

La biosphère souterraine

Présents et actifs jusqu'à plusieurs milliers de mètres de profondeur et tant que la température le permet

- Cavités souterraines et aquifères profonds
- Sédiments profonds
- Sous sol océanique et continental (roches ignées, dépôts salifères, ...)
- Réservoirs d'huile et pétrole

- 5300 m : aquifères des roches ignées (forage de Gravenberg : 65-75°C)

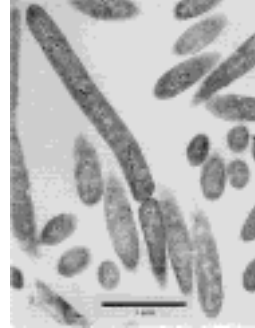
- 2800 m de profondeur dans des roches continentales sédimentaires (Taylorsville Basin, Virginia)

halotolérant, thermophile (76°C), barophile (32 Mpa), Fe(III) et SO₄⁻ réductrices



Pedersen, Göteborg University
Etang (100m de profondeur) avec croissance de bactéries ferroxydantes

Bacillus infernus



La biosphère profonde : un habitat important pour les micro-organismes

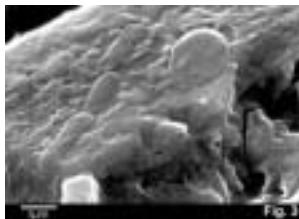
Habitats souterrain à partir de:
8 m de profondeur pour les habitats terrestres
10 cm pour les sédiments marins

Communautés mises en évidence par l'emploi des techniques moléculaires

Problème d'accèsibilité:
exploration favorisée lors de l'étude des affleurements, des excavations dans la surface, l'exploitation du pétrole, les carottes de forage, les matériaux des sites miniers profonds

Motivations des études de la biosphère profonde

- activité microbienne en champ pétrolier impacte sur l'extraction de l'huile
- ★ corrosion des infrastructures
- ✦ récupération assistée
- contamination des nappes phréatiques (sites de stockage, épanchements accidentels, fuite, activité humaine, ...)
- ✦ bioremédiation par microorganismes autochtones ou allochtones
- stockage souterrain de déchets radioactifs ou métaux lourds
- ★ risques de fuite liés à l'activité microbienne
- Réservoirs énormes d'énergie constitués par les fluides riches en méthane expulsés au niveau des suintements froids (cold seeps) ou volcans de boues dans les zones de compression tectonique où la sédimentation est rapide
- ✦ méthane biogénique produit en profondeur
- Origine de la vie profonde au voisinage de sites hydrothermaux sous marins, recherche de vie extraterrestre
- Diversité très grande donc métabolisme potentiels à exploiter

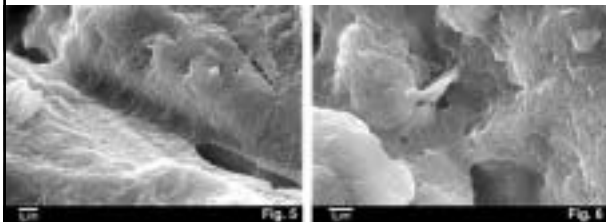


Biofilms

*Réservoirs gréseux à hydrocarbures
(700 m)*

⇒ Mise à profit des communautés endémiques pour la récupération assistée de pétrole à l'échelle du réservoir

(augmentation de la porosité et de la perméabilité par injection de nutriments contenant P et N stimulant la croissance bactérienne)



Hughes Eastern Corp.'s North Blowhorn Creek Unit (NBCU), Lamar County, Ala

La biomasse profonde

- dépend des sites étudiés
- 10^3 à 10^8 individus par ml d'eau ou gramme de sédiment
= 1-10 μg de matière organique sèche
- biomasse conséquente si intégré sur tout le volume de croûte océanique et continentale (sédiments, aquifères, ...)

Global carbon content in plant and prokaryotic biomass

Ecosystem	Carbon content, 10^{12} kg of C		
	plant	soil and aquatic prokaryotes	intraterrestrial prokaryotes
Continental	560	26	22-215
Oceanic	1.8	2.2	303
Total	561.8	28.2	325-518

Whitman, 1998, PNAS

- vie microbienne riche (nombreux espèces inconnues, caractéristiques biochimiques et physiologique unique)

Migration des bactéries dans le sous sol

- Plusieurs hypothèses pour l'origine des bactéries dans le sous sol:
 - Migration depuis la surface soit par un processus naturel géologique soit par les opérations de forage
 - Migration latérale ou verticale avec l'eau de surface via les infiltrations, les flux hydrodynamiques et les mouvements d'eau profonde (plusieurs km)
 - Capture dans les sédiments lors de leur formation

Considérations environnementales

- environnements très différents des habitats terrestres et aquatiques du fait de la prédominance des minéraux
- H₂O présente mais très peu de place pour l'eau et la vie par volume de subsurface
- Microorganismes intraterrestres se logent dans les pores, les fractures et les inclusions fluides
- Espèces anaérobies (sauf si radioactivité induit une hydrolyse de H₂O en H₂ et O₂) et oligotrophes
- Profondeur limitée par la température (113°C)
 - ⇒ plancher océanique au niveau des sites hydrothermaux
 - ⇒ 5000 à 10000m pour les roches continentales
- études de la diversité et de l'abondance des populations microbiennes intraterrestres mais peu d'éléments sur les états métaboliques (espèces actives métaboliquement ou dormantes ?)

- Capacité microbienne d'utiliser toutes formes d'énergie thermodynamiquement disponibles dans l'environnement

- ⇒ Carbone organique de surface drainé par les eaux de recharge souterraines
- ⇒ Matière organiques des roches sédimentaires
- ⇒ Gaz réduits en provenance du manteau (H₂, CH₄, ..)
- ⇒ ...

- Les microorganismes intraterrestres ne peuvent pas être plus actifs que ce que permet la quantité d'énergie biodisponible et les processus sont lents et limités par la diffusion.

Facteurs limitants de la vie microbienne

- pH, salinité, porosité et nature du matériau de l'aquifère, ensemble des caractéristiques de l'habitat ont une influence sur les communautés bactériennes
- Disponibilité d'une source de carbone (cpt conditions oligotrophes suffisent au développement microbien)
- Température: limite principale de vie ou de survie pour les bactéries dans les environnements profonds :
1°C/30m dans les zones stables de la croûte continentale, 1°C/10m dans les zones de déformation

Au tour de 100°C, les molécules de faibles poids moléculaire et thermolabiles (ex: ATP ou NAD) et les acides aminés tels que la cystéine ou la glutamine sont détériorés: la survie bactérienne à de hautes températures résulte de la capacité de synthèse de ces composés par les microorganismes

- Pression: paramètre important en subsurface.
L'effet de la pression hydrostatique sur l'activité des populations microbiennes issues d'habitats profonds doit être prise en compte pour des profondeurs supérieures à 800m (sensible à la décompression durant l'échantillonnage)





Mer Morte

B. Eleazari Volcani

1936

1^{ers} organismes extrêmophiles isolés
halophiles (30-34 % de sel)

Thomas D. Brock

Archées

(3^{ème} domaine du vivant):

- Structure similaire aux bactéries
- Grandes capacités d'adaptation

• « Chasse » aux extrêmophiles et découverte d'une diversité inouïe

• Conséquences importantes sur la compréhension de la diversité et l'évolution microbienne



Yellowstone, USA



Les extrêmophiles

Organismes qui vivent de façon optimale dans des environnements dont les paramètres physico-chimiques s'approchent des limites entre lesquelles la vie peut exister

Capacité à réaliser tout le cycle de vie dans ces conditions

Extrêmes physiques

Température
Pression
Irradiations
(Vide, Gravité)

Extrêmes géochimiques

pH
Salinité
Fugacité d'oxygène
Potentiels Redox
Dessiccation

Extrêmes biologiques

Nutrition (oligotrophe)
Densité de population
Parasites
Prédation

≠ extrémotolérants
≠ conditions stressantes (problèmes d'adaptation mais pas limitant pour la vie)

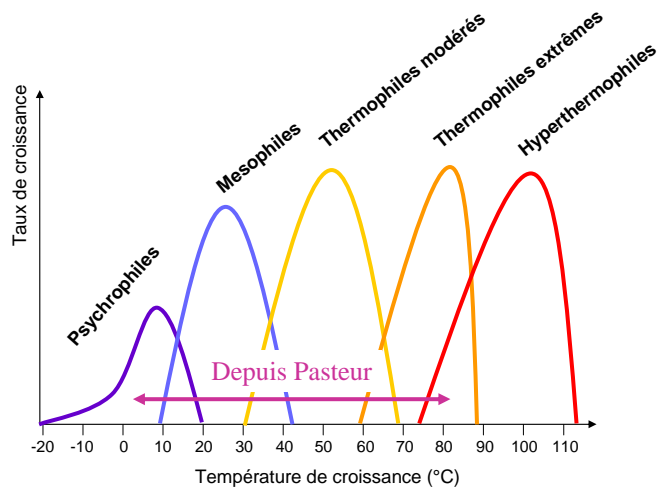
La fonction d'une enzyme dépend du pH, de la température et de la concentration en sels

Dénaturation: Altération de la conformation native et par là de l'activité des protéines

pH et sels: Rupture des liaisons ioniques et hydrogène

Température: Rupture d'interactions.

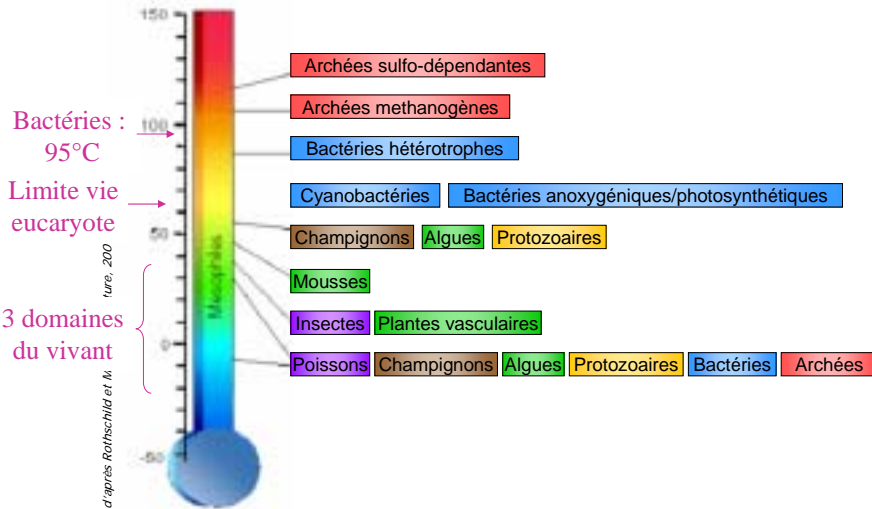
Cas de la température



Tout organisme a une température optimale de croissance à partir de laquelle que la température augmente ou qu'elle diminue, son taux de croissance décroît.

Caractéristiques biologiques des environnements extrêmes

- Prédominance de la vie microbienne
(*bactéries, archées, eucaryotes microbiens*)
- Diminution de la diversité avec l'augmentation de la rudesse des conditions

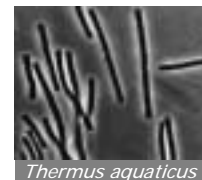


Intérêt des extrémophiles

Source de molécules performantes en conditions extrêmes (extrémenzymes)
Voies métaboliques nouvelles

➡ Biologie moléculaire :

- Taq polymérase utilisée en PCR (*Thermus aquaticus*)
- *Pyrococcus furiosus*, *Thermotoga maritima*
(plus grande fidélité de replication)
-



➡ Biotechnologies :

applications industrielles des extrémophiles ou de leur molécules stables et performantes

- Lessive : enzymes d'organismes alcaliphiles et thermophiles pour dégrader les principaux composants des tâches (protéines, carbohydrates et lipides) aux pH élevés des détergents

Industrie médicale, énergétique, biocatalyse, biohydrométallurgie (traitement du minerai d'or, extraction de pyrite du charbon, ...),



Intérêt des extrémophiles

Exobiologie



Hypothèse plausible de l'existence d'une vie ailleurs.

Phylogénie

Découverte du 3^{ème} domaine du vivant



Evolution



Modèles analogues pour étudier les cycles biogéochimiques anciens, l'origine de la vie et les premières étapes de la diversification du vivant



Les différents types d'extrémophiles et leurs environnements

(classification liée aux paramètres physico-chimiques)

Les hyperthermophiles

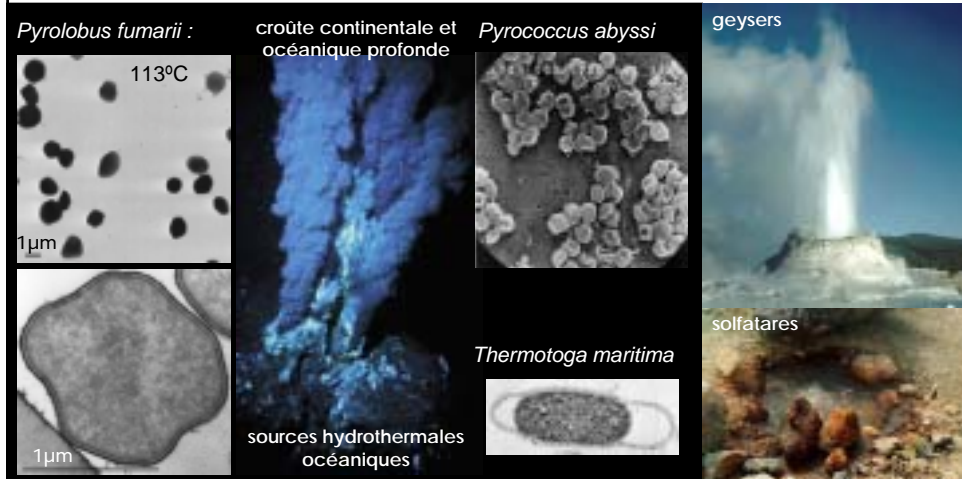
Température optimale de croissance > 80°C

BIODIVERSITE (hyperthermophiles)

- Archées dominantes
- Bactéries (genres *Thermotoga* et *Aquifex*)
- PAS D'EUCARYOTES

BIODIVERSITE (thermophiles)

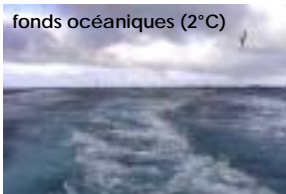
- Archées
- Bactéries
- Quelques champignons



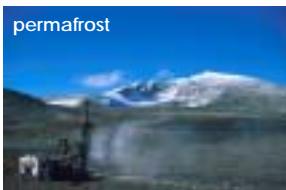
Les psychrophiles

Températures optimales de croissance < 5 °C

fonds océaniques (2°C)



permafrost

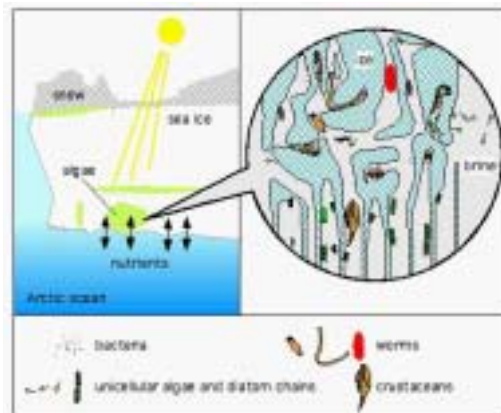


calottes glaciaires arctique et antarctique



neige et haute montagne

- Facteur limitant : eau à l'état liquide (maintenue liquide en dessous de 0°C grâce à la pression)
- Activité microbienne enregistrée au pôle sud à -12 et -17°C



BIODIVERSITE : Archées, Bactéries, Eucaryotes (algues rouges, diatomées,)

Les barophiles (ou piezzophiles)

Tolèrent de fortes pression

ADAPTATIONS MOLECULAIRES :

- Lipides plus insaturés
- Adaptation spécifiques des protéines

BIOTOPES :

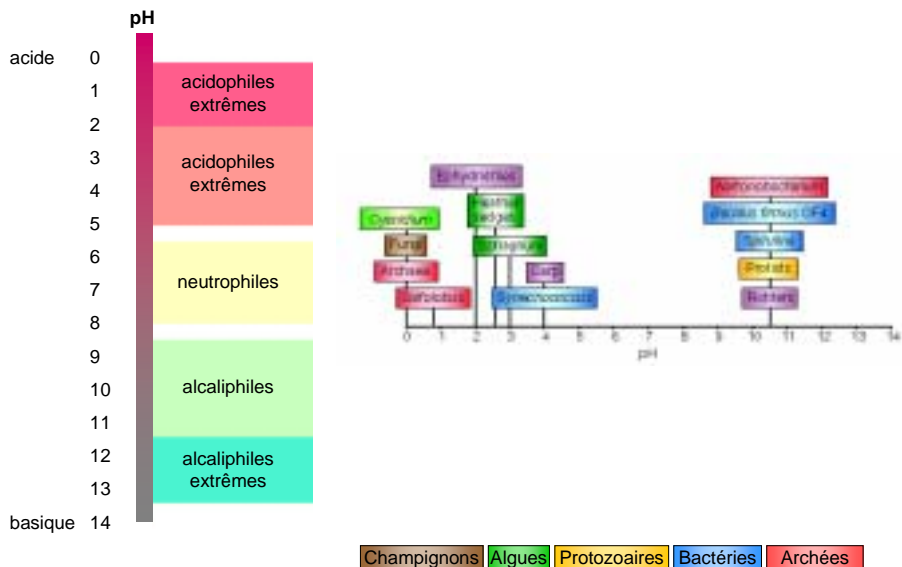
- Océan profond
- Croûte continentale et océanique profonde

BIODIVERSITE :

- Archées (nombreux lignages marins incultivables),
Bactéries, Eucaryotes (champignons, animaux abyssaux)



Cas du pH



Les alcaliphiles

pH optimum de croissance > 9-10

ADAPTATIONS MOLECULAIRES :

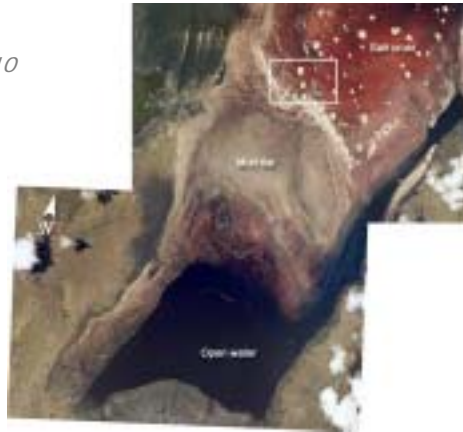
- Grande capacité interne de tamponnage
- Surface externe de la cellule chargée négativement
- Importation de protons par des antiports

BIOTOPES :

- Lac de sodes
- Sources chaudes alcalines

BIODIVERSITE :

- Archées, Bactéries, Eucaryotes (quelques protistes)



Les acidophiles

pH optimum de croissance < 2-3

ADAPTATIONS MOLECULAIRES :

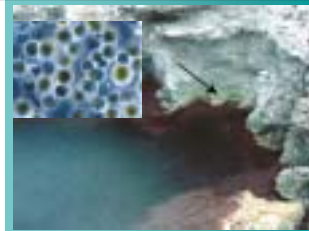
- Grande capacité interne de tamponnage
- Surface externe de la cellule chargée positivement
- Exportation de protons par des enzymes membranaires

BIOTOPES :

- Régions minières
- Sources chaudes acides
- Solfatares acides

BIODIVERSITE :

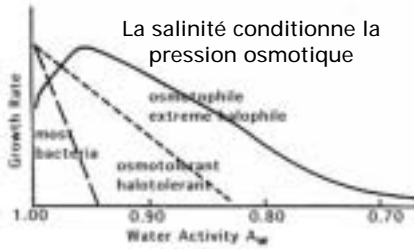
- Archées, Bactéries, Eucaryotes (nombreux champignons, algues rouges)



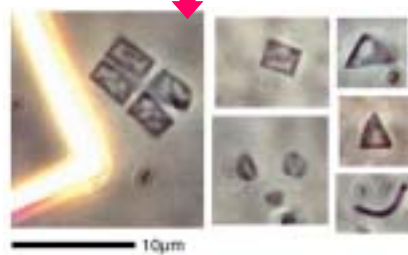
Les halophiles

Fortes concentrations de sels (2-5 M NaCl eq.)

La salinité conditionne la pression osmotique



(A_w) est inversement proportionnelle à la pression osmotique d'un composé et affectée par la présence de sels ou de sucres dissous dans l'eau



DIVERSITE : archées, bactéries et eucaryotes dont certaines levures

Les xérophiles

Croissance en conditions d'anhydrobiose

ADAPTATIONS MOLECULAIRES :

- Augmentation de l'osmolarité interne
- Stabilité de l'ADN : protéines stabilisantes et mécanismes puissants de réparation

BIOTOPES :

- Déserts froids ou chauds
- Plusieurs salines

BIODIVERSITE :

- Archées halophiles, Bactéries, Eucaryotes (quelques champignons, algues, plantes)



Les radiotolérants

Tolèrent de fortes radiations (ionisantes, UV, ...)

ADAPTATIONS MOLECULAIRES :

- Protéines stabilisant l'ADN
- Mécanismes puissants de réparations

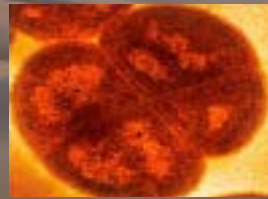
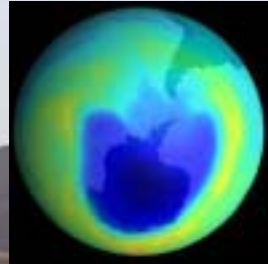
BIOTOPES :

- Désert, salines solaires
- Haute montagne
- Mines radioactives naturelles
- Dépôts de résidus nucléaires

BIODIVERSITE :

- Archées, Bactéries

Deinococcus radiodurans

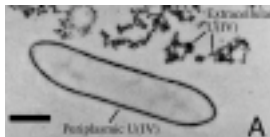


Les métallotolérants

Tolèrent de fortes concentrations de métaux lourds

ADAPTATIONS MOLECULAIRES :

- Mécanismes spécifiques de détoxification
- Accumulation sélective des métaux à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule



BIOTOPES :

- Régions minières
- Aquifères contaminés par les métaux
- Eaux résiduelles
- Sources hydrothermales océaniques

BIODIVERSITE :

- Archées, Bactéries, Eucaryotes (quelques champignons, algues et plantes)



Groupes phylogénétiques adaptés aux conditions extrêmes

Archées : records d'extrémophilie
(les plus performantes)

⇒ Lignées phylogénétiques spécifiques particulièrement adaptées à un type de conditions limites pour la vie et à un type d'environnement très restreint

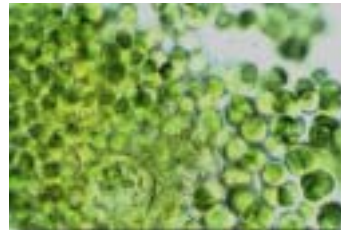
hyperthermophiles : plusieurs lignées d'archées, nombre très réduit de bactéries

⇒ Lignées très diverses adaptées à une même condition sans corrélation phylogénétique

psychrophiles et barophiles : 3 domaines du Vivant

⇒ Groupes d'organismes d'une même famille phylogénétique qui sans posséder de record ont su s'adapter à des conditions extrêmes ou moyennement extrêmes

• **cyanobactéries** : groupe de bactéries photosynthétiques présent de l'Antarctique aux sources hydrothermales le plus adapté à l'extrême



• **champignons** : eucaryotes les plus versatiles qui seuls ou en symbiose avec des algues ou des cyanobactéries formants des lichens ont colonisé le plus grand nombre d'environnements extrêmes et présentent tous les caractères

• **archées méthanogènes** : archées les plus versatiles

Formes de résistance et longévité

Majorité des organismes : **phase de latence** permettant la survie en attendant des conditions de nouveau favorables à leur développement

Différents états d'abiosis :

- Le **repos** : pas de reproduction
- La **dormance** : absence de métabolisme
- La **momification** : transformations déjà irréversibles
- La **mort**

Progression (de l'activité métabolique normale à la mort cellulaire) accompagnée de changements au niveau de la structure interne de la cellule



Survie plus ou moins longue

Effets de carence et de stress

➤ développement de systèmes de régulation pour contrôler cette période de carence par **adaptation du métabolisme** (maximum d'économie)

- ✓ Dégradation de l'ARN cellulaire total
- ✓ Dégradation des protéines
- ✓ Mise en œuvre de systèmes de transport et d'assimilation comme substituts aux éléments manquants
- ✓ Synthèse de protéines de stress qui protègent la bactérie de la privation de nutriments et d'autres stress

➤ différenciation vers une forme de résistance métaboliquement inactive (**sporulation**)

La sporulation

Spore = structure de résistance

- n'échange plus avec le milieu extérieur
- ne se nourrit plus
- stoppe toute activité

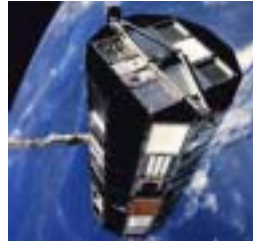
Résiste à :

- une pénurie de nourriture
- une élévation importante du pH, de la température
- une dessiccation
- aux désinfectants
- ...

Permet sa protection, sa survie durable et sa dissémination

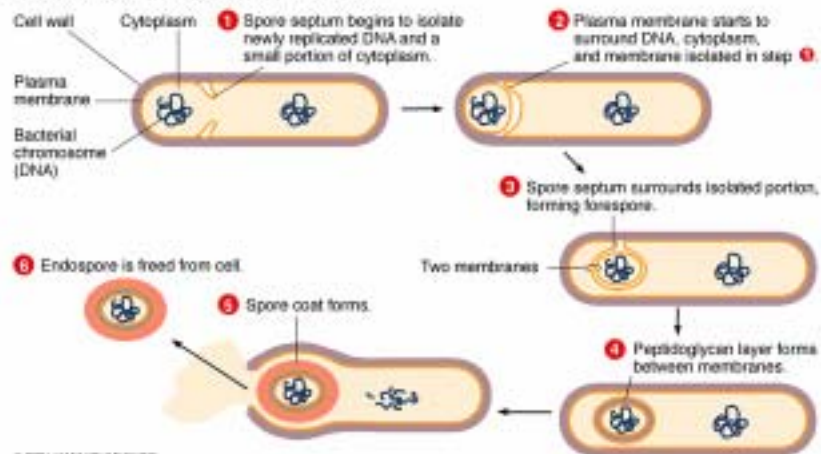


exposition des spores de *Bacillus subtilis* en domaine interplanétaire



Processus de formation des spores

(a) Sporulation, the process of endospore formation



© BOLIVANI/CUMMINGS

Longévité

Halophiles = records de longévité

Formes de conservation les plus efficaces :

- **cryopréservation** :

⇒laboratoire : souches bactériennes congelées à -80°C (avec glycerol pour éviter les dommages lors de la décongélation) ou dans azote liquide

⇒permafrost : conservation des organismes jusqu'à plusieurs dizaines de milliers d'années

- **dessiccation**

⇒ cristaux de sels des mines terrestres ou roches évaporitiques (inclusions fluides)

⇒commerce : souches conservées lyophilisées

*Fish et al. , Nature 2002
Fragments d'ARNr 16S dans des
évaporites anciennes (11-425 Ma)*



Ecologie microbienne des environnements souterrains

La complexité de l'échantillonnage

Echantillonnage & contamination

Obtention d'échantillons représentatifs et
significatifs des milieux profonds

=

opération difficile et coûteuse

(nécessite des forages et l'ouverture d'un puits
et l'utilisation de traceurs ou de techniques aseptiques)

Cout limite le nombre de prélèvements

La contamination

= Introduction de microorganismes non-indigènes pendant le forage (matériel & fluides) et les phases d'échantillonnage

Problème amplifié pour les environnements très profonds où les microorganismes sont peu abondants et la probabilité de contamination très importante

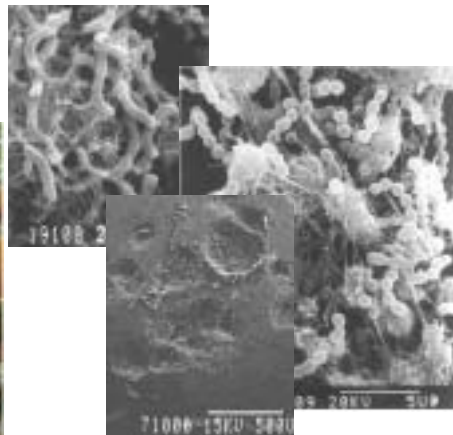
Nécessité de quantifier ce phénomène qui ne peut être complètement évité

Biocorrosion

Acier se corrode au contact de l'eau et produit de l'hydrogène

=

source potentielle d'énergie pour certaines bactéries anaérobies



Les traceurs chimiques

Evaluer l'incursion des fluides de forages dans la porosité des échantillons

Un traceur idéal doit être:

- Inerte chimiquement
- Absent dans les environnements naturels
- Facilement détectable à des concentrations extrêmement faibles

Basé sur l'hypothèse que les microorganismes vont suivre le flux de fluides de forage de façon équivalente aux traceurs

Perfluorocarbon tracers (PFTs)

Traceur chimique inerte
(perfluoro[méthylcyclohexane]) ajouté
aux fluides de forage
(eau de mer de surface/boues)

Teneur quantifiée dans les carottes par
chromatographie gazeuse

PFT delivery system.

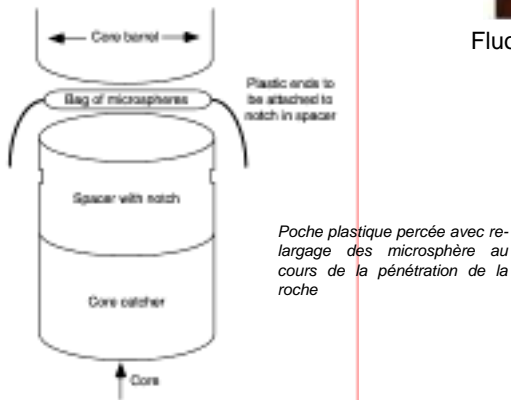
To Mud Pump



Smith, D.C., et al., 2000, ODP Technical Note 28

Les microsphères fluorescentes

Traceurs particulaires en latex fluorescent (diamètre de 0,5 à 1 µm similaire aux microorganismes) introduits dans le carottier à une concentration de ~1010 sphères/mL



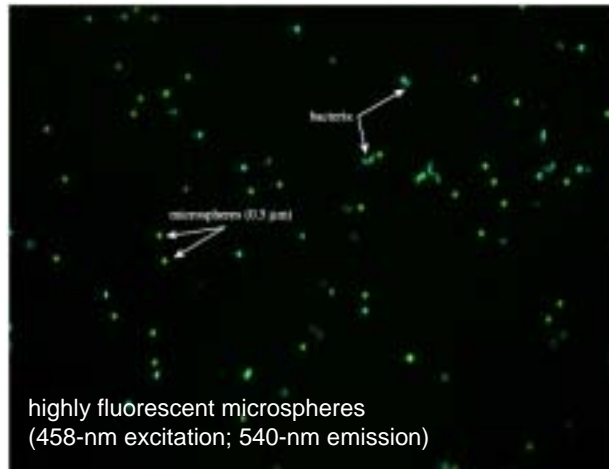
Fluorescent microsphere delivery system



Smith, D.C., et al., 2000, ODP Technical Note 28

Quantification par épifluorescence

(Fluoresbrite carboxylate microspheres; Polysciences Inc. 15700)



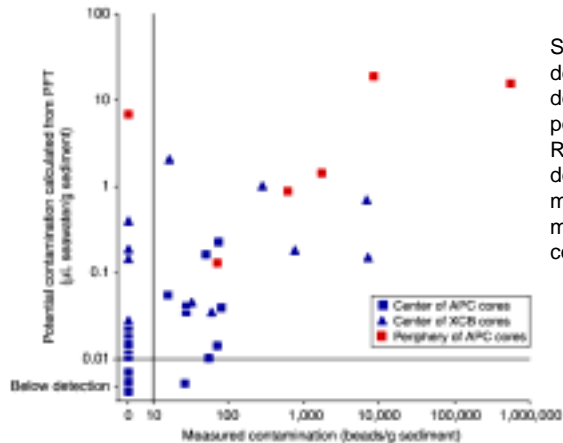
Exemple de population bactérienne d'un échantillon d'eau de mer contaminée par les microsphères fluorescentes

Smith, D.C., et al., 2000, ODP Technical Note 28

Recherche des traceurs en périphérie et au cœur des carottes

Comparaison des tests de contamination (microsphères et PFT) sur 34 échantillons.

(Solid lines = approximate detection limits with each test method. APC = advanced piston corer, XCB = extended core barrel)



Sédiments et roches ignées requièrent des techniques de forage différentes et des tests de contamination ont été fait pour les 2 types de formations

Rq : sphère non détectées à l'intérieur des carottes pour échantillons broyés mais détectées sur l'intérieur des lames minces (contamination pendant la coupe !)

D'Hondt, S.L., Jørgensen, B.B., Miller, D.J., et al.)
Proceedings of the Ocean Drilling Program, Initial Reports Volume 201

Technologies aseptiques

extrêmement coûteuses

- Développement d'un biofilm sur les parois interne du conduits (présence d'eaux stagnantes)
- Purge d'un puits : élimine la microflore non indigène à l'eau de l'aquifère mais insuffisante seule
- Nécessité d'un nettoyage des équipements et du puits par chloration (stérilisation avant prélèvement final) et d'un brossage mécanique des parois

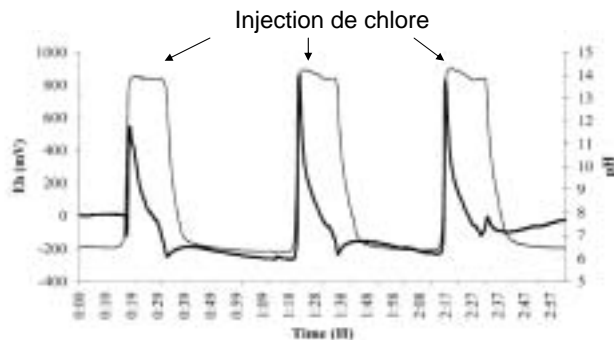


Fig. 1. Evolution of Eh and pH at wellhead during chlorination of the tubing. Fine line, Eh; bold line, pH.

Basso et al, 2005, Env. Microbiol.

Le dénombrement bactérien total dans les échantillons d'eau prélevés décroît au cours de la procédure

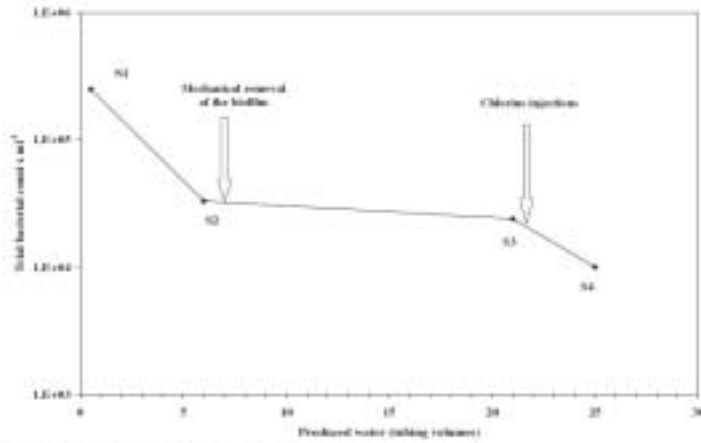


Fig. 2. Total bacterial counts in the S1 to S4 water samples.

Basso et al, 2005, Env. Microbiol.

Les types de métabolisme des populations échantillonnées varient au cours de la procédure

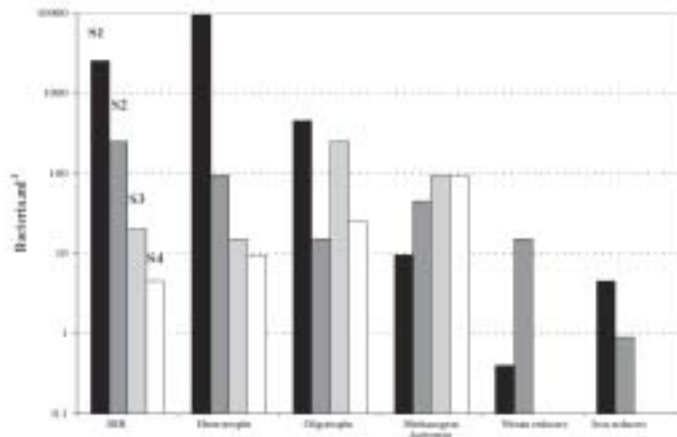
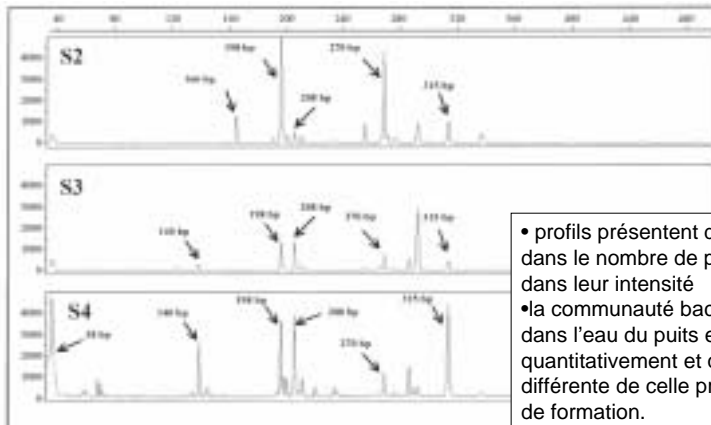


Fig. 3. Results of culture experiments with the S1 to S4 water samples.

Basso et al, 2005, Env. Microbiol.

tRFLP : compare les communautés microbiennes entre elles et donne une estimation de leur évolution au cours du temps



- profils présentent des différences dans le nombre de pics détectés et dans leur intensité
- la communauté bactérienne présente dans l'eau du puits est quantitativement et qualitativement différente de celle présente dans l'eau de formation.

Fig. 4. Chromatograms issued from the tRFLP analysis of rRNA genes amplified in samples S2, S3 and S4. The size (in min) of dominant TFRPs are indicated.

Basso et al, 2005, Env. Microbiol.

L'eau collectée après une purge sans élimination du biofilm n'est pas représentative de l'eau de la formation collectée après les nettoyage du puits.

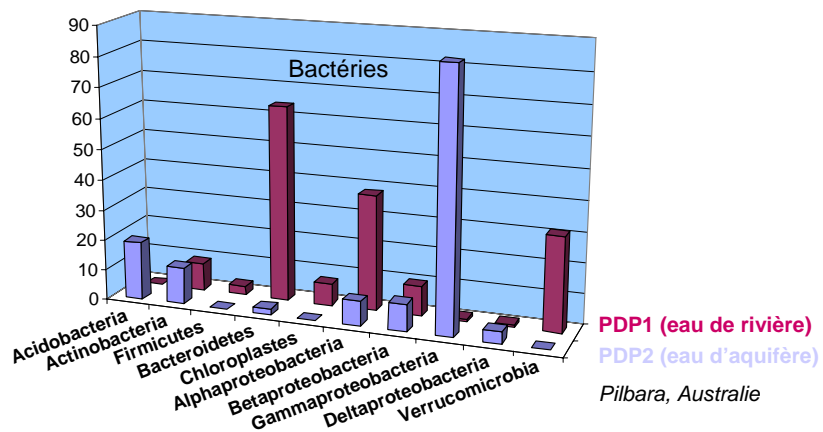
Plusieurs groupes bactériens sont détectés uniquement après la procédure de nettoyage du puits et représentent les composantes de l'écosystème souterrain qui n'auraient pas été détectées en absence de nettoyage

Autre alternative

Collecte d'échantillons de fluides de forages pour déterminer le « fond » de populations microbiennes potentiellement introduites pendant le forage

Analyse d'échantillons de forage par l'approche ARNr (clonage et séquençage des gènes des ARN 16S)

A. Analyse des liquides de forage pour détecter les contaminations



B. Analyse des carottes (en cours)

- ***Analyse d'échantillons minéraux issus de forages superficiels (100m), composés de carbonates, cherts et basaltes***
- ***Détection des contaminations par comparaison avec les résultats obtenus sur les liquides de forage***

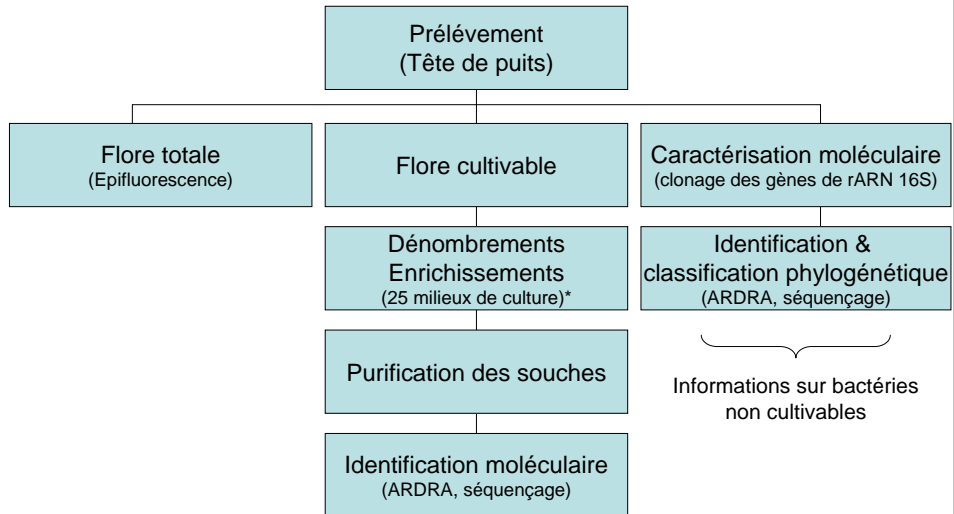
***Utilisation d'un broyeur à billes
avec bol et billes de broyage en zirconium***

Broyage en conditions stériles



**Importance de la procédure mise en œuvre
pour l'obtention d'échantillons
représentatifs de ces écosystèmes
particuliers**

Exemple de stratégie d'étude pour l'obtention d'images représentatives et complémentaires de la structure d'une communauté bactérienne



*Large variété de milieu de culture destinés à recouvrir tous les métabolismes potentiels en aérobiose et anaérobiose (aérobies strictes ou facultatives, anaérobies dénitrifiantes, sulfatoréductrices, thiosulfato-réductrices, méthanogènes, homoacétogènes, soufre-dépendantes, et réductrices du fer)

**Dénombrements réalisés dans toutes ces conditions et comparés au dénombrement de la flore bactérienne totale en microscopie à épifluorescence (test sur l'efficacité de revivification des techniques de cultures)

Milieus de culture exerce une pression de sélection pouvant favoriser le développement d'espèces minoritaires à croissance rapide.

La répartition des microorganismes dans les principaux groupes métaboliques est fonction du milieu de culture sélectif utilisé. Les résultats des dénombrements peuvent sous-estimer la population des espèces majoritaires du biotope étudié

Le clonage donne une image plus représentative de la communauté bactérienne, des espèces majoritaires et minoritaires de la flore d'un environnement profond mais souffre également de biais méthodologiques (extraction et amplification des ADNr 16S en particulier)

La biosphère souterraine

- Eau permet la survie et le développement d'une grande variété de microorganismes
- La diversité est fonction des nutriments possibles, de la présence d'oxydants et de réducteurs en absence d'oxygène
- Nature et capacités métaboliques des communautés bactérienne de subsurface dépendent de la composition et de la qualité de la matière organique disponible
- Habitats varient en fonction de la zone géographique et de la profondeur (biogéographie en 3D)