydrothermal a été dilué par l'eau de mer avant son émission (**Figures 10-6 c et d**), sont les principaux édifices hydrothermaux observés. Cependant, tous les types d'intermédiaires existent. L'émission de fluide ne conduit pas toujours à la formation d'édifices minéraux. Ainsi, au niveau des laves en coussin ou "pillow lava", un fluide à basse température (6-23°C) peut diffuser à faible vitesse. Un autre cas particulier est celui du bassin de Guaymas (Golfe de Californie), où les fluides surchauffés percolent au travers d'une épaisse couche de sédiments, riches en matière organique. Dans ces écosystèmes, les micro-organismes chimiolithotrophes sont à la base d'un chaîne alimentaire qui permet le développement de communautés animales de fortes densités au voisinage des émissions de fluides et ce malgré la présence de conditions physico-chimiques a priori peu propices à la vie.

Les écosystèmes hydrothermaux sous marins littoraux

La présence de sites hydrothermaux sous marins littoraux est souvent associée à une activité volcanique terrestre par exemple à proximité des côtes islandaises, aux Açores et en Italie (Vulcano, îles éoliennes). Comme dans les sites profonds, ils sont caractérisés par la présence de petits édifices émettant un fluide chargé en H_2S mais également par la percolation du sable ou du sédiment. Les températures de ces sites sont proches de 100°C.

Autres habitats : les puits de pétrole et les habitats liés à l'activité humaine

Les réservoirs pétroliers sous marins et continentaux constituent également des habitats qui sont occupés par les procaryotes thermophiles ou hyperthermophiles. Selon le site géographique où ils sont situés, les réservoirs de pétrole se trouvent entre

1,5 et 4 km de profondeur sous la surface avec des pressions élevées et des températures comprises entre 60 et 130°C. Le pH des eaux de gisements pétroliers est généralement proche de la neutralité. Un grand nombre de réservoirs pétroliers contiennent de l'eau de formation (produite au cours de la formation du pétrole) plus ou moins riche en composés soufrés (soufre, sulfates), métaux, gaz dissous comme H_2 , H_2S , CO , CO_2 , CH_4 ainsi qu'en molécules organiques (composé de C2 à C7) comme l'acétate qui peut s'accumuler jusqu'à 20 mM dans les réservoirs pétroliers. La salinité varie d'un réservoir à l'autre et très probablement au sein d'un même réservoir. La combinaison de grandes salinités (>15 %) et de hautes températures (> 60°C) est en général non propice à une vie procaryotique.

Il existe également des écosystèmes chauds résultant des activités humaines. Les rejets des mines de charbon sont stockés sous forme de terril, qui contiennent des fragments de charbon, de la pyrite (FeS) et d'autres composés organiques extraits du charbon. Ces déchets miniers s'échauffent par combustion spontanée générant ainsi un environnement chaud favorable aux procaryotes thermophiles. Certaines activités industrielles sont des sources artificielles de chaleur, on peut citer les raffineries de sucre, les usines de papiers, les centrales électriques et les usines de compostages. Les conduites d'eaux chaudes et les chaudières domestiques ou industrielles sont également un habitat pour les micro-organismes thermophiles.

10.3.2. PANORAMA PHYLOGÉNÉTIQUE ET MÉTABOLIQUE DES PROCARYOTES THERMOPHILES ET HYPERTHERMOPHILES

La découverte des procaryotes hyperthermophiles à la fin des années 70 est contemporaine de la découverte de l'existence du domaine des archées « le troisième domaine du vivant », la mise en évidence ayant été faite grâce aux travaux pionniers de Carl Woese (1990). Les micro-organismes procaryotes thermophiles et hyperthermophiles isolés de zones d'activités géothermales terrestres et marines appartiennent aux deux domaines bactéries et archées. Ces micro-organismes présentent des caractéristiques physiologiques et métaboliques très diverses et interviennent dans la plupart des grands cycles biogéochimiques (**Tableau 10.1.**), notamment celui du soufre. En s'appuyant sur leur position phylogénétique, basée sur la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S, il sera présenté ici un panorama de cette diversité, éclairé par la présentation plus détaillée de quelques genres majeurs (Madigan and Martinko, 2007).

	Réaction productrice d'énergie	Type métabolique	Exemples
Chimio-organotrophes	Composés organiques + S° → H ₂ S + CO ₂	Respiration anaérobie	<i>Thermoproteus, Thermoplasma, Thermococcus, Desulfurococcus, Thermofilum, Pyrococcus,</i>
	Composés organiques + SO ₄ ²⁻ → H ₂ S + CO ₂	Respiration anaérobie	<i>Archaeoglobus, Thermodesulfobacterium, Thermodesulfatator</i>
	Composés organiques + O ₂ → H ₂ O + CO ₂	Respiration aérobie	<i>Sulfolobus, Aeropyrum, Marinithermus, Oceanithermus, Vulcanithermus</i>
	Composés organiques → CO ₂ + H ₂ + acides gras	Fermentation	<i>Staphylothermus, Pyrodictium, Pyrococcus, Thermococcus, Thermotoga, Thermosipho, Marinitoga, Fervidovacterium, Petrotoga, Caminicella, Tepidibacter,</i>
	Composés organiques + Fe ³⁺ → CO ₂ + Fe ²⁺	Respiration anaérobie	<i>Pyrodictium, Deferribacter</i>
	Pyruvate → CO ₂ + H ₂ + acétate	Fermentation	<i>Pyrococcus</i>
Chimio-lithotrophe	H ₂ + S° → H ₂ S	Respiration anaérobie	<i>Acidianus, Pyrodictium, Thermoproteus, Stygiolobus, Ignicoccus, Desulfurobacterium, Caminibacter</i>
	H ₂ + NO ₃ ⁻ → NO ₂ ⁻ + H ₂ O (NO ₂ ⁻ est réduit en N ₂ par quelques espèces)	Respiration anaérobie	<i>Pyrobaculum</i>
	4 H ₂ + NO ₃ ⁻ + H ⁺ → NH ₄ ⁺ + 2 H ₂ O + OH ⁻	Respiration anaérobie	<i>Pyrolobus, Caminibacter</i>
	H ₂ + 2 Fe ³⁺ → 2 Fe ²⁺ + 2 H ⁺	Respiration anaérobie	<i>Pyrobaculum, Pyrodictium, Archaeoglobus, Deferribacter, Thermotoga</i>
	2 H ₂ + O ₂ → 2 H ₂ O	Respiration anaérobie	<i>Acidianus, Sulfolobus, Pyrobaculum, Thermocrinis, Aquifex, Persephonella, Balnearium</i>
	2 S° + 3 O ₂ + 2 H ₂ O → 2 H ₂ SO ₄	Respiration aérobie	<i>Sulfolobus, Acidianus, Thermocrinis, Aquifex, Persephonella</i>
	2 FeS ₂ + 7 O ₂ + 2 H ₂ O → 2 FeSO ₄ + 2 H ₂ SO ₄	Respiration aérobie	<i>Sulfolobus, Acidianus, Metallosphaera</i>
	2 FeCO ₃ + NO ₃ ⁻ + 6 H ₂ O → 2 Fe(OH) ₃ + NO ₂ ⁻ + 2 HCO ₃ ⁻ + 2 H ⁺ + H ₂ O	Respiration anaérobie	<i>Ferroglobus</i>
	4 H ₂ + SO ₄ ²⁻ + 2 H ⁺ → 4 H ₂ O + H ₂ S	Respiration anaérobie	<i>Archaeoglobus, Thermodesulfobacterium, Thermodesulfatator</i>
	4 H ₂ + CO ₂ → CH ₄ + 2 H ₂ O	Respiration anaérobie	<i>Methanopyrus, Methanocaldococcus, Methanothermus</i>

Tableau 10.1. Réactions productrices d'énergie chez les Archées et les Bactéries thermophiles et hyperthermophiles.

Le domaine des Bactéries

Les représentants thermophiles au sein du domaine des bactéries appartiennent à plusieurs lignées dont certaines comportent à la fois des espèces mésophiles et des espèces thermophiles. Trois lignées positionnées à la base de l'arbre phylogénétique des Bactéries ne comportent que des espèces thermophiles et hyperthermophiles.

Au sein des Cyanobactéries on trouve quelques espèces thermophiles dont les représentants les plus thermophiles sont les espèces des genres *Chloroflexus* et *Synechococcus*, qui sont des thermophiles modérés phototrophes bien représentés dans les systèmes hydrothermaux terrestres.

Au sein des *Firmicutes*, un certain nombre d'espèces thermophiles appartenant à l'ordre des *Bacillales* ou des *Clostridiales* ont été décrites telles les espèces des genres *Thermoanaerobacterium*, *Carboxydibrachium*, *Caminicella*, et *Tepidibacter*. Ces micro-organismes sont des bactéries fermentaires anaérobies sporulées.

Des espèces appartenant au groupe *Thermus-Deinococcus*, tels que les espèces des genres *Thermus*, *Rhodothermus*, *Meiothermus*, *Vulcanithermus* et *Oceanothermus* ont été isolées aussi bien d'environnements chauds continentaux que marins. Ces organismes sont des chimio-organotrophes aérobis non sporulés.

Récemment des espèces thermophiles appartenant aux epsilonprotéobactéries ont été isolées d'écosystèmes hydrothermaux sous marins profonds. Ces micro-organismes, telle l'espèce *Caminibacter hydrogenophilus* sont des autotrophes anaérobies sulfo-réductrices.

Les trois lignées (*Thermotogales*, *Thermodesulfobacterales* et *Aquificales*, situées à la base de l'arbre des bactéries) sont constituées d'un ou plusieurs genres ne comprenant que des espèces thermophiles et hyperthermophiles anaérobies ou microaérophiles.

L'ordre des *Thermotogales* comporte plus d'une vingtaine d'espèces isolées d'une grande variété d'écosystèmes chauds. Certaines *Thermotoga* et genres proches sont des bactéries thermophiles chimio-organotrophes fermentaires, dont la température optimale de croissance varie de 60°C à 80°C. Ces micro-organismes ont été isolés aussi bien de sources chaudes terrestres (*Thermotoga*, *Fervidobacterium*) que de sources hydrothermales côtières ou profondes (*Thermotoga*, *Thermosiphon*, *Marinitoga*) mais aussi de puits de pétrole (*Geotoga*, *Petrotoga*) et présentent la caractéristique commune de posséder une enveloppe externe semblable à un fourreau : la « toga ». Les espèces du genre *Thermodesulfobacterium* et *Thermo-*

desulfatator sont des bactéries sulfato-réductrices thermophiles (optimum, 70°C) qui forment une lignée isolée entre *Thermotoga* et *Aquifex*. Les micro-organismes appartenant aux genres *Aquifex*, *Persephonella* et *Desulfurobacterium* sont des chimolithotrophes et autotrophes hyperthermophiles. Ce sont les bactéries les plus thermophiles connues. Différentes espèces d'*Aquificales* utilisent H₂ comme donneur d'électrons (organismes hydrogénotrophes) mais peuvent également utiliser S° ou S₂O₃²⁻ comme donneurs d'électrons et O₂ ou NO₃⁻ comme accepteurs d'électrons. Ces organismes qui peuvent croître jusqu'à 95°C ne tolèrent que de très faibles concentrations en O₂ mais restent (avec quelques espèces d'archées) les rares hyperthermophiles aérobies (ou plus exactement microaérophiles) connues. *Thermocrinis ruber*, est un organisme proche des espèces du genre *Aquifex* qui se développe dans l'eau qui s'écoule de certaines sources chaudes du Parc National de Yellowstone, où il forme des rubans de couleur rose qui sont constitués par une forme filamenteuse de cellules attachées à une structure siliceuse. Cet organisme est hyperthermophile (température optimale de croissance à 80°C) et chimolithotrophe en étant capable d'oxyder aussi bien H₂ que le thiosulfate ou le soufre comme donneurs d'électrons avec O₂ comme accepteur d'électrons.

Le domaine des archées

De nombreuses espèces thermophiles et hyperthermophiles appartiennent aux deux embranchements principaux du domaine des archées : les Euryarchaeota et les Crenarchaeota (**Figure 10-7**). Ces deux lignées comportent également des organismes non thermophiles tels que les halophiles extrêmes aérobies (*Euryarchaeota*) et des organismes psychrophiles pour la plupart non cultivés à ce jour (*Crenarchaeota*).

Au sein des *Crenarchaeota*, les hyperthermophiles se regroupent à la base de l'arbre phylogénétique et comportent une majorité de micro-organismes chimolithotrophes autotrophes et quelques espèces chimio-organotrophes. Les *Euryarchaeota* regroupent des archées hyperthermophiles physiologiquement diverses tels que les *Methanoarchaea* productrices de méthane (dont il existe également de nombreux représentants mésophiles) et des espèces chimio-organotrophes.

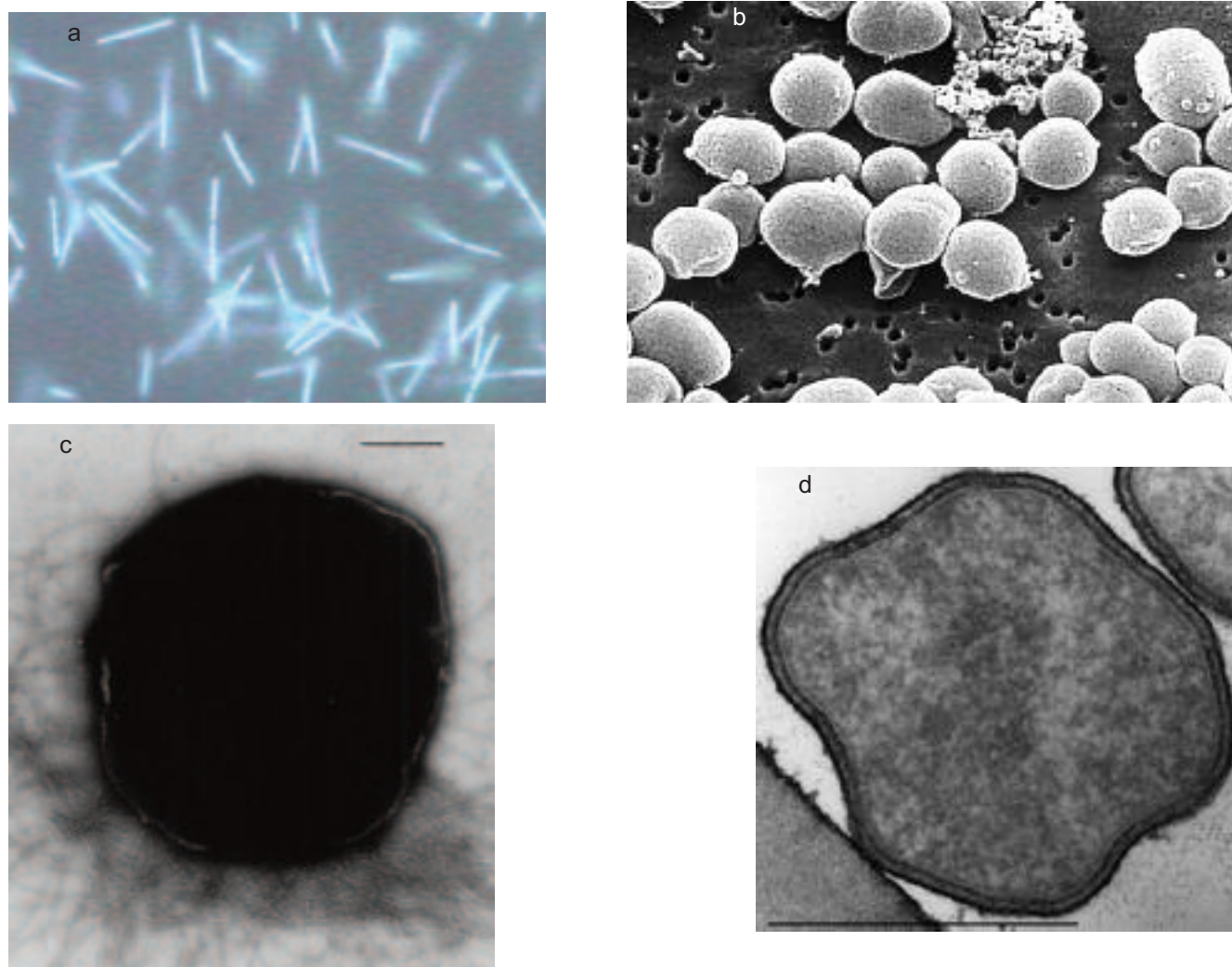


Figure 10-7 : (a) *Methanopyrus kandleri*, (température optimale 98°C), observation en microscopie optique en épifluorescence ; (b) *Thermococcus fumicolans* (température optimale, 85°C), observation en microscopie électronique à balayage ; (c) *Methanocaldococcus indicus* (température optimale, 85°C), observation en microscopie électronique en coloration négative ; (d) *Pyrolobus fumarii*, le plus thermophile des procaryotes actuellement connu (température optimale, 106°C), coupe mince observée en microscopie électronique à transmission.

Photo 10-7 a et c : S. L'Haridon, IUEM, Brest. Photo 10-7 b : A. Godfroy, Ifremer, Brest . Photo 10-7 d : Dr. R. Rachel and Prof. Dr. K. O. Stetter, University of Regensburg, Allemagne.

Euryarchaeota hyperthermophiles

Les *Methanoarchaea* (méthanogènes) hyperthermophiles appartiennent pour la plupart à l'ordre des *Methanococcales* qui comporte 4 genres hydrogénotrophes, *Methanococcus*, *Methanocaldococcus*, *Methanothermococcus* et *Methanotorris*. Ces espèces ont été isolées d'environnements hydrothermaux sous-marins ou terrestres. Des espèces thermophiles appartenant à l'ordre des *Methanosarcinales*, pour la plupart acétoclastes, ont également été décrites. L'espèce *Methanopyrus kandleri* dont la position phylogénétique est séparée des autres espèces

méthanogènes, est un organisme hydrogénotrophe qui a été isolé à partir d'échantillons de sédiments et d'édifices hydrothermaux actifs. Cette espèce qui croît très rapidement à 100°C est l'espèce méthanogène la plus thermophile décrite à ce jour (croissance jusqu'à 110°C).

Les *Thermoplasmatales* comportent des organismes thermophiles parmi les plus acidophiles connus. Les espèces du genre *Thermoplasma* sont des organismes sans parois, chimio-organotrophes qui sont anaérobies facultatives et utilisent le soufre comme accepteur final d'électrons. Elles colonisent des habitats chauds et acides tels que les terrils et des

sources chaudes terrestres. Les espèces du genre *Picrophilus*, ont été isolées de solfatares acides et sont certainement parmi les plus acidophiles puisque elles peuvent se développer à des pH extrêmement faibles (<1).

Les espèces de l'ordre des *Thermococcales* appartiennent à 3 genres, *Thermococcus*, *Pyrococcus* et *Paleococcus*. Ce sont des hyperthermophiles qui ont été isolées de sources hydrothermales océaniques profondes et côtières, mais également des eaux de gisements pétroliers et de sources thermales continentales. Elles constituent un groupe métabolique homogène. Ce sont des chimio-organotrophes capables de se développer très rapidement sur des substrats complexes de type protéine ou sucres, qui réduisent le soufre élémentaire en hydrogène sulfuré. Elles sont parmi les espèces thermophiles dont la physiologie a été le plus étudiée. Le séquençage des génomes de plusieurs espèces a été réalisé.

Au sein de l'ordre des *Archaeoglobales*, les espèces du genre *Archaeoglobus* sont les seuls micro-organismes sulfato-réducteurs au sein des archées. Les deux autres espèces *Geoglobus* et *Ferroglobus* sont des micro-organismes impliqués dans la réduction du fer.

Crenarchaeota hyperthermophiles

Au sein des *Crenarchaeota*, les *Thermoproteales* et les *Sulfolobales* semblent spécifiques des habitats chauds terrestres alors que les micro-organismes de l'ordre des *Desulfurococcales* semblent coloniser les habitats volcaniques sous marins.

Parmi les *Sulfolobales*, les espèces des genres *Sulfolobus* et *Acidianus* ont été isolées de divers habitats volcaniques terrestres (solfatares, sources chaudes). Ce sont des espèces acidophiles, chimio-lithotrophes facultatives, impliquées dans l'oxydation des composés soufrés (H_2S ou S°) en acide sulfurique (*Sulfolobus* spp.). Par contre les espèces du genre *Acidianus* sont anaérobies facultatives et peuvent aussi bien oxyder S° en H_2SO_4 que le réduire en H_2S .

L'ordre des *Desulfurococcales*, regroupe une dizaine de genres qui possèdent des caractéristiques phénotypiques diverses puisque on y trouve des espèces chimio-organotrophes aérobies (*Aeropyrum*, *Sulfurococcus*), anaérobies (*Hyperthermus*, *Desulfurococcus*, *Staphylothermus*, *Pyrodictium* ...) ou chimio-lithotrophes stricts (*Ignicoccus*, *Pyrolobus*), souvent sulfo-réductrices. Mais une des caractéristiques majeures de cet ordre est qu'il comporte les organismes les plus thermophiles connus à ce jour. Les espèces des genres *Pyrodictium* et *Pyrolobus* sont capables de se développer à des températures supé-

rieures à 100°C. *Pyrolobus fumarii* isolé d'une cheminée hydrothermale de la dorsale médio Atlantique détient le record de la température de croissance la plus élevée (113°C) chez les procaryotes. Les espèces des genres *Desulfurococcus*, *Staphylothermus* et *Hyperthermus* sont des espèces hyperthermophiles chimio-organotrophes qui métabolisent le soufre. *Aeropyrum* est un des rares genres hyperthermophiles aérobies. Les espèces du genre *Ignicoccus* ont été isolées aussi bien de sources hydrothermales côtières que profondes. Ce sont des organismes chimio-litho-autotrophes qui utilisent le soufre élémentaire comme accepteur d'électrons. Certaines espèces du genre *Ignicoccus* présentent la particularité de vivre en association avec un petit procaryote *Nanoarchaeum equitans*. Cette espèce forme une lignée distincte, à la base de l'arbre des archées. Il s'agit de l'un des plus petits procaryotes connu aussi bien de par son volume cellulaire que par la taille de son génome. L'absence dans son génome de la plupart des gènes codant pour les fonctions métaboliques classiques le rend complètement dépendant de son hôte, *Ignicoccus*.

Le nombre de micro-organismes hyperthermophiles cultivés et décrits a augmenté de façon considérable ces 30 dernières années (quelques dizaines d'espèces décrites à la fin des années 70, plusieurs centaines aujourd'hui). Comme dans de nombreux autres écosystèmes de la planète, les espèces cultivées ne représentent qu'une petite partie de la diversité microbienne présente. Les études moléculaires de la diversité (principalement basées sur l'étude des gènes codant les ARN ribosomique 16S) ont permis de mettre en évidence l'existence d'une diversité colossale de ces micro-organismes. Ainsi de nombreuses lignées de micro-organismes nouveaux qui n'appartiennent à aucun groupe connu ont pu être mises en évidence dans de nombreux écosystèmes chauds. Au sein des bactéries, la détection par les techniques moléculaires de nombreuses séquences appartenant aux **epsilon protéobactéries** dans les écosystèmes hydrothermaux sous-marins profonds, a conduit à l'isolement récent d'espèces thermophiles autotrophes sulfo-réductrices.

Au sein du domaine archées, de nombreuses lignées d'incultivées de l'embranchement des *Euryarchaeota* ont été également mises en évidence dans ces écosystèmes. L'embranchement des *Korarchaeota* regroupe un ensemble de micro-organismes non cultivés dont le positionnement à la base de l'arbre des archées laisse présager un caractère thermophile.

De nouvelles approches basées sur la recherche de gènes codant pour les enzymes clés d'un métabo-

lisme donné, ainsi que les approches de métagénomique contribuent également aujourd'hui à élargir notre vision de cette diversité. Il apparaît donc clairement que seule la combinaison des approches moléculaires et culturelles innovantes permettra d'accéder à la caractérisation des communautés microbiennes thermophiles des écosystèmes chauds de la planète.

10.3.3. LA VIE À HAUTE TEMPÉRATURE

Les procaryotes thermophiles vivant à des températures bien supérieures à celles tolérées par la plupart des autres procaryotes, leurs macromolécules constitutives (protéines, lipides et ADN) possèdent de ce fait des propriétés particulières propres à être utilisées dans les biotechnologies.

Stabilité des protéines

La composition en acides aminés des protéines de procaryotes thermophiles présente les mêmes caractéristiques que leurs équivalents mésophiles. Néanmoins les protéines thermostables présentent des caractéristiques spécifiques dont la présence :

- (i) de centres très hydrophobes, qui diminuent la tendance de la protéine à se déplier,
- (ii) d'interactions ioniques plus nombreuses à la surface de la protéine qui contribuent aussi au maintien des protéines entre elles. Il a été démontré que c'est le repliement de la protéine qui contribue le plus à sa résistance à la chaleur. Ainsi, des changements subtils dans la séquence des acides aminés suffisent parfois à provoquer des changements significatifs dans le repliement d'une partie de la molécule et donc son comportement vis à vis de la température. La présence de protéines chaperonnes du choc thermique (*heat-shock proteins*) contribue également au repliement des protéines partiellement dénaturées.

Stabilité de l'ADN

Plusieurs mécanismes contribuant à la stabilité de la molécule d'ADN chez les hyperthermophiles ont été identifiés. D'une part la présence de solutés compatibles comme par exemple les fortes concentrations intracellulaires en 2,3-diphosphoglycerate de potassium cyclique chez *Methanopyrus* vont contribuer à la protection de l'ADN contre les lésions chimiques telles que les dépurinations. D'autre part, tous les hyperthermophiles produisent une ADN gyrase inverse qui va provoquer un surenroulement positif (au contraire des ADN gyrases des mésophiles qui produisent un surenroulement négatif) de l'ADN et ainsi assurer une meilleure stabilité vis à vis de la température. D'autres

protéines de liaison à l'ADN ont été identifiés, parfois similaires aux histones des eucaryotes, ces protéines contribuent à la compaction de la molécule d'ADN et ainsi à sa stabilité.

Lipides membranaires

Les lipides membranaires des archées hyperthermophiles sont des tétraéthers de dibiphytanyle. Les tétraéthers de dibiphytanyle sont naturellement résistants à la température du fait de la présence d'une liaison covalente entre les unités phytanyles qui permet la formation d'une membrane monocouche contrairement à la membrane bicouche phospholipidique classique. Cette structure, étayée par des liaisons covalentes, est plus résistante à la température qui tend à séparer la bicouche lipidique classique. Des lipides de ce type ont été également identifiés chez des hyperthermophiles du domaine des bactéries.

10.3.4. CONTRAINTES TECHNIQUES LIÉES À LA CULTURE DES PROCARYOTES THERMOPHILES

La culture des micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles a nécessité d'adapter les techniques de cultures classiques. Par exemple le travail à des températures supérieures à 60°C empêche l'utilisation de l'agar pour la préparation des milieux solides. Les isolements sur boîte ou en tubes des procaryotes thermophiles sont généralement réalisées en utilisant du gelrite ou gellan gum, un polymère thermostable qui résiste à des températures supérieures à 80°C (Erauso *et al.*, 1995).

De nombreux micro-organismes hyperthermophiles sont anaérobies. Les techniques de cultures nécessitent donc des précautions strictes vis à vis de l'oxygène, avec notamment l'utilisation d'enceintes anaérobies. À haute température, la quantité de gaz dissous dans un liquide et donc disponible pour les micro-organismes est moins importante (loi de Henry). Il convient donc d'incuber les cultures en agitation pour les micro-organismes aérobies et sous pression (1 ou 2 bars au dessus de la pression atmosphérique) pour la culture des espèces anaérobies chimio-lithotrophes autotrophes comme les méthanogènes, par exemple, qui utilisent H₂ et CO₂ pour produire du méthane.

Outre leur intérêt d'un point de vue évolutif et écologique, les procaryotes hyperthermophiles ont été rapidement identifiés comme sources potentielles de biomolécules thermostables (*cf. section 10.2.5*). Ainsi la compréhension de leurs caractéristiques physiologiques et métaboliques est apparue comme nécessaire à la concrétisation de leur potentiel biotechnologique. Une des principales limites, s'est

avérée être la difficulté à obtenir de grandes quantités de biomasse. La culture des micro-organismes hyperthermophiles anaérobies tels que les organismes sulfo-réducteurs d'origine marine appartenant à l'ordre des *Thermococcales* génère un certain nombre de difficultés techniques liées à l'utilisation de milieu de culture à base d'eau de mer, et à la production d' H_2S (résultant de la réduction du soufre). Ces deux conditions favorisent les problèmes de corrosion. Un des facteurs clés de l'étude de ces hyperthermophiles a été le développement de stratégies de cultures en bioréacteurs qui a permis d'explorer leur métabolisme, leur physiologie et l'obtention de biomasse en quantités suffisantes (Godfroy *et al.*, 2006).

10.3.5. APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES

Comme précédemment signalé, l'intérêt porté aux procaryotes thermophiles et hyperthermophiles avec l'isolement ces 30 dernières années de nombreuses espèces nouvelles, a été largement motivé par la recherche d'applications biotechnologiques et plus spécialement dans le domaine des biocatalyses : les enzymes provenant des organismes hyperthermophiles étant dans de nombreux cas plus résistantes (notamment vis à vis de la température) que leur équivalent provenant d'espèces mésophiles. Nous donnerons en exemple ici quelques applications issues de ces micro-organismes.

L'application la plus connue est l'utilisation pour la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de la Taq polymérase issue de *Thermus aquaticus*. Depuis d'autres polymérases, issues de procaryotes hyperthermophiles, ont été décrites et sont commercialisées : la Vent pol™ issue de *Pyrococcus furiosus*, une espèce isolée d'une source thermique littorale (Vulcano, Italie), la Deep Vent pol™ et la polymérase Isis™ issues respectivement de *Pyrococcus* GBD et de *Pyrococcus abyssi*, deux espèces hyperthermophiles isolées d'écosystèmes hydrothermaux sous-marins profonds.

D'autres applications concernent les enzymes de type hydrolases (Barbier, 1997), utilisables dans les industries agroalimentaires pour le traitement de l'amidon.

10.3.6. LES HYPERTHERMOPHILES ET L'ÉVOLUTION

La position phylogénétique des micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles, qu'ils appartiennent au domaine des archées ou des bactéries, à la base de l'arbre, ainsi que la longueur des branches témoignent d'une évolution plus lente, certainement liée aux habitats extrêmes qu'ils colonisent et dans les-

quels ils sont soumis à des contraintes physico-chimiques fortes. Ces écosystèmes extrêmes tels qu'ils existent actuellement ont existé sur la terre primitive et pourraient avoir été ceux dans lesquels la vie aurait fait son apparition. Ainsi les micro-organismes extrêmes actuels archées ou bactéries sont peut être les plus proches parents des formes de vie primitives. Notons également que le métabolisme de l'hydrogène, largement répandu chez les organismes hyperthermophiles pourrait être un métabolisme ancien, adapté aux conditions de vie primitive.

10.4. LES MICRO-ORGANISMES HALOPHILES ET HYPERHALOPHILES

Le terme halophile est utilisé pour qualifier des micro-organismes qui nécessitent obligatoirement la présence de sels (généralement le chlorure de sodium) pour leur croissance. On doit faire une distinction entre les micro-organismes halophiles et les organismes qui peuvent tolérer le sel même s'il est présent en grande quantité. On les qualifie alors d'organismes halotolérants.

En 1962, Larsen définissait trois catégories de micro-organismes halophiles basés sur la concentration en sels qui permet une croissance optimale de ces derniers (**Figure 10-8**). Les micro-organismes légèrement halophiles ont un optimum de croissance se situant entre 2 et 5 % de NaCl alors que les organismes modérés halophiles présentent un optimum de croissance entre 5 et 20 %.

Le terme « halophile extrême » est réservé aux micro-organismes présentant une meilleure croissance à des concentrations en sels supérieures à 20 %. Ces micro-organismes peuvent en général pousser dans un milieu saturé en sels (environ 35 %) bien que certaines espèces ne se développent que très lentement à ce niveau de salinité. Par définition, un organisme halophile extrême nécessite au minimum 9 % en NaCl pour sa croissance.

10.4.1. HABITATS DES MICRO-ORGANISMES HALOPHILES

Les habitats salés sont fréquents à travers le monde (i.e. milieu marin), mais les environnements hypersalés sont relativement rares, la plupart d'entre eux se situant dans les zones chaudes et sèches de la planète (**Figure 10-9**) ; on peut les retrouver néanmoins dans les régions tempérées et mêmes polaires. Il sera essentiellement abordé dans ce chapitre, la microbio-

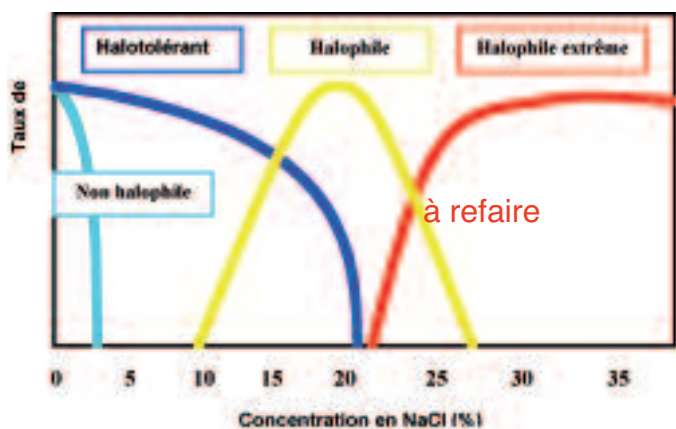


Figure 10-8 : Classifications des micro-organismes procaryotes en fonction de leur comportement vis-à-vis du NaCl. (D'après Madigan and Martinko (2007)).



Figure 10-9 : Exemple d'un écosystème hypersalé. Le lac Retba ou lac rose au Sénégal. Crédit Photo : P. Roger.

logie des environnements hypersalés. Les lacs salés possèdent des compositions ioniques qui peuvent varier de façon considérable car la nature des ions dominants de ces lacs dépend de la topographie environnante, de la géologie (lessivage des sols), et même des conditions climatiques. On définit les milieux hypersalés comme des environnements qui présentent des concentrations en sels minéraux supérieures à celle de l'eau de mer. Cette définition n'est pas spécifique et ne tient ni compte des types de sels ni de leurs proportions.

Les écosystèmes

L'eau de mer qui représente la plus grande partie de l'eau sur terre, contient des sels minéraux en concentration remarquablement constante dont les principaux sont les chlorures (18,98 %), le sodium (10,56 %), différentes formes de sulfates (2,65 %), du magnésium (1,27 %), du calcium (0,4 %), du potassium (0,38 %) et des carbonates (0,14 %).

La majorité des milieux hypersalés ont pour origine les sels de l'eau de mer, soit directement par évaporation et concentration, soit indirectement par la dissolution des dépôts fossiles que l'on retrouve sous forme d'évaporites. Les sels minéraux seront donc dans des proportions semblables à ceux contenus dans l'eau de mer, du moins tant que les seuils de précipitation ne seront pas atteints.

Les eaux hypersalées formées par évaporation partielle de l'eau de mer sont dites « thalassohalines » alors que celles obtenues par la dissolution des dépôts salés fossiles sont qualifiées de « athalassohalines ». Ces dernières peuvent avoir des proportions en sels bien différentes de celles de l'eau de mer en fonction

de la nature des dépôts. Certaines contiennent un fort pourcentage de carbonate de sodium et sont très alcalines (milieux natronés). Ces systèmes hypersalés sont d'origine continentale puisque qu'ils sont générés par dissolution, après action des eaux de pluies ou des eaux de ruissellements, des sels contenus dans les roches ou des couches géologiques traversées. Ces sels sont alors concentrés lorsque ces eaux se trouvent accumulées dans des bassins imperméables. Dans ce cas, chaque lac salé est unique de par sa composition chimique. On classe ces lacs en deux catégories selon l'anion qui prédomine : les lacs sulfatés et les lacs contenant du carbonate comme les lacs alcalins de l'est africain.

Si dans les premiers environnements une flore ubiquiste peut être trouvée, les seconds présentent souvent une biodiversité restreinte et spécifique de son biotope.

Les marais salants sont également un habitat des procaryotes halophiles extrêmes. Ce sont des petits bassins fermés remplis d'eau de mer et qui, par suite de l'évaporation, conduisent à la production de sel.

Au cours des trois dernières décennies, des fosses profondes, hypersalées et anoxiques, ont été découvertes en Méditerranée Orientale (**Encadré 10-1**)

Certains sols contiennent également des teneurs en sels suffisamment élevées pour être qualifiés d'hypersalés.

La physicochimie des lacs

Parmi les environnements hypersalés des USA, le Grand Lac Salé dans l'Utah est principalement constitué d'eau de mer concentrée. Les proportions relatives des différents ions y sont identiques à celle

de l'eau de mer mais la concentration totale en ions y est beaucoup plus élevée. Le sodium est le cation dominant alors que le chlore est l'anion dominant ; des concentrations significatives en sulfate sont également présentes à un pH neutre. Au contraire, dans la Mer Morte, un autre bassin hypersalé entre Israël et la Jordanie où le pH est également neutre, la concentration en sodium est relativement faible, alors que celle en magnésium est élevée. Ces deux écosystèmes présentent des concentrations en sels qui peuvent aller jusqu'à la saturation. En ce qui concerne la chimie de l'eau des lacs alcalins, elle ressemble à celle du Grand Lac Salé, mais du fait de la présence d'importantes quantités de carbonates dans les roches environnantes, le pH est relativement élevé. Des eaux dont le pH est compris entre 10 et 12 sont fréquentes dans ces environnements extrêmes. Les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} sont absents de ces lacs car ils précipitent à pH alcalin à des concentrations élevées en carbonate. Plusieurs lacs du Grand Bassin de l'ouest des Etats-Unis dont la salinité varie de 9 à 10 % sont alcalins avec des valeurs de pH comprises entre 9 et 10.

Quand les sels de l'eau de mer se concentrent par évaporation, les carbonates, en particulier précipitent sous la forme de carbonates de calcium dès que la salinité atteint 6 %. Ensuite, le sulfate précipite et forme des dépôts de gypse (sulfate de calcium) quand les 10 % en sels sont dépassés. Au-delà de 25 %, le chlorure de sodium commence à précipiter sous forme de halite et précipite pleinement à 34 % soit environ 10 fois la concentration de l'eau de mer. Les eaux sont par la suite enrichies en magnésium et potassium dont les sels précipitent à des salinités 20 fois supérieures à l'eau de mer.

L'eau de mer complètement évaporée est à l'origine des formations de dépôts de sels qui constituent à travers le temps des évaporites. Ces dernières sont considérées comme des environnements hypersalés fossiles et sont présentes sur tous les continents. Leur dissolution par l'eau de mer crée de nouveaux milieux athalassohalins. Les environnements salés ainsi formés constituent des sites pour l'évolution sur un long terme car ils permettent le développement de mécanismes et de ce fait l'émergence d'organismes obligatoirement dépendants de ces milieux.

La température des lacs continentaux peut varier énormément durant l'année ; ainsi la température de la région du Grand Lac Salé varie de -30°C en hiver à plus de 48°C en été. La grande majorité de la microflore halophile hétérotrophe est aérobie, mésophile ou thermotolérante avec un optimum entre 40°C et 55°C . Des exemples de thermotolérance ont été aussi ob-

servés parmi les bactéries halophiles phototrophes anaérobies appartenant au genre *Ectothiorhodospira*. Leur température optimale de croissance est comprise entre 45 et 50°C . À l'inverse, certaines bactéries halophiles isolées de lacs hypersalés de l'Antarctique sont psychrophiles, mais ceci reste une exception. La thermotolérance de certains organismes du domaine des Bactéries peut s'expliquer par la présence de solutés comme la bétaine qui protège les enzymes de la chaleur. Bien que mésophiles, des organismes Eucaryotes halophiles du genre *Dunaliella* résistent à des températures élevées. Cette résistance est attribuée à la présence de glycérol intracellulaire qui permet une stabilisation enzymatique.

Les systèmes hypersalés sont des environnements anoxiques en dehors de la surface des eaux, car les températures élevées et les fortes salinités limitent la solubilisation de l'oxygène et engendrent des zones favorables à la prolifération d'espèces plutôt anaérobies, mais l'aérobiose y est cependant largement représentée. Certaines bactéries du domaine des archées possèdent des vacuoles de gaz leur permettant par flottaison de rester en contact direct avec l'oxygène.

La chimie très diverse des habitats hypersalés a sélectionné une importante diversité de micro-organismes halophiles. Certains sont endémiques alors que d'autres sont retrouvés dans divers habitats. Malgré les conditions extrêmes existantes dans les environnements hypersalés, la production primaire y est importante via l'autotrophie.

La matière organique qui résulte de la production primaire par les phototrophes aérobies ou anaérobies permet le développement d'autres populations extrêmes qui sont toutes hétérotrophes.

10.4.2. ORIGINE DE LA MATIÈRE ORGANIQUE

Les écosystèmes hypersalés présentent généralement des formes de vie assez restreintes. En effet, la plus grande concentration en sels tolérée par un organisme vertébré est de 10 % (*Tilapia* spp). Au dessus de cette limite chez les Eucarya seuls des crustacés (*Artemia salina*), des algues (*Dunaliella salina*) ont été répertoriés. On trouve également des bactéries hétérotrophes aérobies ou anaérobies, certaines bactéries phototrophes anaérobies et des *Methanoarchaea*, micro-organismes producteurs de méthane appartenant au domaine des archées. Les végétaux et les algues qui se développent sur les berges de lacs hypersalés, peuvent être une source non négligeable de matière organique après recouvrement par les eaux des rives provoquant ainsi la mort de la végétation.

Encadré 10-1

Les Fosses Hypersalées et Anoxiques de Méditerranée Orientale

Au cours de ces 25 dernières années, des fosses profondes, hypersalées et anoxiques, connues sous l'acronyme anglais « DHABs » pour « Deep Hypersaline Anoxic Basins », ont été découvertes en Méditerranée Orientale. Ces fosses portent généralement le nom du navire océanographique qui les a découvertes.

« Tyro » a été le premier bassin découvert en 1983 dans la Fosse Strabo; suivi, en 1984, par « Bannock », situé sur le front sud-ouest de la Ride Méditerranéenne ; ensuite, il faudra une dizaine d'années de recherches pour mettre en évidence, toujours sur la Ride Méditerranéenne, « l'Atalante » (1993), « Urania » (1993) et enfin « Discovery » (1993-1994).

Des fosses similaires avaient été précédemment découvertes dans des bassins océaniques plus petits : en Mer Rouge, où parmi les quelques 25 fosses répertoriées au cours de ces 40 dernières années, la fosse « Atlantis II », découverte en 1968, est la plus grande (52 km²) ; ainsi que dans la partie nord du Golfe du Mexique, où le « Bassin Orca », découvert en 1975, couvre une aire de 400 km².

Tous ces bassins ont en commun la présence de dépôts salins d'évaporites à faible profondeur sous le plancher océanique, évaporites datant du Jurassique (Ère Secondaire) pour le Golfe du Mexique et du Miocène Supérieur (Messinien – Ère Quaternaire ou Mésozoïque) pour la Mer Rouge et la Mer Méditerranée.

Les DHABS sont des biotopes extrêmes, caractérisés par une salinité et une densité extrêmement élevées, une forte pression hydrostatique, l'absence de lumière, l'anoxie et une chemocline abrupte très prononcée, de quelques mètres d'épaisseur. Ces caractéristiques physicochimiques démontrent que les DHABS ont été physiquement isolés des autres habitats de la planète pendant des milliers d'années.

La détection des DHABS

Tous ces DHABS ont une signature sonore similaire, avec une réflexion sismique très nette au niveau de l'interface entre l'eau de mer et les saumures de fortes densités. Une fois une fosse détectée par réflectivité acoustique, il reste à prélever et vérifier la présence de saumures, afin d'homologuer la fosse hypersalée.

Les caractéristiques des différentes DHABS

Caractéristiques hydrologiques (profondeur maximale en mètres, salinité, pH, densité) et chimiques (concentrations en sodium, chlore, magnésium, méthane, hydrogène sulfuré et sulfate) de différents DHABS.

SITES	Prof m	S‰ psu	pH	Na+ mM	Cl- mM	Mg mM	Densité 10 ³ /kg/m ³	CH ₄ µM	H ₂ S mM	SO ₄ ²⁻ mM
Eau de mer "normale"		26-38	8,2	528	616	60	1,03	2-6nM	0	31.8
Bannock (Bassin Libeccio)	3 790	321	6,5	4 235	5 360	650	1,21	450	3,0	137
Urania	3 570	211	6,8	3 503	3 729	316	1,13	5 560	16	107
L'Atalante	3 522	320		4 674	5 289	410	1,23	520	2,9	397
Discovery	3 533	>120	4,5	68	9 491	4 995	1,32	50	0,7	96
Tyro	3 437		6,6	5 300	5 350	71			2,1	52
Orca - Golfe du Mexique	2 400	250	7,0	4 155	4 136	42,4	1,19	899	0,003	38
Atlantis II - Mer Rouge	2 192	310	5,2	4 880	5 110	32,8		6,3		26

Localisation des DHABs de Méditerranée

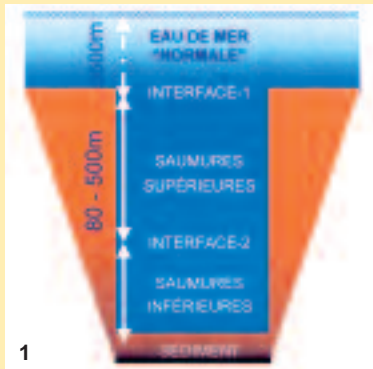


Figure 1. Coupe schématique d'un DHAB contenant deux couches de saumures.

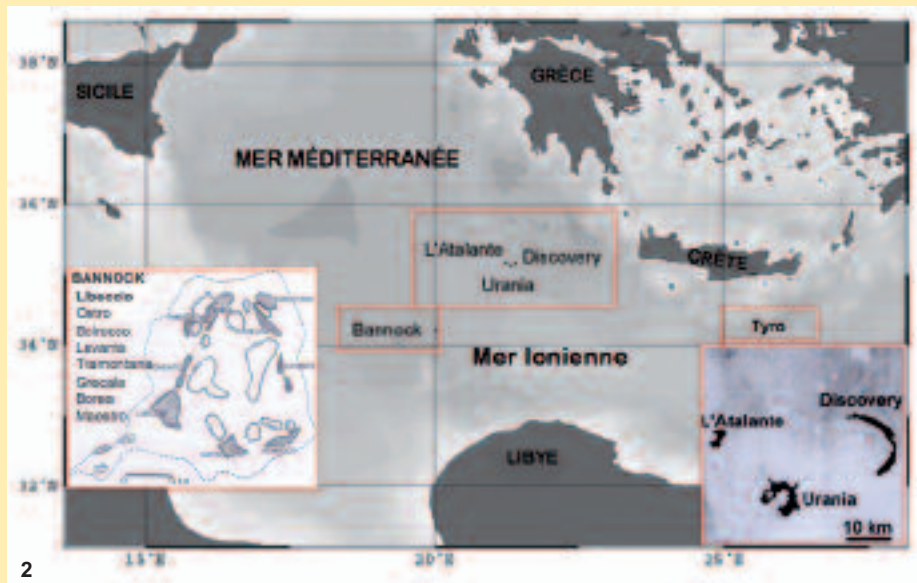


Figure 2. Emplacement des cinq DHABs de Méditerranée Orientale.

La formation des DHABs de Méditerranée

Il y a environ 5,9 à 5,3 millions d'années, durant le Messinien, à la fin du Miocène, des mouvements tectoniques de convergence, entre les plaques Africaine et Eurasiatique, ont entraîné l'occlusion de la Téthys-Méditerranée, avec interruption des entrées d'eaux Atlantiques. Cette phase d'assèchement de la Méditerranée, appelée « crise de salinité » messinienne, s'est accompagnée d'une baisse du niveau marin de l'ordre de 1 500 m et de dépôts massifs d'évaporites sur le fond de la mer ; l'épaisseur de ces dépôts salins pouvant atteindre quelques centaines de mètres, un millier de mètres, voire plusieurs milliers de mètres. Ces dépôts gigantesques d'évaporites dans tout le bassin méditerranéen, plus de un million de km³ de sels, répartis sur plus de 2 millions de km², représentent l'un des plus grands épisodes évaporitiques, si ce n'est le plus grand, que notre planète ait connu.

Vers 5,3 millions d'années, à la limite Messinien/Pliocène, l'ouverture de l'isthme de Gibraltar a entraîné une remise en eau brutale, par intrusion des eaux atlantiques, avec dissolution des évaporites, et constitution de lacs de saumures au fond des dépressions les plus profondes.

Description des DHABs de Méditerranée

Les DHABs de méditerranée représentent un habitat unique, extrême, et encore largement inexploré, situé sous une colonne d'eau de plus de 3 500 m, contenant des saumures très stables emprisonnées dans des bassins situés sous le plancher océanique ; la colonne de saumure, haute de 80 à 500 mètres, peut être homogène, ou stratifiée en plusieurs couches (**Figure 1**). Les 5 lacs de saumure, physiquement isolés les uns des autres (**Figure 2**), présentent chacun des singularités environnementales, indiquant que les saumures proviennent de la dissolution de différentes couches de la séquence évaporitique ; évaporites constituées essentiellement d'halite pour Bannock, Tyro, Urania et L'Atalante et de bischofite pour Discovery.

Tyro. C'est le bassin le plus petit : 4 km de diamètre, en forme d'entonnoir au bord arrondi, encadré, à l'ouest et à l'est par Kretheus et Poséidon, deux bassins présentant des conditions post-hypersalines et post-anoxiques depuis environ 3 000 ans. Tyro contient une seule couche de saumure homogène de moins de 60 m d'épaisseur.

Bannock. Une grande structure complexe, de 15 km de diamètre, qui, avec une aire de 46,5 km², contenant 4,1 km³ de saumures, constitue le plus grand lac de saumures de Méditerranée. Cette aire est divisée en 9 bassins satellites, portant des noms de vents : Libeccio, Sirocco, Ponante, Tramontane, Levante etc. (**Figure 2**). Le Libeccio, bassin le plus profond et le plus étudié, est généralement dénommé Bassin Bannock ; ses saumures, constituées d'eau de mer concentrée 8 à 10 fois, sont riches en potassium, brome et magnésium, et saturées en gypse et dolomites, avec formation de cristaux de gypse dans les sédiments. Les saumures sont disposées en deux couches, une couche supérieure de 150 m d'épaisseur et une couche inférieure de 300 m d'épaisseur, de compositions et de structures différentes. Les saumures de Bannock se seraient formées il y a 150 000 ans.

Urania. Une dépression en forme de fer à cheval de 6 km de large, contenant des saumures dont l'épaisseur varie de 80 m à 200 m, avec une stratification en deux couches, et, dans la branche ouest, la présence d'un puits contenant de la boue en suspension à 65°C (le « mud pit »). Ces saumures sont fortement enrichies en H₂S (110 mM), constituant le biotope aquatique le plus riche en sulfure connu actuellement, et contiennent 10 à 100 fois plus de méthane dissous que les autres DHABs, ainsi que d'autres hydrocarbures, tels que l'éthane et le propane.

L'Atalante. Les saumures de l'Atalante forment une seule couche chimiquement homogène, avec toutefois une stratification en 3 couches en fonction de la température (eau de mer 13,84°C, couche supérieure 13,82°C, couche intermédiaire 13,91°C et couche inférieure 14,06°C). Ces saumures qui affichent les teneurs en sulfate les plus élevées (397 mM), sont également fortement enrichies en potassium (jusqu'à 390 mM), ce qui indique des saumures dérivant du chlorure de potassium, caractéristique des niveaux supérieurs de la séquence d'évaporites.

Discovery. Un bassin en arc de cercle contenant une seule couche homogène de saumure, qui se démarque fortement des autres DHABs, car constitué presque exclusivement d'une solution de chlorure de magnésium (et non de chlorure de sodium), donnant la densité la plus forte pour un milieu aquatique. De nombreux nodules de magnésium et de carbonate sont présents dans le sédiment, ainsi que des infiltrations d'hydrocarbures.

La vie dans les DHABs

Malgré leurs conditions extrêmes, ces cinq fosses hypersalées ne constituent pas des zones mortes d'un point de vue biogéochimique, mais sont le siège d'activités procaryotiques, y compris dans Discovery, où des concentrations en chlorure de magnésium, proches de la saturation (Mg ~5M) rendent, théoriquement, ce bassin impropre à toute vie.

Des activités microbiennes (hétérotrophie, sulfato-réduction, et méthanogénèse) ont été mises en évidence dans les saumures et les sédiments des différentes fosses, indiquant la présence de populations bactériennes adaptées à ces milieux extrêmes. Ceci a été corroboré par des dénombrements par microscopie en épifluorescence, des études d'hybridations in situ par fluorescence (FISH) et de séquençage d'ARN ribosomique. Ces études ont montré la présence de bactéries et d'archées, avec une plus grande diversité pour les bactéries. Si certains organismes sont similaires à ceux déjà décrits, tels que des gamma, delta ou epsilon *proteobacteria* et *Sphingobacter* pour les bactéries et des *Halobacteria* pour les archées, d'autres organismes correspondent à de nouvelles souches de bactéries (sulfato-réductrices) et d'archées (*Euryarchaeota*) non encore cultivées ni décrites.

Les invertébrés, algues ou procaryotes (bactéries et archées) sont donc la principale source de composés oxydables dans ces environnements comme les sucres, lipides, protéines voire même des composés plus complexes tels que la chitine qui est le constituant majeur de la carapace des crustacés.

Les composés intracellulaires de faible poids moléculaire permettant à la plupart de ces micro-organismes de lutter contre la pression osmotique font également partie des composés organiques notoires de l'environnement hypersalé et sont pour certains des substrats privilégiés des *Methanoarchaea*.

Les substrats méthylés résultant de la dégradation de la glycine bêtaïne, choline et triméthylamine, ont également une grande importance dans ces environnements.

Il apparaît donc qu'une assez large gamme de substrats potentiels est disponible dans les écosystèmes hypersalés et malgré les conditions physico-chimiques défavorables de ces milieux, les micro-organismes ont pu malgré tout s'adapter à l'utilisation de composés spécifiques via l'autotrophie, la phototrophie ou l'hétérotrophie aussi bien en conditions aérobie qu'anaérobie.

Dégradation de la matière organique dans les milieux hypersalés

Dans la plupart des biotopes, les macromolécules sont décomposées par des bactéries hydrolytiques et fermentaires en produits plus simples comme des acides organiques, les acides gras, les alcools, l'hydrogène et le dioxyde de carbone. L'hydrogène peut alors servir de donneur d'électrons pour différents types de bactéries dont les bactéries homoacétogènes, les bactéries sulfato-réductrices ou les *Methanoarchaea* amenant à une meilleure minéralisation de la matière organique via l'acétate qui peut être complètement transformé en méthane et dioxyde de carbone par ces dernières. Une augmentation de la salinité du milieu amène une accumulation d'hydrogène et de divers acides gras volatils dans les sédiments. Ces résultats suggèrent donc que l'oxydation de la matière organique est incomplète dans les milieux à forte salinité à l'inverse d'autres écosystèmes comme les milieux marins ou les digesteurs. Au delà d'une salinité supérieure à 15 %, la minéralisation de ces composés organiques est restreinte à cause de l'absence ou de la faible activité des *Methanoarchaea* en particulier vis-à-vis de l'hydrogène et de l'acétate. L'analyse des sédiments des lacs salés le démontre notamment dans le Grand Lac Salé où l'hydrogène s'accumule jusqu'à 200mM dans les couches profondes.

Ces activités hydrogénotrophes réduites (bactéries sulfato-réductrices) ou nulles (*Methanoarchaea*), aboutissent à une accumulation des produits de fermentation de la matière organique qui sont finalement préservés dans les sédiments et seraient à l'origine de la formation du pétrole.

Des études ont montré que certains substrats tels que les méthylamines n'étaient utilisés que par les *Methanoarchaea* et non par les bactéries sulfato-réductrices, compétitrices notoires des méthanogènes pour l'hydrogène. Ce gaz ainsi que le formate, sont préférentiellement utilisées par les bactéries sulfato-réductrices lorsque le sulfate n'est pas limitant dans le milieu, ce qui est particulièrement le cas dans les environnements hypersalés.

La sulfato-réduction bactérienne est donc un processus important lors de la minéralisation de la matière organique dans ces environnements salés et anoxiques en intervenant notamment dans le cadre de l'oxydation de l'hydrogène. Cependant l'oxydation d'acides gras volatils tel que l'acétate ou le butyrate par des bactéries sulfato-réductrices n'a été démontrée que dans des milieux dont la salinité ne dépassait pas 19 %. À des salinités plus élevées, il n'existe donc qu'une oxydation incomplète de la matière organique. Cette oxydation conduit à une accumulation d'acétate dans les sédiments des environnements salés qui peut atteindre plusieurs centaines de millimolaires.

Les solutés compatibles

Une différence de concentration de solutés des deux côtés d'une membrane cellulaire provoque une force que l'on appelle « pression osmotique ». Cette pression qui a été estimée à environ 0,1 bar dans l'eau douce s'élève à plus de 100 bars en milieux hypersalés. Pour assurer sa viabilité, une cellule doit toujours ajuster la pression osmotique intra-cytoplasmique par rapport à celle de son environnement immédiat. Dans ce but, les micro-organismes halophiles ont élaboré deux mécanismes qui préviennent les chocs osmotiques du milieu : (a) le transport d'ions à travers la membrane par des pompes ioniques, (b) la synthèse ou l'accumulation de molécules organiques. De nombreuses espèces bactériennes halophiles ou halotolérantes accumulent des osmolytes organiques soit en les synthétisant, soit en les important du milieu extérieur. Dans les deux cas, ces opérations sont d'un coût énergétique élevé pour la cellule qui préférera généralement le transport à la biosynthèse, dans la mesure où les osmolytes sont déjà présents dans le milieu environnant. Les molécules organiques impliquées sont en général de faibles poids moléculaires, polaires,

hautement solubles, neutres à pH physiologique et incapables de traverser la membrane cytoplasmique sans l'intervention de transporteurs spécifiques. (acides aminés et dérivés, bêtaïnes et divers polyols) et ne perturbent pas le mécanisme de la cellule. Le terme de « solutés compatibles » a été introduit pour qualifier ces molécules protectrices.

L'accumulation d'ions par contre, a été mise en évidence chez les archées aérobies de la famille des *Halobacteriaceae*. Le cation K^+ est plus souvent retrouvé que le Na^+ dont la concentration cellulaire est maintenue faible pour des raisons de toxicité. Le Cl^- est l'anion dominant.

10.4.3. LES BACTÉRIES HALOPHILES EXTRÊMES

Les micro-organismes halophiles anaérobies appartiennent à l'ordre des *Halanaerobiales* (Ollivier *et al.* 1994) qui comprend deux familles les *Halanaerobiaceae* et les *Halobacteroidaceae*.

Toutes les espèces de ces familles fermentent les hydrates de carbones à l'exception d'une bactérie homoacétogène qui réduit le CO_2 en acétate et croît sur bêtaïne et triméthylamine : *Acetohalobium arabaticum*. L'espèce *Halocella cellulolytica* est la seule capable de cellulolyse parmi toutes les espèces décrites. Les espèces des genres *Orenia* et *Sporohalobacter* diffèrent de toutes les autres espèces par leur capacité à sporuler.

La plupart de ces espèces peuvent être considérées comme des organismes modérés halophiles à cause de leur optimum de croissance qui est compris entre 3 et 15 % de NaCl. *Halanaerobium lacusroseus* est le seul organisme anaérobie halophile considéré comme extrême (**Figure 10-10**), son optimum de croissance se situant vers 20 % de NaCl. Toutes les espèces décrites appartenant aux *Halanaerobiales* sont des organismes mésophiles : *Halothermothrix orenii* est le seul organisme thermophile décrit à ce jour, un second organisme fermentaire halophile et thermophile a été isolé d'un marais salant mais l'étude phylogénétique a permis de placer dans l'ordre des *Clostridiales*. En plus de leur capacité à coloniser des environnements salins terrestres, ces organismes anaérobies halophiles peuvent aussi se rencontrer sous la surface terrestre et notamment dans des puits pétroliers. De manière surprenante, les micro-organismes isolés de ces couches pétrolifères appartiennent seulement au genre *Halanaerobium* (*H. kuschneri*, *H. acetethylicum*, *H. salsuginis*, *H. congolense*).

Un certain nombre de micro-organismes photosynthétiques ont été décrits parmi lesquelles des cyano-

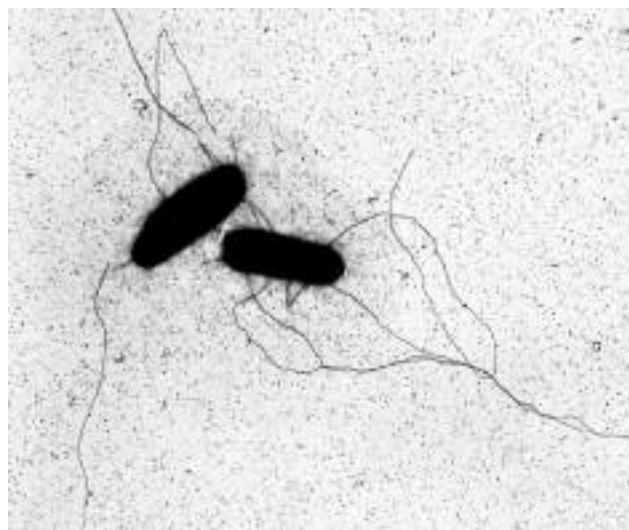


Figure 10-10 : Exemple de bactéries halophiles anaérobies : *Halanaerobium lacusrosei*.

bactéries (organismes aérobies) mais aussi des bactéries anaérobies représentées par les genres *Halorhodospira*, *Halochromatium* et *Ectothiorhodospira*.

10.4.4. LES ARCHÉES HALOPHILES EXTRÊMES

Les archées halophiles extrêmes forment un groupe diversifié de micro-organismes qui habitent les environnements à forte concentration en sels dont les surfaces de salaisons des poissons ou des viandes.

Les membres des archées halophiles aérobies sont classés dans la famille des *Halobacteriaceae* (genres *Natronobacterium* et *Natronococcus*) qui requièrent un minimum de 2 M de NaCl. Ce sont des organismes hétérotrophes.

Différents critères dont l'analyse des séquences de gènes codant les ARN ribosomiques 16S ont été utilisés pour définir les différents genres chez ces halophiles extrêmes aérobies (Litchfield 2007, Oren 2006). On les appelle fréquemment halobactéries (haloarchaea est plus formel). Le genre *Halobacterium*, le premier décrit dans ce groupe Archaéen reste le représentant le plus étudié. Les genres *Natronobacterium*, *Natronomonas* et les espèces proches de ces genres se différencient des autres halophiles extrêmes en étant des alcalinophiles extrêmes. Ces natronoarchaea possèdent une croissance optimale pour des concentrations très faibles en magnésium et un pH élevé (9-11).

Les archées halophiles extrêmes sont à Gram négatif, se divisent par fission binaire et ne produisent pas de forme de résistance ou de spores. La plupart des haloarchaea ne sont pas mobiles, mais quelques

rares souches le sont faiblement ou sont capables de flotter grâce à leurs vésicules gazeuses. La structure du génome des bactéries des genres *Halobacterium* et *Halococcus* sont inhabituelles du fait de la présence de gros plasmides pouvant contenir de 25 à 30 % de l'ADN total de la cellule, et dont le contenu en G+C % (57-60) est significativement différent de celui de l'ADN chromosomique (66-68 %). Les plasmides des archées halophiles extrêmes sont les plus gros plasmides naturels connus. Elles utilisent les acides aminés et les acides organiques comme source d'énergie et requièrent de nombreux facteurs de croissances (principalement des vitamines) pour une croissance optimale. Quelques espèces du genre *Halobacterium* oxydent les sucres, mais cette capacité est relativement rare. Des chaînes de transport d'électrons comptant des cytochromes de type a, b et c sont présentes chez *Halobacterium* et l'énergie est produite pendant la phase aérobie, par l'intermédiaire d'une force proton-motrice provenant d'événements chimio osmotiques membranaires. Chez quelques espèces, la croissance en anaérobiose (fermentation des sucres et respiration du nitrate ou du fumarate), a été mise en évidence.

Les archées halophiles extrêmes anaérobies sont retrouvés parmi les *Methanoarchaea* dans les genres *Methanohalophilus* et *Methanohalobium* de la famille des *Methanosarcinaceae* et sont essentiellement méthylotrophes, (utilisation du méthanol et des méthylamines).

10.4.5. LES EUCARYA HALOPHILES

Bien que les organismes procaryotes soient très majoritaires dans les écosystèmes hypersalés, des micro-organismes eucaryotes peuvent être retrouvés dans ces environnements. Cela inclut des espèces qui sont soit adaptées à de fortes concentrations en sels, soit qui sont capables de survivre dans ces conditions. Il s'agit d'algues, de diatomés, de protozoaires ou même de champignons. Des études menées en Slovénie ont permis d'observer une grande diversité de champignons appartenant notamment au genre *Cladosporium*. Des études réalisées sur la Mer Morte ont permis de caractériser un grand nombre de champignons filamenteux appartenant aux groupes des Zygomycètes et des Ascomycètes. Des algues vertes du genre *Dunaliella* ont souvent été rencontrées dans la Mer Morte mais aussi dans des écosystèmes artificiels tels que les marais salants.

10.4.6. APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES

Les micro-organismes modérés halophiles peuvent être à l'origine d'applications technologiques poten-

tielles des plus prometteuses ; non seulement parce que certaines d'entre elles produisent des molécules qui ont un intérêt pour l'industrie (enzymes, polymères ou osmoprotectants) mais surtout parce qu'elles présentent des propriétés physiologiques qui peuvent faciliter leur exploitation à des fins commerciales.

La plupart de ces organismes ne nécessite que peu de nutriments pour croître car leurs exigences nutritionnelles sont faibles, elles peuvent en outre utiliser une assez grande gamme de composés organiques comme sources de carbone et d'énergie. Ces organismes peuvent croître sous de fortes concentrations en sels et réduire par conséquent le risque de contamination dans certains procédés industriels.

Il existe aujourd'hui des applications biotechnologiques qui sont rapportés ci-dessous :

La fermentation de la sauce soja fait intervenir des micro-organismes halophiles se développant en présence de 19 % de NaCl. Ce sont des bactéries halotolérantes et modérées halophiles qui sont utilisées dans la préparation de la sauce de poisson appelée « nuoc mam ». On retrouve notamment certaines archées à pigmentation rouge dans ce procédé de fabrication.

Les bactéries halophiles modérées accumulent de grandes quantités de molécules de bas poids moléculaires pour pouvoir lutter contre les effets de la pression osmotique. Quelques composés comme la glycine-bétaine et l'ectoïne peuvent être utilisés en tant que molécules protectrices contre les stress dues à une forte salinité, dénaturation thermique, congélation ou dessiccation. On leur porte un grand intérêt notamment dans les industries pharmaceutiques mais aussi cosmétiques. De récents progrès dans la fermentation et la génétique des bactéries halophiles ont permis la surproduction de ces solutés compatibles.

Il est aussi possible de réaliser des transferts de gènes à partir de bactéries modérées halophiles pour donner à des produits agricoles tels que le blé, le riz ou l'orge, une capacité de résistance aux sels et à la sécheresse qui pourront par conséquent pousser sur des sols plus salins. Certains polysaccharides extracellulaires synthétisés par des micro-organismes halophiles indigènes aux eaux de gisements pétroliers pourraient avoir une grande valeur pour la récupération assistée des pétroles grâce à leurs propriétés de bio émulsifiants et leur activité de surfactants actifs notamment dans les eaux salées de ces gisements. Ces composés possèdent des propriétés de résistance à la dénaturation thermique et présentent des valeurs de viscosité plus élevées pour de fortes températures et dilutions, que la plupart des polymères actuellement commercialisés tel que la gomme de xanthane.

Halomonas eurihalina, par exemple, produit de grandes quantités d'un polysaccharide extracellulaire polyanionique (EPS V2-7) qui de par ses propriétés émulsifiantes peut être utilisé en industrie alimentaire ou pharmaceutique.

Depuis quelques années, de plus en plus d'eaux usées hypersalées sont rejetées par les industries chimiques ou pharmaceutiques. Les procédés classiques de traitement microbiologique ne fonctionnent pas pour des effluents salés mais pourraient être très performants grâce à l'utilisation de micro-organismes halophiles. Un traitement d'eaux usées contenant de fortes concentrations en sels a été réalisé avec succès pour l'élimination de composés phénoliques, aromatiques et de composés très toxiques comme les composés organophosphorés.

Une multitude d'autres utilisations potentielles pour des micro-organismes halophiles peut être envisagée en biotechnologie, parmi lesquelles on trouve : la récupération du phosphate par voie biologique qui est une alternative beaucoup moins chère que l'approche chimique, la recherche de nouvelles molécules bioactives comme par exemple des antibiotiques, de nouveaux surfactants ou de nouvelles enzymes (endonucléases de restriction).

Beaucoup de micro-organismes halophiles produisent des composées colorées tel que des caroténoïdes qui trouvent des applications en industries alimentaires en tant qu'agent de coloration.

Une application spectaculaire a été envisagée pour une protéine issue de la membrane cytoplasmique de *Halobacterium halophilum* (la bactériorhodopsine), une protéine qui joue le rôle d'une pompe à protons pour établir un gradient de part et d'autre de la membrane. Une puce électronique composée d'une couche mince de bactériorhodopsine serait en mesure de stocker plus d'informations qu'une puce au silicium et de traiter l'information plus rapidement. Ces puces plus petites, plus rapides et de plus grandes capacités permettraient probablement de créer des ordinateurs de très hautes performances.

10.4.7. CONCLUSION

Considérés pendant longtemps comme milieux hostiles à toutes formes de vie, les écosystèmes hypersalés n'ont été étudiés de manière systématique, que depuis peu de temps. Les micro-organismes qu'ils renferment présentent une grande diversité tant du point de vue de leurs formes, leurs métabolismes que

de leurs stratégies à croître dans ces milieux sursalés. Ces micro-organismes possèdent des potentialités biotechnologiques que l'on commence à peine à entrevoir. Leurs études devraient se poursuivre et amener des réponses aussi bien sur le plan technologique que sur un plan plus fondamental : leur adaptabilité à des milieux fortement minéralisés.

10.5. LES MICRO-ORGANISMES PIEZOPHILES

La pression est un paramètre physique important des milieux aquatiques. Elle est définie comme le rapport d'une force sur l'aire de la surface sur laquelle elle s'applique. Une force de 1 Newton appliquée sur 1 m² produit une pression de 1 Pascal (Pa). D'autres unités sont également employées selon les correspondances suivantes :

$$1 \text{ Pa} = 1.10^{-5} \text{ bar} = 9,8692 \cdot 10^{-4} \text{ atm} = 1,4503 \cdot 10^{-4} \text{ PSI} = 7,5003 \cdot 10^{-3} \text{ Torr}$$

Pour calculer la pression hydrostatique exercée par un liquide sur une surface donnée, il convient de tenir compte de l'accélération de la pesanteur, de la masse volumique du milieu, et de la profondeur. Plus simplement, dans le cas de l'eau (douce, océanique) la pression augmente de 10 Mpa par kilomètre. Ainsi à une profondeur océanique de 3 kilomètres correspond une pression hydrostatique de 30 Mpa, 300 atmosphères ou 300 bars.

L'exemple de l'océan pour expliciter les unités de mesure de la pression est tout à fait justifié, car c'est l'étude de cet environnement qui donna naissance à ce que l'on nomme parfois la piézomicrobiologie. Depuis une douzaine d'années environ, le terme piéophile a progressivement remplacé le terme barophile employé auparavant.

La surface de la planète Terre est couverte à 70 % par les mers et les océans, avec une profondeur moyenne de 3800 mètres, mais qui atteint dans la Fosse des Mariannes la profondeur maximale de 10 790 mètres, ce qui correspond à une pression hydrostatique de 110 Mpa. Pour les auteurs anglophones, le terme de « deep-sea » que l'on peut traduire par océan profond, correspond aux profondeurs supérieures à 1 000 mètres. Une telle profondeur se rencontre pour 88 % de la surface océanique, soit 75 % du volume total des océans et 62 % de la biosphère en terme de volume. Il s'agissait à l'époque (début des

années 80) de cette estimation de l'un des plus vastes biotopes de la planète sous l'influence de ce paramètre. Depuis cette estimation, d'autres habitats de subsurface, donc soumis à de fortes pressions, tous peuplés de micro-organismes, ont été découverts tels que les aquifères profonds, les réservoirs pétroliers, ou les sédiments océaniques. Comme nous allons le voir, l'essentiel de la biosphère terrestre est donc peuplée de piézophiles.

10.5.1. LES PIEZO-PSYCHROPHILES DES ABYSSES : UN PEU D'HISTOIRE

Outre la profondeur et l'absence de lumière, les abysses sont caractérisés par des températures basses de l'ordre de 2°C, et sont donc peuplés de psychrophiles (cf. Chapitre 10.1).

La présence de bactéries vivant dans les eaux océaniques et les sédiments à une profondeur de 5 000 mètres fut démontrée par le microbiologiste français Certes, suite à l'examen d'échantillons collectés par les navires « Le Travailleur » et le « Talisman » (1882-1883). Après ce travail de pionnier, et celui de l'américain Fisher 10 ans plus tard, il fallut attendre la seconde moitié du XX^e siècle et les travaux des microbiologistes américains Claude Zobell et Richard Morita pour que se mette progressivement en place une microbiologie marine.

En l'absence de photosynthèse locale, les conditions nutritionnelles des abysses sont plutôt oligotrophes, et l'une des premières questions abordées par les microbiologistes étudiant ces milieux fut celle de la dégradation de la matière organique dans les conditions physico-chimiques de fortes pressions et faibles températures de l'océan profond. De nombreuses expérimentations portant sur des bactéries de surface, des bactéries abyssales, et bien sûr des échantillons abyssaux collectés puis traités sous pression indiquèrent que l'activité hétérotrophe et la respiration aérobie de molécules organiques étaient considérablement ralenties par ces conditions abyssales, d'où l'idée que les bactéries libres, réellement adaptées à ces conditions étaient peu nombreuses. L'étude de l'activité de certaines enzymes extraites de bactéries abyssales en fonction de la pression, comme des chitinases, conduisirent au même résultat, l'activité observée étant supérieure lors d'incubations à la pression atmosphérique. Mais en fait, les micro-organismes ainsi étudiés provenaient davantage des couches superficielles de l'océan, atteignant le fond après une longue sédimentation. Plusieurs auteurs suggérèrent alors que les micro-organismes abyssaux « vrais » étaient peut-être confinés à des micro-envi-

ronnements tels que les tractus digestifs des invertébrés abyssaux. Effectivement, l'analyse d'abord de crustacés amphipodes abyssaux, puis d'holothuries et de poissons montra l'existence de communautés bactériennes réellement piézophiles.

Présentation de quelques bactéries piézopsychrophiles

Les premières bactéries piézopsychrophiles furent isolées et décrites par A. Yayanos, chercheur à la Scripps Institution for Oceanography (Californie). La souche CNPT3, apparentée au genre *Spirillum* a été isolée d'un amphipode en décomposition capturé par un piège à une profondeur de 5600 mètres. La bactérie, isolée à 2°C et 57 MPa se divise optimalement entre 2 et 4°C, à 50 MPa, avec un temps de doublement compris entre 4 et 13 heures. À la même température, mais à pression atmosphérique, le temps de doublement augmente jusqu'à 3-4 jours. Une nouvelle étape fut franchie avec l'isolement, toujours à partir d'un amphipode en décomposition, mais cette fois collecté à 10476 mètres, de la souche MT 41. Ce micro-organisme croît de façon optimale à 2°C et 69 MPa, avec un temps de doublement de 25 heures. Aucune croissance n'est observée pour une pression inférieure à 38 MPa, et la souche perd son aptitude à former des colonies après quelques heures d'exposition à la pression atmosphérique. Ultérieurement, d'autres piézophiles hétérotrophes aérobies furent isolées, essentiellement par des équipes américaines et japonaises. L'utilisation des méthodes de phylogénie moléculaire permit de les décrire avec précision comme de nouvelles espèces des genres *Photobacterium*, *Shewanella*, ou même de nouveaux genres comme *Colwellia* ou *Moritella*.

L'étude détaillée de la croissance de plusieurs souches piézophiles permit à Yayanos de dégager quelques caractéristiques de ces bactéries. Il démontra en particulier que la piézophilie était un trait commun des bactéries des mers froides, provenant de profondeurs supérieures à 2000 mètres, qui semble constituer un seuil pour la piézophilie. Il remarqua aussi que la tolérance à la pression variait avec la profondeur d'origine de la bactérie concernée, mais que la pression optimale pour la croissance d'une souche donnée était toujours inférieure à la pression existant à la profondeur de collecte de l'échantillon.

Bien qu'ayant apporté des informations majeures sur la microbiologie des fonds océaniques, ces travaux, de l'aveu de Yayanos lui-même, ne résolvaient pas toutes les questions. En particulier, toutes ces bactéries ont été isolées de milieux riches en matière or-

ganique (tubes digestifs), alors que les milieux abyssaux sont globalement oligotrophes. De plus, la minéralisation complète de la matière organique nécessite l'intervention de communautés microbiennes métaboliquement diversifiées (oligohétérotrophes, chimio-lithoautotrophes), non mises en évidence par les techniques employées. Leur détection permettrait établir le caractère ubiquiste de la piézophilie. Mais il est vrai que les autotrophes croissent en général beaucoup plus lentement que les hétérotrophes. Compte tenu de la croissance très lente des piézopsychrophiles hétérotrophes, la croissance des autotrophes abyssaux pourrait se chiffrer en semaines, ou en mois.

10.5.2. TAXONOMIE ET PHYLOGÉNIE DES PIÉZOPSYCHROPHILES

La plupart des bactéries piézopsychrophiles isolées ont fait l'objet d'études taxonomiques et phylogénétiques détaillées. Toutes appartiennent à la sub-division gamma des protéobactéries. Il ne semble pas qu'il existe une corrélation entre la position phylogénétique de ces organismes et la profondeur, la localisation ou la nature de l'échantillon. Alors que de nombreux autres extrémophiles (halophiles, hyperthermophiles) représentent des lignées phylogénétiques bien distinctes, les piézophiles étudiés à ce jour sont distribués dans des groupes phylogénétiques comportant également des espèces piézo-sensibles. Ceci tendrait à indiquer que les adaptations aux hautes pressions sont apparues séparément au cours d'une spéciation bactérienne relativement récente. L'utilisation des méthodes moléculaires pour l'étude de la diversité microbienne des abysses a certes révélé l'existence d'une plus grande diversité que les méthodes culturales (Protéobactéries des subdivisions alpha et delta, Actinobactéries, Planctomycetales, etc), mais aucune lignée phylogénétique spécifiquement piézophile n'a été mise en évidence.

10.5.3. ADAPTATIONS AUX HAUTES PRESSIONS CHEZ LES PIÉZOPSYCHROPHILES

Les premières études sur les mécanismes adaptatifs à la pression ont porté sur la composition en acides gras des membranes cellulaires de la souche CNPT3. Lors des cultures sous fortes pressions, on observe une diminution des acides gras $C_{14:1}$, $C_{16:0}$ et $C_{14:0}$, mais une augmentation des acides gras en $C_{16:1}$ et $C_{18:1}$. Plus globalement, le rapport acides gras insaturés sur acides gras saturés passe de 1,9 à 3 lorsque la pression augmente de 0,1 à 68 MPa. Une augmentation similaire de la teneur en acides gras insaturés a

également été observée chez *Vibrio marinus*, lorsque la température de culture décroît de 25 à 15°C. L'étude comparée de plusieurs souches isolées de profondeurs allant de 1200 à 10476 mètres indiquait également une augmentation des acides gras polyinsaturés, et particulièrement de ceux à longues chaînes allant jusqu'à 22 carbones. La synthèse de tels acides gras polyinsaturés à longue chaîne, rares chez les procaryotes, a été interprétée comme une réponse permettant le maintien de la fluidité membranaire.

C'est également au niveau de la membrane externe de la souche *Photobacterium* SS9 que des mécanismes adaptatifs ont été mis en évidence au niveau moléculaire. Cultivée sous pression, cette souche originaire d'une profondeur de 2500 mètres réprime l'expression de plusieurs protéines, tandis que de nouvelles sont exprimées. Parmi ces dernières, la protéine OmpH de 37 KDa s'est révélée être une porine non spécifique dont le niveau de transcription est augmenté sous pression hydrostatique. D'autres facteurs environnementaux comme la densité cellulaire ou la disponibilité en carbone peuvent aussi influencer sur l'expression du gène *ompH*, le même promoteur pouvant être activé par une forte densité cellulaire à 0,1 MPa ou une faible densité à 27 MPa. Sans exclure d'autres adaptations via plusieurs gènes agencés en opérons et régulés par la pression, il apparaît qu'une partie importante des adaptations à la pression chez les piézopsychrophiles concerne la membrane et les transports membranaires : les modifications des acides gras membranaires ou des protéines associées à la membrane externe ayant pour but de maintenir la fonctionnalité des échanges entre la cellule et son environnement.

10.5.4. CAS PARTICULIER DES SOURCES HYDROTHERMALES OCÉANIQUES

Les sources hydrothermales océaniques se trouvent essentiellement le long des dorsales océaniques à des profondeurs allant de 800 à 4000 mètres. Découvertes en 1977 sur la dorsale du Pacifique oriental, les sources hydrothermales océaniques constituent un environnement où l'on rencontre de forts gradients, en particulier thermiques : la température passe en effet de 2°C (eaux abyssales) à 350°C ou plus (l'eau demeure liquide en raison de la pression hydrostatique) sur des distances de quelques décimètres. Ces températures très élevées ont incité les microbiologistes à rechercher des micro-organismes hyperthermophiles, et effectivement de nombreuses nouvelles espèces et de nouveaux genres ont été décrits, particulièrement dans le domaine des archées (cf. section 10.2).

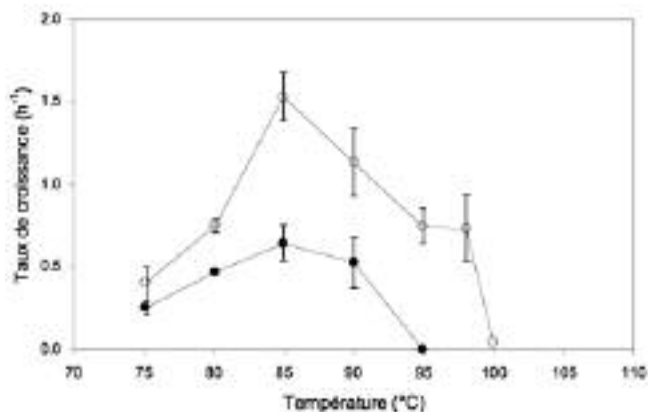


Figure 10-11 : Effets de la température et de la pression hydrostatique sur le taux de croissance de *Thermococcus barophilus*; [λ] : cultures à 0,3 MPa, (γ) : cultures à 40 MPa].

Réponses à la pression hydrostatique

La grande majorité des espèces hyperthermophiles ainsi isolées ont été obtenues en cultures légèrement pressurisées (0,2 MPa) de manière à éviter l'ébullition du milieu. Très peu ont été ensuite exposées aux fortes pressions afin de déterminer leurs réponses à la pression, mais plusieurs comportements ont été observés. Certaines souches sont apparues piézosensibles, d'autres piézotolérantes, d'autres enfin piézophiles. Chez les hétérotrophes piézophiles anaérobies, la piézophilie se manifeste par une augmentation sensible du taux de croissance, et une augmentation de quelques degrés (1 à 4°C) de la température maximale de croissance. La piézophilie a également été notée chez des archées méthanogènes hyperthermophiles, mais aux températures les plus élevées testées, croissance et méthanogénèse apparaissent découplées, la pression augmentant la température maximale, seulement pour la méthanogénèse.

Une autre approche a consisté à réaliser à partir d'échantillons collectés dans les sources hydrothermales océaniques des cultures d'enrichissement sous fortes pressions et températures élevées, dans des bioréacteurs construits à cet effet. Cette méthode a permis d'isoler *Thermococcus barophilus*, une archée hétérotrophe anaérobie hyperthermophile. Cette espèce, qui croît également à la pression atmosphérique, voit son taux ainsi que sa température maximale de croissance augmenter sous l'effet de la pression (**Figure 10-11**). Cultivée à la pression atmosphérique, elle

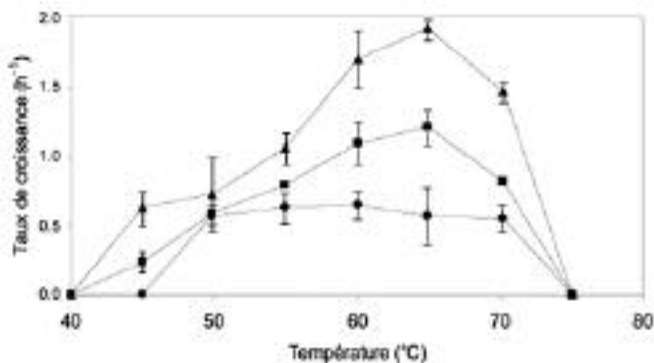


Figure 10-12 : Effets de la température et de la pression hydrostatique sur le taux de croissance de *Marinitoga piezophila*; [λ] : cultures à 0,3 MPa, après précultures en pression hydrostatique; (\blacksquare) : cultures à 0,3 MPa, après précultures en pression atmosphérique; (\square) : cultures à 40 MPa).

exprime une protéine de stress, ce qui confirme sa piézophilie. De la même façon, la bactérie *Marinitoga piezophila*, isolée d'un autre échantillon hydrothermal voit sa croissance améliorée par la pression hydrostatique jusqu'à 40 MPa (**Figure 10-12**). Dans ces conditions, elle présente une morphologie classique de coccobacille, alors que pour des pressions inférieures et surtout à pression atmosphérique, elle forme des filaments, les cellules ne se séparant plus (**Figure 10-13**). Curieusement, un tel phénomène avait été observé pour *Escherichia coli*, mais pour des pressions croissantes. La pression agirait donc, en sens inverse, chez ces deux organismes au niveau de la division cellulaire.

Un autre phénomène intéressant a été noté lors des essais de cultures sous pression de différentes souches thermophiles, et ce par plusieurs laboratoires. Dans le cas des espèces piézophiles, la pression hydrostatique pour laquelle la meilleure croissance est observée est toujours supérieure à la pression existant à l'endroit de la collecte de l'échantillon, soit le contraire du phénomène observé pour les psychrophiles (cf. Chapitre 10.1). Ces observations ont conduit John Baross et Jody Deming (School of Oceanography, Seattle, USA) à écrire un article intitulé : « Black smokers : windows to a deep biosphere ». En d'autres termes, les micro-organismes hyperthermophiles isolés des parois de cheminées hydrothermales vivent-ils en permanence à cet endroit, où viennent-ils de réservoirs situés sous le plancher océanique et donc sou-

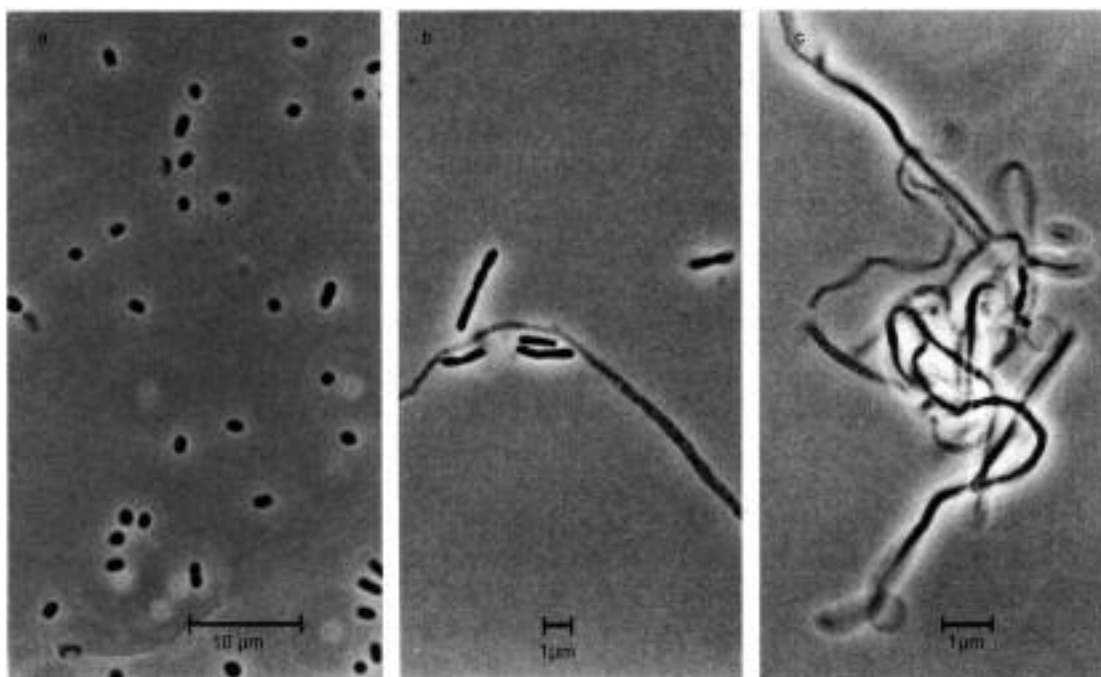


Figure 10-13 : Observation en microscopie à contraste de phase de *Marinitoga piezophila* après incubation à 40 MPa (a), 10 MPa (b) et 0,3 MPa (c).

mis à de plus fortes pressions qu'au niveau de celui-ci ? Plusieurs observations suivant immédiatement des éruptions sous marines seraient en faveur de cette hypothèse. Mais quoi qu'il en soit, d'autres environnements profonds, et donc soumis à de fortes pressions ont été découverts ces dernières années.

10.5.5. D'AUTRES PIÉZOPHILES À DÉCOUVRIR

Aquifères, réservoirs pétroliers, couches sédimentaires sont autant d'environnements soumis à de fortes pressions. Bien que la présence de micro-organismes ait été signalée, parfois même bien étudiée dans ces divers écosystèmes, peu de références à l'effet de la pression sont disponibles. Pourtant, selon les estimations de Whittmann, une très grande majorité des procaryotes vivrait en subsurface, principalement sous le plancher océanique. Plus que la pression existant en subsurface, ce sont surtout les sources de carbone et d'énergie qui interpellent les microbiologistes. Ces nutriments viennent-ils de la surface, ou en d'autres termes, les micro-organismes de subsurface sont-ils dépendants, indirectement, de la photosynthèse et de l'énergie solaire ? Sont-ils définitivement enfouis dans les couches sédimentaires profondes, ou bien transportés par des fluides circulant en profondeur ? Sont-ils réellement actifs, en état de dormance ? Quel est leur temps de génération (certaines estimations évoquent des milliers d'années) ? Trouvent-ils leurs sources d'énergie et de carbone dans l'hydrogène et le gaz carbonique produits

lors de réactions abiotiques ? Ils seraient alors totalement indépendants de l'énergie solaire, comme le furent les premiers organismes vivants il y a environ 4 milliards d'années ? On le voit, l'étude de ces écosystèmes récemment découverts et de leurs habitants, piézophiles par obligation, nous conduit à réfléchir, à formuler des hypothèses quant à l'origine de la Vie.

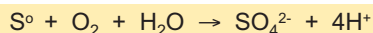
10.6. LES MICRO-ORGANISMES ACIDOPHILES

10.6.1. INTRODUCTION

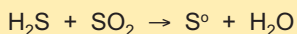
L'étude des micro-organismes extrémophiles suscite un intérêt croissant auprès des scientifiques et des industriels, étant donné leurs particularités physiologiques et écologiques, mais également leur potentiel biotechnologique (Rawlings, 2002). Cela est d'autant plus vrai pour ceux qui occupent les environnements acides où le pH ambiant (< 4) résulte directement de l'activité microbienne indigène (Ehrlich, 2002) et non de contraintes physico-chimiques (température, force ionique, pH alcalin, radiation, pression, etc.) imposées par l'écosystème, ce qui est le cas pour les autres types d'environnements extrêmes (chauds, froids, hypersalés, profonds, etc.). Le cas de l'estomac animal a été abordé au chapitre 9.

Les environnements acides, le plus souvent riches en métaux lourds et métalloïdes, ont deux origines

principales. La première est directement liée aux activités volcaniques. À ces endroits, l'acidité provient généralement de l'oxydation microbienne du soufre élémentaire (S^0) :

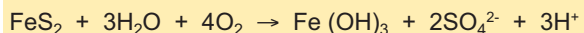


où S^0 est en fait le résultat d'une réaction de condensation entre des formes oxydées et réduites de gaz soufrés :



Dans de tels environnements, des gradients de température peuvent facilement s'établir pour laisser la place à une biodiversité microbienne pouvant croître dans différentes gammes de température allant de la mésophilie à l'hyperthermophilie. Ce type d'environnements acides peut également être associé à des activités minières. En effet, lors de l'exploitation du charbon ou des métaux, les minéraux sulfurés sont exposés extemporanément à l'action combinée de l'eau et de l'oxygène, facilitant ainsi les attaques microbiennes et conduisant à des écoulements d'eaux minières acides (*Acid Mine Drainage*) qui constituent par la suite un grave problème environnemental. Le composé minéral sulfuré le plus abondant, en l'occurrence la pyrite, fait l'objet de toutes ces attaques oxydatives.

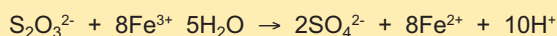
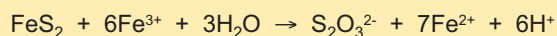
L'oxydation biologique de la pyrite a été étudiée en détail. Elle se déroule au cours d'étapes successives pour aboutir à la réaction globale présentée ci-dessous :



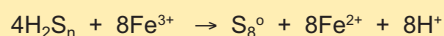
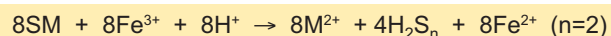
Les environnements acides varient énormément en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques et de leur composante microbienne. Des hautes températures résultant d'une activité biologique aérobie peuvent être observées. Elles favorisent alors l'adaptation de micro-organismes dits "thermo-acidophiles". Les mécanismes par lesquels les microbes obtiennent de l'énergie via l'oxydation de composés soufrés minéraux (CSM) (i.e. pyrite), phénomène étant reconnu sous le terme de "biolixiviation" dans le domaine des biotechnologies, sont restés controversés pendant de longues années. La récente démonstration du rôle important joué par le fer ferrique (Fe^{3+}), présent dans les parois cellulaires et les matrices polysaccharidiques extracellulaires des organismes concernés, dans le transfert des électrons des CSM vers la chaîne respi-

ratoire, est venue clarifier la situation. Il en a découlé des retombées immédiates aussi bien sur le plan fondamental qu'appliqué.

Les différences observées durant la biolixiviation des sulfures métalliques (SM) dépendent de la nature de l'oxydation chimique par le fer ferrique, laquelle est fonction des caractéristiques cristallographiques du minéral métallique. Sous des conditions normales de pression et de température, la pyrite, mais aussi d'autres composés sulfurés comme la tungsténite et la molybdénite, ne peuvent être oxydées par Fe^{3+} que par ce que l'on appelle communément le "mécanisme thio-sulfate" (*thiosulfate mechanism*) :

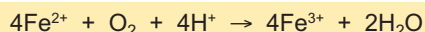


Le sulfate est alors le produit final de la réaction. La plupart des autres sulfures métalliques (i.e. la galène, la chalcopryrite, la spharélite, etc..) peuvent être soumis à une attaque protonique ou à une oxydation par le fer ferrique suivant un autre mécanisme, appelé "mécanisme polysulfure" (*polysulfide mechanism*) :



Dans ce cas de figure, il y a production de soufre élémentaire qui peut être oxydé par la suite par les micro-organismes "soufre-oxydants" en acide sulfurique.

Le fer ferreux (Fe^{2+}) produit au cours de toutes ces réactions présentées ci-dessus est réoxydé par les bactéries ferro-oxydantes en fer ferrique (Fe^{3+}).



Le rôle majeur des micro-organismes chimolithotrophes acidophiles est finalement de maintenir en solution de grandes concentrations d'oxydant chimique, en l'occurrence ici, le fer ferrique.

Prenons par exemple le cas de la bactérie acidophile chimolithotrophe *Acidithiobacillus ferrooxidans* (anciennement appelée *Thiobacillus ferrooxidans*), qui a été isolée d'une mare acide dans une mine de charbon, il y a maintenant plus de cinquante ans. Bien que cette bactérie puisse obtenir de l'énergie en oxydant les sulfures, mais également le fer ferreux, il a été accordé plus d'importance à son métabolisme vis à vis des composés soufrés qu'à celui du fer, à cause



Figure 10-14 : Vue de la « Peña de Hierro » en amont du Río Tinto en Espagne.

de considérations purement bioénergétiques. Cependant, avec la découverte de certains organismes chimolithotrophes stricts (i.e. *Leptospirillum ferrooxidans*), qui n'étaient capables d'utiliser que le fer ferreux comme seule source d'énergie, et dont l'activité métabolique était directement liée à la biolixiviation des métaux et aux écoulements d'eaux acides, un regain d'intérêt s'est porté depuis sur le métabolisme du fer (Rawlings, 2002). Concernant ce métabolisme, il a par ailleurs été bien établi que le fer pouvait être oxydé en condition anaérobie lors d'un couplage à la photosynthèse anaérobie ou à la respiration anaérobie faisant intervenir le nitrate comme accepteur final d'électrons.

La plupart des micro-organismes acidophiles stricts reconnus d'un point de vue taxonomique est isolé de régions volcaniques ou de zones d'écoulements d'eaux résultant d'activités minières. Le Río Tinto (dit « ceinture pyritique Ibérique » en Espagne) (**Figure 10-14**) représente un écosystème non conventionnel à cause de son acidité ambiante (valeur moyenne du pH aux alentours de 2, ce dernier étant tamponné par le fer ferrique), de son étendue (100 km), de sa grande concentration en métaux lourds (fer, arsenic, cuivre, zinc, chrome...) et d'un niveau élevé de diversité microbienne occupant cet écosystème terrestre acide (Amaral-Zettler *et al.*, 2003). Ce n'est que récemment qu'il a été démontré que les conditions d'acidités extrêmes qui règnent dans le Río Tinto ne sont probablement pas le résultat de l'activité minière actuelle, mais liés à la nature même de l'écosystème et des activités naturelles qui s'y déroulent. Tenant compte de la dimension du site et de la facilité d'accès, le Río Tinto est considéré aujourd'hui comme un modèle expérimental de référence pour les environnements acides.

10.6.2. DIVERSITÉ DES ENVIRONNEMENTS “ACIDES EXTRÊMES”

Les environnements acides font partie des environnements les moins bien caractérisés. Cela est dû au fait que les organismes qui occupent ces niches écologiques possèdent des propriétés physiologiques très particulières (métabolisme microbien en relation directe ou indirecte avec les composés soufrés et les métaux). Par ailleurs, les chimio-lithotrophes acidophiles ne sont en général pas faciles à cultiver notamment en milieu solide.

Les procaryotes qui sont métaboliquement actifs dans les environnements “acides extrêmes” sont répartis à la fois dans le domaine des bactéries et celui des archées et sont différenciés en fonction des sources de carbone et d'énergie qu'ils sont capables d'utiliser.

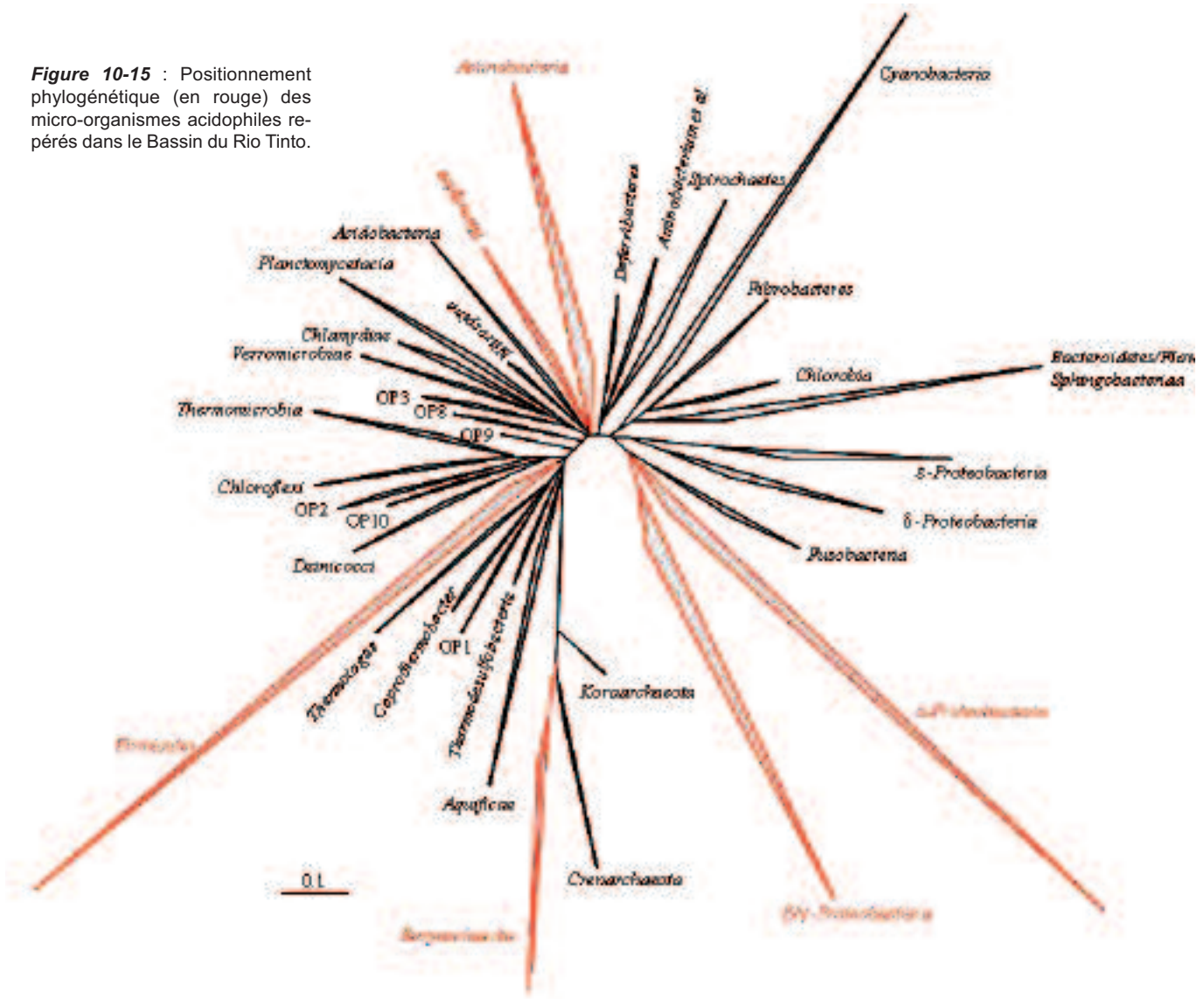
Il existe un grand nombre de micro-organismes chimolithotrophes isolés d'environnements acides capables d'oxyder à la fois le fer et les composés minéraux soufrés. Ces bactéries sachant tirer leur énergie pour la croissance de substances strictement minérales sont ubiquistes, et les plus communément recensées sont : *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum* spp., *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus caldus*, dans le domaine des bactéries ou *Sulfobacillus* spp. et les membres de la famille des *Ferroplasma*-ceae dans le domaine des archées.

À côté des chimio-lithotrophes, il existe également bon nombre d'hétérotrophes acidophiles colonisant les environnements acides, dont ceux appartenant en particulier au genre *Acidiphilium*, ou des hétérotrophes facultatifs appartenant aux espèces des genres *Acidimicrobium* et “*Ferromicrobium*”. Les acidophiles se différencient entre eux par des critères physiologiques comme la température optimale de croissance (mésophiles, thermophiles modérés, thermophiles, hyperthermophiles), le pH optimum de croissance, ou sur la base de la source de carbone utilisée (autotrophes, hétérotrophes et mixotrophes). En général, les acidophiles thermophiles extrêmes appartiennent au domaine des archées.

Domaine des bactéries

La majorité des micro-organismes acidophiles isolés et caractérisés fait partie du domaine des bactéries. Ils se répartissent dans divers groupes phylogénétiques (**Figure 10-15**). La plupart d'entre eux sont à Gram négatif (toutes les espèces du genre *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*, et *Acidiphilium* spp.),

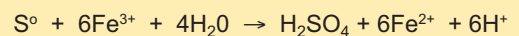
Figure 10-15 : Positionnement phylogénétique (en rouge) des micro-organismes acidophiles repérés dans le Bassin du Rio Tinto.



mais récemment plusieurs micro-organismes à Gram positif appartenant à de nouveaux genres ont été isolés d'environnements naturels ou de ceux résultant d'activités anthropogéniques (activités minières). On compte parmi eux les espèces des genres *Sulfobacillus*, *Acidimicrobium* et "*Ferrimicrobium*". Les principaux éléments de différenciation de ces micro-organismes acidophiles sont rapportés dans le **Tableau 10.2**.

En ce qui concerne le genre *Acidithiobacillus*, *A. ferrooxidans* a été le premier organisme acidophile chimolithotrophe strict isolé d'eaux acides d'origine minière. Cette bactérie à Gram négatif de 0,5 µm de large sur 1,0 µm de long est un bâtonnet mobile utilisant le CO₂ comme source de carbone et tirant son énergie de l'oxy-

duction du fer ferrique, du soufre élémentaire et des composés soufrés réduits. Pendant de longues années, on pensait que *A. ferrooxidans* était une bactérie principalement responsable de la solubilisation des sulfures métalliques et qu'elle était essentiellement aérobie. Cependant, en condition anaérobie, le fer ferrique peut remplacer l'oxygène et est alors utilisé comme accepteur final d'électrons pour notamment oxyder le soufre élémentaire. A pH 2, l'énergie libre de la réaction :



est négative ($\Delta G = -314$ kJ/mol), suggérant que cette réaction est fortement exergonique. *Acidithiobacillus thiooxidans* est phylogénétiquement proche de *A. fer-*

Caractéristiques	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	<i>Ferrimicrobium acidiphilum</i>	<i>Sulfobacillus acidophilus</i>	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>
Morphologie des cellules	Vibrios 1 µm, spirilles	Bâtonnets	Bâtonnets	Bâtonnets	Bâtonnets 1,5 µm filaments
pH Optimum	1,5-2,0	2,5	2,0-2,5	2	2
mol %G+C	51-56	58-59	52-55	55-57	67-68,5
Oxydation du S ⁰	–	+	–	+	–
Réduction du fer	–	+	+	+	+
Présence d'endospores	–	–	–	+	–
Mobilité	++	+	+	+	+
Utilisation de l'extrait de levure	–	–	+	+	+
Croissance à 50°C	–	–	–	+	–

Tableau 10.2. : Comparaison des propriétés phénotypiques des micro-organismes acidophiles oxydant le fer.

rooxidans. À l'inverse de ce dernier, il n'est cependant pas capable d'oxyder Fe²⁺.

Dans ce même genre, on retrouve *A. caldus*, une acidophile thermophile modérée qui occupe les environnements miniers, notamment les déchets résultant de l'exploitation du charbon, mais également les bioréacteurs industriels où s'effectuent une dissolution oxydative des minéraux contenant du sulfure. Cette bactérie utilise le CO₂ atmosphérique comme source de carbone en effectuant une réduction de ce gaz. Elle est également capable d'utiliser une grande gamme de composés soufrés, mais est incapable comme *A. thiooxidans*, d'oxyder le fer ferreux ou la pyrite. Le principal produit de l'oxydation des composés soufrés réduits est H₂SO₄, justifiant ainsi son adaptation à des pH très acides.

D'autres acidophiles sont regroupées dans le genre *Leptospirillum*, et sont également des micro-organismes autotrophes à Gram négatif (pH optimum 1,5-1,8), capables de n'utiliser que le fer comme source d'énergie. L'affinité que ces micro-organismes ont vis à vis du fer est élevée et contrairement à *A. ferrooxidans*, la capacité qu'ils ont à oxyder le fer ferreux n'est pas inhibée par le produit de la réaction d'oxydation (le fer ferrique). Ce sont des aérobies stricts. Trois espèces se différencient clairement sur la base de caractères phylogénétiques : *L. ferrooxidans* (température optimale de croissance 26-30°C), *L. ferriphilum* (température optimale de croissance située

entre 30 et 40°C) et "*L. ferrodiazotrophum*". *L. ferrooxidans* est celle qui domine dans des écosystèmes naturels comme le Río Tinto, alors que *L. ferriphilum* se retrouve principalement dans les autres environnements acides tels que « Iron Mountain » en Californie ou les bioréacteurs industriels.

Toujours chez les bactéries à Gram négatif, des espèces du genre *Acidiphilium* ont été caractérisées. Elles sont acidophiles et hétérotrophes et appartiennent au phylum des alphaprotéobactéries. Malgré ce caractère hétérotrophe, elles restent toujours associées phylogénétiquement aux acidithiobacilles ou leptospirilles chimio-lithotrophes. Ces micro-organismes sont capables d'utiliser des composés carbonés réduits comme donneurs d'électrons en utilisant le fer ferrique comme accepteur final d'électrons. Quelques espèces peuvent également réduire le fer malgré la présence d'oxygène.

Parmi les bactéries à Gram positif, on compte les espèces du genre *Sulfobacillus*, caractérisées par un contenu à faible G+C % de leur ADN. Ce sont des acidophiles modérées thermophiles capables de sporuler. Elles ont été isolées d'environnements géothermaux et dans le cadre de procédés biohydro-métallurgiques. Elles croissent de manière autotrophe entre 40 et 60°C, utilisant le fer ferreux, le soufre élémentaire et les minéraux sulfurés comme sources d'énergie. Les membres de ce genre sont capables de croître également en mixotrophie dans des milieux contenant du fer ferreux et de l'extrait de levure, ou en

hétérotrophie et dans ce cas, le glucose peut alors être utilisé comme source de carbone et d'énergie.

En ce qui concerne *Acidimicrobium ferroxydans*, considérée également comme une bactérie thermophile, elle croît en autotrophie en oxydant le fer ferreux en aérobiose et en réduisant le fer ferrique en anaérobiose. Les souches qui ont été isolées à ce jour requièrent des sources de carbone assez variées pour leur croissance.

On compte aussi chez les bactéries à Gram positif acidophiles les espèces du genre *Desulfosporosinus* qui présentent la particularité de réduire le sulfate en sulfure. Ces bactéries dites « bactéries sulfato-réductrices » n'ont été repérées que très récemment dans les environnements acides (González-Toril *et al.*, 2005) où elles sont susceptibles d'utiliser l'hydrogène et le glycérol, comme sources d'énergie. En produisant des sulfures, ces micro-organismes se trouvent parfaitement adaptés à la biorémédiation des eaux industrielles contaminées par les métaux lourds qui sont alors précipités en sulfures métalliques.

Domaine des archées

Les acidophiles aérobies ou anaérobies facultatifs du domaine des archées colonisent des biotopes comme les sites d'activités minières et les solfatares où le fer comme le soufre se trouvent à l'état réduit. On les rencontre dans deux groupes différents d'un point de vue phylogénétique, à savoir l'ordre des *Sulfolobales* et des *Thermoplasmatales*. Ces groupes présentent des caractéristiques phénotypiques différentes. Quelques représentants des *Sulfolobales*, (i.e. *Acidianus brierleyi* ou des espèces du genre *Metallosphaera*), obtiennent de l'énergie en oxydant le soufre, les minéraux sulfurés ou le fer ferreux. D'autres membres de l'ordre des *Sulfolobales*, i.e. *Sulfolobus acidocaldarius* et *Sulfolobus solfataricus*, n'utilisent que le soufre élémentaire et les composés soufrés réduits. Le soufre élémentaire ainsi que les minerais de fer sulfureux sont des sources d'énergie potentielles pour *Sulfolobus metallicus*. Parmi les membres de l'ordre des *Sulfolobales* reconnus comme ayant la capacité de croître en chimolithotrophie, seuls *S. metallicus* et *Acidianus ambivalens* sont considérés comme des chimio-lithotrophes obligatoires. D'un point de vue phénotypique, *Sulfolobus acidocaldarius* ressemble morphologiquement et physiologiquement à *Acidianus brierleyi* qui fût le premier micro-organisme thermophile chimio-lithotrophe acidophile caractérisé. Ces deux espèces sont cependant différenciables d'un point de vue génotypique. En ce qui concerne l'ordre des *Thermoplasmatales*, seules les espèces du genre *Ferroplasma*, en l'occurrence *Ferroplasma acidiphilum*

et *Ferroplasma acidarmanus*, sont acidophiles chimio-lithotrophes capables d'oxyder le fer. Elles nécessitent cependant des traces d'extrait de levure lors d'une croissance autotrophe. *Ferroplasma acidarmanus* est considéré comme un extrême acidophile capable de pousser à un pH proche de zéro. Ce dernier a été isolé de biofilms de sédiments pyritiques originaires de la mine d'«Iron Mountain». On retrouve également les souches de ce genre dans des réacteurs destinés à la biolixiviation des métaux, suggérant ainsi le rôle écologique que joue ce type de micro-organismes bien au delà des écosystèmes naturels. Pour les représentants des autres genres, *Thermoplasma* et *Picrophilus*, ce sont des archées hétérotrophes. Dans l'environnement du Rio Tinto, sont retrouvés essentiellement des représentants de l'ordre des *Thermoplasmatales*, notamment *Thermoplasma acidophilum* et *Ferroplasma acidiphilum*.

Domaine des Eucarya

Il a été rapporté l'existence d'une grande diversité d'eucaryotes associée aux environnements acides, notamment dans les sites d'activités minières (Amaral-Zettler *et al.*, 2003). Malheureusement, nous n'avons que peu d'informations sur les représentants de ce domaine qui ne sont pas particulièrement adaptés d'un point de vue physiologique et morphologique pour lutter contre le stress acide. Au delà de l'adaptation à ces conditions acides, ces micro-organismes doivent également développer des mécanismes de résistance aux métaux et métalloïdes qui sont le plus souvent des composants d'importance qualitativement et quantitativement dans les environnements acides. Dans le Bassin du Rio Tinto, les espèces les plus fréquemment rencontrées appartiennent au phylum *Chlorophyta* (*Chlamydomonas*, *Chlorella*, et *Euglena*), suivies de deux algues filamenteuses appartenant aux genres *Klebsormidium* et *Zygnemopsis*. Dans la partie la plus acide du Rio Tinto, on retrouve une population d'eucaryotes dominée par deux espèces du genre *Dunaliella* et *Cyanidium*, qui sont bien connues pour leur tolérance à l'acidité et aux métaux lourds. Les champignons y sont également abondants et divers d'un point de vue taxonomique, et comprennent des levures ou des formes filamenteuses. La communauté mixotrophe est représentée essentiellement par les Cercomonades et les straménopiles. Les protistes ne sont pas absents de tels écosystèmes où sont recensés deux ciliés qui appartiendraient aux genres *Oxytrichia* et *Euplotes*. Des amibes affiliées aux genres *Valhampfia* et *Noegleria* sont également rencontrées aux endroits les plus acides du Rio. Une espèce du genre *Actinophrys*, apparaît comme étant un des prédateurs

les plus caractéristiques de la chaîne alimentaire benthique de cette rivière acide.

10.6.3. ECOLOGIE MICROBIENNE D'UN ENVIRONNEMENT ACIDE EXTRÊME : LE RIO TINTO

Bien que l'isolement et la caractérisation de micro-organismes restent des approches indispensables pour analyser à la fois la biodiversité d'un écosystème et son fonctionnement, il n'en est pas moins indéniable que l'introduction d'outils moléculaires tels que l'hybridation à fluorescence *in situ* (FISH), la séparation par électrophorèse en gel dénaturant (DGGE en anglais) des gènes codant pour l'ARNr amplifié, ou le clonage ont complètement bouleversé le concept que nous avions de l'écologie microbienne en général (Amann *et al.*, 1990), notamment en ce qui concerne la caractérisation des environnements extrêmes et les environnements acides plus particulièrement.

En combinant l'utilisation de techniques propres à la microbiologie classique (cultures d'enrichissement, isolement et caractérisation phénotypique) à celle de techniques dites « moléculaires » (DGGE, FISH ou clonage), il a été possible d'identifier les micro-organismes les plus représentatifs du Bassin du Rio Tinto (González-Toril *et al.*, 2003). Quatre vingt pour cent de la diversité dans la colonne d'eau correspondent à des micro-organismes qui appartiennent à *Leptospirillum ferrooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* et plusieurs autres espèces du genre *Acidiphilium*, qui se singularisent par leur rôle notoire dans le cycle du fer.

Toutes les souches isolées du Río Tinto et affiliées à *L. ferrooxidans* sont des bactéries aérobies capables d'oxyder le fer. En ce qui concerne celles affiliées à *A. ferrooxidans*, elles ont la capacité à la fois d'oxyder et de réduire le fer. Tous les isolats du genre *Acidiphilium*, sont des hétérotrophes pouvant oxyder les composés organiques réduits en utilisant le fer ferrique comme accepteur final d'électrons (respiration anaérobie). Certains de ces isolats peuvent également oxyder ces composés en présence d'oxygène. Bien que d'autres micro-organismes oxydant le fer (*Ferroplasma* spp., *Thermoplasma acidophilum*, *Acidimicrobium* spp. et "*Ferromicrobium*" spp.) ou le réduisant (*Acidimicrobium* spp. and "*Ferromicrobium*" spp.) aient été détectés dans l'écosystème du Tinto, ils semblent être peu représentatifs de la biodiversité indigène de cet environnement et ne seraient donc pas impliqués de manière importante dans le cycle du fer, tout du moins au niveau de la colonne d'eau.

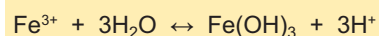
Parmi les bactéries isolées, seule *A. ferrooxidans* intervient dans le cycle du soufre en oxydant les composés réduits soufrés. Cette oxydation peut s'effectuer non seulement en condition aérobie, mais aussi en condition anaérobie. Concernant toujours, le cycle du soufre, une activité liée à la sulfato-réduction (activité essentiellement anaérobie) a été également détectée dans les sédiments à certains endroits de la rivière.

En considérant les caractéristiques géomicrobiologiques du Rio Tinto telles qu'établies ci-dessus, nous ne pouvons que soulever l'importance du fer dans les mécanismes biotiques et abiotiques qui régissent cet environnement extrême (González-Toril *et al.*, 2003). Le fer au niveau de cette niche écologique résulterait de la biolixiviation de la pyrite ou d'autres minéraux sulfurés contenant du fer comme la chalcopyrite, ces deux éléments se retrouvant en fortes concentrations dans la ceinture Pyritique Ibérique qui entoure le Río Tinto. L'activité des procaryotes oxydant le fer serait donc responsable :

- (i) de la solubilisation des minéraux sulfurés,
- (ii) des teneurs élevées en fer ferrique, sulfate et protons dans la colonne d'eau. On sait par ailleurs que le fer ferrique est un oxydant puissant capable d'oxyder directement les minéraux sulfurés.

De leur côté, les micro-organismes soufre-oxydants sont responsables de la production d'acide sulfurique en oxydant le soufre élémentaire résultant d'une attaque chimique des sulfures solubles acides par les polysulfures. La **figure 10-16** présente un modèle géomicrobiologique des différents micro-organismes acidophiles interagissant aussi bien dans le cycle du fer que dans celui du soufre au niveau de l'"écosystème Tinto".

Le fer présente différentes propriétés d'importance écologique qui confèrent des perspectives scientifiques intéressantes, notamment pour l'apport d'une meilleure connaissance du biofonctionnement des environnements acides en général et du Rio Tinto en particulier. En effet, le fer n'est pas seulement une source d'énergie pour les procaryotes ferro-oxydants, il peut également servir d'accepteur d'électrons lors de la respiration anaérobie. Le fer ferrique est également responsable du maintien du pH de l'écosystème.



L'effet dilution de la rivière dû à la pluie ou à l'entrée d'affluents à pH neutre favorise la précipitation de l'hydroxyde ferrique et la génération de protons, qui main-

tiennent aussi l'acidité de la rivière. Bien que cette réaction soit réversible, cet «effet dilution» a plus d'impact que l'évaporation et par voie de conséquence une partie importante du fer reste sous forme précipitée sur les berges de la rivière, donnant ainsi naissance à des bioformations ferreuses. Il en résulte par conséquent une diminution de la concentration en fer soluble d'amont en aval de la rivière. De plus les solutions de fer ferrique absorbent avec une grande efficacité les radiations ultraviolettes, protégeant ainsi les micro-organismes environnants. L'importance de ces phénomènes biotiques et abiotiques en relation avec le cycle du fer est rapportée dans la **figure 10-16**.

Ce scénario qui met en exergue le rôle primordial du fer apparaît comme parfaitement en adéquation avec la présence de procaryotes chimolithotrophes que l'on retrouve dans l'écosystème Tinto ou d'autres environnements acides. Il reste cependant remarquable que dans ces environnements, la diversité des eucaryotes est largement supérieure à la diversité des procaryotes. En effet, la plus grande partie de la production primaire de cet écosystème dérive de l'activité de protistes photosynthétiques. On peut donc supposer que ces eucaryotes savent tirer un certain avantage à se développer dans de telles conditions physico-chimiques extrêmes. Une explication plausible de la présence de leur grande diversité, serait la disponibilité limitée du fer dans des écosystèmes à pH neutre. En effet, alors même que le fer est un élément extrêmement important pour la vie, il reste néanmoins un facteur limitant pour toute croissance à pH neutre. De ce fait, les organismes ont élaboré et développé des mécanismes très spécifiques pour récupérer le fer de l'environnement. Quelle en est finalement la raison, si l'on considère que le fer est un des éléments les plus abondants sur notre planète ? Dans une atmosphère oxydée à pH neutre, le fer soluble est rapidement oxydé en composés insolubles, qui sont alors incorporés dans les sédiments anaérobies. Les bactéries sulfato-réductrices (BSR) peuvent alors intervenir pour les transformer en pyrite, qui est lui peu réactif. Par conséquent, le recyclage géologique de ces sédiments et les phénomènes géomicrobiologiques associés au cycle du fer restent les seuls moyens pour réintroduire cet élément d'importance dans la biosphère. Une des raisons de retrouver une importante diversité de micro-organismes eucaryotes dans le Rio Tinto, pourrait donc être liée essentiellement à la grande disponibilité du fer dans ce type d'habitat.

Ce scénario de faible disponibilité en fer a-t-il été une constante dans l'histoire de la vie sur terre ? Rien n'est moins sûr. En effet, d'après plusieurs auteurs, les

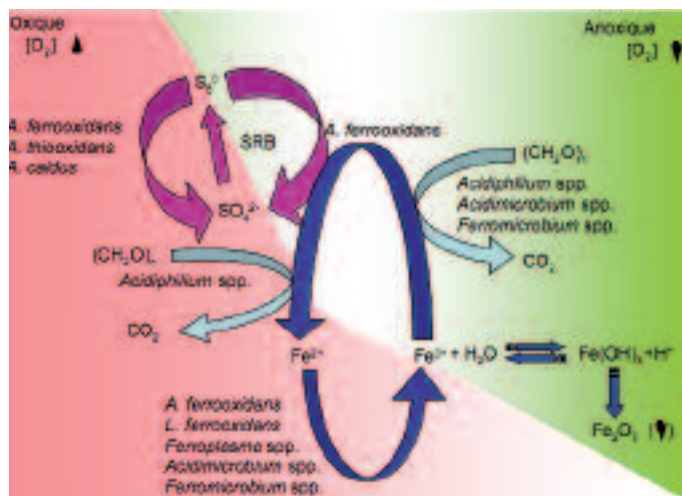


Figure 10-16 : Modèle géomicrobiologique du Rio Tinto et rôle des différents micro-organismes isolés et identifiés dans le Rio Tinto dans les cycles du soufre et du fer.

océans primitifs contenaient d'importantes concentrations en fer soluble et la concentration en oxygène y était très faible. Tenant compte de ces particularités physico-chimiques, il est donc raisonnable de postuler que l'émergence de la vie aurait pu se faire quasiment dans des conditions anaérobies en tirant de l'énergie de processus oxydo-réductifs du fer. En ce qui concerne le cycle du soufre, il n'aurait pas été parfaitement opérationnel durant cette période, mais plutôt au Protérozoïque, période géologique pendant laquelle il y aurait eu une séquestration massive des métaux et une déficience marquée en azote qui auraient eu des conséquences importantes sur l'évolution.

Comme nous pouvons le voir, le rôle joué par le fer dans l'histoire de la terre reste une question d'actualité à laquelle il est toujours difficile de répondre. Il ne subsiste par contre aucun doute sur l'importance réelle des micro-organismes dans la mobilisation de ce métal dans l'environnement. À ce jour, nous ne sommes donc pas sûrs que le Bassin du Tinto ou d'autres écosystèmes similaires soient des reliques de cette période de l'histoire de la vie sur la terre où le fer était facilement accessible. Dans de telles niches écologiques, l'apparition de la vie pourrait être également le résultat d'une adaptation récente des micro-organismes chimolithotrophes à ce type d'environnements capables de maintenir suffisamment de fer en solution pour générer une acidité constante. En ce qui concerne cette adaptation des micro-organismes, des études physiologiques préliminaires conduites sur des protistes photosynthétiques acidophiles suggèrent qu'ils s'intègrent plutôt facilement dans les environne-

ments extrêmement acides. Il en découle que si des systèmes cellulaires plus évolués comme les eucaryotes sont capables de s'adapter à de telles conditions physico-chimiques drastiques, cela ne pose forcément aucun problèmes à ceux qui le sont moins comme les procaryotes. Comme nous venons de le voir, la diversité en eucaryotes du Tinto semble être supérieure à la diversité des procaryotes. Bien que cela puisse être à priori étonnant, il n'en reste pas moins vrai que nous en sommes toujours à une connaissance encore limitée du biofonctionnement des ces environnements extrêmes. En fait, cette diversité procaryotique pourrait être plus importante dans les sédiments anaérobies ou dans l'environnement profond de la ceinture Pyritique Ibérique encore inexplorés. Il ressort de toutes ces observations faites et hypothèses formulées sur la vie dans les milieux acides qu'un certain nombre de questions doivent être clarifiées par la communauté scientifique pour conclure définitivement sur l'origine et le rôle des différents composants de cet habitat singulier.

Au final, l'exploration des environnements « acides extrêmes » de la planète a permis de répondre à quelques questions basiques concernant :

- (i) la biodiversité microbienne occupant ces niches écologiques particulières,
- (ii) le type précis de micro-organismes intervenant activement dans les cycles du fer et du soufre, cycles dont le biofonctionnement est capital pour maintenir la vie en condition acide,
- (iii) la présence inattendue d'une diversité eucaryotique conséquente,
- (iv) la caractérisation des bioformations ferreuses.

Comprendre le fonctionnement de ces écosystèmes est nécessaire pour améliorer notre connaissance des habitats atypiques et tirer des conclusions aussi bien géomicrobiologique, paléontologique, astrobiologique qu'évolutif à l'échelle de la planète. Cela nous permettra également d'améliorer les performances de procédés biotechnologiques, tels que la biolixiviation en milieu minier, ou de rechercher de nouvelles applications industrielles qui mettraient en jeu les micro-organismes acidophiles ou les molécules secrétés par ces derniers.

10.7. LES MICRO-ORGANISMES ALCALIPHILES

10.7.1. INTRODUCTION

Les micro-organismes dont le développement est favorisé par un pH élevé se classent en deux groupes: les micro-organismes alcalitolerants capables de croître à un pH supérieur ou égal à 9, mais dont la croissance est optimale à un pH proche de la neutralité, et les micro-organismes alcaliphiles dont la croissance est optimale à un pH supérieur à 9. Les micro-organismes alcaliphiles peuvent être, à leur tour, subdivisés en deux groupes, les alcaliphiles facultatifs et les alcaliphiles obligés. Le premier groupe de bactéries se développe à un pH supérieur à 9 mais aussi à un pH proche de la neutralité, tandis que le second groupe renferme des bactéries qui ne peuvent pas se développer à des pH inférieurs à 8,5-9.

Certains micro-organismes alcaliphiles sont aussi halophiles (haloalcaliphiles); ils sont capables de se développer en présence de concentration en NaCl pouvant aller jusqu'à la saturation. Les micro-organismes alcaliphiles sont ubiquistes; au contraire des autres micro-organismes extrémophiles que l'on trouve principalement dans les milieux extrêmes correspondants, on rencontre les micro-organismes alcaliphiles dans les milieux ayant un pH élevé mais aussi souvent dans ceux à pH neutre. Il y a peu d'environnements naturellement alcalins sur Terre; les plus remarquables sont les lacs et les déserts sodiques, les sources alcalines, les microniches alcalines telles que certaines parties de l'estomac des termites et les environnements contenant des matières protéiques en cours de décomposition. Il existe aussi des environnements alcalins qui résultent de l'activité humaine comme les déchets de l'industrie alimentaire et d'autres procédés industriels.

Les micro-organismes alcaliphiles font l'objet de multiples travaux en raison des nombreuses applications industrielles que présentent leurs enzymes et pour la nouvelle perspective de diversité microbienne et des mécanismes d'adaptation à ce type particulier de conditions extrêmes.

10.7.2. LES ÉCOSYSTÈMES ALCALINS

L'alcalinité des milieux alcalins naturels est due à la présence de carbonate de sodium en quantités très importantes. Globalement il existe deux types d'environnements alcalins qui diffèrent par leur salinité (NaCl) : les environnements alcalins salés à fortement salés et les environnements alcalins faiblement salés.

Les premiers sont représentés par les lacs sodiques ou natronés ; ils correspondent aux environnements alcalins naturels les plus stables sur la Terre. On les trouve dans des bassins fermés situés dans les zones arides où les vitesses élevées d'évaporation contribuent à la concentration des sels et des carbonates. Ils peuvent avoir une salinité pouvant atteindre 35 % de NaCl et des valeurs de pH comprises entre 8 et 12. Ils sont caractérisés par des concentrations élevées en carbonate de sodium (Na_2CO_3) et de faibles concentrations en ions calcium (Ca^{2+}) et magnésium (Mg^{2+}). Les lacs et les déserts sodiques se trouvent ainsi dans diverses parties du monde, sur le continent américain, en Australie, et en Afrique (**Tableau 10.3.**). En Asie, on rencontre des lacs sodiques en Turquie, en Inde et en Chine, et en Europe, on les rencontre en Hongrie et dans l'ex-Yougoslavie ainsi que dans les pays de l'ex-URSS. Les lacs sodiques les mieux caractérisés sont ceux de la vallée du Rift en Afrique de l'Est. Leur formation résulte de la combinaison de facteurs géologiques, géographiques et climatiques: lessivage des roches environnantes riches en carbonate de sodium par les eaux souterraines et de ruissellement, accumulation dans une dépression et évaporation élevée.

Tableaux 10.3 : Distribution des environnements alcalins naturels (lacs et des déserts sodiques)

AFRIQUE ET MAHGREB	
Libye	Lac Fezzan
Egypte	Wadi Natrum
Ethiopie	Lac Aranguadi, Lac Kilotes, Lac Abiata, Lac Shala, Lac Chilul, Lac Herlate, Lac Metahara
Soudan	Lacs Dariba
Kenya	Lac Bogoria, Lac Nakuru, Lac Elmentita, Lac Magadi, Lac Simbi, Lac Sonachi
Ouganda	Lac Katwe, Lac Mahega, Lac Kikorongo, Lac Nyamunuka, Lac Munyanayange, Lac Murumuli, Lac Nunyampaka
Tanzanie	Lac Natron, Lac Embagi, Lac Magad, Lac Manyara, Lac Balangida, Basotu, Lac Crater, Lac Kusare, Lac Tulusia, El Kekhooito, Lac Momela, Lac Lekandiro, Lac Reshitani, Lac Lgarya, Lac Ndutu, Lac Ruckwa North
Tchad	Lac Bodu, Lac Rombou, Lac Djikare, Lac Momboio, Lac Yoan

AMÉRIQUE DU NORD	
Canada	Manito
Etats-Unis	Alkali valley, Albert Lake, Soap Lake, Big Soda Lake, Owens Lake, Mono Lake, Deep Springs, Rhodes Marsh, Summer Lake, Surprise Lake, Pyramid Lake, Walker Lake

AMÉRIQUE CENTRALE	
Mexique	Lac Texcoco

AMÉRIQUE DU SUD	
Venezuela	Vallée de la Langunilla
Chili	Antofagasta

ASIE	
Asie Centrale	Lacs de Tuva
Turquie	Lac Van
Inde	Lac Looner, Lac Sambhar
Chine	Qinghai Hu, Sui-Yian, Heilungkiang, Kirin, Jehol, Chahar, Shansi, Shensi, Kansu
Tibet	Lac Soda

AUSTRALIE	
	Lac Corangamite, Lac red Rock, Lac Waerowrap, Lac Chidnup

EUROPE	
Hongrie	Lac Fehér
Slovénie	Pecena Slatina
Russie	Steppes de Kulunda, Lacs Tannatar, Karakul, Plaines d'Araxes, Chita, Barnaul, Slavgerod

Leur alcalinité élevée est le résultat d'un déplacement de l'équilibre $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ vers une dominance de CO_3^{2-} à cause de l'absence d'ions Ca^{2+} . En effet, lorsqu'il est présent, le Ca^{2+} diminue l'alcalinité en provoquant la précipitation du CO_3^{2-} en calcite insoluble (CaCO_3). C'est le cas pour les eaux saumâtres qui dérivent de l'eau de mer. Elles présentent généralement des concentrations élevées en Ca^{2+} et elles ont un pH

proche de la neutralité, même lorsqu'elles sont très concentrées car la concentration en ions Ca^{2+} excède toujours celle du CO_3^{2-} . Les environnements alcalins faiblement salés sont plus rares.

Les sources thermales avec un contenu élevé en calcium constituent un autre type de milieu naturel fortement alcalin que l'on trouve en différentes régions du globe : en Californie, Oman, Chypre, en ex-Yougoslavie et en Jordanie. La composition chimique de ces eaux est similaire à celles qui sont produites par les cimenteries. Elles sont le résultat du lessivage, par l'intermédiaire du CO_2 , des minéraux riches en calcium et magnésium, que sont l'olivine et le pyroxène. Leur décomposition libère des ions OH^- et des produits de dégradation qui, avec les ions Mg^{2+} libérés, précipitent pour former de la serpentine et de la chaux éteinte ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). Le pH de ce type d'eaux peut atteindre des valeurs supérieures à 11. Quelques études préliminaires de ces sources font état de faibles populations bactériennes dont la composition est analogue à celles de sols et d'eaux moins alcalins.

Les termites hébergent une grande variété de micro-organismes dans les différents compartiments qui composent leur intestin. Le premier compartiment de l'intestin des termites supérieurs présente un pH très élevé, compris entre 10 et 12, et est très riche en ions K^+ . Cependant, la plupart des bactéries alcaliphiles isolées de l'intestin des termites sont des alcalitolerantes. Des micro-organismes capables de se développer à pH alcalin sont aussi fréquemment isolés du sol. Les processus microbiens du sol, en particulier l'ammonification, peuvent entraîner une alcalinisation localisée du sol. Il est admis que certaines bactéries alcaliphiles, par leur métabolisme, sont capables de modifier localement le pH créant ainsi des microniches alcalines. Dans d'autres cas, c'est l'activité métabolique d'autres micro-organismes qui élève suffisamment le pH pour permettre le développement des alcaliphiles. La majorité des bactéries alcaliphiles isolées de tels environnements non alcalins, sont des bâtonnets sporulés à Gram positif qui appartiennent pour la plupart au genre *Bacillus*. Les autres bactéries alcalitolerantes appartiennent aux genres *Aeromonas*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Paracoccus*, *Pseudomonas* et *Streptomyces*.

Enfin, il existe des environnements alcalins d'origine anthropique. Ils sont associés à l'usage d'alcalis (généralement la soude) dans différents procédés industriels (galvanoplastie, industries alimentaire et papetière) ou dérivés de la production de chaux éteinte ou d'hydroxyde de calcium (cimenterie, hauts fourneaux). Les rares études de microbiologie réalisées montrent que ces environnements sont peuplés par des bactéries al-

calitolerantes et alcaliphiles du même type que celles isolées des environnements non alcalins.

10.7.3. DIVERSITÉ MICROBIENNE DES LACS SODIQUES

Malgré les conditions extrêmes en termes d'alcalinité et de salinité qui règnent dans les lacs sodiques, les différents groupes trophiques composant la microflore sont analogues à ceux composant les communautés microbiennes rencontrées dans des environnements plus traditionnels, excepté qu'ils sont tous alcalitolerants ou alcaliphiles (Grant, 1992). Le **tableau 10.4.** présente l'ensemble des genres bactériens isolés des environnements alcalins. Les communautés haloalcaliphiles les plus étudiées ont été les communautés productrices primaires (cyanobactéries et bactéries pourpres anoxygéniques) et les bactéries fermentaires anaérobies. Les bactéries fermentaires sont principalement représentées par les bactéries à Gram positif de faible G+C %.

Récemment, des bactéries responsables de l'oxydation des composés inorganiques réduits comme le méthane, l'hydrogène, les sulfures et l'ammoniaque produits par les anaérobies haloalcaliphiles dans les sédiments des lacs sodiques ont été identifiées. Cependant, certaines voies métaboliques, possibles sur le plan de la thermodynamique, n'ont encore pas été mises en évidence chez les haloalcaliphiles. En particulier, les micro-organismes utilisateurs de l'acétate comme donneur d'électrons dans les lacs sodiques n'ont pas été identifiés, ni ceux qui pourraient tirer bénéfice de l'utilisation du NO (au lieu de la réduction du nitrite/nitrate) au cours de la dénitrification hétérotrophe.

Tableau 10.4. Principaux genres bactériens renfermant des espèces alcaliphiles facultatives ou obligatoires

DOMAINE BACTERIA

PHYLUM CYANOBACTERIA

Cyanobacteria

Arthrospira, *Spirulina*, *Anabaenopsis*, *Cyanospira*

PHYLUM ACTINOBACTERIA

Actinomycetales

Cellulomonadaceae

Cellulomonas

Dietziaceae

Dietzia

Micrococcaceae

Arthrobacter, *Nesterenkonia*

Bogoriellaceae

Bogoriella

PHYLUM BACTEROIDETES

Bacteroidales
Rikenellaceae
Alkaliflexus (tolérance O₂)

Sphingobacteria

Sphingobacteriales
Flexibacteraceae
Rhodonellum

PHYLUM FIRMICUTES

Bacilli

Bacillales
Bacillaceae
Bacillus, *Anoxybacillus*, *Amphibacillus*, *Alkalibacillus*, *Caldakalibacillus*, *Exiguobacterium*, *Oceanobacillus*, *Paenibacillus*, *Natronobacillus*

Staphylococcaceae
Salinicoccus

Lactobacillales
Carnobacteriaceae
Alkalibacterium, *Carnobacterium*, *Marinilactibacillus*

Clostridia

Clostridiales
Eubacteriaceae
Alkalibacter
Clostridiaceae
Clostridium (cluster XI), *Alkaliphilus*, *Anoxynatronum*, *Natronincola*, *Tindallia*

Syntrophomonadaceae
Anaerobranca, *Dethiobacter*
Heliobacteriaceae
Heliorestis

Natranaerobiales
Natranaerobiaceae
Natranaerobius

Halanaerobiales
Halanaerobiaceae
Natroniella
Halobacteroidaceae
Halonatronum

PHYLUM PROTEOBACTERIA

Alphaproteobacteria

Rhizobiales
Nitrobacteraceae
Nitrobacter

Rhodobacterales
Rhodobacteraceae
Rhodobaca, *Roseinatronobacter*

Betaproteobacteria

Nitrosomonadales
Nitrosomonadaceae
Nitrosomonas

Deltaproteobacteria

Desulfobacterales

Desulfobulbaceae
Desulfurivibrio

Desulfovibrionales

Desulfohalobiaceae
Desulfonatronospira
Desulfonatronaceae
Desulfonatronovibrio, *Desulfonatronum*, *Desulfotomaculum*

Desulfuromonadales

Geobacteraceae
Geoalkalibacter

Gammaproteobacteria

Chromatiales

Ectothiorhodospiraceae
Alkalilimnicola, *Alkalispirillum*, *Thiorhodospira*, *Thioalkalispira*, *Thioalkalivibrio*, *Ectothiorhodospira*, *Halorhodospira*

Chromatiaceae
Thioalkalicoccus

Methylococcales

Methylococcaceae
Methylomicrobium (*Methylobacterium*)

Oceanospirillales

Oceanospirillaceae
Marinospirillum
Halomonadaceae
Halomonas

Pseudomonadales

Pseudomonadaceae
Pseudomonas

Thiotrichales

Piscirickettsiaceae
Methylophaga, *Thioalkalimicrobium*

Alteromonadales

Alteromonadaceae
Nitrocola, *Salinimonas*

Vibrionales

Vibrionaceae
Salinivibrio

Gammaproteobacteria non classée

Alkalimonas

PHYLUM SPIROCHAETES

Spirochaetes

Spirochaetales
Spirochaetaceae
Spirochaeta

DOMAINE ARCHAEA

PHYLUM EURYARCHAEOTA

Halobacteria

Halobacteriales
Halobacteriaceae
Natrialba, *Natrinema*, *Natronobacterium*, *Natronomonas*, *Na-*

tronorubrum, *Natronolimnobius*,
Natronococcus, *Halorubrobac-*
terium (*Halorubrum*)
Methanobacteria
 Methanobacteriales
 Methanobacteriaceae
 Methanobacterium
Methanomicrobia
 Methanosarcinales
 Methanosarcinaceae
 Methanosalsum, *Methanohalo-*
 philus

Producteurs phototrophes primaires

Une constante remarquable de la plupart des lacs sodiques est leur couleur. Selon la chimie de leur eau, ils peuvent être vert, rose, rouge ou orange, en raison de leur abondance permanente ou saisonnière en micro-organismes. Cela est le reflet d'une production carbonée primaire extrêmement élevée, plus de 10 g de C m⁻² j⁻¹. En effet, les lacs sodiques sont localisés, pour la plupart, dans des régions du monde qui bénéficient d'un fort ensoleillement et où la température est élevée (30-35 °C). La disponibilité en phosphate et la disponibilité quasi-illimitée du CO₂ dans ces eaux riches en carbonate favorisent aussi la photosynthèse. Les principaux producteurs de matière organique dans les lacs sodiques sont des micro-organismes procaryotes : les cyanobactéries et les bactéries phototrophes anaérobies appelées aussi bactéries pourpres.

Les cyanobactéries dominantes ont été peu étudiées, mais des cyanobactéries filamenteuses (*Cyanospira*) et unicellulaires (*Chroococcus* et *Pleurocapsa*) ont été décrites. Dans certains lacs sodiques, les tapis algaires sont constitués essentiellement par des cyanobactéries filamenteuses des genres *Spirulina*, *Anabaenopsis* et *Arthrospira*. Ces cyanobactéries sont aussi impliquées dans la fixation de l'azote atmosphérique.

Les lacs faiblement alcalins sont généralement dominés par de gros amas de cyanobactéries tandis que les lacs hyperalcalins comme le lac Magadi renferment à la fois des cyanobactéries et des bactéries anoxygéniques phototrophes appartenant aux genres *Ectothiorhodospira* et *Halorhodospira*. La productivité primaire de ces bactéries phototrophes haloalcaliphiles est vraisemblablement à l'origine de tous les processus biologiques dans les lacs sodiques. Vers le milieu des années 1990, de nouvelles bactéries anoxygéniques phototrophes ont été isolées de lacs sodiques. Ces bactéries incluent non seulement des bactéries pourpres mais aussi des Héliobactéries (Clostridies). Ces dernières diffèrent des espèces haloalcaliphiles

telles que *Halorhodospira*, à la fois sur le plan de la phylogénie et sur celui de la physiologie, en particulier elles ne nécessitent pas ou peu de NaCl pour leur croissance. Ces isolats sont très alcaliphiles. Plusieurs de ces nouveaux isolats sont à l'origine de nouveaux genres: *Rhodobaca*, *Thiorhodospira* et *Thioalkalicoccus* (toutes des bactéries pourpres) et *Heliorestis* (Héliobactérie). *Rhodobaca* présente un intérêt particulier car elle est dépourvue d'antenne périphérique collectrice de lumière de type II, propriété originale chez les bactéries pourpres non sulfureuses, et parce qu'elle synthétise plusieurs caroténoïdes originaux responsables de la couleur jaune des cultures de ce micro-organisme phototrophe.

Les lacs sodiques hautement salés (NaCl compris entre 20 % et la saturation) ont une microflore primaire différente. Les cyanobactéries sont absentes et ce sont les *Ectothiorhodospira* qui sont responsables de la production primaire. Les micro-organismes dominants sont des archées haloalcaliphiles, leur population peut atteindre 10⁷ à 10⁸ bactéries par ml. Les archées haloalcaliphiles sont classées en deux genres : *Natronobacterium* et *Natronococcus*, qui renferment chacun 3 espèces.

Microflore alcaliphile aérobie

Bien que les environnements alcalins soient le plus souvent peu profonds et limités en oxygène (eutrophisés), ils présentent des populations très denses de bactéries organotrophes aérobies non photosynthétiques qui utilisent les produits de la photosynthèse aussi bien que les produits de la dégradation anaérobie. Relativement peu d'isolats ont été caractérisés et déposés dans des collections publiques de micro-organismes. Cependant, il semble que la majorité des bactéries à Gram négatif isolées appartient aux gammaprotéobactéries et comprend de nombreux micro-organismes protéolytiques apparentés au genre *Halomonas*. Des isolats protéolytiques à Gram négatif ont été affiliés aux genres *Pseudomonas* sensu stricto et *Stenotrophomonas*, tandis que d'autres souches étaient apparentées aux bactéries aquatiques typiques telles qu'*Aeromonas*, *Vibrio* et *Alteromonas*. De récentes études sur les populations bactériennes des lacs sodiques sibériens peu salés et quelques lacs de la vallée du Rift au Kenya ont révélé la présence de bactéries aérobies chimiolithotrophes sulfo-oxydantes des genres *Thioalkalimicrobium*, *Thioalkalivibrio* et *Thioalkalispira* appartenant aux Gamma Protéobactéries. Plus récemment, une nouvelle bactérie hétérotrophe aérobie, *Alkalilimnicola halodurans*, de la famille *Ectothiorhodospirillaceae*, a été isolée des sédiments du lac Natron. De plus, plusieurs bactéries alcaliphiles mé-

thanotrophes de la famille des *Methylococcaceae* ont été isolées de plusieurs lacs alcalins modérément salés d'Asie Centrale et du Kenya, parmi lesquelles *Methylobacterium alcaliphilum*, *Methylobacterium buryatense* et *Methylobacterium kenyense*. Cette dernière espèce, dont la souche type est la souche AMO1, possède des propriétés originales puisqu'elle est capable d'oxyder l'ammoniaque en nitrite à pH 10-10,5, et d'oxyder aussi des composés organiques soufrés à pH élevé.

Des bactéries chimio-lithotrophes oxydant le nitrite (*Nitrobacter alkalicus*) appartenant aux alphaprotéobactéries ont été isolées de lacs sodiques. Ces bactéries nitrifiantes jouent un rôle important dans le cycle de l'azote en convertissant les composés inorganiques azotés en nitrate.

Des souches aérobies à Gram positif des phyla à fort et à faible % G+C ont été décrites. Les isolats à faible % G+C sont principalement apparentés au genre *Bacillus* tandis que les isolats à fort % G+C ont été affiliés aux genres *Dietzia*, *Arthrobacter* et *Terrabacter*. Plusieurs espèces de *Bacillus* ont été récemment reclassifiées dans des genres nouveaux apparentés au genre *Bacillus*, dont certains, *Anoxybacillus*, *Natronobacillus* et *Oceanobacillus*, renferment des espèces alcaliphiles. *Natronobacillus* est une espèce capable de fixer l'azote atmosphérique.

Les genres *Alkalispirillum* et *Alkalilimnicola* ont été originellement décrits comme des micro-organismes hétérotrophes aérobies non-photosynthétiques avec une tolérance remarquable à l'alcalinité. Bien que la possibilité de croissance anaérobie avec le nitrate ait été brièvement mentionnée pour *Alkalilimnicola*, le potentiel de dénitrification n'a pas été étudié en détail, ni la capacité de croissance en litho-autotrophie. Une étude du cycle de l'arsenic dans le lac Mono en Californie a mis en évidence un nouveau métabolisme chimiolithoautotrophe avec l'arsenic comme seul donneur d'électrons et le nitrate comme accepteur d'électrons. Durant ce processus, l'arsénite est oxydé en arsénate avec la réduction simultanée du nitrate en nitrite. La bactérie responsable de cette réaction est la souche MLHE-1. Elle a été isolée en culture pure et caractérisée comme un nouveau membre du groupe *Alkalispirillum-Alkalilimnicola*. De plus, cette bactérie est aussi capable de se développer, en litho-autotrophie avec le sulfure et l'hydrogène comme donneurs d'électrons et le nitrate comme accepteur d'électrons, et également en hétérotrophie en utilisant l'acétate en conditions aérobie et dénitrifiante. Ce travail a mis en évidence une versatilité métabolique remarquable, non décrite dans ce groupe de gammaprotéobactéries haloalcaliphiles.

Le criblage de nombreux lacs alcalins à forte salinité de différentes origines géographiques a montré que les archées haloalcaliphiles de la famille des *Haloacteriaceae*, connues aussi sous le nom générique d'« halobactéries » ou d'« haloarchaea », étaient toujours présentes dans de tels environnements. Ces micro-organismes sont les plus halophiles que l'on connaisse. Ils constituent la microflore dominante lorsque les conditions de salinité approchent de la saturation et ils sont responsables de la coloration rouge des eaux à cause de leur teneur en caroténoïdes. Les lacs sodiques supportent des amas denses des espèces alcaliphiles des genres *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronomonas*, *Natrialba*, *Natronrubrum* et *Halorubrum*.

Microflore alcaliphile anaérobie

Par rapport aux environnements aérobies, les environnements haloalcalins anaérobies ont été peu étudiés. Un des processus biologiques qui prédominent dans les lacs sodiques est la sulfato-réduction. Elle est responsable, non seulement de l'étape finale de la dégradation de la matière organique mais aussi, en partie, des conditions qui génèrent l'alcalinité du milieu comme le résultat de la transformation du sulfate en sulfure. La première bactérie sulfato-réductrice alcaliphile, *Desulfonatronovibrio hydrogenovorans*, un membre des deltaprotéobactéries, a été isolée du lac Magadi, lac sodique hypersalé. Cette espèce a été également trouvée dans les lacs sodiques de la région de Tuva en Asie Centrale, ce qui a poussé certains auteurs à proposer que cette espèce pourrait jouer un rôle universel d'accepteur final d'hydrogène dans les communautés anaérobies alcaliphiles productrices de sulfures. Un autre sulfato-réducteur des deltaprotéobactéries, *Desulfonatronum lacustre*, a été isolé d'un lac alcalin oligotrophe, le lac Khadyn (Tuva). Ces deux genres renferment des espèces de BSR à Gram négatif, mésophiles et non sporulantes, nécessitant la présence de carbonate, et qui sont incapables de se développer à des valeurs de pH inférieures à 8. Un sulfato-réducteur alcaliphile sporulé et modérément thermophile, *Desulfotomaculum alkaliphilum*, a été isolé de lisier de porcs à pH neutre, montrant que l'adaptation des micro-organismes aux environnements alcalins n'est pas la conséquence de modifications génétiques profondes, et que des micro-écosystèmes ayant un pH et une température élevés peuvent être créés localement dans des substrats composites comme le sol ou le lisier par ces micro-organismes.

Il n'y a aucun doute que la méthanogénèse intervient dans les lacs sodiques. À ce jour, les archées méthanogènes isolées des lacs sodiques sont majori-

tairement des méthylotrophes qui utilisent des composés à un atome de carbone, le méthanol ou la méthylamine. Les composés en C1 sont abondants dans les lacs sodiques, ils ont vraisemblablement pour origine la dégradation anaérobie des tapis de cyanobactéries. Les archées méthanogènes méthylotrophes isolées de plusieurs lacs sodiques avec des concentrations en sel proches de la saturation appartiennent aux genres *Methanosalsus* et *Methanohalophilus*, famille des *Methanosarcinaceae* (*Euryarchaeota*). Des archées méthanogènes hydrogénotrophes du genre *Methanobacterium* ont été également mises en évidence dans plusieurs lacs sodiques. Cependant, ces micro-organismes semblent être alcalitolerants plutôt que des alcaliphiles vrais. D'une manière générale, les études des méthanogènes alcaliphiles des sédiments lacustres à pH élevés montrent que, dans des conditions de faible salinité, la méthanogénèse à partir de H_2/CO_2 augmente tandis que dans des conditions de salinité élevée, c'est la méthanogénèse à partir des méthylamines qui prédomine.

L'acétogénèse (*Natroniella acetigena*) et la réduction des nitrates (*Halomonas campisalis*, *Thioalkalivibrio nitratireducens*) sont des activités métaboliques déjà détectées dans les environnements alcalins. *Natroniella acetigena* est une bactérie halo-alcaline proche des *Halobacteroidaceae* (ordre des *Halanaerobiales*) dans le groupe des bactéries à Gram positif. Plus récemment, *Halonatronum saccharophilum*, un représentant modérément halo-alcaliphile chimio-organotrophe de l'ordre des *Halanaerobiales* a été isolé à partir de sédiments du lac Magadi.

Des micro-organismes fermentant les acides aminés appelés ammonifieurs acétogènes ont été isolés des lacs sodiques. Les deux espèces, *Natronincola histidinovorans* et la bactérie non sporulante *Tindallia magadiensis* ont été isolées également du lac Magadi et sont phylogénétiquement proches du groupe XI du taxon des *Clostridium*. Un certain nombre de clostridies alcaliphiles saccharolytiques ont été isolées des lacs Elmenteita, Bogoria et Magadi. Les isolats des lacs Elmenteita et Bogoria sont proches des membres du groupe XI des *Clostridia*, tandis que les souches haloalcaliphiles du lac Magadi sont phylogénétiquement proches des membres du genre *Moorella* (groupe VI des *Clostridium*).

10.7.4. HOMÉOSTASIE DU PH

Les bactéries alcaliphiles sont également intéressantes pour le problème de bioénergétique que pose leur croissance dans un milieu où le pH est très élevé. Ces bactéries semblent avoir développé, au cours de

leur évolution, des mécanismes d'adaptation pour prévenir l'alcalinisation de leur cytoplasme. Dans la membrane cellulaire, il existe des mécanismes de régulation du transport des ions à travers celle-ci qui, dans les conditions normales, maintiennent le pH cytoplasmique dans une fourchette assez étroite autour de la neutralité (1 à 2 unités), même lorsque le pH extracellulaire varie de façon importante; ces mécanismes sont connus sous le terme d'homéostasie du pH.

Les micro-organismes alcaliphiles qui se développent abondamment à un pH supérieur à 9 exigent la présence d'ions Na^+ dans le milieu environnant pour le transport effectif des solutés à travers la membrane cytoplasmique. Des études chez des *Bacillus* alcaliphiles ont montré qu'un gradient de Na^+ permettait d'obtenir l'énergie nécessaire aux phénomènes de transport et de mobilité, et qu'une force proton-motrice engendrait la synthèse d'ATP à partir de la respiration. D'après la théorie chimio-osmotique, la force proton-motrice dans les cellules est générée par la chaîne des transporteurs d'électrons ou par l'excrétion des protons dérivés du métabolisme de l'ATP par l'ATPase. Les protons sont ensuite réincorporés dans les cellules par co-transport avec d'autres substrats. Dans les systèmes de transport Na^+ -dépendants, les protons sont échangés avec Na^+ par un antiporteur H^+/Na^+ , générant ainsi une force sodium motrice qui achemine les substrats avec les ions Na^+ dans les cellules. L'exigence spécifique en Na^+ des bactéries alcaliphiles requiert une voie efficace de réintroduction des ions Na^+ dans la cellule pour que l'antiporteur continue de fonctionner. Au moins deux mécanismes sont importants, les symporteurs Na^+ /solutés et les canaux à sodium. Le fonctionnement précis de ces processus demeure un aspect intéressant des travaux menés sur les bactéries alcaliphiles.

10.7.5. APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES DES MICRO-ORGANISMES ALCALIPHILES

Les communautés microbiennes des milieux alcalins naturels comme les lacs sodiques ont, depuis longtemps, attiré l'attention des industriels en raison des nombreuses possibles utilisations de leurs enzymes ou de leurs métabolites dans les procédés industriels. Les micro-organismes alcaliphiles ont un intérêt commercial pour la production d'enzymes comme les protéases alcalines couramment utilisées dans les poudres de lessives biologiques et dans l'industrie du cuir. L'industrie de l'amidon emploie les cyclodextrine glucanotransférases alcalines pour l'obtention de cyclodextrines à partir d'amidon en vue de son utilisation en cosmétologie, en pharmacologie, en chimie et dans

l'alimentation. Les amylases et les xylanases alcalines ont aussi de nombreuses applications dans l'industrie du papier. Les études des enzymes alcalines se sont essentiellement concentrées sur les micro-organismes les plus couramment observés dans les environnements naturels et pour lesquels l'isolement est aisé. Ainsi, de nombreuses espèces de *Bacillus* alcaliphiles ont été isolées en grande partie grâce au travail de Horikoshi et ses collaborateurs (1996).

Le potentiel biotechnologique de certaines archées a aussi été évalué. Leur chimie est différente de celle des bactéries; ils contiennent, entre autre, des lipides dont la configuration stéréochimique est très différente de celle des bactéries. L'archée halo-alcaliphile *Natrococcus* strain Ah-36 synthétise une amylase extracellulaire qui produit du maltotriose. Le gène de cette enzyme a été cloné et exprimé dans *Haloferax volcanii*. La plus grande partie des micro-organismes haloalcaliphiles renferme des pigments impliqués dans la translocation des ions à travers la membrane cellulaire. La bactériorhodopsine, comme pompe à protons fonctionnant grâce à l'énergie lumineuse, et l'halorhodopsine, en tant que pompe permettant l'entrée des chlorures dans la cellule, ouvrent des perspectives biotechnologiques du plus grand intérêt pour l'utilisation des ces molécules dans différentes applications, comme l'holographie et le stockage de l'information. Sans oublier la production de biomasse de *Spirulina* comme source de protéines ; elle est toujours utilisée en Afrique et dans d'autres régions du monde ; elle constituait même, au Moyen-Âge, un élément majeur de la ration alimentaire des Aztèques et de certaines ethnies en Afrique et l'ESA envisage son utilisation pour le recyclage de la matière organique dans les vols spatiaux de longue durée.

10.7.6. CONCLUSION

En résumé, malgré des conditions apparemment inhospitalières à cause de conditions alcalines extrêmes, et souvent de salinité élevée, les lacs sodiques renferment de nombreux micro-organismes représentant les principaux groupes phylogénétiques et trophiques des bactéries et des archées : cyanobactéries, fermentaires, halophiles aérobies et anaérobies, bactéries à Gram positif à faible et à % de G + C élevé, Protéobactéries, nitrato- et sulfato-réducteurs, archées méthanogènes et halophiles. Les cycles élémentaires du carbone, de l'azote et du soufre sont particulièrement actifs dans les lacs sodiques. Bien qu'au cours des dernières années, les études des environnements alcalins se soient considérablement développées, la diversité microbienne et la structure des communau-

tés qui s'y développent ainsi que le rôle joué par certaines espèces en particulier, ne sont pas entièrement élucidés. Au cours des prochaines années, notre connaissance de la distribution et de la diversité taxonomique des bactéries alcaliphiles sera sans doute augmentée avec l'isolement et la caractérisation de nouvelles espèces, mais aussi par les résultats de l'analyse des séquences génomiques directement obtenues à partir des environnements alcalins.

10.8. EXTREMOPHILES ET EXO BIOLOGIE

L'Exobiologie (les anglo-saxons préfèrent le terme d'astrobiologie) a été définie par le Prix Nobel Joshua Lederberg comme la science étudiant la Vie, son origine, son évolution et sa distribution sur Terre et dans l'Univers. Sujet qui existe sans doute sans être nommé depuis le début de l'humanité, sujet complexe car ceux qui l'étudient (les Humains) ne disposent comme références sur la Vie que celles qu'ils ont eux mêmes établies en étudiant la Vie sur la planète Terre.

Il ne fait aucun doute que la Planète Terre, formée par accréation il y a plus de 4,5 milliards d'années était à son origine beaucoup plus hostile qu'aujourd'hui. En particulier la température était trop élevée pour que de l'eau liquide y demeure : or l'eau liquide est indispensable à la Vie (telle que nous la connaissons). 100 à 200 millions d'années plus tard, de l'eau liquide existe à la surface de la Terre ; la température est encore très élevée, le volcanisme actif, des « objets » énormes frappent la surface de la Terre (l'impact d'un corps de la taille de Mars dans les 100 premiers millions d'années est à l'origine de la Lune) jusqu'à environ 3,8 Milliards d'années.

Un milliard d'années après l'accréation, il semble que la Vie se soit mise en place car l'analyse de roches anciennes où des fossiles attribués à des formes de vie ancestrales vraisemblablement anaérobies ont été découverts. Encore un peu plus d'un milliard d'années et l'oxygène apparaît dans l'atmosphère, suivis encore un milliard d'années plus tard par les premiers Eucaryotes (cf. Chapitre 3).

La découverte récente des extrémophiles, notamment celle des hyperthermophiles (ces 20-30 dernières années) a profondément modifié notre perception de la Vie Terrestre. La Vie n'était pas seulement cantonnée dans les environnements convenant

à l'Homme, aux animaux et plantes ; elle foisonnait (certes essentiellement par des formes microscopiques et procaryotiques) dans des endroits de la Terre où l'Homme ne peut s'aventurer sans protection ou sans l'intermédiaire d'une technologie complexe.

Les connaissances sur la Terre primitive révélant des caractéristiques physicochimiques extrêmes, il y avait tout lieu d'imaginer que les extrémophiles actuels pouvaient être les descendants des premiers « habitants » de la Terre. Cette hypothèse est particulièrement tentante si l'on regarde l'arbre phylogénétique du vivant basé sur l'analyse des gènes codant l'ARNr 16S, où l'on voit que les branches les plus anciennes, tant chez les bactéries que les archées correspondent à des organismes hyperthermophiles. Cette hypothèse fut sévèrement et sérieusement critiquée, mais il faut bien avouer que le problème n'est pas résolu quant aux températures (basses ou hautes) ayant permis l'origine de la Vie.

Tout autant que les valeurs (très faibles ou très fortes) des paramètres physico-chimiques auxquelles sont confrontées les extrémophiles, l'étude de leurs métabolismes présente un grand intérêt fondamental et industriel. Un certain nombre utilise du carbone organique comme source d'énergie au cours de diverses fermentations. Mais de nombreux extrémophiles sont des lithotrophes (leur source d'énergie est minérale), anaérobies (leur accepteur d'électrons n'est pas l'oxygène moléculaire) et autotrophes (leur source de carbone est le dioxyde de carbone). En fait, de nombreux organismes extrémophiles, et il faut le souligner de nombreux thermophiles, se complaisent dans des conditions nutritionnelles ressemblant à celles qui devaient exister sur la Terre primitive. Certains d'entre eux, qui vivent en subsurface, semblent indépendants de l'énergie solaire, et des produits dérivés de la photosynthèse : c'est ce qui se passait il y a plus de 2,5 milliards d'années. L'étude des extrémophiles actuels, et de leurs habitats, ne peut donc que nous aider à comprendre nos origines lointaines. Mais attention, la totalité de la planète Terre, sa diversité biologique (en danger en surface) sont loin d'être totalement explorés en profondeur.

Il y a plusieurs siècles, le moine italien Giordano Bruno fut brûlé pour avoir osé dire que d'innombrables planètes tournaient autour de leur soleil comme nos 7 (c'était le chiffre de l'époque) planètes tournaient autour de notre soleil, et que de nombreux êtres vivants s'y trouvaient. Aujourd'hui, la sonde de la NASA Phoenix explore la planète Mars et fore la glace polaire, la

sonde européenne Exomars se prépare elle aussi pour forer la planète rouge, et un satellite sophistiqué devrait partir vers les lunes de Jupiter dans moins de dix ans pour enfin prouver l'existence d'un océan d'eau liquide sous la croûte de glace d'Europa.

De l'eau sur Mars, il y en avait à l'époque où la Vie est apparue sur Terre. Que s'est-il passé alors ? La Vie a-t-elle pu démarrer ? Subsiste-t-elle encore en profondeur, en subsurface ? Ou à défaut, reste-t-il des traces fossiles ? Après les sondes automatiques qui effectuent des analyses in situ, d'autres sondes ramèneront sur Terre des échantillons martiens, qui après une quarantaine rigoureuse seront analysés par les meilleurs experts mondiaux. Un peu plus tard, l'Homme débarquera sans doute sur la planète rouge. Du rêve ? Consultez les sites des agences spatiales !

De l'eau liquide sous la glace d'Europa ? Pourquoi ? Sans doute l'effet de marée dû à la planète mère géante Jupiter, et au fond de cet océan, un noyau de silicates. Donc un contact entre roches et eau : pourquoi pas une circulation hydrothermale, et alors... Pour Europa, la réponse aux questions des exobiologistes n'est pas immédiate. Après une mission d'observation orbitale, il faudra se poser à la surface d'un satellite dépourvu d'atmosphère. Puis dans une autre mission, il faudra forer la glace, épaisse sans doute d'une centaine de kilomètres... Et chaque voyage de la Terre vers Jupiter dure de 5 à 6 ans. Mais sur Terre, dans l'Antarctique, existent des analogues tels le lac Vostok, situé sous 3,5 kilomètres de glacier. Les forages dans cette glace ont révélé des micro-organismes, dont certains thermophiles, indicateurs d'une activité géothermale en profondeur.

Ce n'est pas fini, sortons du système solaire. C'est plus d'une centaine de planètes extra solaires (tournant autour d'étoiles lointaines) qui ont été découvertes. Les plus récemment observées ont des masses équivalentes à quelques Terres. Et les techniques de détection vont prochainement permettre de détecter des planètes d'une masse équivalente à la Terre, situées dans la zone d'habitabilité (possibilité d'eau liquide, températures convenables), et d'en étudier l'atmosphère.

Pour toutes ces « cibles » exobiologiques, dans le système solaire ou à l'extérieur, les exobiologistes, planétologues, astrophysiciens recherchent des traces, des indices, des signatures de Vie. Les propriétés, les capacités extraordinaires des extrémophiles terrestres repoussent les limites physico-chimiques, métabo-

liques, géographiques de la Vie. Les habitats plausibles, possibles n'en sont que plus nombreux. Les technologies permettant l'exploration deviennent de plus en plus performantes. Le XXI^e siècle apportera-t-il la réponse ?

PUBLICATIONS

- Barbier, G. (1997) Les micro-organismes "extremophiles": une nouvelle sources d'enzymes en cours d'exploration. In *Les enzymes en agroalimentaire*. Larreta-Garde, V. (ed). Paris: Tec et Doc Lavoisier, pp. 308-347.
- Cita, M.B. (2006). Exhumation of Messinian evaporites in the deep-sea and creation of deep anoxic brine-filled collapsed basins. *Sedimentary Geology* 188-189: 357-378.
- Daffonchio, D. et al. (2006). Stratified prokaryote network in the oxic-anoxic transition of a deep-sea halocline. *Nature*. **440**: 203-207.
- D'Amico, S., Collins, T., Marx, J.C., Feller, G., and Gerday, C. (2006) Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep* **7**: 385-389.
- Erauso, G., Prieur, D., Godfroy, A., and Raguénès, G. (1995) Plate cultivation techniques for strictly anaerobic, thermophilic, sulfur-metabolizing archae. In *Archaea: a laboratory manual*. *Thermophiles*. Robb, F.T., and Place, A.R. (eds): Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 25-29.
- Godfroy, A., Postec, A., and Raven, N. (2006) Growth of hyperthermophilic microorganisms for physiological and nutritional studies. In *Methods in Microbiology, Extremophiles*. Rainey, F.A., and Oren, A. (eds). Oxford, England: Academic Press.
- Grant, W.D. (1992) Alkaline environments in *Encyclopedia of Microbiology*, Vol. 2 (ed. J. Lederberg), pp. 73-84, Academic Press, NewYork.
- Hébraud, M., and Potier, P. (2000) Cold acclimation and cold shock response in psychrotrophic bacteria. In *Cold shock response and adaptation*. Inouye, M., and Yamanaka, K. (eds). Norfolk: Horizon Scientific Press, pp. 41-60.
- Horikoshi, K. (1996). Alkaliphiles – from an industrial point of view. *FEMS Microbiol Rev.* **18**: 259–270.
- Jones, E.J., Grant, W. D., Duckworth, A. W. & Owenson, G.G. (1998). Microbial diversity of soda lakes. *Extremophiles* **2**: 191–200.
- Larsen, H. (1962). Halophilism, In : I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier (ed.), *The bacteria*, vol. 4 Academic Press, Inc., New York. p. 297-342.
- Litchfield CD (2004) Microbial molecular and physiological diversity in hypersaline environments, In A. Ventosa (ed.), *Halophilic Microorganisms*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 49-58
- Madigan, M., and Martinko, J. (2007) *Brock Biologie des micro-organismes*: Pearson Education, France
- Morita R.Y. (1975) Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev* **39**: 144-167.
- Ollivier, B., Caumette, P., Garcia, J.L., and R A Mah. (1994) Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol Rev.* **58(1)**: 27–38.
- Oren, A. (2002). Halophilic microorganisms and their environments. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Price, P.B. (2007) Microbial life in glacial ice and implications for a cold origin of life. *FEMS Microbiol Ecol.* **59**: 217-231.
- Sass, A.M., Sass, H., Coolen, M.J.L., Cypionka H. & Overmann, J. (2001). Microbial communities in the chemocline of hypersaline deep-sea basin (Urania Basin, Mediterranean Sea). *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5392-5402.
- Van Der Wielen, P.W.J.J. et al. (2005). The enigma of prokaryotic life in deep hypersaline anoxic basins. *Science*. **307**: 121-123.
- Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4576-4579

