

**Chapitre 4 : Adaptation microbienne dans les conditions de stress environnementales (Les microorganismes extrémophiles).**

**- Introduction**

Les environnements normaux, sont ceux dont les facteurs physico-chimiques les plus importants se situeraient approximativement à des valeurs de température de 4 à 50 C°, de pH supérieur à 5 et inférieur à 9, de salinité entre celle de l'eau douce et celle de l'eau de mer (3,5%) et de pression inférieure à 20 MPa. Loin de ces valeurs, le stress environnemental augmente et la diversité des espèces diminue. Un environnement est considéré extrême si ses facteurs physiques ou chimiques sont situés en dehors de la gamme des environnements qualifiés de normaux. Ces environnements hostiles abritent une riche biodiversité de microorganismes dits **extrémophiles**.

**L'extrémophilie** est la capacité de certains microorganismes à se développer dans des conditions physiques et chimiques défavorables pour la plupart des organismes vivants. Le concept d'extrémophilie, à la différence de celui de résistance aux conditions extrêmes, implique que l'ensemble de la machinerie cellulaire soit adapté aux conditions extrêmes et que les cellules fonctionnent de manière optimale dans ces conditions.

**1. Les microorganismes extrémophiles**

De nombreux microorganismes qualifiés **d'extrémophiles**. Pour certains, vivent en présence de sel à forte concentration (**halophiles**), pour d'autres à des **températures froides** ou **chaudes (psychrophiles et thermophiles)**, dans des milieux **très acides ou basiques (acidophiles et alcaliphiles)** ou sous **pression (piézophiles)**...etc

**Tableau 1 : Les micro-organismes extrémophiles et leurs environnements.**

<b>Microorganismes extrémophiles</b>	<b>Environnement favorable à la croissance</b>
Acidophile	pH optimum de croissance < 3
Alcaliphile	pH optimum de croissance > 10
Halophile	Nécessite au moins 1M de sel pour la croissance
Hyperthermophile	Croissance optimale à des températures > 80 °C
Thermophile	Croissance à des températures entre 60 °C et 85 °C
Eurypsychrophile (psychrotolérant)	Croissance à des températures > 25 °C, mais également < 15 °C
Stenopsychrophile (psychrophile)	Croissance à des températures entre 10 °C et 20 °C
Piezophile	Croissance sous haute pression → 400 atm (40 MPa)
Endolithique	Croissance à l'intérieur des roches
Hipolithe	Croissance sur les roches et les déserts froids
Oligotrophe	Capable de croître dans des environnements faibles en nutriments
Radiorésistant	Tolérance à de fortes doses de radiations
Metallotolérant	Tolérance aux fortes concentrations de métaux lourds
Toxitolérant	Tolérance aux fortes concentrations d'agents toxiques (solvants organiques)
Xerophile	Croissance en présence d'une faible disponibilité d'eau, résistance à la dessiccation

### 1.1. Les micro-organismes halophiles

Les halophiles sont des micro-organismes qui ne peuvent croître qu'en présence de sel généralement sous forme de chlorure de sodium (NaCl). Les halophiles sont classées en trois catégories : les légèrement halophiles (optimum de croissance entre 2 et 5 % de NaCl) ; les modérées halophiles (optimum de croissance entre 5 et 20 % de NaCl) ; et les halophiles extrêmes (optimum de croissance entre 20 et 30 % de NaCl). La majorité de ces micro-organismes habitent le milieu marin où la concentration est voisine de 3,5 % en sel. Il existe cependant des habitats plus spécifiques et plus localisés tels que les marais salants ou les lacs salés colonisés par les micro-organismes hyperhalophiles (**Fig.1**).



**Figure 1** : Le Great Salt Lake, dans l'Utah, aux États-Unis (dépôts de sel).

La composition physico-chimique de ces lacs varie avec la topographie environnante et la géologie. Il en existe deux types, ceux formés par évaporation totale principalement d'eau de mer, et ceux formés par évaporation d'eaux résultant du lessivage des roches par la pluie.

Les bactéries halophiles (modérées et extrêmes) anaérobies appartiennent à l'ordre des *Halana-erobiales* qui comprend deux familles : les *Halana-erobiaceae* et les *Halobacter-oidaceae* dont les espèces fermentent les hydrates de carbone à l'exception d'une bactérie homo-acétogène qui réduit le CO<sub>2</sub> en acétate et croît sur bêtaïne et triméthylamine, *Aceto-halobium arabaticum*. La plupart de ces espèces sont des modérées halophiles avec un optimum de croissance entre 3 et 25 % de NaCl. On retrouve également dans le domaine des *Bacteria*, des micro-organismes sulfato-réducteurs modérés halophiles pouvant croître jusqu'en présence de 24% de NaCl. Ils appartiennent en particulier au genre *Desulfo-halobium* et oxydent incomplètement leurs substrats. Chez les *Archaea*, les *Methano-archaea* anaérobies sont spécialisées dans l'utilisation de composés méthylés. En ce qui concerne les aérobies hyperhalophiles, ils appartiennent à la famille des *Halo-bacteriaceae*. Ils nécessitent un minimum de 10 % de NaCl pour croître et sont hétérotrophes. Certains de ces micro-organismes peuvent avoir un métabolisme fermentaire.

### 1.2. Les micro-organismes thermophiles

Les procaryotes thermophiles et hyperthermophiles vivent à des températures optimales de croissance de l'ordre de 60°C et 80°C, respectivement. Ces micro-organismes sont retrouvés dans des habitats géothermiques naturels largement répandus sur notre planète et souvent associés à des zones tectoniques actives. Dans le cas des sources chaudes localisées en Islande, aux Açores ou encore dans le Parc national de Yellowstone (**Fig.2**) ; La nature de l'eau va dépendre des roches traversées et elle est généralement associée à une activité volcanique ; la température de l'eau *in situ* sera en fonction de la profondeur d'origine pour atteindre des températures inférieures à 100°C et des pH acides ou basiques à la surface de la terre.



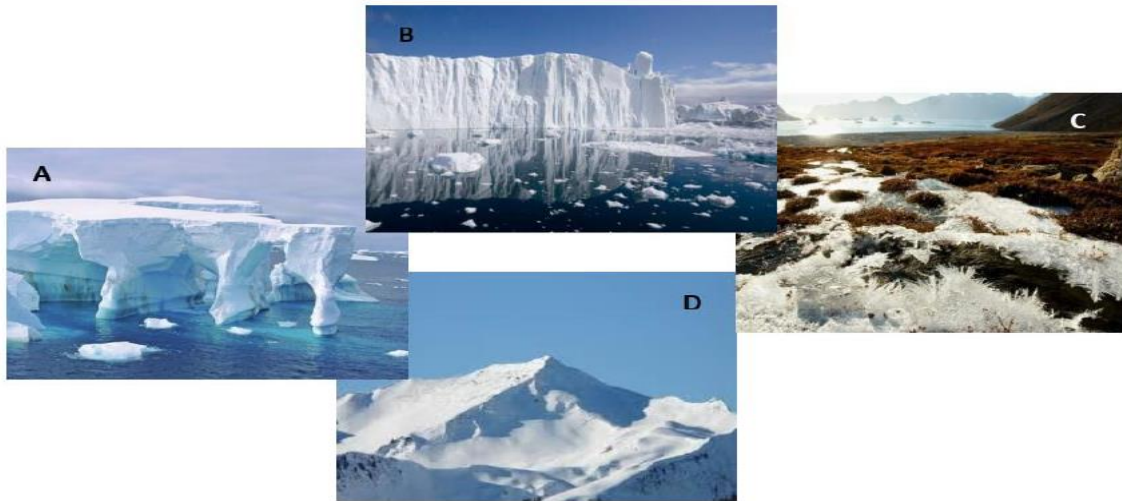
**Figure 2** : Sources chaudes dans le Parc national de Yellowstone – USA.

On retrouve dans la plupart de ces écosystèmes des gaz comme  $H_2$ ,  $H_2S$ ,  $CO_2$ , ou  $CH_4$  qui pour certains peuvent servir de sources d'énergie ( $H_2$  en particulier). Les micro-organismes retrouvés dans ces zones appartiennent aux domaines des *Bacteria* et des *Archaea*.

Chez les *Bacteria*, il existe un grand nombre de bactéries thermophiles anaérobies hétérotrophes à Gram positif de l'ordre des *Clostridiales* (*Thermoanaerobacterium*, *Carboxydibrachium*, etc..), mais également des espèces aérobies appartenant au phylum des *Deinococcus-Thermus* telles que les espèces des genres *Thermus*, *Rhodothermus*, etc..... Chez les *Archaea* thermophiles et hyperthermophiles, il existe deux phylums, celui des *Euryarchaeota* regroupant des hyperthermophiles (croissance possible jusqu'à  $110^\circ C$  pour certains) producteurs de méthane ou *Methano-archaea*, le plus souvent chimiolitho-autotrophes et des chimio-organotrophes.

### 1.3. Les micro-organismes psychrophiles

Les bactéries psychrophiles sont des bactéries adaptées au froid pouvant vivre dans des environnements variés : régions arctiques, glaciers pour les températures négatives, et les océans profonds pour des températures légèrement positives (aux alentours de  $4^\circ C$ ) etc.... (**Fig. 3**). Selon la classification la plus répandue, les micro-organismes psychrophiles auraient un optimum de croissance entre  $15^\circ C$  et  $20^\circ C$ , certains pouvant se développer en dessous de  $0^\circ C$ . Il existerait également des bactéries dites psychrotolérantes dont l'optimum serait entre  $20^\circ C$  et  $35^\circ C$ . Aux deux pôles, ce sont les *alpha*, et *gamma*-protéobactéries mais également les cytophagas-flavobactéries qui dominent. Les archées représenteraient jusqu'à 30 % de la population totale dont une majorité de *Methanoarchaea*. Les genres bactériens les plus rencontrés sont : *Alteromonas*, *Colwellia*, *Glacieola*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella* et *Polaribacter*. 60 % de la surface terrestre est composée d'eaux marines à plus de 1000 mètres de profondeur ayant une température autour de  $4^\circ C$ . Dans ces conditions environnementales, les bactéries sont dites psychrophiles, mais peuvent être également piézophiles ; tous les genres appartiennent aux *gamma*s protéobactéries avec 5 genres dominants: *Photobacterium*, *Colwellia*, *Moritella*, *Shewanella* et *Psychromonas*. La caractéristique commune à toutes ces bactéries est la capacité à produire des acides gras polyinsaturés entrant de 50 à 70 % dans la composition de la membrane cytoplasmique. Leurs protéines sont généralement plus polaires et moins hydrophobes que celles des thermophiles, ce qui leur maintient une relative souplesse et leur permet d'optimiser leur fonctionnement.



**Figure 3** : Habitats naturels des microorganismes psychrophiles : (A) Glace de la mer Antarctique, (B) Glacier de l'arctique, (C) Sol gelé : permafrost, (D) Montagnes enneigées (Alpes).

#### 1.4. Les micro-organismes acidophiles

Les environnements où sont retrouvés les micro-organismes acidophiles qui se développent de façon optimale à pH de 2.0, sont très rares dans le monde, ont généralement un pH égale à 4 et souvent riches en métaux lourds (fer, arsenic, cuivre, zinc, chrome...).

La plupart de ces micro-organismes sont des chimio-lithotrophes acidophiles dont le métabolisme cellulaire est basé sur l'oxydation des composés ferreux et soufrés, appartenant aussi bien au domaine des *Bacteria* (*Acidithio-bacillusferrooxidans*, *Leptospirillum spp.* etc...chez les mésophiles et *Sulfobacillus spp.* chez les thermophiles) qu'à celui des *Archaea* (*Ferroplasma* et *Sulfolobus spp.*; ces espèces sont essentiellement thermophiles). Les hétérotrophes strictes et facultatives colonisent également les environnements acides, elles appartiennent aux genres *Acidiphilium* et *Acidimicrobium* du domaine des *Bacteria*.

L'écosystème acide le plus étudié est le Río Tinto en Espagne avec un pH inférieur à 2, une longueur de 100 km de long, une concentration importante en métaux lourds et un surprenant niveau de diversité microbienne (**Fig. 4**).



**Figure 4** : Le fleuve de Rio Tinto-Espagne.

#### 1.5. Les micro-organismes alcaliphiles ou alcalophiles

Les alcalophiles sont des microorganismes qui se développent à des valeurs de pH égaux ou supérieures à 9.0, avec un pH optimum entre 10 et 12. Parmi les lacs de soude les plus stables et productifs ; le Lac Magadi au Kenya, avec des valeurs de pH supérieures à 10 atteignant parfois 12 (**Fig. 5**).



**Figure 5 :** le Lac Magadi au Kenya.

Les alcalophiles sont souvent isolés de milieux naturels qui ont également tendance à avoir des concentrations élevées en chlorure de sodium (NaCl) ; ceux-ci sont ainsi appelés haloalcalophiles.

La diversité microbienne retrouvée dans ces environnements est très variée mais les bactéries haloalcaliphiles les plus étudiées sont les cyanobactéries filamenteuses (*Spirulina*, *Anabaenopsis* et *Arthrospira*) et les bactéries pourpres anoxygéniques (*Ectothiorhodospira* et *Halorhodospira*), Mais également les bactéries fermentaires anaérobies à Gram positif.

### 1.6. Les micro-organismes piézophiles

Le terme piézophile (en Grec piezo = pression et philo = aimer) a été introduit pour décrire les microorganismes barophiles qui ont été définies comme celles ayant une croissance optimale à des pressions supérieures à 40 MPa (méga-pascal).

Les bactéries piézophiles vivant dans des conditions abyssales océaniques (>5000 m de profondeur) sont également des bactéries psychrophiles car la température moyenne à ces profondeurs est de l'ordre de 4°C. On parle donc de bactéries piézopsychrophiles.

La première bactérie piézopsychrophile isolée est la souche CNPT 3, apparentée au genre *Spirillum*, retrouvée à une profondeur de 5600 mètres. Elle se développe de manière optimale entre 2 et 4°C pour une pression de 50 MP. Une deuxième souche, la souche MT 41 collectée à 10476 mètres de profondeur, pousse de manière optimale à 2°C et à 69 MP.

Les sources hydrothermales océaniques profondes constituent également un habitat idéal pour les bactéries piézophiles. Situées sur les dorsales océaniques, leur profondeur varie de 800 à 4000 mètres et la gamme de température s'étend de 2°C à 350°C. On peut donc y retrouver des thermopiézophiles.

Outre le milieu aquatique marin, il est possible de retrouver de tels micro-organismes dans les aquifères profonds, la croûte terrestre ou les réservoirs pétroliers.

Parmi les représentants des piézophiles, on cite les genres : *Shewanella*, *Colwellia*, *Moritella*, *Methanococcus*, *Pyrococcus* et *Thermus*.

## 2. Propriétés des extrémophiles

Les extrémophiles montrent une extraordinaire capacité d'adaptation aux conditions physicochimiques brutales régnant dans certains environnements dits extrêmes tant en termes de température, de salinité, de pH que de pression hydrostatique.

Ils ont développé plusieurs stratégies. Ils présentent de ce fait un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales leur permettant non seulement de survivre dans ces conditions, mais aussi de se développer souvent de manière optimale. Les cellules sont capables de contrôler jusqu'à un certain point les conditions intracellulaires pour certains paramètres comme l'osmolarité.

De ce fait, le pH intracellulaire de souches alcaliphiles sera inférieur à celui du milieu extérieur et inversement pour les espèces acidophiles.

En revanche, pour certains paramètres, comme la température, la pression, les conditions du milieu extérieur s'imposent aux cellules dans leur globalité, membranes, milieu intérieur et totalité des constituants

cellulaires. Ces constituants cellulaires devront être non seulement stables dans ces conditions, mais surtout, fonctionnels.

Nous n'illustrerons ici que certaines propriétés, et plus particulièrement la thermostabilité des protéines et l'osmoadaptation.

### **2.1. Stabilité des constituants cellulaires**

L'une des premières questions qui se pose pour les hyperthermophiles est celle de la stabilité de leur matériel génétique. Comment est préservée l'intégralité du message génétique stockée dans le chromosome et comment peuvent opérer la transcription et la traduction au-dessus de 100-110°C?. A ces températures, in vitro, l'ARN est dégradé et l'ADN linéaire et circulaire est dénaturé (séparation des deux brins de la double hélice) puis dégradé.

La stabilité des acides nucléiques à haute température chez les hyperthermophiles résulte sans doute d'une interaction avec des protéines de liaisons non spécifiques qui restent à découvrir. Il a également été démontré que la thermodégradation de l'ADN est réduite en présence de concentrations physiologiques de sels monovalents (50 à 500 mM de KCl ou NaCl) ou divalents (1 à 25 mM MgCl<sub>2</sub>).

Les protéines et tout particulièrement les enzymes des hyperthermophiles doivent être thermostables et fonctionner dans les conditions de température rencontrées dans les sources thermales ou hydrothermales.

### **2.2. Osmoadaptation**

Tous les procaryotes ont dû développer des stratégies adaptatives leur permettant d'ajuster les concentrations des solutés intracellulaires aux concentrations externes.

Dans le cas des halophiles, cette adaptation aux fortes concentrations du milieu extérieur implique l'accumulation de solutés intracellulaires afin de contrer la pression osmotique qui autrement conduirait à la déshydratation et à la mort.

Deux stratégies principales ont été identifiées pour équilibrer la pression osmotique extérieure : le flux de certains ions dans la cellule et l'accumulation de solutés compatibles organiques de faible poids moléculaire. La première stratégie semble être limitée à quelques genres d'archées halophiles extrêmes (*Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Natronobacterium*, et *Natronococcus*) et de bactéries halophiles extrêmes (*Salinibacter*). Le cation majoritairement accumulé est K<sup>+</sup>. De nombreuses enzymes de ces espèces présentent un enrichissement en résidus acides et une activité K<sup>+</sup> dépendante.

La seconde stratégie n'est pas limitée aux halophiles, mais les propriétés remarquables de certains solutés organiques leur ont permis de s'adapter aux conditions changeantes.

Les solutés compatibles regroupent des molécules de structures très diverses : acides aminés, sucres (tréhalose, sucrose), phosphodiesteres et glycérols qui sont des solutés chargés, les autres sont neutres. Parmi les acides aminés et dérivés, seuls un petit nombre a un rôle de soluté compatible : glutamine, glutamate, lysine (chez les méthanogènes), proline, glycine bêtaïne, ectoïne et hydroxyectoïne chez de nombreuses halophiles.

### **2.3. Adaptation des psychrophiles à basse température**

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

Pour la fluidité membranaire la synthèse des acides gras insaturés, poly-insaturés et acides gras branchés est favorisée.

Quant à l'adaptation des enzymes est expliquée par la relation « activité-stabilité-flexibilité ». Celle-ci suggère que les enzymes psychrophiles augmentent leur flexibilité globale ou celle de leur site actif afin de compenser la rigidification induite par le froid. De ce fait, elles perdent de leur stabilité mais gagnent en activité.

### 3. Applications des micro-organismes extrêmophiles

Les micro-organismes en général sont d'abondantes sources d'enzymes uniques pouvant être utilisées en particulier en biotechnologie.

Pour faire face à la demande croissante des industriels notamment dans le domaine des biocatalyses et en se basant sur le modèle de la synthèse organique traditionnelle pour aboutir à une chimie verte plus respectueuse de l'environnement, de nombreux efforts ont été fournis pour la recherche d'enzymes d'intérêt. Ceci est particulièrement vrai pour les enzymes provenant de microorganismes extrêmophiles (extrêmozymes).

En effet, leur robustesse, leur capacité à réaliser des réactions chimiques dans des conditions extrêmes et parfois le caractère unique des réactions chimiques qu'elles réalisent les rendent très intéressantes pour de multiples applications.

Ainsi les biotechnologies utilisent des extrêmozymes pour la production de biocarburants ou de molécules pharmaceutiques.

Les enzymes halophiles sont capables de fonctionner dans des milieux salés, dans les solvants organiques et dans une large gamme de pH. Elles sont utilisées dans les procédés agroalimentaires, dans l'industrie papetière ainsi que dans l'industrie textile.

En ce qui concerne la stabilité des enzymes actives à des températures élevées d'intérêt industriel, nous pouvons citer les protéases, les lipases et d'autres hydrolases comme les cellulases, les chitinases et les amylases, sans oublier la Taq polymérase.

Les applications d'enzymes actives à des basses températures sont également étudiées en partie pour des raisons d'économie d'énergie. L'exemple le plus connu est l'utilisation d'enzymes psychrophiles (protéases, lipases) dans les détergents ménagers. Il est également possible d'utiliser ce type d'enzymes dans l'industrie du papier grâce à des enzymes dégradant les polymères (xylanases).

Les bactéries halophiles à hyperhalophiles ont la capacité de croître dans des conditions hypersalées grâce à une régulation osmotique intracellulaire aboutissant à l'accumulation de molécules de bas poids moléculaires leur permettant de vivre en isotonie avec le milieu naturel. Ces molécules de bas poids moléculaires, comme la glycine-bétaine ou l'ectoïne, présentent un grand intérêt notamment dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques. Ceci est particulièrement vrai pour l'ectoïne qui est un des composants importants de certaines crèmes à vocation hydratante.

En ce qui concerne les enzymes halophiles, elles peuvent supporter des concentrations très élevées de sel (par exemple, 30 % en NaCl ou KCl), et sont tout à fait applicables dans des procédés industriels qui génèrent des sels (neutralisation des acides dans l'industrie).

Certaines bactéries, comme *Halomonaseuri-halina*, produisent de grandes quantités d'un polysaccharide extracellulaire poly-anionique (EPS V2-7) aux propriétés émulsifiantes utilisé en industrie alimentaire ou pharmaceutique. Une multitude d'autres utilisations peut être envisagée en biotechnologie : élimination du sel, des composés aromatiques, organophosphorés et phénoliques, etc..... Concernant la production d'une enzyme par *Halobacterium-halophilum*, la bactériorhodopsine, son imprégnation sur des puces informatiques augmenterait les performances de ces dernières.

Des bactéries halophiles se développant à 19 % de NaCl interviennent également en industrie alimentaire, notamment dans la fermentation de la sauce soja ou dans la préparation de la sauce poisson appelée nuocmam. Dans le cadre de la biologie moderne, il est concevable de réaliser des transferts génétiques permettant de donner des capacités de résistance au sel et à la sécheresse à des céréales comme le blé, le riz ou l'orge, tenant compte de l'information génétique générée par le séquençage de génomes de bactéries halophiles.

Les bactéries acidophiles et alcaliphiles sont capables de produire des protéases, des amylases, des lipases et autres enzymes résistantes et actives à pH élevé et à des hautes concentrations chélatrices de détergents.

Dans cet esprit, des processus d'hydrolyse de polymères à pH acide ont fait intervenir des biocatalyseurs d'acidophiles. C'est le cas de plusieurs enzymes utilisées pour l'hydrolyse de l'amidon (les amylases, pullulanases, glucoamylases et glucosidases qui doivent être actives à pH acide).

Enfin, les protéines résistantes à la pression peuvent être utiles, en particulier pour la production alimentaire où la haute pression est appliquée pour le traitement et la stérilisation de produits alimentaires.

Contrairement au traitement à haute température, les hautes pressions ne modifient pas les liaisons covalentes, et donc ne peuvent pas détruire les arômes naturels ou les colorants, comme c'est le cas avec la température.

**Tableau 2 :** Applications des extrémophiles en biotechnologie, médecine et industrie.

<b>Source</b>	<b>Biomolécule</b>	<b>Process</b>
Thermophiles	ADN polymérase	Polymerase Chain Reaction (PCR) (diagnostique)
Thermophiles Psychrophiles	Protéases	Industrie alimentaire, industrie laitière
Thermophiles	$\alpha$ -amylase	Blanchiment de papier
Alcalophiles Psychrophiles	Protéases, amylases, cellulases, lipases	Dégradation des polymères et détergents
Alcalophiles	Antibiotiques	Traitement d'infections
Psychrophiles	Acides gras insaturés	Suppléments alimentaires
Psychrophiles	Déshydrogénases	Biosensors
Halophiles	Solutés compatibles Glycérol	Industrie pharmaceutique
Halophiles	Carotène	Additif alimentaire
Psychrophiles		Bioremédiation
Radio-résistants		Bioremédiation des déchets radioactifs