

Chapitre I

L'ETUDE DU DOMAINE OCEANIQUE PROFOND : INTERETS ET IMPERATIFS

RESUME

Les différentes étapes de la minéralisation (activités ectoenzymatiques (aminopeptidase – EAA et phosphatase – PA), production de biomasse bactérienne (BP), assimilation (GA) et respiration (GR) de monomères) ont été étudiées dans l'ensemble de la colonne d'eau, à l'interface benthique et dans les dépôts récents en Mer Ligure, Golfe du Lion et Mer Ionienne. La relative homéothermie de la colonne d'eau Méditerranéenne nous a permis d'apprécier les effets de la pression hydrostatique sur les activités microbiennes indépendamment des effets des faibles températures habituellement observées dans les océans profonds. Cette étude a permis de prouver que, dans le domaine pélagique profond chaque étape conduisant à la minéralisation de la matière organique (de l'hydrolyse des macromolécules jusqu'à la production finale de CO₂) est réalisée par des organismes adaptés aux conditions ambiantes de pression. En effet, en période de stratification, la décompression d'un échantillon profond entraîne une sous-estimation moyenne de son activité métabolique de $3,6 \pm 4,3$ (\pm e.t.; n = 99). Malheureusement, un tel écart à la moyenne empêche d'utiliser cette moyenne comme facteur de correction des mesures effectuées sur des échantillons décomprimés.

Les microflores profondes doivent tirer l'essentiel de leur demande carbonée de la matière particulaire qui chute le long de la colonne d'eau. C'est le cas au printemps 2000 à la station DYFAMED où les bactéries pélagiques profondes libres présentent des activités aminopeptidasiques (EAA) répondant étroitement à l'apport en matériel frais (le flux potentiel d'aminopeptides hydrolysés entre 1000 et 2000 m est égal à $490 \text{ mg C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) et un rendement d'utilisation de l'acide glutamique élevé (65 %). En automne, les fortes activités ectoenzymatiques potentielles ne sont pas cohérentes avec le très faible flux de particules organiques, ce qui suggère qu'au cours des périodes d'ultra-oligotrophie, les microflores profondes doivent puiser leur source de carbone dans la matière organique dissoute réfractaire. L'utilisation de ce matériel nécessite plus d'énergie : le rendement d'utilisation n'est plus que de 12 %. La structure taxonomique des microflores profondes est différente de celle des eaux de surface, conséquence probable d'une adaptation à la forte pression hydrostatique et à un matériel organique plus réfractaire.

Si la décompression des échantillons de la colonne d'eau induit une sous-estimation des activités microbiennes, celle des échantillons d'eau proche du fond provoque une sur-estimation des mesures. Cette divergence est attribuée à la différence d'origine des peuplements microbiens dans la colonne d'eau et dans le néphéloïde de fond. Les vitesses métaboliques mesurées dans les sédiments superficiels sont supérieures d'un ordre de grandeur à celles mesurées dans la colonne d'eau. Cependant, le calcul des flux potentiels de dégradation et de minéralisation à travers les eaux superficielles (jusqu'à 200 m), les eaux intermédiaires et profondes (200-2000m) et l'étage benthique (eaux surnageantes et sédiment mélangé) suggère un potentiel métabolique qui est loin d'être négligeable dans les compartiments profonds. Pour affiner ces estimations, on a utilisé une approche expérimentale originale pour simuler la chute du matériel particulaire dans la colonne d'eau.

La stratégie adoptée, respectant les conditions caractéristiques du domaine profond, permet une étude de l'évolution quantitative et qualitative de la composition chimique de la matière organique, et de la diversité des microflores, de la zone productrice de surface jusqu'au fond océanique. Cette stratégie conduira à une estimation plus réaliste des flux de matière et énergie qui assurent le couplage pelagos-benthos, l'une des clés principales du fonctionnement de l'Océan global.

I. L'ETUDE DU DOMAINE OCEANIQUE PROFOND : INTERETS ET IMPERATIFS

I.1 Intérêt biogéochimique

L'océan mondial est considéré comme le plus large réservoir de carbone réactif sur la planète Terre. La presque totalité (>97 %) de ce réservoir de carbone est sous forme de matière organique dissoute (DOM) (Benner *et al.*, 1992). Les bactéries hétérotrophes sont considérées comme les consommateurs et reminéralisateurs de la DOM dans les océans (Williams & Gray, 1970; Pomeroy, 1974). Elles jouent un rôle de pivot dans le recyclage de la matière organique au sein de la boucle microbienne et du réseau trophique qui en découle (Azam *et al.*, 1983; Ducklow & Carlson, 1992). Dans la zone euphotique, environ 50 % de la production primaire journalière est utilisée par les processus microbiens pour produire de la biomasse et satisfaire aux besoins énergétiques au travers de la respiration bactérienne (Ducklow & Carlson, 1992). D'un point de vue biogéochimique, l'étude du rôle des processus réalisés par les microorganismes planctoniques doit être étendue à la zone aphotique afin d'élucider la contribution des communautés microbiennes profondes dans les flux océaniques de carbone.

Dans les paragraphes suivants, nous essaierons de caractériser au mieux la DOM disponible pour les microorganismes du domaine profond afin de choisir les proxys nécessaires à l'évaluation des processus microbiens profonds et leur rôle dans la minéralisation de la matière organique.

I.1.1 **Caractérisation de la DOM**

I.1.1.1 **Classes de taille de la DOM**

La distinction selon la taille de la matière organique dans les systèmes aquatiques est basée sur la séparation physique à travers une membrane ou un filtre de porosité variable. Pour les géochimistes, la séparation de la matière organique particulaire (POM) et dissoute (DOM) est réalisée sur des filtres ayant des pores de 0,2 à 1,0 μm . En pratique, les géochimistes évitent souvent l'étape de filtration (source de contamination) en particulier dans les échantillons d'eaux profondes où la fraction particulaire est infime (~1 % du carbone organique total ou TOC). La biomasse bactérienne est donc le plus souvent incluse dans cette fraction dissoute.

Les techniques d'ultrafiltration tangentielle permettent de séparer en deux classes de taille la DOM. Les membranes les plus souvent utilisées, de 1000 daltons¹ (soit ~1 nm de diamètre de porosité), séparent la DOM de faible poids moléculaire (LMW DOM pour *low molecular weight* DOM) de la DOM de haut poids moléculaire (HMW DOM pour *high molecular weight* DOM).

En surface, la majorité (60-75 %) du carbone organique dissous (DOC) passe au travers des membranes d'ultrafiltration de porosité de 1000 Da. Dans les eaux profondes, le LMW DOC représente 75-80 % du DOC, indiquant que la fraction LMW DOM est la fraction majoritaire de la matière organique dans les océans (Benner, 2002). La majorité du LMW DOM dans les eaux profondes est sous forme combinée, comme en témoignent les conditions hydrolytiques sévères requises pour libérer les acides aminés libres dissous (DFAA pour *Dissolved Free Amino Acids*) et les sucres neutres (polysaccharides) lors de leur caractérisation moléculaire (Druffel *et al.*, 1992; Borch & Kirchman, 1997; Skoog & Benner, 1997). Les formes monomériques des principales classes de biomolécules (i.e. acides aminés, sucres, acides gras) ont typiquement des tailles moléculaires supérieures à 100 Da, ce qui signifie que l'ultrafiltration tangentielle à 1000 Da laisse passer au travers de ses pores des molécules ayant moins de 10 sous-unités de monomère (Benner, 2002). Malheureusement, cette coupure à 1000 Da, devenue classique pour les données de géochimie, ne correspond pas à la limite de taille des molécules pouvant traverser directement les membranes cellulaires des microorganismes (<~600Da) (Nikaido & Vaara, 1985).

I.1.1.2 Teneurs en DOC dans les eaux profondes

Les progrès analytiques en géochimie ont été considérables ces 20 dernières années depuis les travaux controversés de Suzuki *et al.* (1985) et Sugimura & Suzuki (1988) décrivant un "nouveau" DON et DOC (Hedges, 2002). Actuellement, les mesures analytiques utilisent deux types de références fournies par le Hansell Laboratory (Université de Miami) : (1) une référence d'eau de mer profonde correspondant à des échantillons collectés à 2600 m dans la Mer des Sargasses (Deep Sea Water Reference à 44-46 µM DOC, Bermuda Biological Station for Research, INC.) et (2) une référence de faible contenu en carbone (Low Carbon Water d'un contenu d'environ 2 µM DOC).

¹ Unité de masse souvent utilisée par les biochimistes, le dalton, qui est la masse d'un atome d'hydrogène, vaut $1,67 \times 10^{-24}$ g. Il est symbolisé par Da.

Les concentrations en DOC sont relativement uniformes en profondeur (Amon & Benner, 1996), variant entre ~35 et 45 μM dans les océans (Sharp *et al.*, 1995; Benner, 2002) et ~50 μM en Méditerranée (Cauwet *et al.*, 1997; Avril, 2002; Sempéré *et al.*, 2002). Cette uniformité de la teneur en DOC des eaux profondes semble refléter une large fraction réfractaire (Amon & Benner, 1996). Le pool du DOC apparaît effectivement résistant lorsqu'on considère son âge apparent estimé entre 4000 et 6000 ans, respectivement dans l'Océan Atlantique Nord (Williams & Druffel, 1987) et l'Océan Nord Pacifique (Bauer *et al.*, 1992). Une telle longévité, en contraste avec une homogénéité des teneurs en DOC, nous incite à rechercher les processus intervenant dans la régulation du DOC dans le domaine océanique profond.

I.1.1.3 Disponibilité de la DOM

Le stock de DOM dans les océans se présente sous une large gamme de composés allant des petites molécules simples (tels que les acides aminés libres dissous (DFAA) ou les carbohydrates) qui ont un "turn over" de la minute à la journée (Keil & Kirchman, 1991; Kirchman *et al.*, 1991; Keil & Kirchman, 1992) aux structures moléculaires complexes (tels que les substances humiques) qui ont un "turn over" du siècle au millénaire (Williams & Druffel, 1987; Bauer *et al.*, 1992). Carlson (2002) propose un schéma conceptuel présentant les différentes fractions du DOC le long de la colonne d'eau (Figure I-1).

Afin de prendre en compte à la fois la faible disponibilité, le faible poids moléculaire et la fraction non-caractérisée de la DOM, Amon & Benner (1996) proposent le modèle du "continuum taille-réactivité". Ce modèle suggère que lorsque la matière organique est décomposée, elle devient moins bioréactive et plus petite en taille. Ainsi, la bioréactivité de la matière organique décroît comme suit : POM \rightarrow HMW DOM \rightarrow LMW DOM; chaque fraction de taille se compose d'un continuum de composition, de réactivités et d'états diagénétiques (Amon & Benner, 1996).

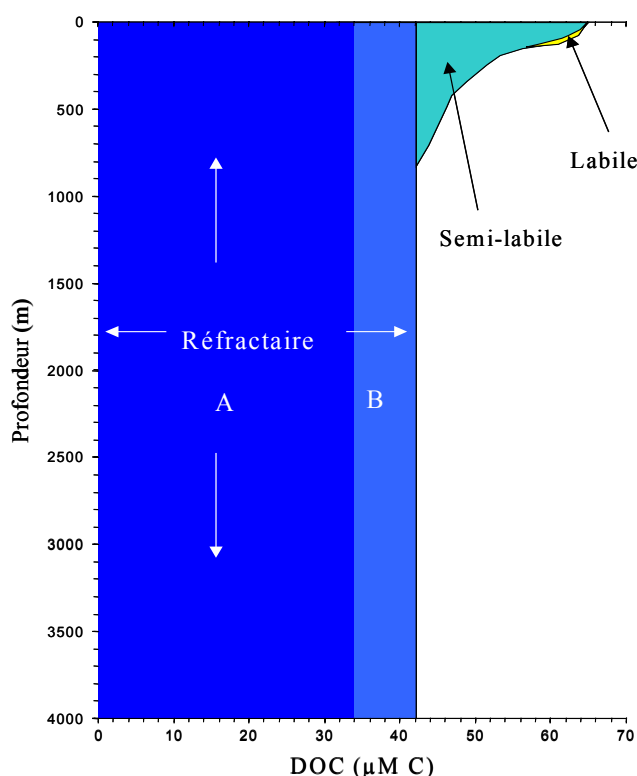


Figure I-1. Schéma conceptuel de la distribution du DOC réfractaire, semi-labile et labile le long de la colonne d'eau. Le pool réfractaire est séparé en DOC ayant un turn over sur une échelle de temps (A) supérieure et (B) inférieure à la durée du cycle de la circulation générale des océans (Carlson, 2002).

I.1.1.4 Accumulation de la DOM

La DOM réfractaire serait formée à partir de composés labiles, par des réactions de condensation par la lumière et les métaux, ou par la modification du matériel LMW au cours des processus biologiques (Carlson, 2002 et références incluses). Ainsi, Keil & Kirchman (1994) ont démontré que des protéines labiles sont transformées abiotiquement en protéines réfractaires. Ogawa *et al.* (2001) ont démontré, qu'en moins de 48 heures, de la HMW DOM réfractaire est produite après utilisation de composés labiles (acide glutamique, glucose) et persiste pendant plus d'une année. Hedges *et al.* (2000) suspectent que la matière organique serait "capsulée" créant ainsi un bouclier rendant les processus de minéralisation des microflores hétérotrophes plus difficiles.

La Figure I-1 présente le DOC du domaine océanique profond réfractaire à l'échelle de temps (A) supérieure ou (B) inférieure à la durée du cycle de la circulation générale des océans. Les travaux de Hansell & Carlson (1998), qui mettent en évidence un gradient de DOC profond de $14 \mu\text{M}$ entre l'Atlantique Nord et le Pacifique Nord, semblent indiquer qu'une portion du DOC profond réfractaire disparaît à une vitesse de l'ordre 10^{-3} à 10^{-4} an^{-1} . Anderson & Williams (1999) proposent un modèle couplant photochimie et biologie dans lequel le DOC profond est

biologiquement réfractaire mais photochimiquement réactif. Une fois exposée aux radiations UV de surface, le DOC réfractaire serait transformé par photo-oxydation ou par cassage de la DOM réfractaire en DOM labile et utilisé par les bactéries hétérotrophes (Mopper *et al.*, 1991). Ces mécanismes photochimiques interviennent certainement dans la disparition de la DOM réfractaire de surface, mais comme le fait remarquer Williams (2000), ces processus sont limités à la zone de sub-surface et ne peuvent être pris en compte dans le gradient de DOC réfractaire observé par Hansell & Carlson (1998). Williams (2000) propose un autre modèle de décomposition du DOC profond, dans lequel les bactéries associées aux particules en cours de chute supportent une courte phase de croissance et servent ainsi d'intermédiaires à la disparition du DOC profond réfractaire. Mais peut-on attribuer aux bactéries associés aux particules qui chutent la disparition du DOC profond réfractaire ? La pression hydrostatique qui augmente le long de la colonne d'eau n'a-t-elle pas un effet inhibiteur sur ces bactéries originaires des couches océaniques superficielles et donc en principe adaptées à la seule pression atmosphérique ? Des processus physiques, chimiques, microbiens doivent donc réguler ce DOC profond dit "réfractaire" puisque ses teneurs restent stables et que l'océan profond ne s'est pas encore transformé en "soupe" de matière organique réfractaire!

I.1.1.5 Composition moléculaire de la DOM

La composition moléculaire de la matière organique dissoute n'est que peu référencée, pourtant il y a un besoin évident de la caractériser dans un futur proche (Hedges, 2002). Les profils complets sur l'ensemble de la colonne d'eau n'ont été réalisés que pour 2 classes biochimiques, les acides aminés et les sucres (Benner, 2002). Les acides aminés les plus abondants sont l'acide glutamique, l'acide aspartique, la glycine et l'alanine (Huberton *et al.*, 1995; Mccarthy *et al.*, 1996; Amon *et al.*, 2001; Benner, 2002). Les profils des acides aminés totaux dissous (THAA) affichent des concentrations variant entre 200 et 500 nM en surface et entre 80 et 160 nM en profondeur dans les océans polaires (Huberton *et al.*, 1995). Keil & Kirchman (1999) donnent des concentrations en Mer des Sargasses variant entre 167 nM à 1000 m et 810 nM en surface. Les acides aminés constitueraient environ 1 à 3 % du DOC en surface et 0,8 à 1,8 % du DOC en profondeur. Les substances humiques représenteraient entre 5 et 25 % du pool de DOC en surface, et entre 15 et 25 % dans l'océan profond, la plus grande part du DOC restant en fait chimiquement indéfinie (Benner, 2002).

I.1.2 Apports nutritifs au domaine profond

I.1.2.1 Le POC, principal vecteur de carbone et d'énergie en profondeur

Le milieu pélagique profond est caractérisé, entre autres, par une teneur en composés organiques directement assimilables insuffisante pour soutenir la croissance des bactéries profondes. Le flux de particules constitue la principale source de carbone et d'énergie utilisable pour le métabolisme des microflores profondes. Ainsi 40 à 100 % du flux de carbone organique particulaire (POC) seraient utilisés par les bactéries dans la zone mésopélagique (200-1000 m), suggérant un couplage étroit entre le flux de POC et les bactéries libres de la zone mésopélagique (Cho & Azam, 1988). Récemment, Nagata *et al.* (1998) suggéraient que ce transfert "POC en cours de chute → DOC → bactéries" existe également dans la zone bathypélagique (en dessous de 1000 m de profondeur), permettant la mise en place d'une "boucle microbienne" dans le domaine océanique profond (Tanaka & Rassoulzadegan, 2002). En effet, au cours de leur chute, les particules sont solubilisées à la fois par des processus de solubilisation et de fragmentation abiotiques (Karl *et al.*, 1988), et par des processus d'hydrolyse enzymatique (Cho & Azam, 1988). L'intervention des bactéries lors de la chute des particules pourrait avoir une grande influence sur le cycle océanique du carbone (Azam & Long, 2001; Kiørboe & Jackson, 2001). Nous discuterons plus en détail de ce couplage possible entre la chute des particules et le métabolisme des microflores profondes dans le manuscrit n°4 (Tamburini *et al.*, soumis-c).

La matière organique qui a été produite en surface subit donc d'importantes transformations au cours de son transit à travers la colonne d'eau (Wakeham & Lee, 1989). Il est classiquement admis que plus de 90 % de cette matière organique sont en fait recyclés dans la colonne d'eau. La nature chimique de la matière organique qui atteint le sédiment est donc à la fois le reflet de sa source, des processus de dégradation subits au cours de son transit, processus qui dépendent eux même de sa vitesse de chute, et de sa composition d'origine.

I.1.2.2 Composition moléculaire du POC

Les acides aminés les plus abondants dans le POC sont, comme dans le DOC, l'acide glutamique, l'acide aspartique, la glycine, et l'alanine. Les acides aminés contribueraient pour environ un quart du carbone organique total en surface, et pour environ 16 % en profondeur (Cowie & Hedges, 1994; Lee *et al.*, 2000). Cowie & Hedges (1992), ainsi que Lee *et al.* (2000), estiment que l'acide glutamique (Glu), l'arginine (Arg) et les acides aminés aromatiques sont plus labiles que les autres acides aminés puisque leur teneur diminue avec la

profondeur. Par contre, la glycine (Gly) et la sérine (Ser) seraient mieux conservés le long de la colonne d'eau (Cowie & Hedges, 1994; Nguyen & Harvey, 1997). La Figure I-2 illustre la composition relative en acides aminés retrouvée à différents niveaux de l'océan.

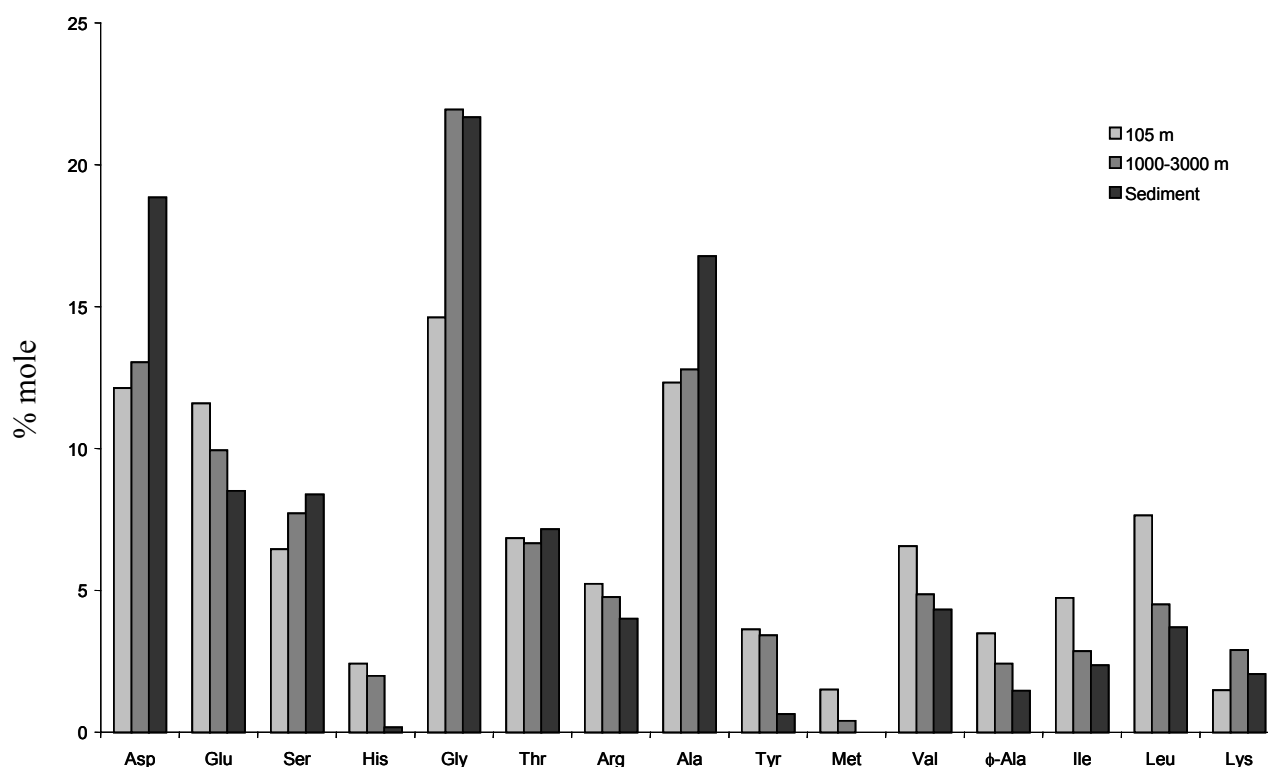


Figure I-2. Composition relative moyenne des acides aminés (en % mole) du POC à 105m, entre 1000 et 3500m et dans les sédiments du Pacifique Central Equatorial. Schéma réalisé d'après les données de Lee *et al.* (2000). Les échantillons provenaient de □ pièges à particules situés à 105 m de profondeur; ■ pièges à particules situés à 1000 et 3000 m de profondeur; ■ sédiments. Asp, acide aspartique; Glu, acide glutamique; Ser, sérine; His, histidine; Gly, glycine; Thr, thréonine; Arg, arginine; Ala, alanine; Tyr, tyrosine; Met, méthionine; Val, valine; Φ-Ala, phénylalanine; Ile, isoleucine; Leu, leucine; Lys, lysine.

Ce qu'il y a de plus surprenant dans les nombreuses données recueillies sur le carbone organique particulaire dans l'Océan Pacifique Central Equatorial (Wakeham *et al.*, 1997; Hedges *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Hedges *et al.*, 2001), c'est la proportion de carbone organique non caractérisé qui augmente avec la profondeur (Figure I-3).

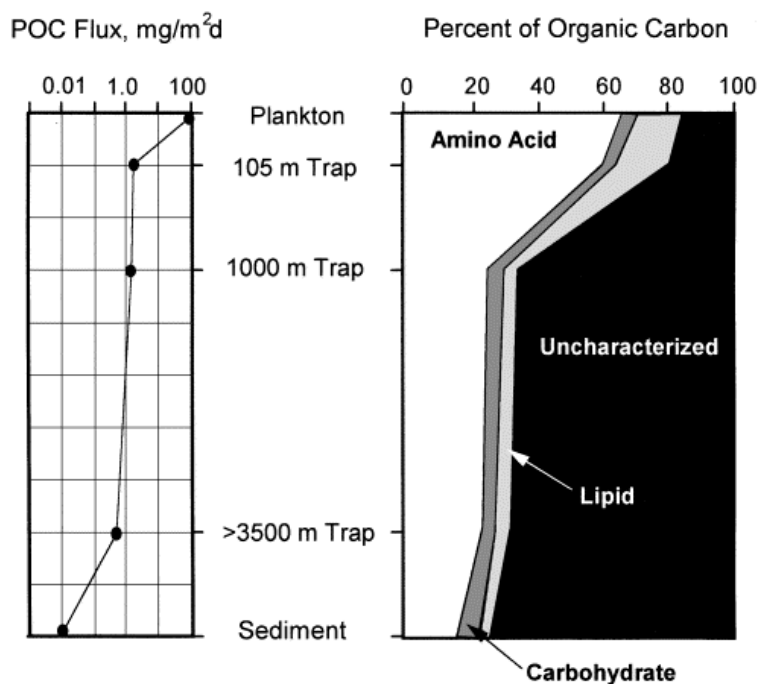


Figure I-3. Flux de carbone organique particulaire (POC) et fractions correspondantes en acides aminés, carbohydrates, lipides et la fraction non caractérisée du carbone organique (contenu en C d'une classe de composé en pourcentage du carbone organique total) dans des échantillons de plancton, de pièges à sédiment, et de sédiments dans le Pacifique Central Equatorial. La fraction du carbone organique non-caractérisée d'un point de vue moléculaire augmente avec la profondeur pour devenir le constituant majeur des échantillons de POC profonds (Wakeham *et al.*, 1997; Hedges *et al.*, 2000).

I.2 Processus de minéralisation de la matière organique

Ce travail de thèse a pour objectif l'estimation des processus microbiens agissant dans la dégradation de la matière organique, en respectant le plus possible les conditions du milieu profond. Cet objectif nous emmène (1) à définir et choisir des traceurs pertinents et, (2) à maintenir les conditions de prélèvement et d'incubation les plus proches de celles des conditions *in situ*.

Dans les paragraphes précédents, on a pu constater que le stock de matière organique dans les environnements aquatiques profonds est principalement sous forme de macromolécules qui nécessitent un pré-conditionnement préalable avant leur incorporation à l'intérieur des cellules bactériennes. Une hydrolyse enzymatique extracellulaire est nécessaire pour scinder les molécules de taille supérieure à 600 Da qui ne peuvent être transportées à travers les membranes cellulaires microbiennes (Nikaido & Vaara, 1985). L'activité de ces enzymes est, dans la plupart des cas le facteur limitant à la fois la décomposition du matériel organique et la croissance bactérienne (Hoppe, 1983; Chrost & Velimirov, 1991). Ces enzymes sont exprimées principalement par les bactéries. Selon la définition donnée par Priest (*in* Hoppe,

1983), les enzymes extracellulaires sont généralement localisées à l'extérieur de la membrane cytoplasmique (on parle d'ectoenzymes ou enzymes extracellulaires).

En l'état actuel des connaissances, les données de la géochimie organique ne permettent pas de définir clairement le contenu de la matière organique dans les océans. Toutefois, la classe de composés la mieux connue est vraisemblablement celle des peptides et des acides aminés; c'est donc sur l'utilisation de ce groupe de composés que j'ai basé ce travail de thèse. La Figure I-4 schématise les différentes mesures réalisées qui focalisent essentiellement sur la minéralisation des polymères organiques peptidiques, leur utilisation pour soutenir la biomasse bactérienne et leur minéralisation par les populations profondes (le produit final des processus métaboliques étant le CO₂). Les mesures que nous avons systématiquement réalisées sont :

- comptage total des cellules bactériennes,
- mesure des activités ectoenzymatiques aminopeptidase et phosphatase,
- assimilation et respiration du ¹⁴C-glutamate,
- production de biomasse bactérienne.

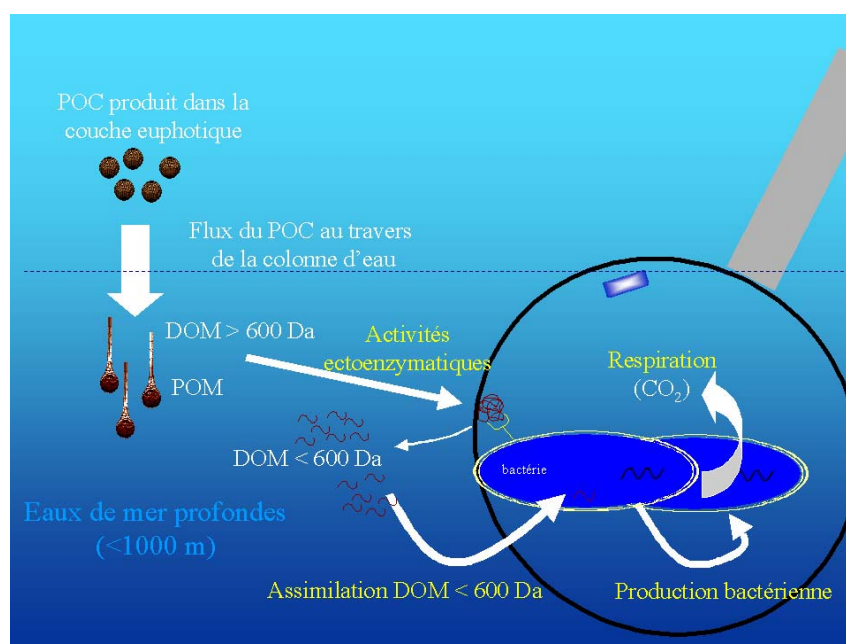


Figure I-4. Schéma des processus microbiens impliqués dans la reminéralisation de la matière organique en milieu profond. En jaune, apparaissent les mesures réalisées au cours de ces travaux : activités ectoenzymatiques, activités aminopeptidase et phosphatase; Assimilation et respiration DOM < 600 Da : utilisation du ¹⁴C-glutamate pour suivre l'assimilation et la respiration d'un monomère simple; Production bactérienne, mesurée à l'aide de la leucine tritiée.

Les microflores profondes sont-elles adaptées à utiliser la matière organique profonde dite réfractaire ? Comment peut-on s'approcher de la mesure de vitesses réelles plutôt que potentielles dans le domaine océanique profond ?

I.3 Adaptation des microflores à la forte pression hydrostatique

La découverte des sources hydrothermales océaniques profondes en 1977 a suscité un nouvel intérêt pour le domaine océanique profond, mais en fait les premières études biologiques du domaine océanique profond peuvent être créditées à l'Expédition du Challenger (1873-1876) (*in* Jannasch & Taylor, 1984). La découverte de spécimens vivants à de grandes profondeurs détruisait la théorie d'une zone azoïque, au-dessous de 600 m, suggérée dans les années 1840 par Edward Forbes. Dès 1883, Certes, (cité par Jannasch & Taylor, 1984) a pu observer au microscope des bactéries dans des échantillons profonds (jusqu'à 5000 m) de sédiments et d'eaux. Il note que des bactéries survivent à de fortes pressions hydrostatiques, semblant vivre dans un état de "vie suspendue" jusqu'à 5000 m de profondeur. En 1904, Portier utilise un tube en verre stérile et scellé comme moyen de prélèvement, ce qui lui permet de reporter et compter des bactéries vivantes et formant des colonies à différentes profondeurs (Richard, 1907 *in* Jannasch & Taylor, 1984). Ce sont ZoBell & Johnson qui réalisent en 1949 les premiers travaux dévolus à comprendre l'effet de la pression hydrostatique sur les microorganismes marins. La synthèse des travaux réalisés par ZoBell et collaborateurs sur les effets des conditions de haute pression hydrostatique sur la physiologie des bactéries profondes peut être trouvée dans la revue de ZoBell (1970).

La pression est définie comme une force appliquée sur une surface. Dans la colonne d'eau océanique, la pression hydrostatique augmente d'environ 1 bar [0,1 MPa] tous les 10 m. Différentes unités de pression sont utilisées dans la littérature (1 atm = 1,01325 bars = $1,01325 \times 10^5$ Pascals) mais l'unité légale internationale est le Pascal². Ainsi, la profondeur moyenne de l'océan global étant de 3800 m, la pression hydrostatique moyenne est donc d'environ 38 MPa.

ZoBell & Johnson³ (1949) *in* Yayanos (1995) créent le mot "barophile" pour décrire les bactéries qui ont la capacité de croître et d'entretenir leur métabolisme aussi bien, ou même mieux, sous une pression élevée qu'à la pression atmosphérique. Yayanos (1995) propose le terme de piezophile plus approprié d'un point de vue étymologique puisque le préfixe "*piezo*" donne le sens de "pression" alors que "*baro*" a un sens de "poids". Dès 1949, ZoBell & Johnson montrent qu'il y a des effets concomitants dus à la basse température et à la forte

² Par définition l'unité légale de pression est le Pascal de symbole Pa. C'est la pression exercée par une force pressante de 1 N sur une surface plane de 1 m².

³ ...barophilic [piezophilic] is a term to describe "the ability to grow and carry on metabolism as well or better under increased pressure"

pression sur le métabolisme bactérien; on parle alors de bactéries psychropiezophiles lorsque les bactéries sont adaptés à la fois à la température basse et la forte pression. La Figure I-5 schématise les relations entre les taux de croissance microbienne et la pression hydrostatique.

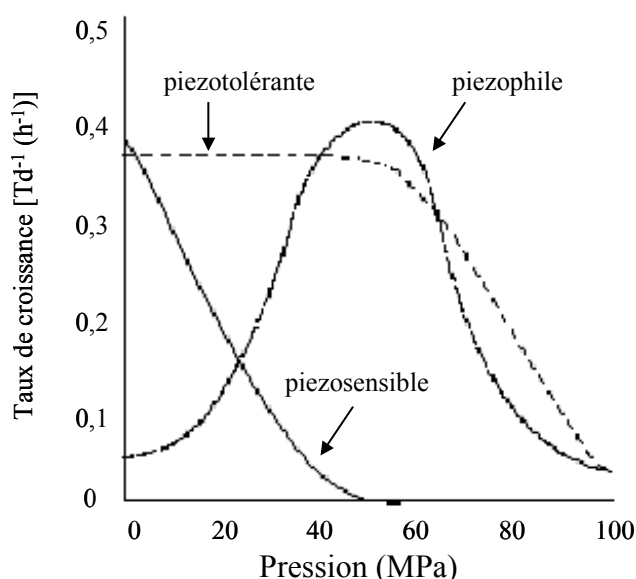


Figure I-5. Comportement des différents types de bactéries, exprimé par leur taux de croissance en fonction de la pression hydrostatique (Abe & Horikoshi, 2001).

La suite de ce chapitre présentera dans un premier temps les principaux travaux de laboratoire consacrés aux effets de la pression hydrostatique au niveau cellulaire et moléculaire. Ces travaux décrivant les différentes adaptations physiologiques mises en évidence sur des cultures de bactéries piezophiles nous amèneront à considérer, dans un deuxième temps, les techniques qu'il est nécessaire de mettre en œuvre pour obtenir une mesure réellement significative des activités métaboliques exercées par les microflore dans les écosystèmes soumis à de fortes pressions hydrostatiques.

I.3.1 Expériences en laboratoire

De nombreux travaux ont été réalisés sur les effets d'un accroissement de la pression hydrostatique sur des bactéries non marines mais piezotolérantes comme *Escherichia coli*. Ces travaux apportent, sans aucun doute, des informations majeures sur la capacité des bactéries à s'adapter à un stress quelconque comme l'accroissement de la pression hydrostatique. Toutefois, nous ciblerons cette analyse plus spécifiquement sur les travaux effectués sur des bactéries isolées du milieu océanique profond et ayant un comportement piezophile. L'objet de ce paragraphe est de réaliser une synthèse des connaissances actuelles de la réponse des bactéries adaptées aux fortes pressions hydrostatiques à des variations de ce facteur.

I.3.1.1 Taxonomie

Le prélèvement, la culture et la purification sans décompression de bactéries prélevées à très grande profondeur a nécessité la mise en œuvre d'une technologie spécifique. Ainsi, très peu d'espèces bactériennes ont pu être isolées et identifiées dans ces conditions du domaine benthique profond. La première culture pure d'une souche bactérienne réellement piezophile (souche CNPT-3) a été reportée en 1979 (Yayanos *et al.*, 1979). Cette culture a été obtenue à partir de crustacés collectés au moyen d'un piège maintenant la pression hydrostatique *in situ*. Cette bactérie, de type *Spirillum*, présentait un temps de doublement compris entre 4 et 13 heures sous une pression de 50 MPa alors qu'à pression atmosphérique son temps de doublement était de 3 à 4 jours et ne permettait pas la formation de colonies.

L'analyse des séquences de l'ADNr 16S et 5S a montré que toutes les bactéries piezophiles et psychrophiles, isolées et identifiées, sont affiliées à l'un des 5 genres de la subdivision gamma de la classe des *Proteobacteria* (γ -*Proteobacteria*) : *Shewanella*, *Photobacterium*, *Colwellia*, *Moritella* et un nouveau groupe contenant la souche CNPT-3 (DeLong *et al.*, 1997; Kato, 1999; Yanagibayashi *et al.*, 1999). Le Tableau I-1 présente la liste des espèces de bactéries piezophiles isolées et identifiées.

Tableau I-1. Liste des espèces de bactéries isolées du domaine profond identifiées comme des bactéries piezophiles (Kato & Qureshi, 1999).

Genre	Espèce	Souche	Piezophilie	Référence
<i>Colwellia</i>	<i>C. hadaliensis</i>	BNL-1	extrême ¹	(Deming <i>et al.</i> , 1988)
<i>Photobacterium</i>	<i>P. profundum</i>	SS9, DSJ4	modérée ²	(Nogi <i>et al.</i> , 1998b)
<i>Shewanella</i>	<i>S. benthica</i>	PT-99, DB-series	modérée,	(Deming <i>et al.</i> , 1984; Macdowell & Colwell, 1985; Kato <i>et al.</i> , 1998; Li <i>et al.</i> , 1998; Nogi <i>et al.</i> , 1998a)
			obligatoire et extrême	
	<i>S. violacea</i>	DSS12	modérée	(Nogi <i>et al.</i> , 1998a)
<i>Moritella</i>	<i>M. japonica</i>	DSK1	modérée	(Nogi <i>et al.</i> , 1998a)
	<i>M. yayanosii</i>	DB21MT-5	extrême	(Kato <i>et al.</i> , 1998; Nogi & Kato, 1999)

¹Bactéries piezophiles extrêmes sont définies comme les bactéries qui ne sont pas capables de croître à des pressions inférieures à 50 MPa. ²Bactéries piezophiles modérées sont définies comme les bactéries ayant un optimum de croissance à une pression de moins de 40 MPa et capables de croître à pression atmosphérique.

Les études menées sur ces bactéries piezophiles nous renseignent sur l'adaptation des structures membranaires et des processus vitaux aux fortes pressions hydrostatiques, et *a contrario*, sur les effets d'une décompression sur ces mêmes structures.

I.3.1.2 Modifications au niveau de la structure membranaire

Les bactéries marines attachées à des particules chutant dans la colonne d'eau, ou migrants avec des organismes, ou soumises à des processus de transports verticaux de masses d'eaux subissent des changements drastiques de pression hydrostatique. L'accroissement de la pression hydrostatique, tout comme la diminution de la température, provoquerait un changement dans la composition phospholipidique des membranes cellulaires entraînant une rigidification de la membrane lipidique (DeLong & Yayanos, 1985). L'isolation de la bactérie piezophile, CNPT-3, qui a un optimum de croissance entre 30 et 50 MPa, a permis de prouver que la composition membranaire d'une bactérie adaptée à de fortes pressions hydrostatiques était différente de celle de ses homologues du même genre mais non adaptées à la pression. Une plus grande quantité en acides gras insaturés est retrouvée chez les bactéries se développant sous de fortes pressions hydrostatiques. Delong & Yayanos (1985) ont observé que les changements de composition membranaire en acides gras induits par une augmentation de pression étaient similaires à ceux provoqués par une diminution de la température. L'augmentation de la pression, tout comme la baisse de la température, provoque une rigidification de la membrane cellulaire et une diminution de la fluidité membranaire. Pour compenser ce phénomène, les bactéries piezophiles et les bactéries piezotolérantes assurent le maintien de la fluidité membranaire en augmentant la proportion des acides gras monoinsaturés (Abe *et al.*, 1999).

Bartlett *et al.* (1989) ont montré que la protéine transmembranaire OmpH (outer membrane protein, H pour haute pression) est produite en grande quantité par la souche SS9 de *Photobacterium profundum* (barophile facultative ou piezomesophile dont l'optimum de croissance est situé autour de 20-30 MPa). Ces auteurs montrent que la souche SS9 exprime un programme génétique pour développer la synthèse de protéines de type OmpH en réponse à un accroissement de pression hydrostatique, alors que les porines fonctionnant à pression atmosphérique (OmpL) sont sensibles à l'accroissement de pression hydrostatique. Les porines de type OmpH fourniraient un plus gros canal, et seraient moins spécifiques que les porines de type OmpL. Une telle propriété fournirait un avantage nutritionnel à ces organismes vivant dans les conditions particulièrement oligotrophes du domaine océanique profond (Bartlett, 1999).

I.3.1.3 Modifications au niveau du mécanisme respiratoire

Pour étudier la régulation du système respiratoire par la pression, les cytochromes de type-c et une quinol-oxydase terminale ont été purifiés de *S. benthica* DB172F (Qureshi *et al.*, 1998a; Qureshi *et al.*, 1998b). Ces auteurs ont purifié deux cytochromes c (l'un membranaire; c-551, l'autre cytoplasmique; c-552). Ils montrent que le cytochrome c-551 est exprimé à 0,1 MPa et à 60 MPa tandis que le cytochrome c-552 est exprimé seulement à 60 MPa (Qureshi *et al.*, 1998b). A cette forte pression un complexe quinol-oxydase membranaire a été identifié et considéré comme l'accepteur terminal d'électrons (Qureshi *et al.*, 1998a). Kato (1999) montre qu'un changement de pression altère les composantes de la chaîne respiratoire. Cet auteur suggère l'existence de 2 types de systèmes respiratoires, l'un fonctionnant à 0,1 MPa et l'autre à 60 MPa. Il fait l'hypothèse qu'à 0,1 MPa, 3 complexes enzymatiques rentrent en jeu alors qu'à 60 MPa la chaîne respiratoire est plus compacte avec 2 systèmes enzymatiques qui permettent le transport d'électron avec comme accepteur terminal d'électron une quinol-oxydase.

I.3.1.4 Adaptation au niveau des enzymes ectocellulaires

L'activité protéasique de la serine alcaline d'une bactérie piezotolérante (croissance optimale à 0,1 MPa) *Sporosarcina sp.* isolée de la fosse du Japon à 6500 m de profondeur est quasiment doublée à 60 MPa par rapport à son activité à pression atmosphérique (Kato *et al.*, 1995). L'activité de cette protéase augmente lorsque la pression augmente montrant qu'il peut y avoir une adaptation au niveau de l'activité ectoprotéasique bactérienne. Les bactéries du domaine océanique profond semblent donc être munies des "outils" nécessaires pour hydrolyser les macromolécules en plus petits composés pour subvenir à leurs besoins anaboliques et cataboliques.

I.3.1.5 Mécanismes moléculaires régulés par la pression

Les équipes du laboratoire japonais DEEPSTAR et du laboratoire de Bartlett ont mis en évidence la présence de 3 cadres ouverts de lecture (open reading frame appelés ORF1, ORF2 et ORF3) et de 5 sites d'initiations de la transcription régulés par la pression de la bactérie piezophile *S. benthica* DB6075 (Kato, 1999; Kato & Qureshi, 1999). ORF1 et ORF2 forment ainsi un seul promoteur transcriptionnel régulé par la pression et a pu être cloné à une bactérie mésophile (*S. violacea* DSS12) qui a ainsi exprimé son maximum transcriptionnel à une pression plus élevée (50 MPa au lieu de 30 MPa) (Abe *et al.*, 1999). Selon les résultats des analyses de transcription, ces auteurs ont montré que la transcription est exprimée à forte

pression hydrostatique (maximale à 70 MPa) pour la souche de *S. benthica* DB6705. Toutefois, les fonctions et les régulations précises des ORF1 et 2 dans l'opéron "pression-réglée" sont en cours d'investigation.

1.3.2 Activités microbiennes obtenues en condition de pression hydrostatique *in situ*

Après avoir isolé un nombre conséquent de bactéries du domaine océanique profond, ZoBell (1968 *in* (Jannasch & Taylor, 1984) statue que : "Bien que la plupart des bactéries provenant du domaine océanique profond survivent, cette observation ne permet pas de prouver que certaines bactéries, les plus sensibles d'entre elles, ne sont pas détruites au cours de la décompression. La réponse à cette interrogation requiert l'examen des bactéries originaires du domaine océanique profond en maintenant les conditions *in situ* de pression sans leur faire subir de décompression". Deux approches peuvent être développées pour satisfaire cette requête :

- La première est la mesure d'activités microbiennes *in situ*. Cette technologie nécessite l'emploi de sous-marins, actuellement remplacés par des ROVs (remotely-operated vehicle) ou l'utilisation de chambres benthiques. Cette approche est destinée avant tout à l'étude du domaine benthique : l'eau proche du fond et les sédiments superficiels.
- La seconde est le développement de systèmes de prélèvement permettant de maintenir la pression hydrostatique au cours du prélèvement d'un échantillon, lors de sa remontée et lors de son incubation.

Cette dernière approche permet avant tout d'étudier les bactéries libres du domaine océanique profond. L'article qui est présenté ci-après (manuscrit n°1 - Bianchi et al., soumis-a) présente une synthèse bibliographique des activités microbiennes mesurées à l'aide de système de prélèvement d'échantillon en maintenant les conditions de pression hydrostatique.

