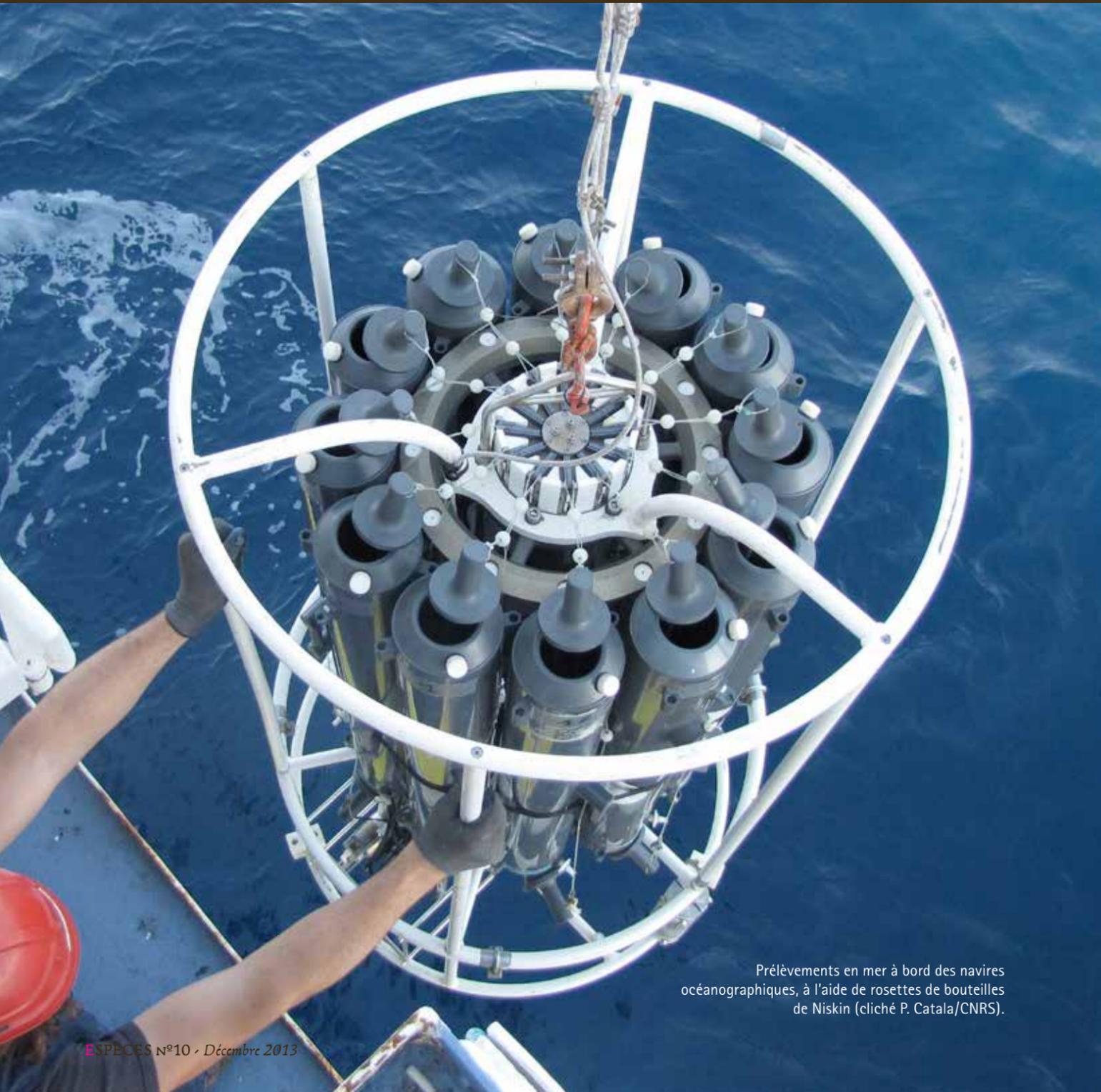


Par Raphaël Lami
Maître de conférences à l'UPMC,
station marine de Banyuls-sur-Mer,
Agrégé de SVT
raphael.lami@obs-banyuls.fr

Voyage au centre

d'une goutte d'eau de mer



Prélèvements en mer à bord des navires océanographiques, à l'aide de rosettes de bouteilles de Niskin (cliché P. Catala/CNRS).



Les bactéries ont colonisé tous les environnements marins (côtiers et au large). Leur abondance moyenne est de 10^5 cellules par millilitre (cliché D. Sorel/UPMC-Biodiversarium).

ILS SONT INVISIBLES, IMPOSSIBLES À CULTIVER ET À ISOLER EN LABORATOIRE... ET POURTANT, LES CHERCHEURS SUPPOSENT QUE PAR LEUR NOMBRE ET LEUR DIVERSITÉ LES MICRO-ORGANISMES JOUENT UN RÔLE DÉTERMINANT DANS L'ÉQUILIBRE DES OCÉANS. VOYAGE AU CENTRE D'UNE TERRA INCOGNITA DE L'INFINIMENT PETIT : UNE GOUTTE D'EAU DE MER

Comment plonger dans une goutte d'eau de mer? Pas besoin de bouteilles d'oxygène, de détendeur ou d'une combinaison intégrale sophistiquée. Un microscope suffit pour aller explorer le monde du "picoplankton", l'univers des organismes en suspension mesurant moins d'un dixième de millimètre. Première surprise au cours de cette plongée: vous serez étonnés du nombre d'habitants peuplant chaque goutte d'eau... Il en existe plus d'un million dans chacune d'elles! Pourtant, ces êtres vivants restent très mal connus... Qui sont-ils? Que font-ils? Les biologistes marins commencent à peine à comprendre le rôle essentiel qu'ils jouent pour le bon état écologique des océans. Quant aux chimistes, ils débutent eux aussi l'exploration de l'infinie diversité des molécules utiles à l'homme

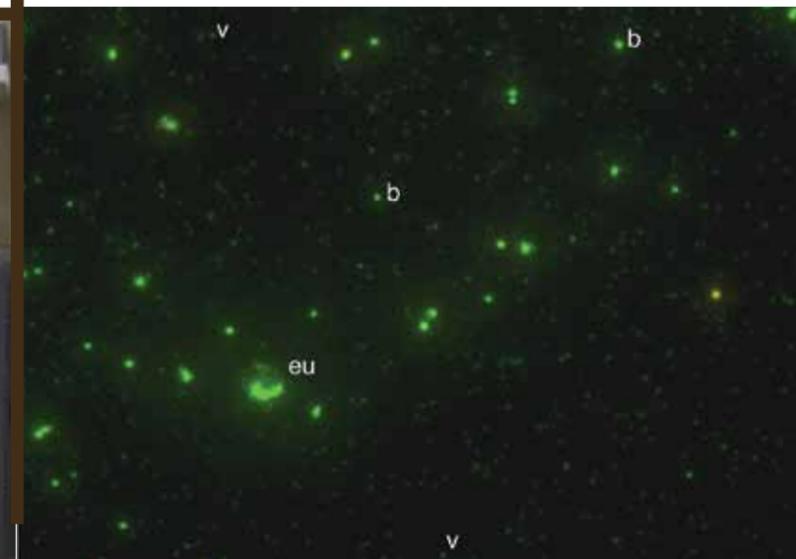
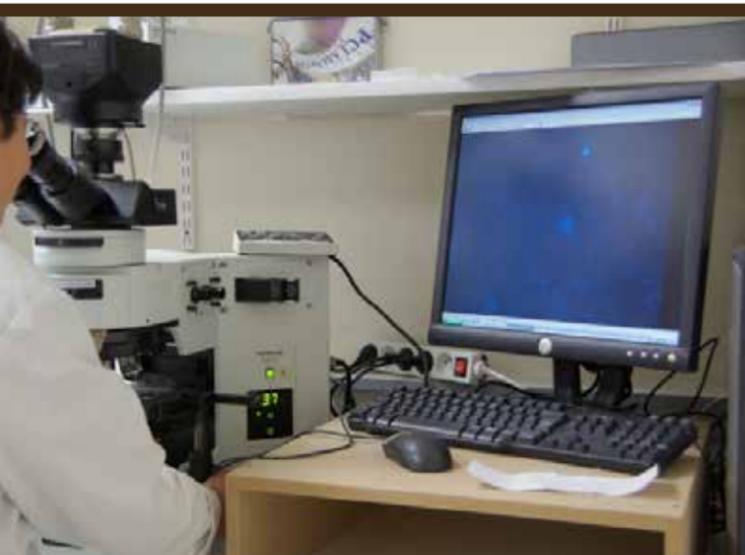
que produisent ces milliards de milliards de micro-organismes* flottant dans toutes les mers du globe.

Des armées de bactéries

Il est assez facile de révéler, d'observer et de compter tous les êtres vivants présents dans chaque goutte d'eau. Il suffit d'en prélever quelques-unes, puis de les placer sur une lame de microscope, en présence de "SYBR-Green". Cette molécule, une fois intercalée dans l'ADN des organismes marins, est capable d'émettre une forte fluorescence verte. Elle permet ainsi de révéler tous les êtres vivants présents dans l'eau observée. Une fois atteint le grossissement x 1 000 sur microscope adapté à la détection de cette molécule verte (microscope dit à "épifluorescence"), l'observation des milliers de bactéries présentes dans chaque goutte peut commencer. Cette expérimentation, pourtant très simple dans sa conception, n'a été mise au point que vers la fin des années soixante-dix, lorsque le développement de la microscopie à épifluorescence et sa généralisation dans les laboratoires d'océanographie ont rendu son utilisation possible par les biologistes marins. Notre approche de la microbiologie est très éloignée de celle qui était pratiquée par Pasteur ou des méthodes traditionnellement employées dans les laboratoires



Bactéries marines observées sous microscope à épifluorescence : b : bactéries, v : virus, eu : petite cellule eucaryote planctonique (grossissement x 1000, cliché M. Lorre-Guidt et Nicole Batailler/UPMC).



d'analyses médicales. Ces approches classiques reposent sur l'identification d'espèces de bactéries par leur culture. C'est ainsi que des bactéries pathogènes pour l'homme sont caractérisées. Ces méthodes de travail ont permis à la microbiologie médicale de prendre tout son essor au XX^e siècle et de faire progresser la médecine à grands pas. Les agents de nombreuses maladies très répandues dans le monde, comme la tuberculose par exemple, ont été découverts suite à leur isolement en culture sur boîte.

Cependant, isoler des micro-organismes par de telles approches classiques dans un environnement naturel comme l'océan est en fait quasi impossible. Si vous déposez une goutte d'eau de mer sur un milieu de culture, vous cultivez moins d'un centième de la totalité des micro-organismes présents dans votre échantillon. Les raisons de notre incapacité à cultiver et isoler les micro-organismes de l'océan sont multiples et elles soulèvent un problème : comment connaître des espèces que l'on ne sait pas isoler ?

Qui sont ces micro-organismes ?

Répondre à cette question, c'est donc s'affranchir des méthodes traditionnelles de mise en culture des bactéries. Alors comment s'y prendre ? Première étape : partir en mer. Les biologistes marins organisent régulièrement de grandes campagnes océanographiques pour prélever de l'eau à l'aide de bouteilles de Niskin*. Cette eau est ramenée à la surface, puis filtrée sur un filtre de maille 0,2 micron (0,0002 mm), qui permet de collecter tous les micro-organismes de l'eau de mer, dont la taille moyenne est d'environ 0,5 à 1 micron (0,001 mm). Ces filtres sont ensuite congelés à très basse température (-80 °C en général) pour une préservation optimale.

Ensuite, de retour au laboratoire, le matériel génétique (l'ADN) de tous les micro-organismes est extrait. Paradoxalement, nous ne sommes pas capables d'isoler plus de 1 % des micro-organismes de l'eau de mer, mais nous pouvons facilement en extraire l'ensemble du matériel génétique ! Le biologiste marin aura alors pour objectif de décoder puis d'étudier – les spécialistes diront "séquen- cer*" – cet ADN, qui va permettre d'identifier toutes les



Pourquoi ne sait-on pas cultiver plus de 1 % des micro-organismes de l'eau de mer ?

Il y a trois raisons principales qui expliquent notre incapacité à cultiver l'immense majorité des bactéries de l'environnement. La première est chimique : l'eau de mer n'est pas que de l'eau salée, c'est surtout un milieu chimiquement très complexe et impossible à reconstituer en laboratoire, contenant de multiples molécules présentes à des concentrations infinitésimales mais pourtant utiles à la croissance des bactéries. Deuxième explication : notre incapacité à reconstituer *in vitro* la diversité des interactions entre espèces vivantes, interactions essentielles à la survie des bactéries. Enfin, un troisième facteur d'ordre physiologique est aussi souvent avancé. Beaucoup de microbiologistes considèrent que certaines bactéries sont "dormantes" dans l'environnement naturel, et les conditions de croissance en culture nécessitent des facteurs chimiques encore inconnus pour les activer.

Campagnes de prélèvements en mer à bord de navires océanographiques. Sur ce cliché, l'Atalante (Ifremer) pendant la campagne "Biosope" d'étude de des eaux du Pacifique Sud (cliché P. Catala/CNRS).

espèces de micro-organismes présentes dans l'eau prélevée. Pour répondre précisément à la question « *Qui sont-ils ?* », les chercheurs détectent et séquencent les gènes ARNr16S, véritables cartes d'identité de chaque bactérie.

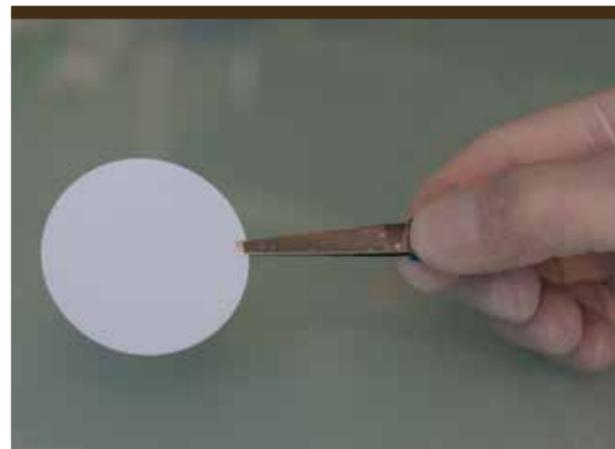
Ces méthodes de séquençage de l'ADN directement extrait de l'environnement naturel ont fortement évolué ces dernières années. Il y a encore dix ans, un inventaire de la diversité microbienne présente dans un échantillon d'eau de mer se limitait à quelques dizaines de séquences. Aujourd'hui, ces inventaires en contiennent plusieurs centaines de milliers, et l'amélioration des techniques promet des inventaires de diversité encore plus complets dans les prochaines années. Malgré ces avancées, l'étendue réelle de la diversité des espèces microbiennes marines est si vaste qu'elle ne reste que partiellement connue.

Alors, qui sont ces bactéries? Dans une goutte d'eau de mer, il existe quelques espèces de bactéries très largement dominantes et assez facilement détectables. C'est le cas, par exemple, du genre *Roseobacter*, qui représente près de 15 à 20 % des espèces présentes dans chaque goutte. Ces bactéries sont retrouvées dans tous les océans du globe, et fréquemment associées à des algues marines et des efflorescences* de

phytoplancton. Ces approches de la biologie moléculaire ont aussi confirmé l'importance des cyanobactéries des genres *Prochlorococcus* et *Synechococcus*, assurant une part importante de la production primaire* dans les océans.

Un autre groupe très dominant est formé par les bactéries du clade SAR11*, probablement le clade le plus abondant des océans; il représente en moyenne 35 % des espèces présentes dans un échantillon d'eau.

Ce n'est que très récemment qu'un membre de cet immense clade SAR11 a pu, après de multiples échecs, être isolé et caractérisé en laboratoire, mais l'immense majorité des espèces de ce clade ne sont toujours connues que par quelques fragments, et rien de plus, de matériel génétique



Filtre de maille de 0,2 micron pour collecter les bactéries marines (cliché M. Lorre-Guidt).



Que font ces micro-organismes dans l'eau ?

Autre inconnue majeure de ces peuples de microbes dans chaque goutte d'eau de mer: que font-ils? Non, l'immense majorité d'entre eux ne sont pas pathogènes pour l'homme! C'est à nouveau par l'étude de gènes particuliers dans des extraits d'ADN de l'eau de mer que les biologistes marins commencent à répondre à cette question. L'abondance des bactéries est telle dans un océan que ces dernières jouent un rôle écologique central. Par exemple, les micro-organismes marins sont les premiers consommateurs de toutes les petites particules de matière organique (algues et animaux morts, etc.): ainsi sont-ils essentiels aux cycles des éléments

Thermocyclers (PCR) permettant l'amplification de séquences génétiques cibles (comme les gènes ARNr16S par exemple) dans l'ADN de bactéries marines extrait de l'eau de mer (cliché M. Lorre Guidt/UPMC)

Culture de bactéries marines sur boîte et en fioles (à gauche). Ces approches traditionnelles permettent d'isoler des bactéries modèles pour le laboratoire, mais moins de 1 % des bactéries présentes dans l'eau de mer (cliché L. Intertaglia et M. Lorre Guidt/UPMC).



Pourquoi les gènes ARNr16S de l'ADN sont-ils considérés comme des "cartes d'identité" des bactéries ?

Trois arguments principaux sont avancés pour justifier ce choix. D'abord, l'ubiquité de ces gènes, puisqu'ils sont présents chez tous les micro-organismes, sans exception. Cette ubiquité en fait des marqueurs universels pour l'identification de ces êtres vivants: puisqu'on les trouve chez tous les micro-organismes, ils permettent de tous les classer. Ensuite, ces gènes sont constitués d'une alternance de zones d'ADN très variables et de zones très peu variables. Ainsi, l'étude des zones peu variables permet au naturaliste qui cherche à classer une nouvelle espèce de micro-organisme de la rapprocher d'espèces connues, et les zones très variables d'estimer son degré d'originalité. Enfin, ces gènes ne sont transmis que d'une bactérie "mère" à une bactérie "fille", il n'y a pas d'échange dit "latéral" (entre bactéries qui ne sont pas issues d'une même lignée). Ainsi, ces gènes ARNr16S permettent de retracer l'histoire évolutive des micro-organismes. Ces trois arguments font des gènes ARNr16S de l'ADN d'excellentes cartes d'identité des bactéries. Ce ne sont pas les seuls utilisés, mais ils restent incontournables lorsque l'on cherche à connaître la diversité des espèces présentes dans une goutte d'eau de mer.



en milieu marin. D'autres, comme la bactérie du genre *Marinobacter*, se sont spécialisés au cours de l'évolution dans la dégradation d'hydrocarbures (cette bactérie commence d'ailleurs à être étudiée en laboratoire pour examiner son potentiel de bioremédiation en cas de pollution). Ces activités microbiennes intéressent aussi nos laboratoires pharmaceutiques. Les micro-organismes marins sont capables de produire de très nombreuses molécules, avec des structures chimiques et des activités infiniment variées. Certaines, d'ailleurs, pourraient présenter des potentialités fortes pour le traitement de maladies humaines. C'est le cas par exemple des composés produits par les bactéries associées aux éponges marines. Dans le milieu naturel, ces composés chimiques bactériens sont extrêmement toxiques et permettent à l'éponge de se protéger de ses prédateurs; l'éponge

Bactéries marines dégradant une particule organique (représentation d'artiste, R. Gendron/UPMC).

Extraction d'ADN de bactéries marines. Les approches de la biologie moléculaire permettent de s'affranchir des approches de mise en culture des micro-organismes (cliché D. Sorel/UPMC-Biodiversarium).



offre en retour un abri et des conditions de croissance optimales à ces bactéries qui la protègent. Ces molécules très toxiques, comme les polykétides, pourraient se révéler être d'excellents anticancéreux, car elles limitent ou empêchent la croissance cellulaire, point clé du développement des cancers. Ainsi, chaque goutte d'eau de mer de l'océan pourrait bien constituer une armoire à pharmacie pleine d'avenir! ❄️

Éponge marine du genre *Axinella* dans la réserve sous-marine de Banyuls-Cerbère. Les bactéries qu'elle abrite lui permettent de se défendre contre ses prédateurs. Les molécules microbiennes émises par de nombreuses éponges marines sont actuellement caractérisées en vue d'applications pharmaceutiques (cliché J. Loubet/UPMC).



Glossaire

Bouteille de Niskin: Dispositif de prélèvement permettant de collecter de l'eau de mer à la profondeur souhaitée. Les bouteilles sont fermées par une masse (messager) descendant le long du câble porteur. Pour les bouteilles les plus récentes, la fermeture est assurée par un dispositif électronique.

Clade SAR11: les bactéries SAR11 ne forment pas seul genre bactérien, leur diversité est plus large. Cependant, l'immense majorité des genres et espèces formant de ce groupe n'a jamais été isolée. Les organismes appartenant à ce groupe et ne sont connus et regroupés entre eux qu'à l'aide d'analyses moléculaires.

Efflorescence de phytoplancton ("bloom"): prolifération d'algues en milieu aquatique.

Micro-organisme: les êtres vivants observables au microscope. En terme d'abondance, il s'agit principalement de bactéries, mais on y trouve aussi des petits eucaryotes (cellules à noyau) comme des algues, ou des larves de zooplancton.

Production primaire: production de biomasse par photosynthèse. Les bactéries des genres *Synechococcus* et *Prochlorococcus* sont des producteurs primaires importants en milieu marin.

Séquençage de l'ADN: établissement de l'enchaînement des constituants de l'ADN, en vue d'établir des cartographies de gènes.

Remerciements

Nicole Batailler, Philippe Catala, Romain Gendron, Mylène Lorre Guidt, Laurent Intertaglia, Julien Loubet, Diane Sorel, Tatiana Severin à la station marine de Banyuls/Mer, pour leurs illustrations et photographies.

Pour en savoir plus

- > Bertrand J.-C., Caumette P., Lebaron P., Matheron R., Normand P., 2011 – *Écologie microbienne: microbiologie des milieux naturels et anthropisés*. Éd. Presses universitaires de Pau et des Pays de l'Adour.
- > Kirchman D. L., 2008 – *Microbial ecology of the oceans* (2nd édition). Éd. Wiley-Liss.
- > Kirchman D. L., 2012 – *Processes in microbial ecology*. Éd. Oxford University Press.
- > Ressource universitaire en ligne présentant les méthodes actuelles d'étude des micro-organismes de l'eau de mer: <http://www.obs-banyuls.fr/genoval>