

# 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

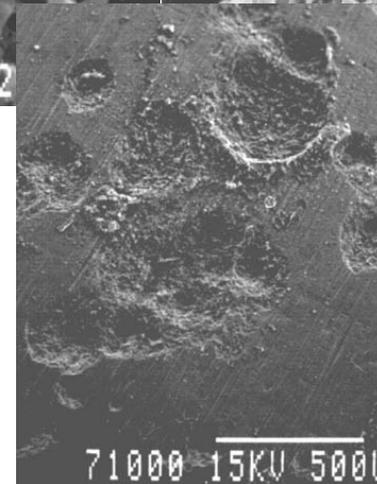
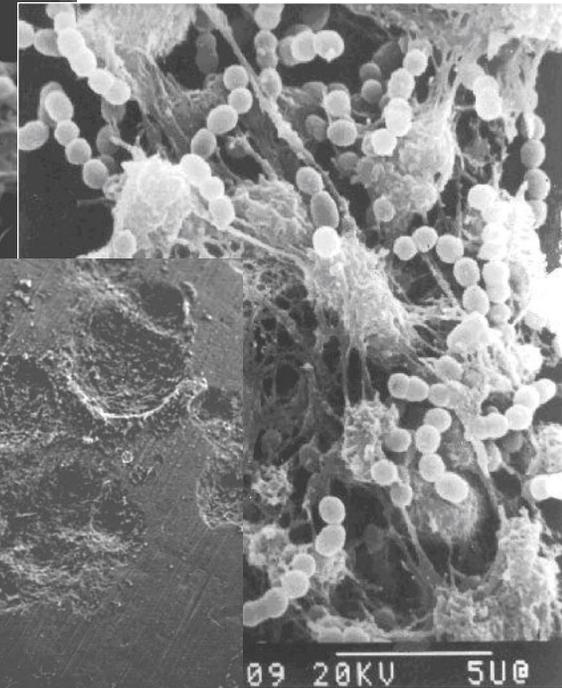
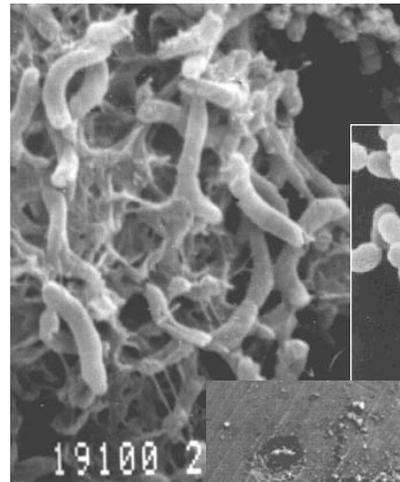
Nécessité de quantifier ce phénomène qui ne peut être complètement évité

# 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

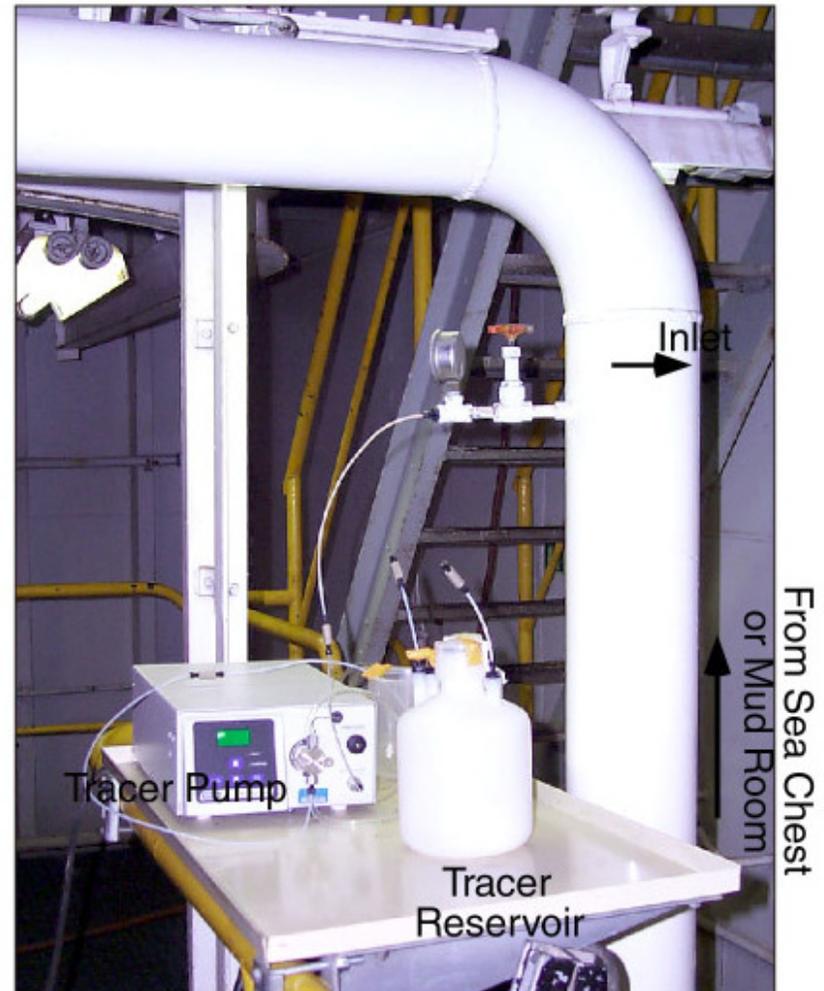
# Perfluorocarbon tracers (PFTs)

PFT delivery system.

←  
To Mud Pump

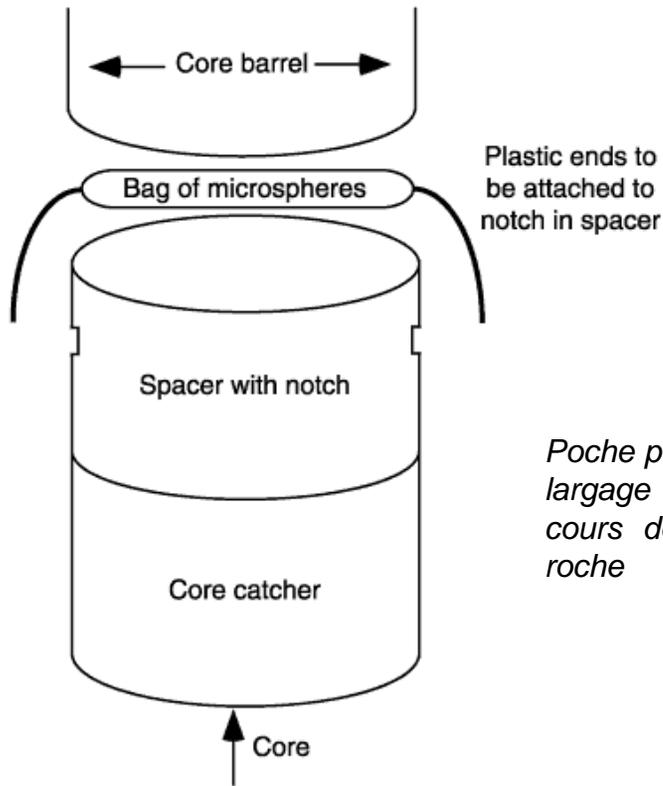
Traceur chimique inerte  
(perfluoro[méthylcyclohexane]) ajouté  
aux fluides de forage  
(eau de mer de surface/boues)

Teneur quantifiée dans les carottes par  
chromatographie gazeuse



# Les microsphères fluorescentes

Traceurs particulaires en latex fluorescent  
(diamètre de 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  similaire aux  
microorganismes) introduits dans le  
carottier à une concentration de  $\sim 10^{10}$   
sphères/mL

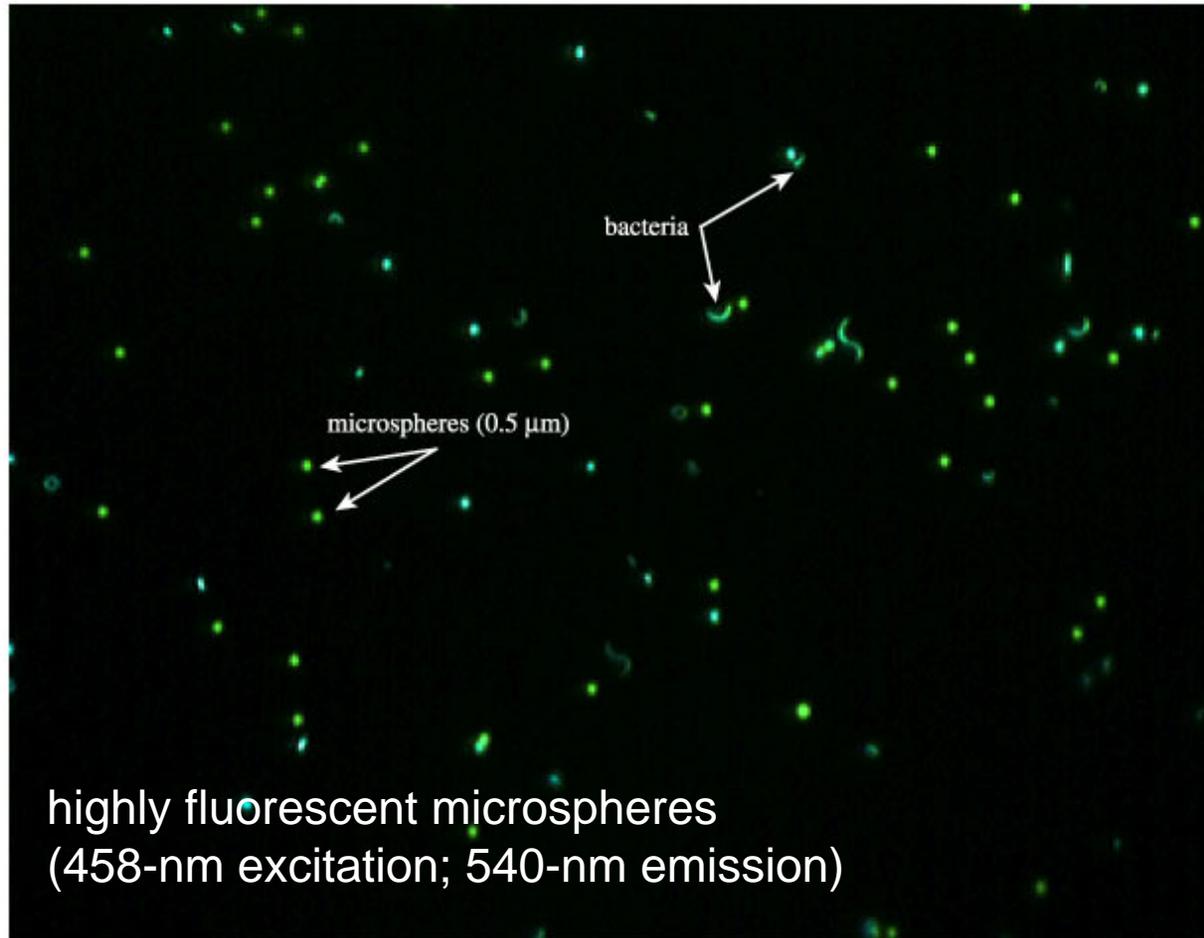


Fluorescent microsphere delivery system



# Quantification par épifluorescence

(Fluoresbrite carboxylate microspheres; Polysciences Inc. 15700)

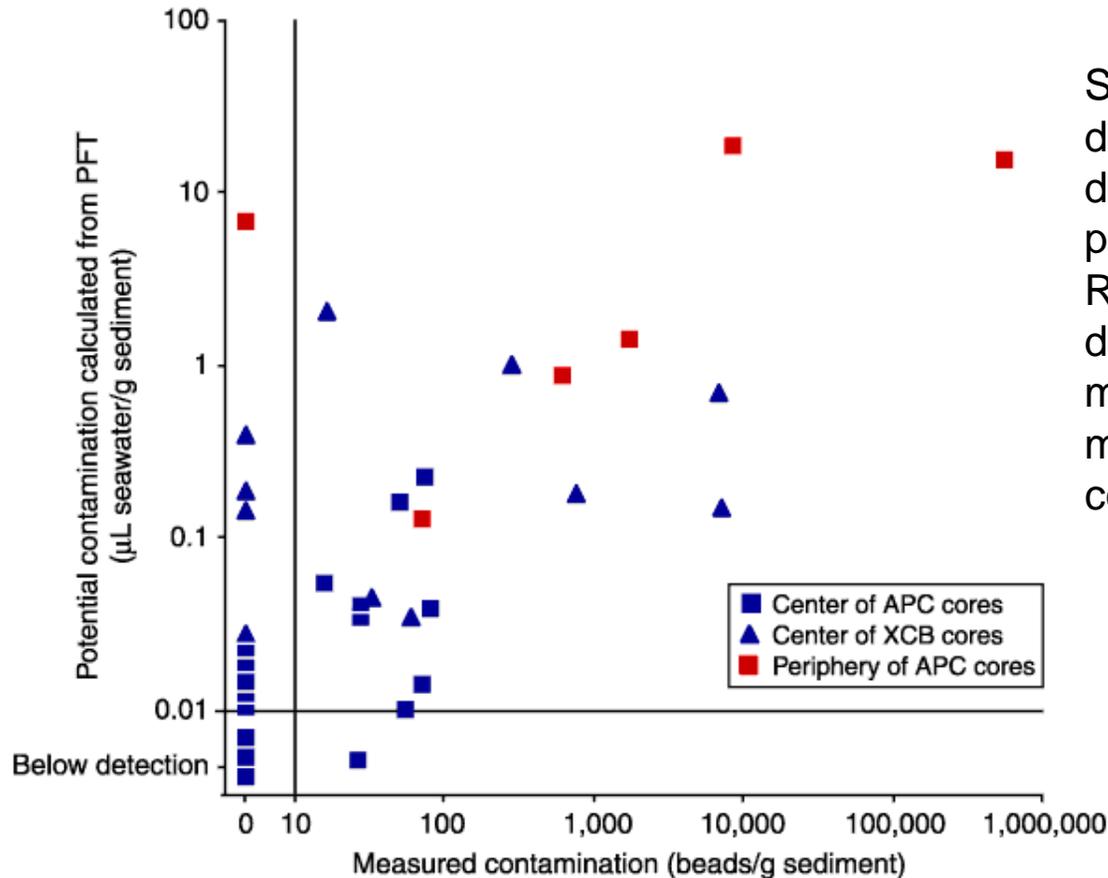


Exemple de population bactérienne d'un échantillon d'eau de mer contaminée par les microsphères fluorescentes

# 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 !)

# 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

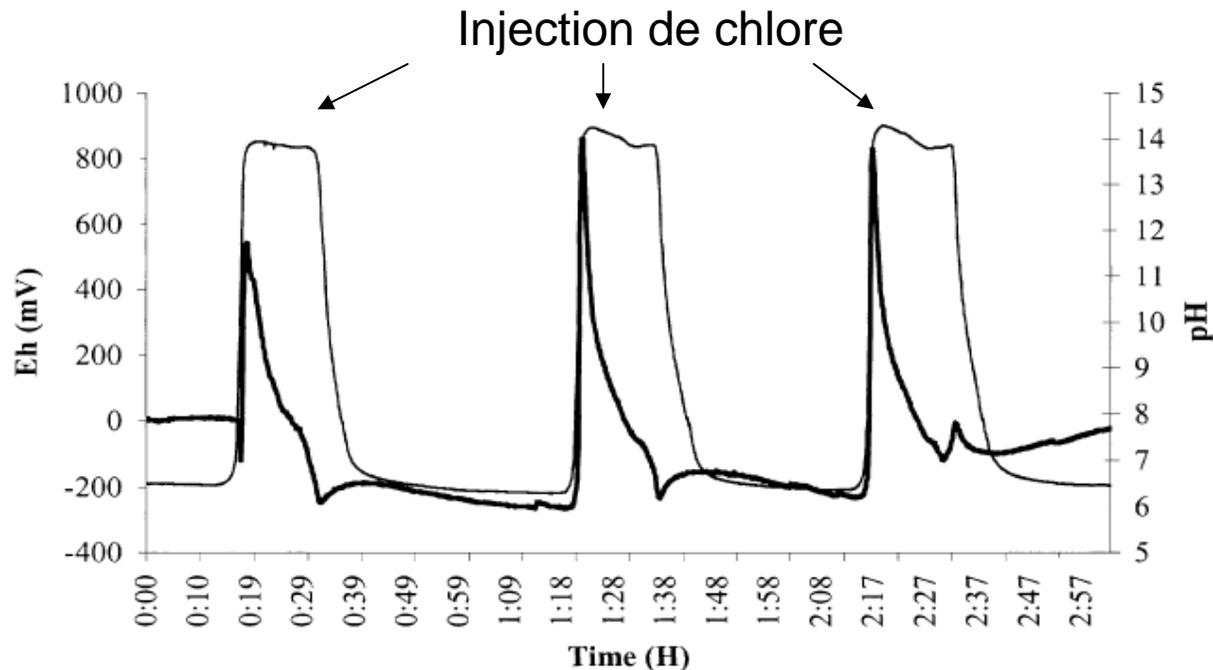


Fig. 1. Evolution of Eh and pH at wellhead during chlorination of the tubing. Fine line, Eh; bold line, pH.

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

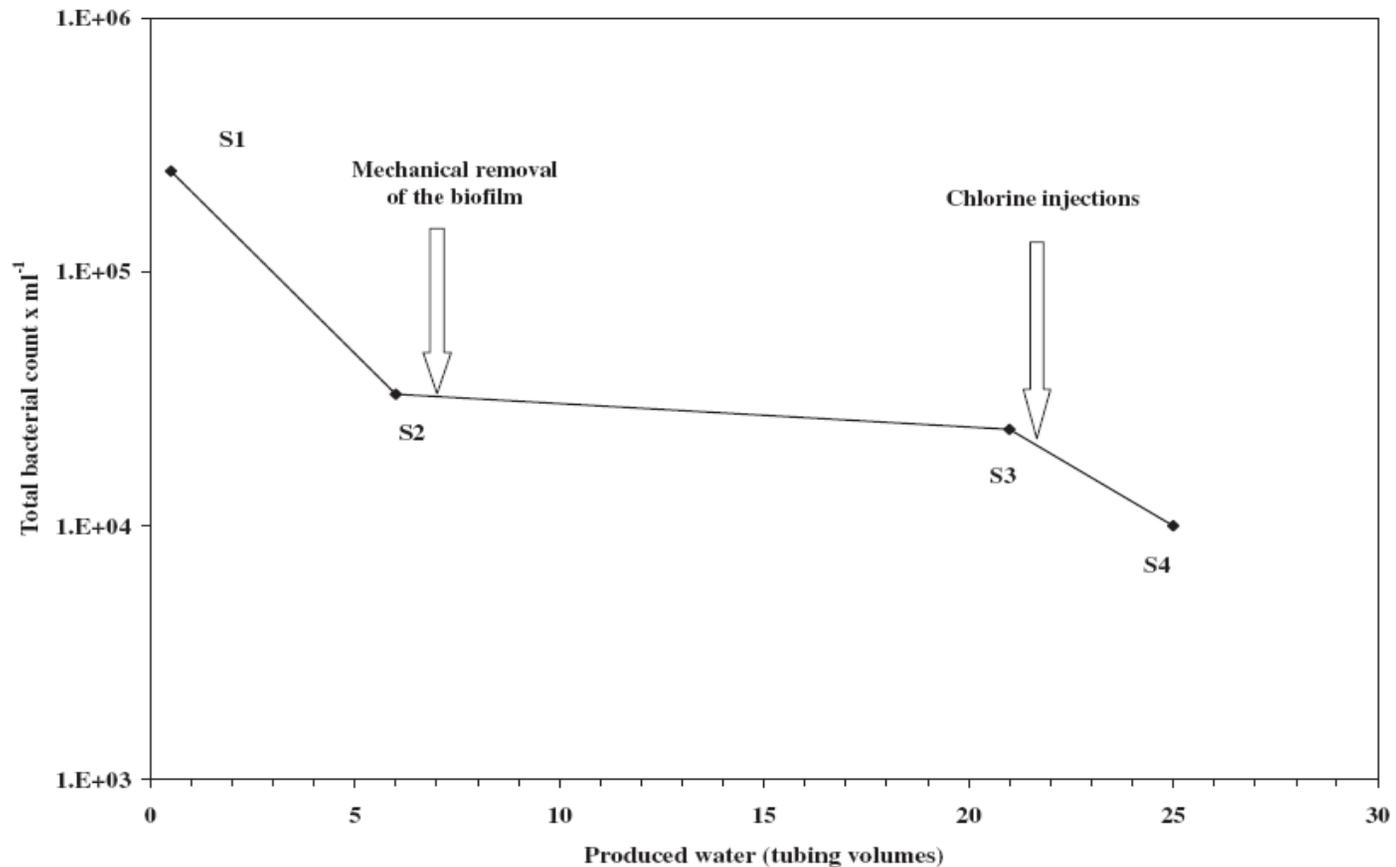


Fig. 2. Total bacterial counts in the S1 to S4 water samples.

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

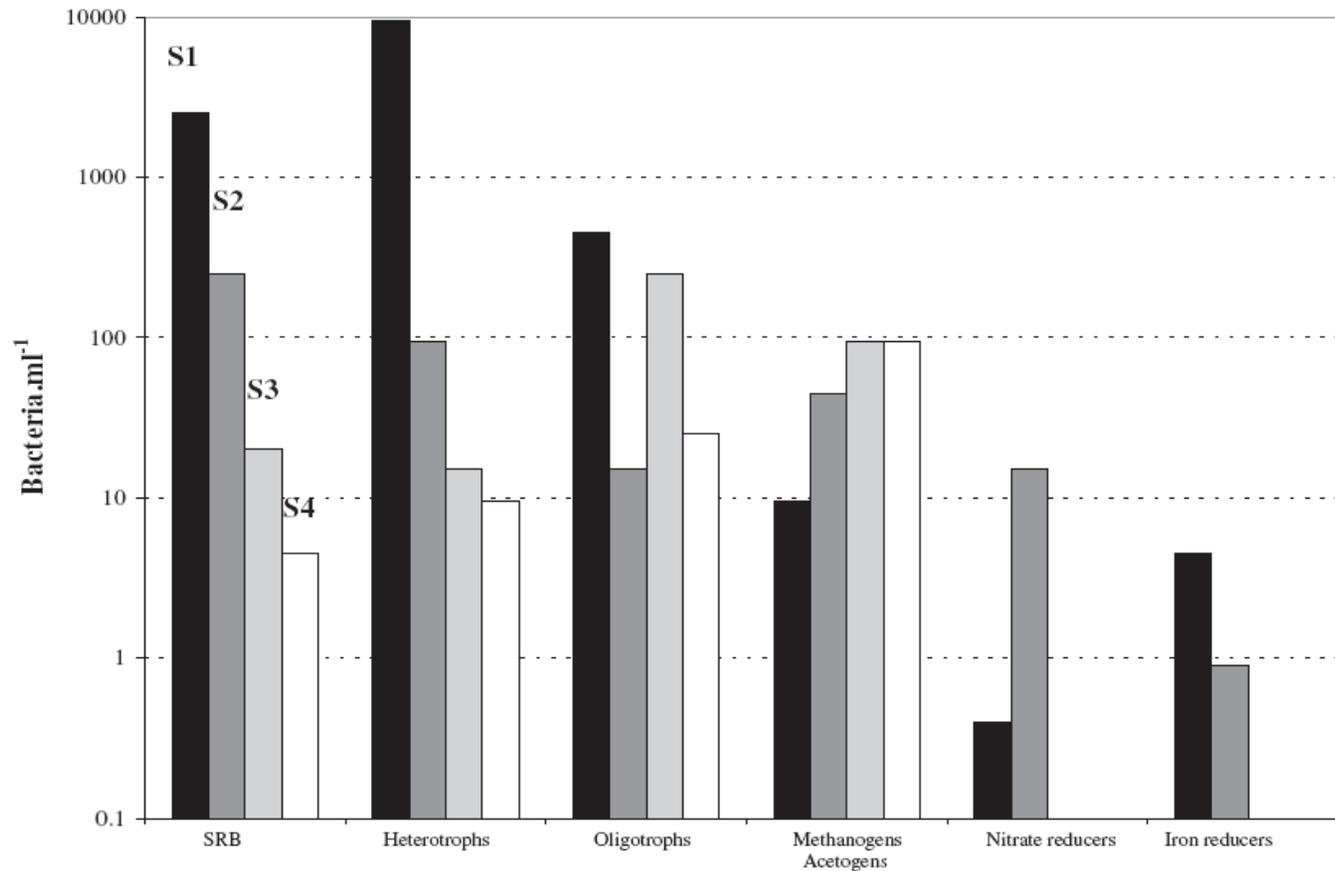


Fig. 3. Results of culture experiments with the S1 to S4 water samples.

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

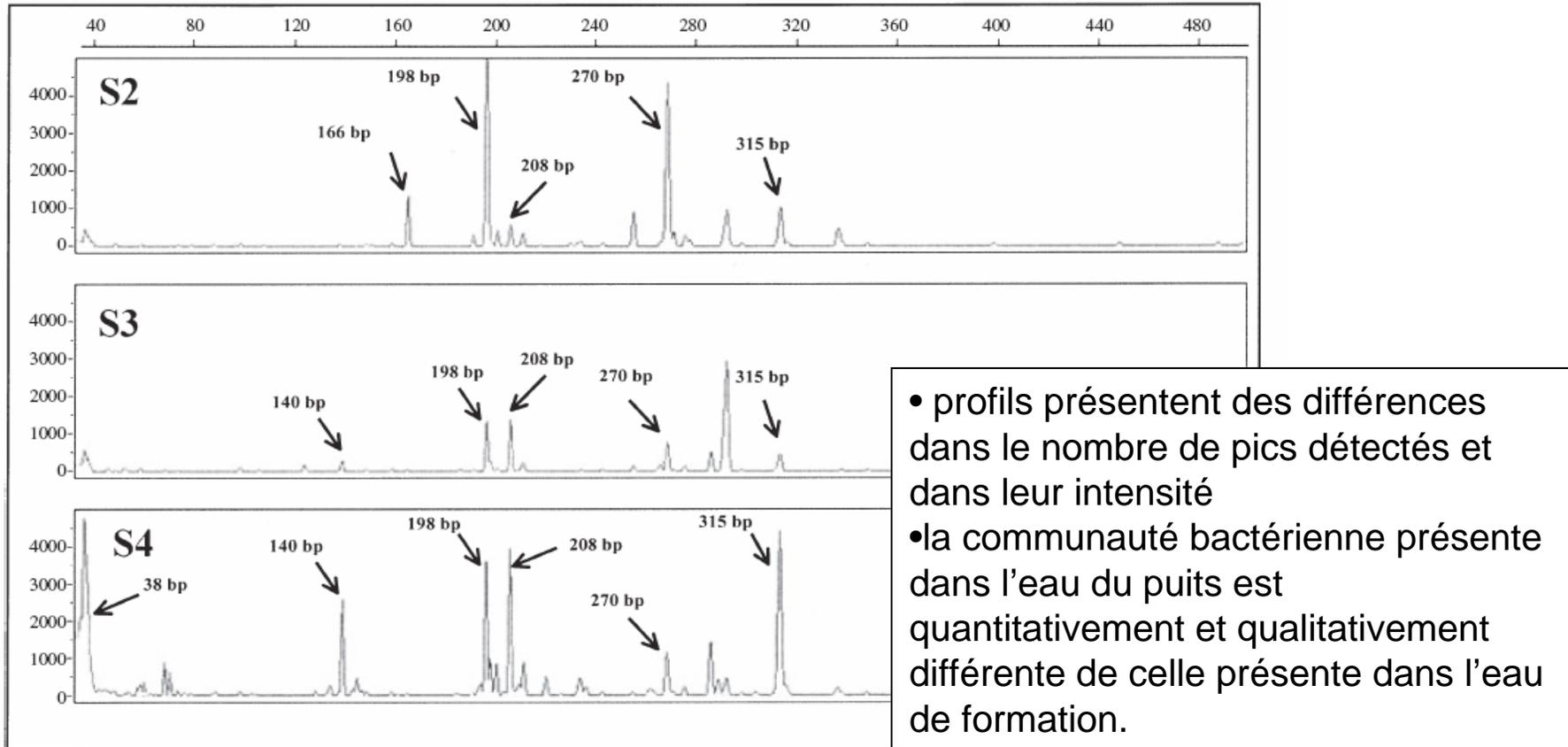


Fig. 4. Chromatograms issued from the T-RFLP analysis of rRNA genes amplified in samples S2, S3 and S4. The size (bp) of dominant T-RFs are indicated.

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

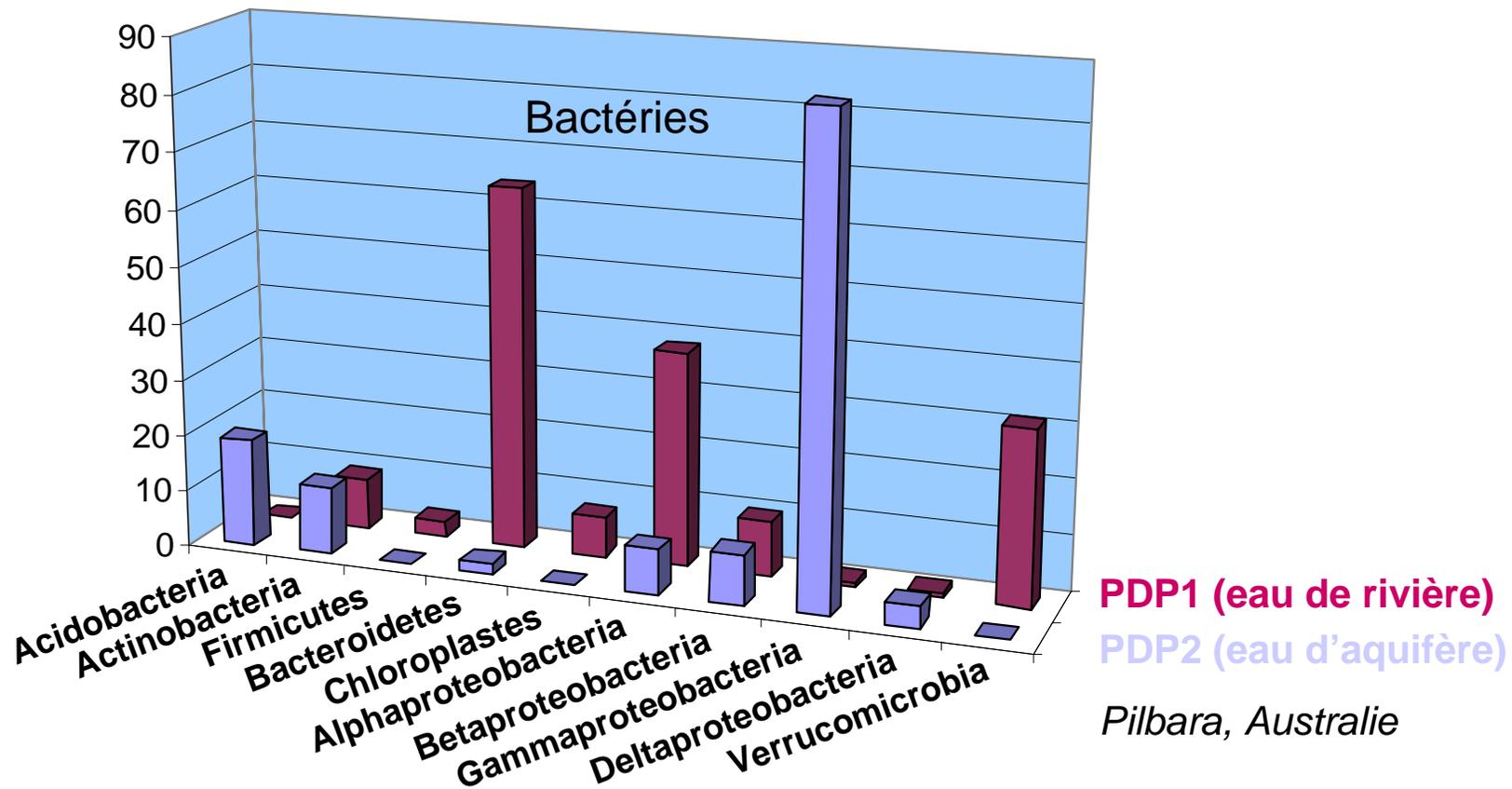
Plusieurs groupes bactériens sont détectés uniquement après la procédure de nettoyage du puits et représentent les composantes de l'écosystème souterrain qui n'auraient pas été détectées en absence de nettoyage

## 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***

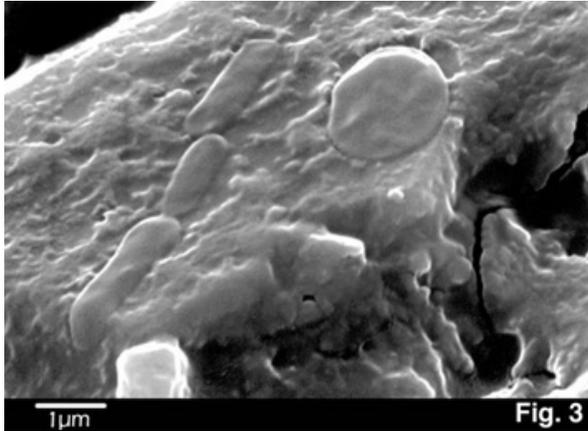
***Broyage en conditions stériles***



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

# Motivations des études de la biosphère profonde

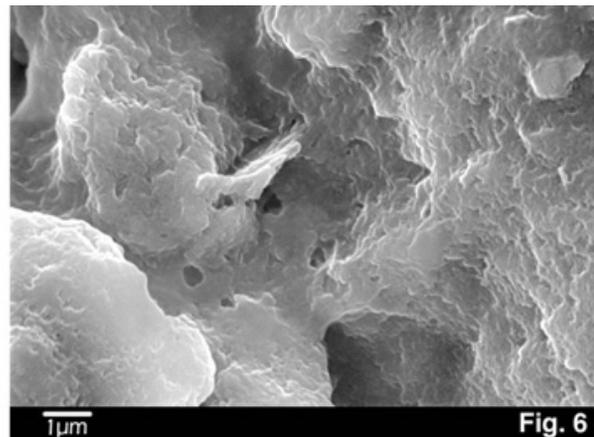
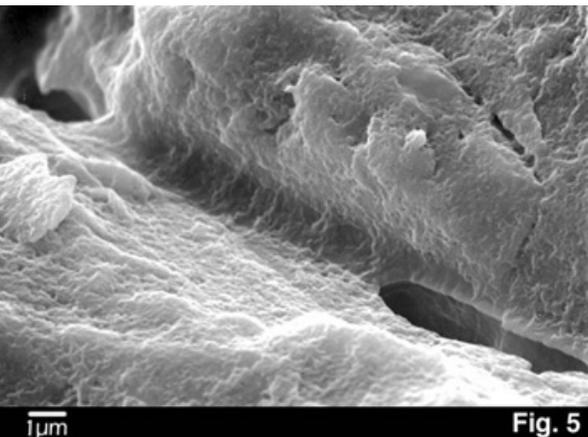
- activité microbienne en champ pétrolier impacte sur l'extraction de l'huile
- ★ corrosion des infrastructures
- ⊛ récupération assistée
- contamination des nappes phréatiques (sites de stockage, épanchements accidentels, fuite, activité humaine, ...)
- ⊛ bioremédiation par microorganismes autochtones 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*)



# Considérations environnementales

- Environnements très différents des habitats terrestres et aquatiques du fait de la prédominance des minéraux
- En fonction de la profondeur, de la faible perméabilité, de l'âge des couches géologiques : conditions oligotrophes parfois hostiles à la vie microbienne
- H<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O en H<sub>2</sub> et O<sub>2</sub>) et oligotrophes
- Profondeur limitée par la température (113°C)
  - ⇒ plancher océanique au niveau des sites hydrothermaux
  - ⇒ 5000 à 10000m pour les roches continentales

# Facteurs limitants de la vie microbienne

- pH, salinité, porosité et nature du matériau, 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*

*Autour 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)*

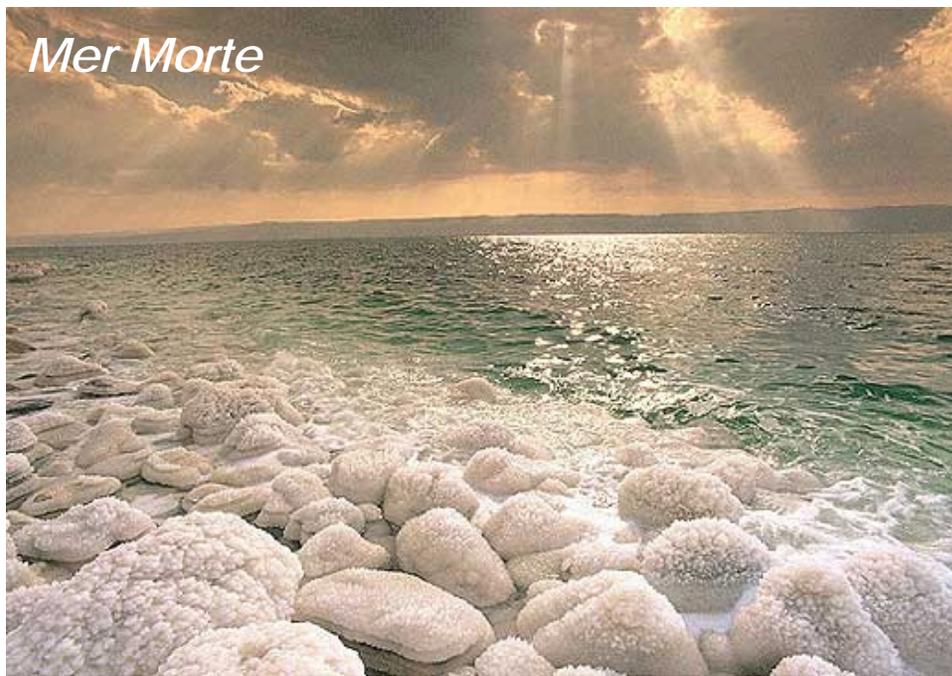


Les milieux extrêmes:

hostiles à la vie ?



Mer Morte



Thomas D. Brock  
Archées

(3ème domaine du vivant):

- Structure similaire aux bactéries
- Grandes capacités d'adaptation

« Chasse » aux extrémophiles et découverte d'une diversité inouïe

1970-72

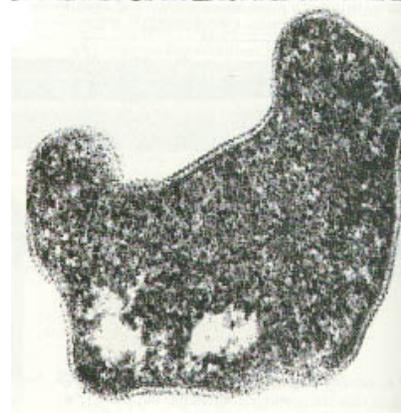
- Conséquences importantes sur la compréhension de la diversité et l'évolution microbienne

*Sulfolobus acidocaldarius*  
bactérie thermophile (~70°C)

*B. Eleazari Volcani*

1936

1<sup>ers</sup> organismes extrémophiles isolés  
halophiles (30-34 % de sel)



# Les extrémophiles

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  
Dessication

## Extrêmes biologiques

Nutrition (oligotrophe)  
Densité de population  
Parasites  
Prédation

≠ extrémotolérants

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

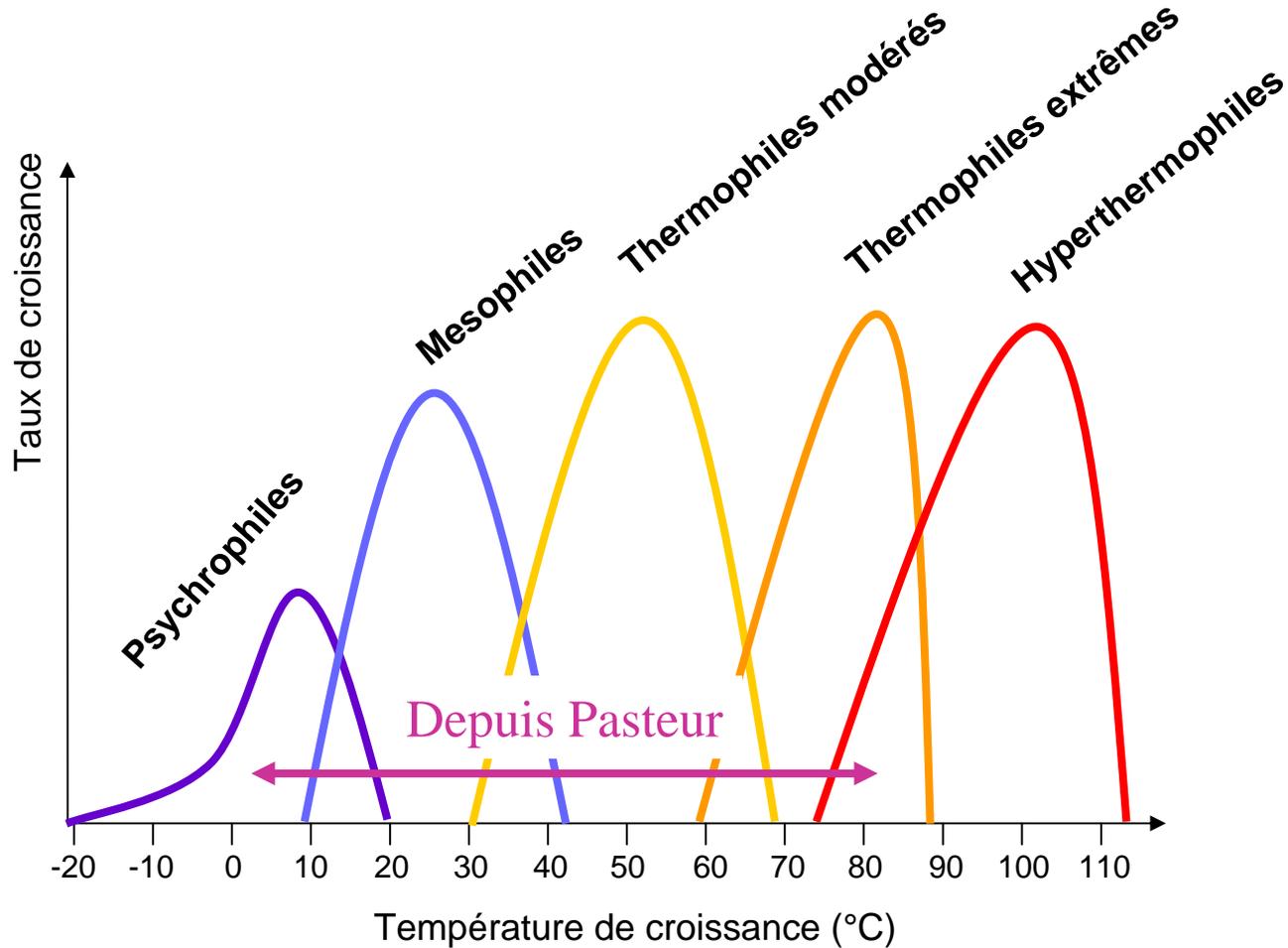
## La fonction d'une enzyme dépend du pH, de la température et de la concentration en sels

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.

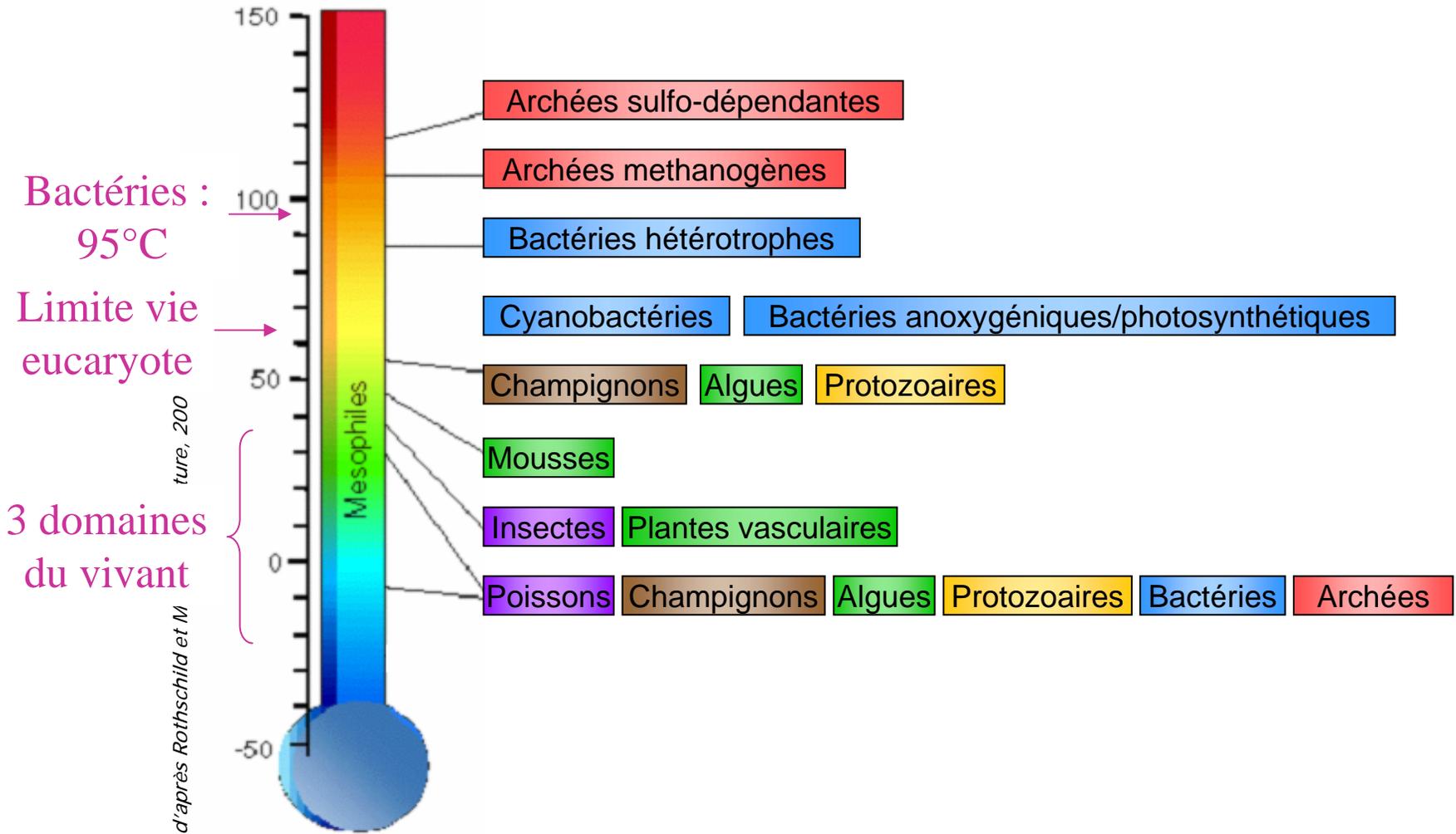
# Cas de la température



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





# Les différents types d'extrémophiles et leurs environnements

(classification liée aux paramètres physico-chimiques)

# Les hyperthermophiles

*Température optimale de croissance > 80°C*

## BIODIVERSITE (hyperthermophiles)

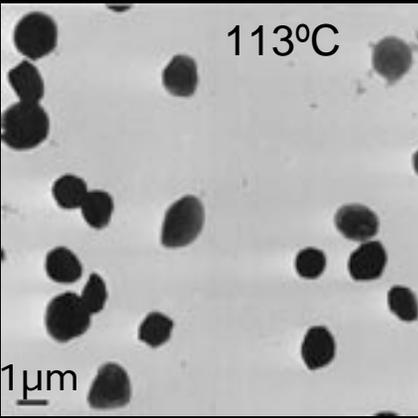
- Archées dominantes
- Bactéries (genres *Thermotoga* et *Aquifex*)
- PAS D'EUCARYOTES

## BIODIVERSITE (thermophiles)

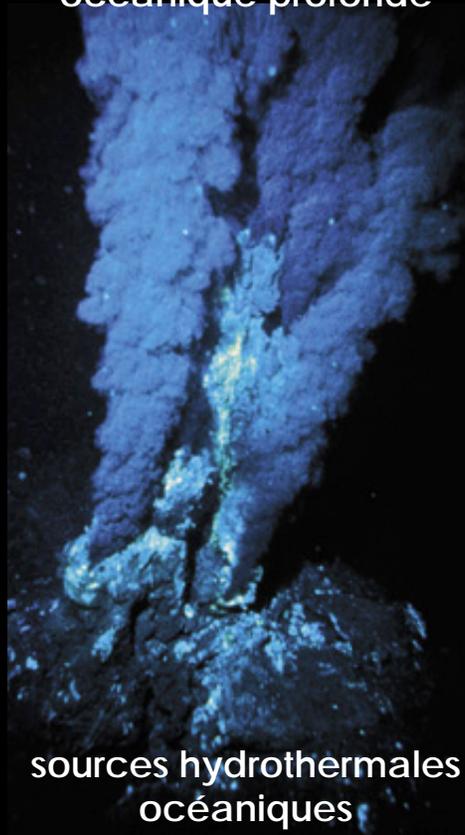
- Archées
- Bactéries
- Quelques champignons

*Pyrolobus fumarii* :

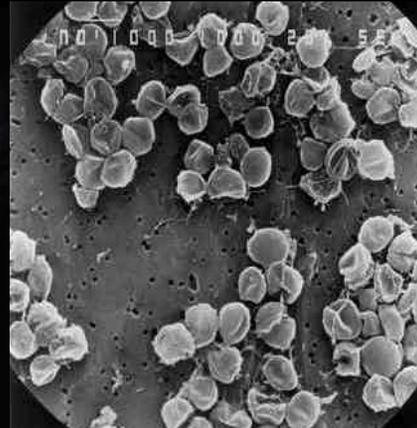
113°C



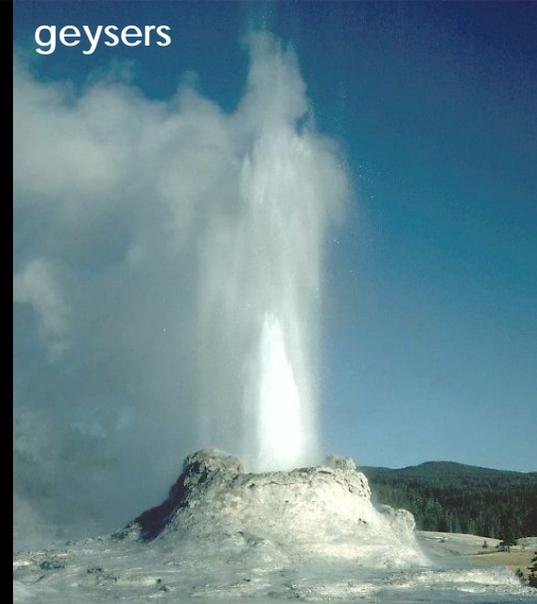
croûte continentale et  
océanique profonde



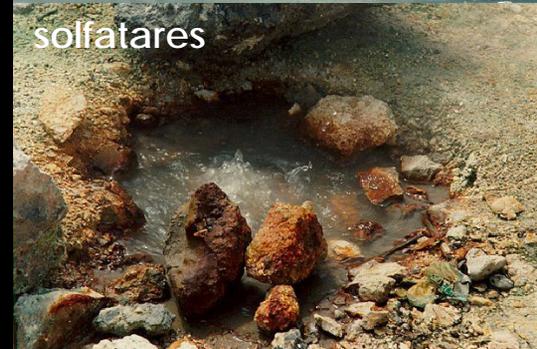
*Pyrococcus abyssi*



geysers

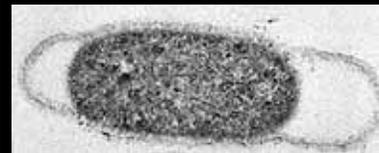


solfatares



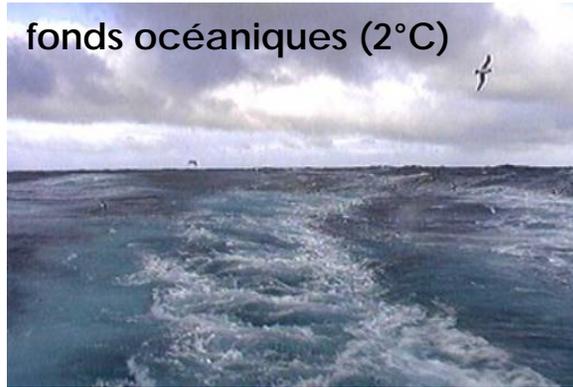
sources hydrothermales  
océaniques

*Thermotoga maritima*



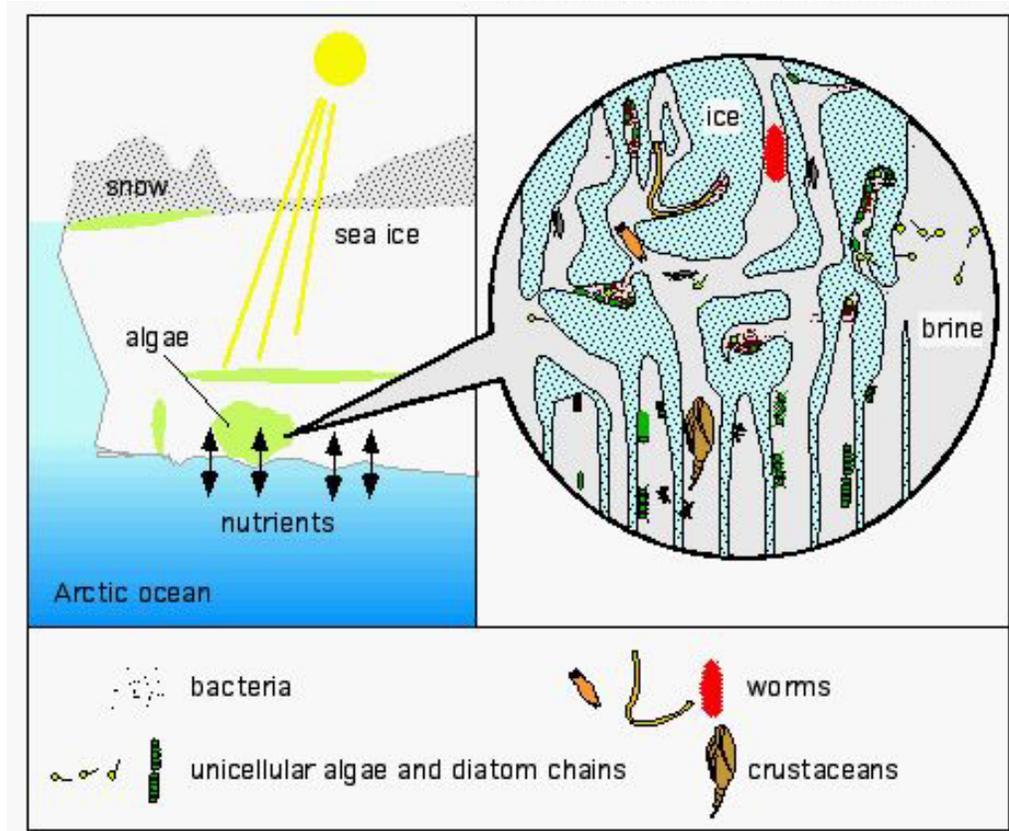
# Les psychrophiles

*Températures optimales de croissance < 5 °C*



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 :

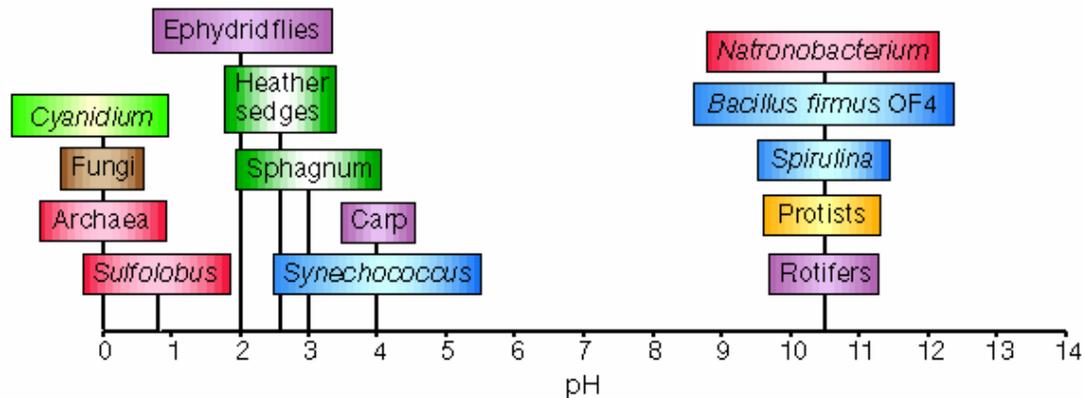
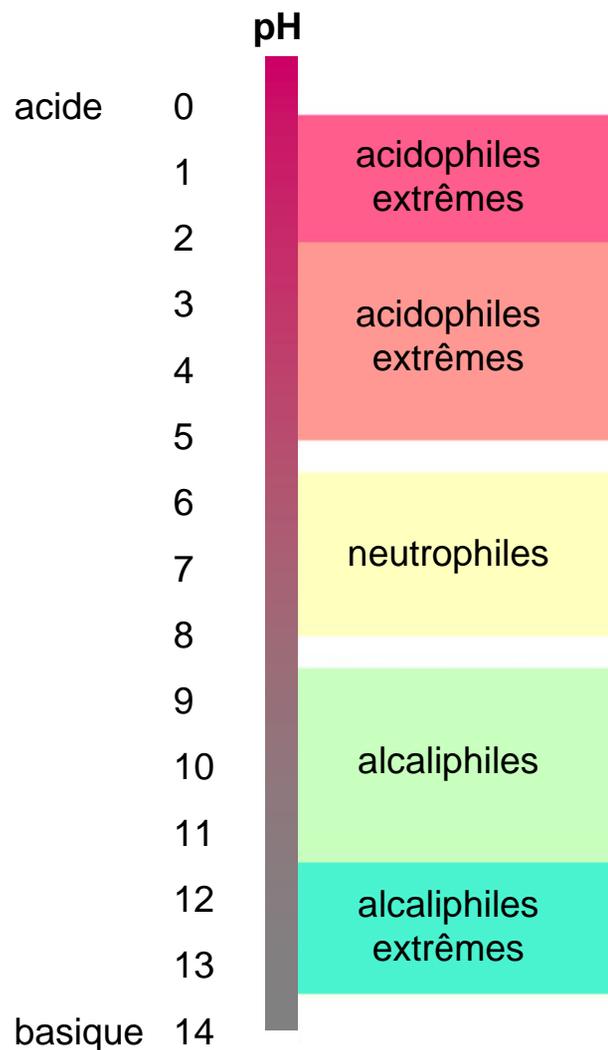
- Océan profond
- Croûte continentale et océanique profonde

## BIODIVERSITE :

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



# Cas du pH



Champignons Algues Protozoaires Bactéries Archées

# Les alcaliphiles

*pH optimum de croissance > 9-10*

## ADAPTATIONS MOLECULAIRES :

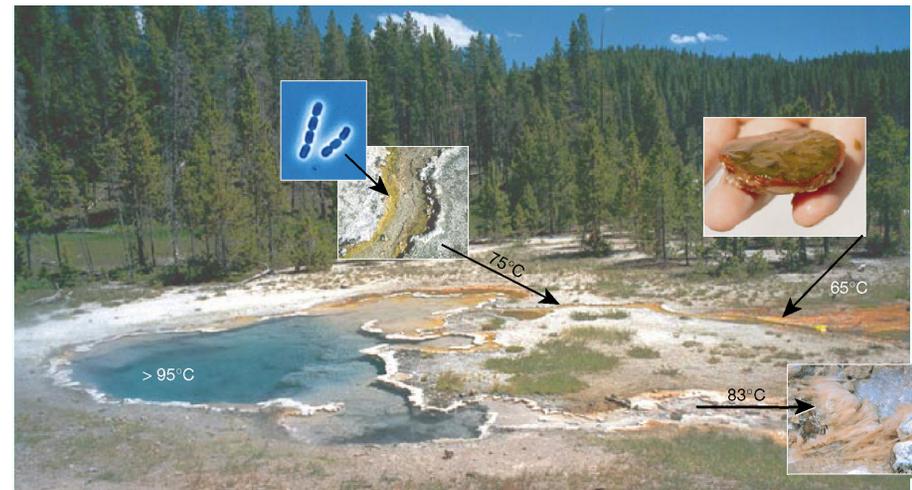
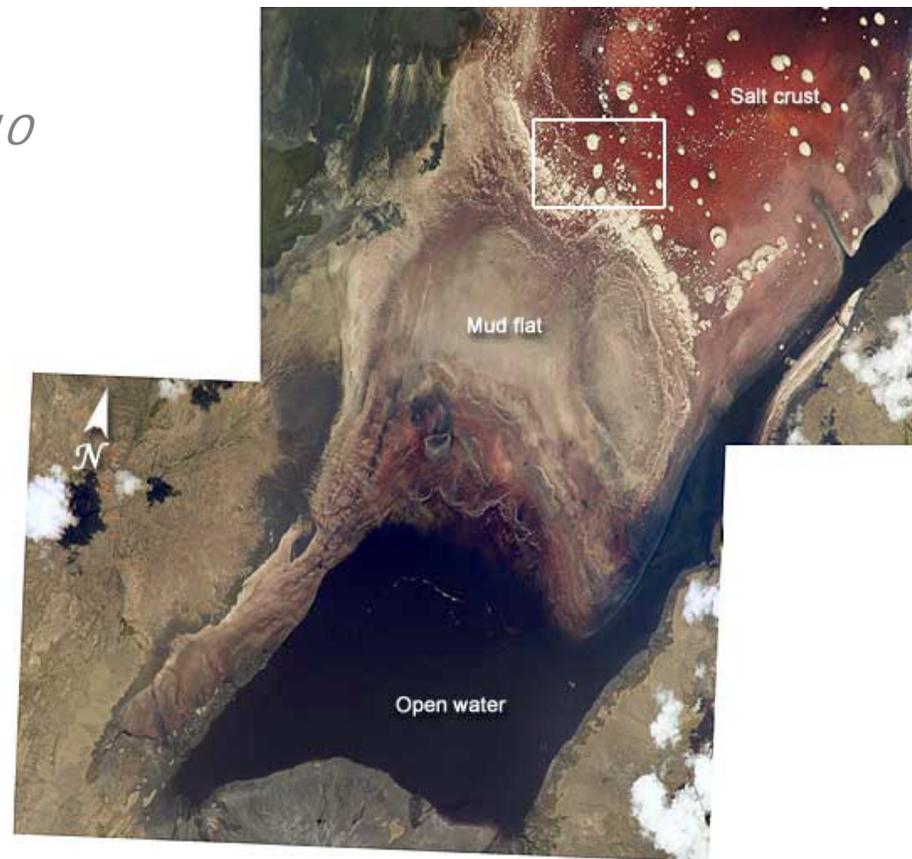
- Grande capacité interne de tamponnage
- Surface externe de la cellule chargée négativement
- Importation de protons par des antipores

## BIOTOPES :

- Lac de sodes
- Sources chaudes alcalins

## BIODIVERSITE :

- Archées, Bactéries, Eucaryotes (quelques protistes)



# Les acidophiles

*pH optimum de croissance < 2-3*

## ADAPTATIONS MOLECULAIRES :

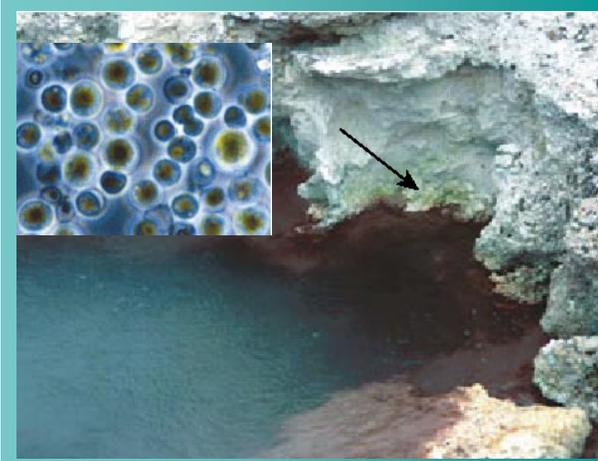
- Grande capacité interne de tamponnage
- Surface externe de la cellule chargée positivement
- Exportation de protons par des enzymes membranaires

## BIOTOPES :

- Régions minières
- Sources chaudes acides
- Solfatares acides

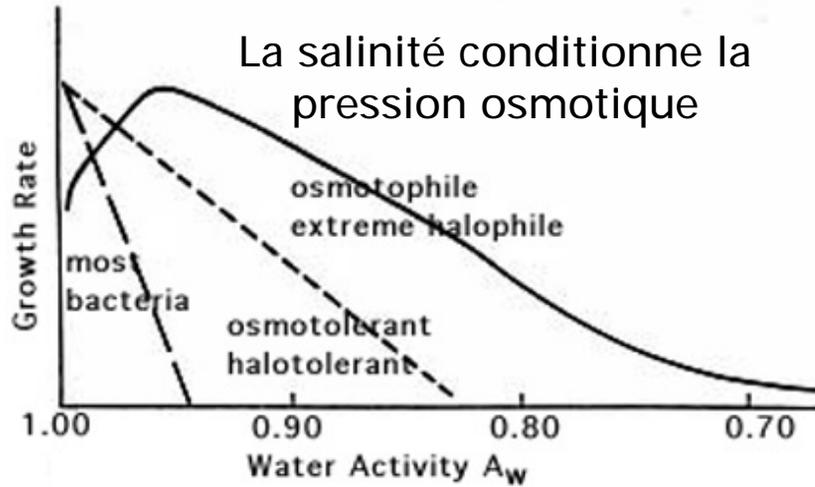
## BIODIVERSITE :

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

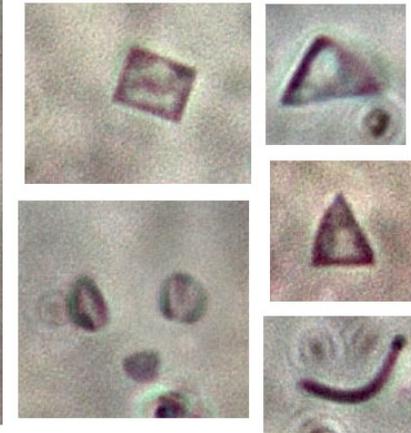
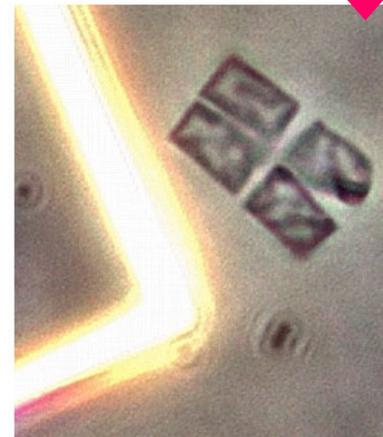
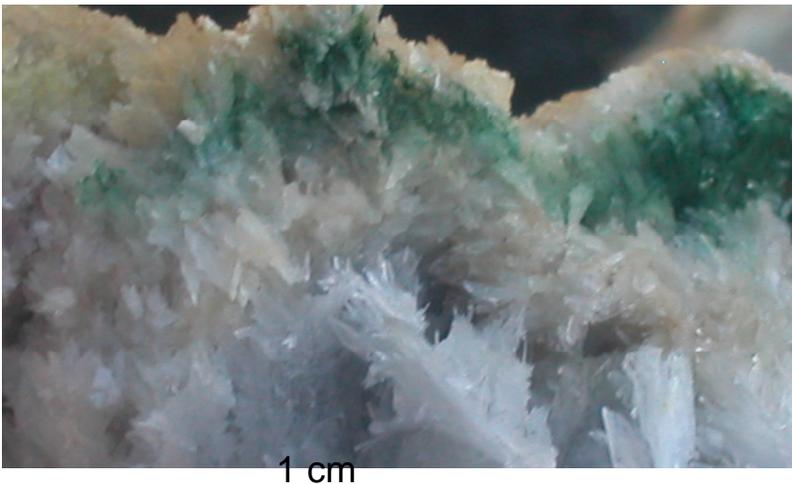
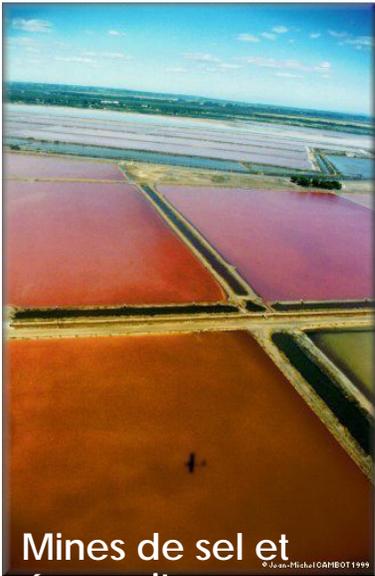


# Les halophiles

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



( $A_w$ ) 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 :

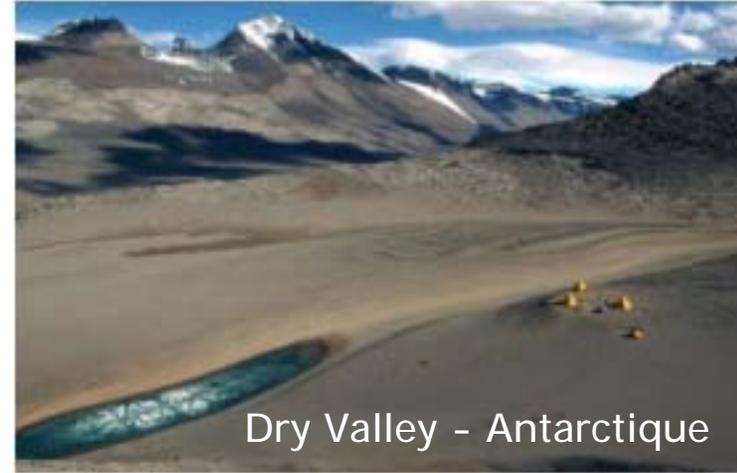
- Augmentation de l'osmolarité interne
- Stabilité de l'ADN : protéines stabilisantes et mécanismes puissants de réparation

## 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

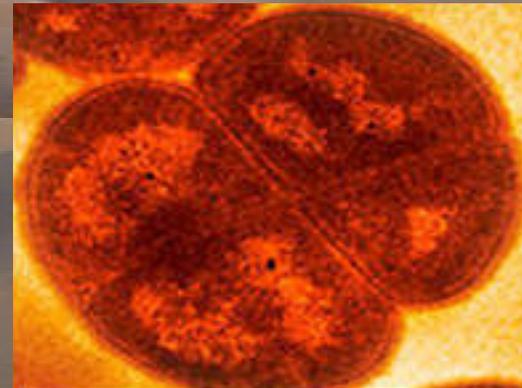
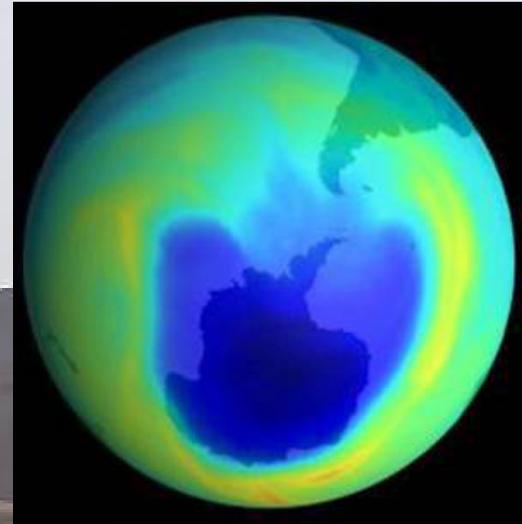
## BIOTOPES :

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

## BIODIVERSITE :

- Archées, Bactéries

*Deinococcus radiodurans*

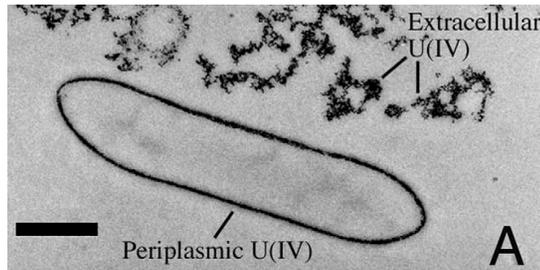


# Les métallotolérants

*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

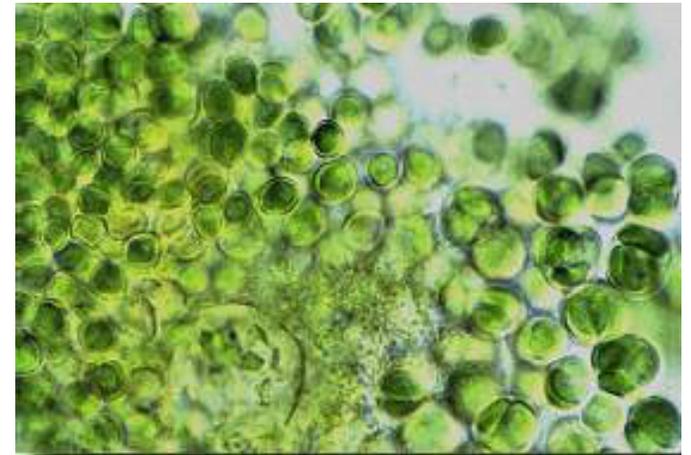
*hyperthermophiles : plusieurs lignées d'archées, nombre très réduit de bactéries*

⇒ 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

# La biosphère souterraine

- Eau permet la survie et le développement d'une grande variété de microorganismes
- Habitats varient en fonction de la zone géographique et de la profondeur (biogéographie en 3D)
- 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

# Communauté microbiennes souterraines profondes

## En résumé :

- Métabolisme anaérobie strict
- Environnement réducteur
- Densité microbienne faible
- Taux métaboliques bas (faible quantité de nutriments)
- Très stables
- protégées des irradiations
- Les processus sont lents et limités par la diffusion.
- Facteurs limitants de la vie microbienne : caractéristiques physico-chimiques de l'habitat (température, pression, pH, porosité, ...)

# En résumé :

- Capacité microbienne d'utiliser toutes formes d'énergie thermodynamiquement disponibles dans l'environnement
- Grande variété de fonctions biochimiques et métaboliques
- Production continue de  $H_2$ ,  $CH_4$ ,  $CO_2$  = sources de carbone et d'énergie
- Rôle primordial de l'hydrogène  
*(95 % d'archées méthanogènes utilisant  $H_2$  et  $CO_2$  pour produire  $CH_4$ )*
- Sources de carbone
  - ⇒ Carbone organique de surface drainé par les eaux de recharge souterraines
  - ⇒ Matière organiques des roches sédimentaires
  - ⇒ Gaz en provenance du manteau ( $CO_2$ ,  $CH_4$ , ..)
  - ⇒ ...
- Les microorganismes intraterrestres ne peuvent pas être plus actifs que ce que permet la quantité d'énergie biodisponible

# Rôle clé de l'hydrogène moléculaire

- Omniprésent dans la nature
- Capacité à libérer des protons et des électrons
- Source d'énergie importante pour les bactéries
- Permet la réduction des nitrates, sulfates, métaux (Fe, Mn, ...), et du CO<sub>2</sub>
- Peut être produit de manière abiotique dans les environnements souterrains par:
  - Réaction entre les gaz dissous dans le système C-H-O-S des magmas
  - Décomposition du CH<sub>4</sub> en graphite et H<sub>2</sub> à des températures supérieures à 600°C
  - Réaction entre CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O et CH<sub>4</sub> à des températures élevées
  - Radiolyse de l'eau
  - catalyse des silicates en présence d'eau (pH légèrement acide)
  - Hydrolyse des minéraux ferreux présents dans les roches basiques et ultrabasiques (serpentinisation)  
$$2\text{FeO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2 + \text{FeO}_3$$
- H<sub>2</sub> peut ainsi diffuser dans la lithosphère pour alimenter des écosystèmes anaérobies

# Cycle proposé pour le carbone et l'hydrogène dans la biosphère profonde (en condition anoxique)

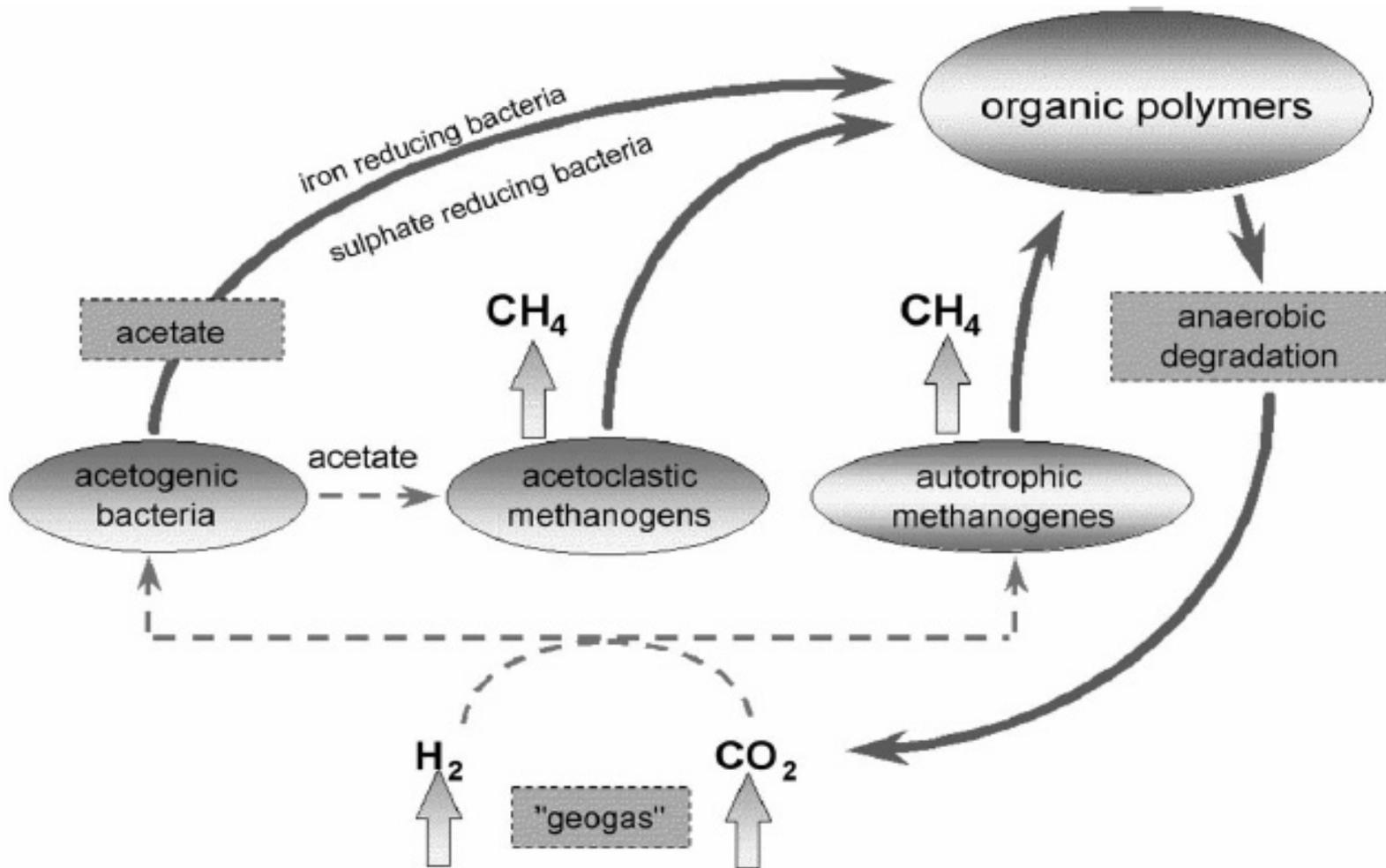


Fig. 2. Scheme of subterranean microbial anaerobic community based on energy of hydrogen (from Pedersen, 1997).

# Rôle clé de l'hydrogène moléculaire

- Selon les accepteurs d'électrons disponibles sous forme inorganiques dans le système on peut avoir :
  - Méthanogenèse
  - Acétogenèse
  - Sulfato réduction
- Les bactéries autotrophes capables de réaliser la réaction  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$  peuvent fonctionner comme producteur primaire de la matière organique

études de la diversité et de l'abondance des populations microbiennes intraterrestres mais peu d'éléments sur les types d'activité et états métaboliques (espèces actives métaboliquement ou dormantes ?)

# 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

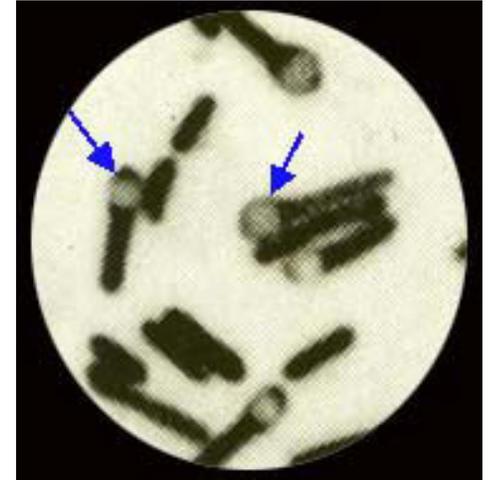
Spore = structure de résistance

- 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

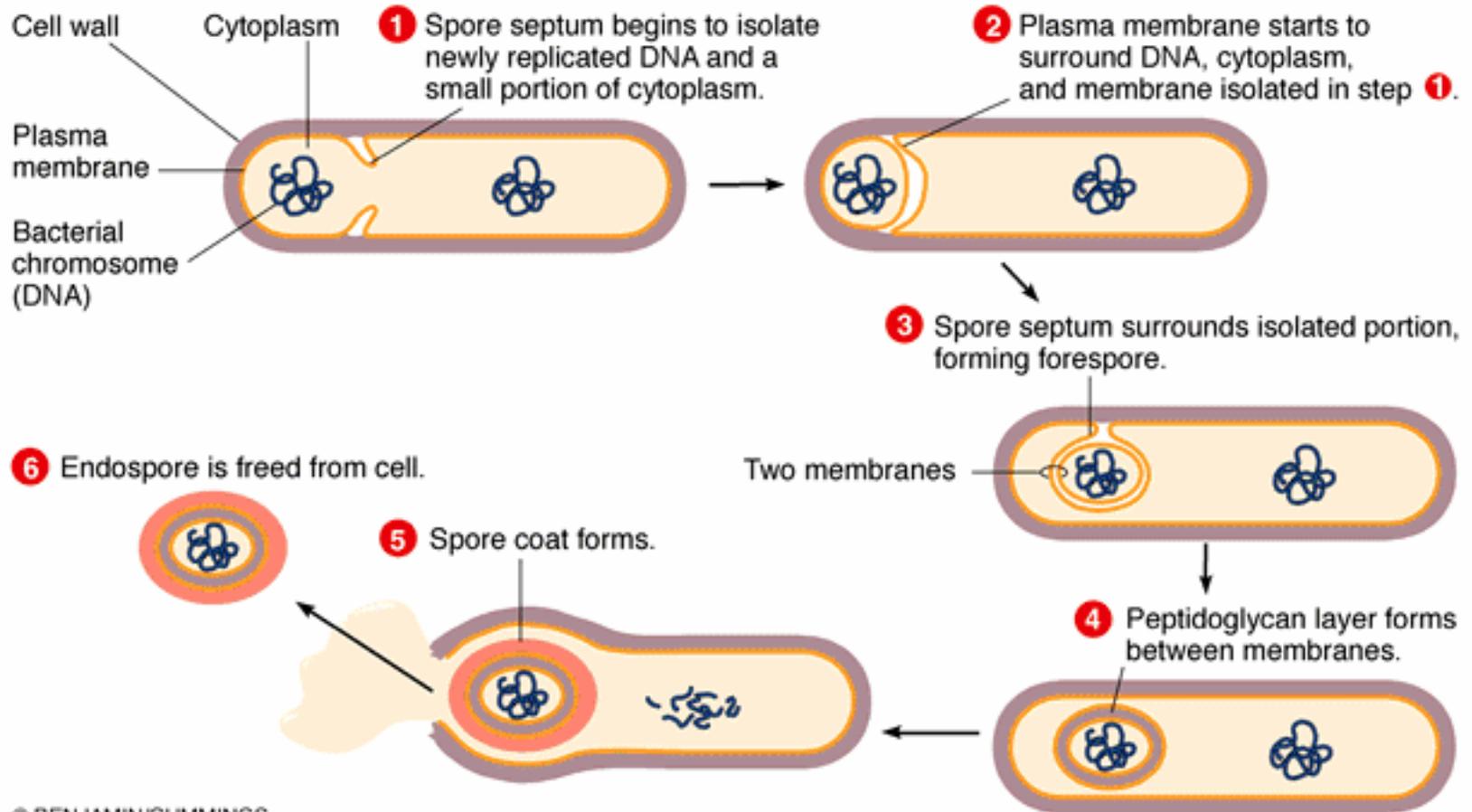


exposition des spores de *Bacillus subtilis* en domaine interplanétaire



# Processus de formation des spores

(a) Sporulation, the process of endospore formation



# Longévité

Halophiles = records de longévité

Formes de conservation les plus efficaces :

- **cryopréservation** :

⇒ laboratoire : souches bactériennes congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$  (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  
evaporites anciennes (11-425 Ma)*



