

ISSN 1424-4993

Ecole d'Été
Piora, 5-10 août 2001

Actes et contributions scientifiques

**ÉCOLOGIE MICROBIENNE
MOLECULAIRE:
SYMBIOSES DES ORGANISMES
AQUATIQUES ET TERRESTRES**

*sous la responsabilité de
Raffaele Peduzzi et Renata Boucher-Rodoni*

Edizioni Centro di Biologia Alpina
Piora, 2002

Grafica e stampa: Dazzi SA - Tipografia
CH-6747 Chironico

(c) 2002 Edizioni Centro Biologia Alpina di Piora,
c/o Istituto Cantonale di Microbiologia, Via Mirasole 22A
6500 Bellinzona

ISSN 1424-4993

AVANT-PROPOS

En complément d'une collaboration internationale soutenue par le CNRS (Programme international de collaboration scientifique, PICS 743 avec la Suisse), en concertation avec l'Ambassade de France à Berne et sous l'impulsion du Dr.G.Crozat (attaché pour la science et la technologie près l'Ambassade), une école d'été a été organisée afin d'offrir à des thésards ou jeunes chercheurs en Sciences de la vie, une formation complémentaire sur les associations symbiotiques dans différents milieux. Cette formation, d'une durée de 5 jours, s'est déroulée au Centre de Biologie Alpine de Piora, situé à 2000m d'altitude dans le massif du St Gothard, bien équipé et adapté à l'organisation de ce genre de réunion. Ce Centre, infrastructure des Universités de Genève, de Zürich et de Suisse Italienne (USI), est sous la responsabilité du Professeur R.Peduzzi, Université de Genève.

Les participants à cet atelier ont reçu une formation théorique, par une série de conférences (18heures), concernant des symbioses caractéristiques de différents milieux et une formation pratique, sous forme de travaux pratiques (20 heures) montrant les adaptations des techniques de biologie moléculaire à l'analyse des associations symbiotiques. Sur le plan académique, cette formation équivaut à un crédit universitaire de 3 ECTS pour les doctorants de l'Université de Genève. Les intervenants sont des chercheurs et enseignants issus de différentes Universités et Instituts, tous concernés par l'étude des symbioses, chacun ayant l'expérience d'un domaine particulier.

Le programme de l'Ecole d'Eté a prévu d'envisager les associations symbiotiques dans les différents milieux de l'environnement (vie en milieu hydrique et terrestre), et le rôle de certaines symbioses dans l'acquisition de la pathogénicité. L'originalité de cette formation est donc d'envisager en parallèle les différents aspects des associations symbiotiques liées à la fois au monde animal, végétal et microbien.

Sommaire

Introduction générale	9
I. Vie marine et Symbiose	
Renata Boucher-Rodoni et Sveva Grigioni.	
- Les associations symbiotiques dans différents milieux marins.	12
Sveva Grigioni et Renata Boucher-Rodoni.	
- Les associations symbiotiques des Mollusques Céphalopodes.	16
Pascale Joannot	
- Les récifs coralliens: d'incontournables symbioses. Exemple de l'Outre-mer Français	21
II. Vie en eau douce et Symbiose	
Mauro Tonolla et Sandro Peduzzi.	
- Bactéries sulfatoréductrices et bactéries phototrophes dans le Lac de Cadagno: symbiose ou simple agrégations ?	31
III. Vie terrestre et Symbiose	
Roland Beffa	
- Les microorganismes source de nouveaux produits phytosanitaires.	41
Xavier Perret et William John Broughton	
- Les bases moléculaires des symbioses à large spectre d'hôte.	45
Silvio Gianinazzi, Diederik van Tuinen et Vivienne Gianinazzi-Pearson.	
- Les mycorhizes, le sol et le développement végétal.	48
Andrea Zocchi et Raffaele Peduzzi.	
- Les lichens.	56
IV. Pathogénicité et Symbiose	
Colette Harf-Monteil et Henri Monteil.	
- Biologie et symbiose de <i>Legionella</i> .	63
Valeria Gaia et Raffaele Peduzzi	
- Détection de <i>Legionella</i> dans des échantillons cliniques et environnementaux.	66
Raffaele Peduzzi et Valeria Gaia.	
- La légionellose, une infection bactérienne liée à l'eau et aux systèmes de climatisation.	70
Conclusions générales	75

INTRODUCTION GENERALE

Le terme symbiose provient d'un mot grec qui signifie " vivre ensemble ". Pendant longtemps de nombreuses discussions ont entouré la définition d'une symbiose : est-ce que la pollinisation des plantes par les insectes est une symbiose? Est-ce que des relations parasitaires sont une symbiose?...

L'encyclopédie définit la symbiose comme l'association permanente de deux êtres vivants, indispensable à l'un d'eux, utile ou indifférente à l'autre. La définition la plus généralement admise dans la communauté scientifique est celle d'une association durable entre deux partenaires, un hôte et un symbiote (intra ou extra-cellulaire): association de type commensale ou mutualiste. Mais pour certains auteurs, la définition inclut aussi les associations parasitaires. Ces dernières sont faciles à définir. En revanche, les associations mutualistes ou commensales le sont beaucoup moins. Comment identifier si une association est bénéfique pour l'un ou les deux partenaires? En les élevant ou cultivant séparément. Mais les interactions avec le milieu par exemple ne sont pas nécessairement les mêmes pour chaque espèce séparément et pour l'association des deux. De plus, il peut y avoir des effets bénéfiques à certains stades du cycle de vie et pas à d'autres.

Dans le cas des associations mutualistes entre animaux et bactéries, par exemple, l'hôte fournit un environnement riche en nutriments qui stimule la croissance bactérienne en échange de produits provenant de voies métaboliques spécifiquement bactériennes (digestion de la cellulose, synthèse de vitamines).

Nous assistons aussi à des spécialisations qui ont permis à certaines communautés de s'adapter à des régimes inhabituels (ruminants). Par ailleurs, d'autres spécialisations ont conduit l'hôte à développer un organe particulier qui abrite les symbiotes (organes lumineux des sépioles, nodules racinaires).

Les progrès récents de la biologie mettent l'accent sur le rôle central des microorganismes aussi bien dans la structuration passée et présente des environnements, que dans la nature de nombre de phénomènes biologiques. Les associations symbiotiques impliquant des microorganismes sont très répandues dans la nature, aussi bien dans le monde végétal qu'animal ; certaines sont " à bénéfice réciproque ", d'autres ne profitent qu'à l'un des partenaires, enfin certaines sont pathogènes. Les symbioses non pathogènes sont de loin les plus abondantes, les plus spectaculaires étant les symbioses permettant la survie en milieu extrême, telles les sources hydrothermales. Dans ce cas, divers organismes marins vivent en étroite symbiose avec des populations denses de bactéries chimioautotrophes. D'autres associations, sans être aussi spectaculaires, interviennent néanmoins de façon déterminante au niveau de processus physiologiques de l'hôte. Chez les végétaux, certaines plantes vertes fournissent à leurs associés les aliments glucidiques résultant de leur photosynthèse, en échange de l'humidité, de la protection, d'aliments azotés. Dans le domaine médical, beaucoup de maladies sont dues à des bactéries pathogènes. Mais on s'est trop con-

centré sur l'étude des effets pathogènes et pas suffisamment sur le fait que ces effets sont dus à la rupture du fonctionnement équilibré de la communauté symbiotique animal-bactérie en période normale. C'est-à-dire qu'il faut à présent combler tout le retard accumulé concernant l'étude des interactions entre hôtes et symbiotes, choisir des modèles et les étudier à l'aide des techniques les plus récentes.

Ainsi, la symbiose établit entre organismes une relation différente de la relation classique "proie-prédateur". Il s'agit d'un partage harmonieux du même espace ou de la même ressource. Pour établir une association spécifique, des mécanismes ont dû se développer pour assurer la reconnaissance des partenaires vrais et l'exclusion de partenaires potentiels. De ce fait, des organismes associés dans une relation symbiotique stable sont supposés avoir évolué ensemble. Le rôle fondamental des symbioses dans les changements évolutifs a d'ailleurs été souligné dès l'introduction du terme "symbiose", à la fin du siècle dernier (De Bary, 1879). Indispensables à la survie des organismes dans de nombreux cas, les associations symbiotiques ont effectivement joué un rôle important dans l'évolution du monde vivant, puisqu'elles sont à l'origine de la cellule eucaryote. En outre, comme elles permettent la survie en milieu drastique, elles ont sans doute eu le même rôle au cours des ères géologiques perturbées.

I. Vie marine et Symbiose

La mer occupe 71% de la surface du globe, la majorité des taxons actuels y vivent. Le milieu marin est très diversifié, il va du côtier au profond, des pôles à l'équateur. Les zones côtières sont dites eutrophes car elles reçoivent les apports du continent et des sédiments (faible profondeur). Pour ce qui est des eaux océaniques, longtemps considérées comme de vastes déserts, des études récentes ont révélé qu'un extraordinaire monde microbien, de taille inférieure aux premiers maillons de la chaîne alimentaire classique des mers eutrophes, vivait dans ces eaux oligotrophes pauvres en nourriture.

Dans tous les compartiments marins, la vie est présente y compris dans les milieux extrêmes, qui représentent une part importante de notre planète. Par exemple, la température des trois quarts de la planète reste la plupart du temps inférieure à 5°C. L'essentiel de ces régions inhospitalières correspond aux océans profonds et aux régions polaires. Longtemps considérées comme dépourvues de vie, en comparaison avec les zones plus tempérées, on a découvert qu'un grand nombre de bactéries vivaient dans ces régions. Ces organismes psychrophiles (du grec psukros=froid) doivent effectuer à des températures proches de 0°C toutes les fonctions essentielles à leur croissance et leur reproduction. Autre milieu extrême, les sources hydrothermales : dans ces sites dépourvus de lumière, pauvres en oxygène, très riches en soufre, et où les températures sont très élevées (300°C dans la cheminée) une faune dense est présente. Outre ces zones extrêmes, un autre milieu marin est très riche et diversifié: la zone intertropicale, c'est-à-dire la zone des récifs coralliens, qui joue un rôle important dans l'équilibre climatique de la planète.

Dans tous ces milieux, de nombreux processus métaboliques sont assurés par l'association entre plusieurs organismes, c'est-à-dire par des associations symbiotiques.

LES ASSOCIATIONS SYMBIOTIQUES DANS DIFFERENTS MILIEUX MARINS

Renata Boucher-Rodoni et Sveva Grigioni

Si la mer représente un milieu important dans l'équilibre de l'environnement mondial actuel, elle est aussi à l'origine de la vie. C'est là qu'est apparue la cellule eucaryote, résultat de l'association symbiotique permanente entre une archaebactérie et une eubactérie (Margulis, 1991, 1993). Cette cellule eucaryote a dû s'adapter à l'évolution des conditions du milieu, c'est-à-dire apprendre à gérer l'oxygène lorsqu'il a commencé à apparaître sur terre. En effet, l'oxygène était rare ou absent dans l'atmosphère primitive du globe. On pense qu'il a commencé à s'accumuler grâce à l'activité des premières cyanobactéries. L'apparition de ces formes vivantes capables de fabriquer de l'oxygène moléculaire a dû provoquer de grands bouleversements écologiques au sein de la biosphère. C'est de nouveau une association symbiotique de la cellule eucaryote avec des cyanobactéries (origine des chloroplastes) et des α -protéobactéries (origine des mitochondries) qui permet la survie dans le nouvel environnement (Gray, 1993).

Le milieu marin héberge la majorité des phylums actuels d'Invertébrés, des organismes qui ont généralement une émergence précoce. Ils fournissent des modèles précieux pour la compréhension de l'histoire évolutive: apparition des grands plans d'organisation, radiations adaptatives précoces, colonisation des grands types d'environnement marin. Il s'avère donc indispensable de développer les analyses du patrimoine génétique de ces organismes, qui peuvent apporter des informations précieuses pour la compréhension des mécanismes de l'évolution du monde vivant.

De plus, chez les Invertébrés, la plupart des taxons sont associés à des symbiotes (Tableau 1). Les associations symbiotiques avec des bactéries sont nombreuses. Elles ont joué un rôle capital dans l'évolution du monde vivant (origine de la cellule eucaryote) et elles continuent à être très importantes pour de nombreux organismes actuels. En effet, dans la compétition vitale, les bactéries ont adopté de nombreuses solutions originales qui n'ont pas forcément d'équivalents dans les autres espèces, d'où l'association de nombreux organismes avec des bactéries pour pallier d'éventuelles carences ou pour optimiser certaines fonctions (Saffo, 1992).

Tableau 1 :
Phyla d'Invertébrés marins vivant en association avec des symbiotes.

PHYLUM	SYMBIOTE
Eponges	<u>Bactéries</u>
Cnidaires	Dinoflagellés
Plathelminthes	Dinoflagellés <u>Bactéries</u>
Nématodes	<u>Bactéries</u>
Annélides	<u>Bactéries</u>
Pogonophores	<u>Bactéries</u>
Mollusques	Dinoflagellés Dicyémides <u>Bactéries</u>

Les associations organismes-symbiotes peuvent être intra ou extra-cellulaires, concerner des organismes libres, fixés, coloniaux.

Ainsi, en milieu tropical, la vie des coraux, si importants pour l'équilibre climatique de la planète, est liée à une association symbiotique avec des zooxanthelles. En cas de perte prolongée (quelques mois) des symbiotes les hôtes finissent par mourir, alors que les zooxanthelles survivent indéfiniment dans le milieu. Une association similaire se retrouve chez le bivalve géant *Tridacna gigas* qui contient des endosymbiotes photosynthétiques intracellulaires (dinoflagellés dans ce cas aussi) qui jouent un rôle dans le recyclage de l'azote ammoniacal excrété (Rees et al., 1994).

Dans les sources hydrothermales, où les conditions chimiques et physiques sont particulièrement néfastes à la survie des organismes, la faune présente est dépendante de bactéries symbiotiques assurant certaines des fonctions vitales. Dans ce milieu, Annelides, Bivalves, Pogonophores, Vestimentifères vivent en étroite symbiose avec des populations denses de bactéries chimioautotrophes oxydant le soufre, l'ammonium, le manganèse, le fer, l'hydrogène et les composés carbonatés. Les *Riftia*, par exemple ne possèdent pas de tube digestif mais abritent dans un organe spécial des bactéries capables de synthétiser de la matière organique à partir de carbone minéral en utilisant comme source d'énergie les sulfures métalliques. Le ver absorbe

l'oxygène et les sulfures dissous dans le mélange eau de mer-fluide hydrothermal et les fournit aux bactéries symbiotes. Le vers est une véritable oasis pour les bactéries, à l'abri des extrêmes thermiques et chimiques dans le corps de l'animal, où une hémoglobine spéciale leur apporte sulfure, oxygène et CO₂ à domicile. Les sources hydrothermales sont des modèles d'écosystèmes très anciens et protégés, probablement les lieux les moins perturbés sur terre pendant les périodes d'extinctions.

La symbiose concerne souvent les échanges nutritifs, mais parfois elle intervient dans le comportement des partenaires. Ainsi, certaines sépioles vivent en association avec des bactéries luminescentes (*Vibrio fischeri*). Rôle de cette symbiose: attirer des proies, effrayer des prédateurs? Ce que l'on sait est que ces bactéries jouent un rôle inducteur dans la morphogenèse des organes lumineux (Montgomery & Mc Fall-Ngai, 1995). C'est-à-dire qu'à la naissance les jeunes sont aposymbiotiques et que c'est l'infestation par des bactéries du milieu qui provoque le développement de l'organe lumineux. Certains poissons ont aussi des symbiotes bactériens luminescents, soit pour attirer les proies, soit pour communiquer ou pour tromper un prédateur.

Les associations symbiotiques concernant plusieurs phylotypes bactériens sont rares. De telles associations avec plusieurs souches bactériennes sont cependant la règle dans les glandes accessoires des céphalopodes (Barbieri *et al.*, 1996 ; Grigioni *et al.*, 2000), et ont récemment été mises en évidence chez l'oligochète *Olavius loisiae* (Dubilier *et al.*, 1999).

L'adaptation à une autre espèce peut produire des réponses réciproques qui soit contrarient ou renforcent l'adaptation. Souvent les interactions sont trop mal connues ou trop complexes pour connaître la véritable mission de la symbiose. Mais si quelques études se sont intéressées au rôle adaptatif et morphogénétique des symbioses (McFall-Ngai & Ruby, 1991), la signification évolutive de ces associations a été jusque ici peu envisagée. Or, l'analyse en parallèle de la phylogénie moléculaire du groupe hôte et des symbiotes bactériens permet d'envisager une analyse de la co-évolution des partenaires : une spéciation parallèle a été mise en évidence entre hôte et symbiotes bactériens (bactéries lumineuses) chez certains céphalopodes (Nishiguchi *et al.*, 1998). Les Céphalopodes sont des organismes anciens et plusieurs types d'associations symbiotiques ont été mises en évidence. Certaines de ces symbioses leur ont peut-être permis de survivre pendant des ères géologiques perturbées.

Bibliographie

- Barbieri E., Gullede J., Moser D., Chieng C.C. (1996) New evidence for bacterial diversity in accessory nidamental gland of the squid (*Loligo forbesi*). Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole 191 : 316.
- Childress J.J., Fisher C.R. (1992) The biology of hydrothermal vent animals: physiology, biochemistry and autotrophic symbioses. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 30 : 337-341.
- De Bary (1879) De la symbiose. Rev. Int. Sci. 3: 301-309.
- Dubilier N., Amann R., Erséus C., Muyzer G., Park S.Y., Giere O., Cavanaugh C.M. (1999) Phylogenetic diversity of bacterial endosymbionts in the gutless marine oligochaete *Olavius loisiae* (Annelida). Mar. Ecol. Prog. Ser. 178: 271-280.
- Gray M.W. (1993) Origin and evolution of organelle genomes. Current Opinion in Genetics and Development 3 : 884-890.
- Lee R.W., Thuesen E.V., Childress J.J. (1992a) Ammonium and free amino acids as Nitrogen sources for the chemoautotrophic clam symbiosis *Solemya reidi* Bernard (Bivalvia : Protobranchia). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 158 : 75-91.
- Lee R.W., Thuesen E.V., Childress J.J., Fisher C.R. (1992b) Ammonium and free amino acids uptake by a deep sea mussel containing methanotrophic bacterial symbionts. Mar. Biol. 113 : 99-106.
- Lum-Kong A., Hastings T.S. (1992) The accessory nidamental glands of *Loligo forbesi* (Cephalopoda, Loliginidae). Characterization of symbiotic bacteria and preliminary experiments to investigate factors controlling sexual maturation. J. Zool. Lond. 228: 395-403.
- Margulis L. (1991) Symbiogenesis and symbiogenesis. In Symbiosis as a source of evolutionary innovation. Margulis, Fester Eds, The MIT press, Cambridge: 1-14.
- Margulis L. (1993) Symbiosis in cell evolution. Freeman Ed, New York.
- McFall-Ngai M.J., Ruby E.G. (1991) Symbiotic recognition and subsequent morphogenesis as early events in an animal-bacterial mutualism. Science 254: 1491-1494.
- McFall-Ngai M.J., Ruby E.G. (1998) Sepioids and Vibrios: when first they meet. Bioscience 48 (4): 257-265.
- Montgomery M.K., McFall-Ngai M.J. (1995) Bacterial symbionts induce host organ morphogenesis during early postembryonic development of the squid *Euprymna scolopes*. Development 120: 1719-1729.
- Nishiguchi M.K., Ruby E.G., McFall-Ngai M.J. (1998) Competitive dominance among strains of luminous bacteria provides an unusual form of evidence for parallel evolution in sepioid squid - Vibrio symbioses. Appl. Environm. Microbiol. 64(9) : 3209-3213.
- Rees T.A.V., Fitt W.K., Yellowlees D. (1994) Host glutamine synthetase activities in the giant clam-zooxanthellae symbiosis: effects of clam size, elevated ammonia and continuous darkness. Mar. Biol. 118: 681-685.
- Saffo M.B. (1992) Invertebrates in endosymbiotic associations. Amer. Zool. 32 : 557-565.

LES ASSOCIATIONS SYMBIOTIQUES DES MOLLUSQUES CÉPHALOPODES

Sveva Grigioni et Renata Boucher-Rodoni

Comportant à la fois des espèces primitives et des espèces plus récentes, les Céphalopodes constituent un modèle intéressant pour l'étalonnage des différentes techniques complémentaires d'analyse des mécanismes de l'évolution d'un Invertébré à émergence précoce.

Chez les Céphalopodes, on connaît des associations symbiotiques dans différents organes, en relation avec les principales fonctions physiologiques de l'hôte (Tableau 1).

Tableau 1 :
Activités physiologiques et organes concernés par des associations symbiotiques, chez les Céphalopodes.

Activités physiologiques	Organes	Taxon
Nutrition	Glandes lumineuses	Sepiolidés
	Glandes salivaires	Octopodidés (<i>Hapalochlaena</i>)
Reproduction	Glandes accessoires	Sepiidés, Sepiolidés
		Loliginidés
Excrétion, Croissance, Flottabilité	Sacs rénaux	Sepiidés, Nautilidés
	Sacs coquilliers	Sepiidés
	Glande péricardique	Nautilidés

* Symbiose et nutrition

Chez les Céphalopodes, ce sont des bactéries luminescentes (*Vibrio fischeri*) qui servent à certaines espèces, dont de nombreuses sepioles, pour leur comportement de chasseur crépusculaire.

Les sépioles, comme beaucoup d'autres céphalopodes sont des carnivores actifs. Elles vivent enfouies dans le sable dans la journée et sortent le soir pour aller chasser. Ces animaux semblent utiliser la bioluminescence des bactéries pour émettre ventralement de la lumière de la même intensité que celle de la lune ou des étoiles. Grâce à ce subterfuge, il n'y a pas d'ombre et leur silhouette n'est pas visible par les prédateurs éventuels venant des profondeurs. Les glandes lumineuses sont absentes à la naissance et ce sont les bactéries qui jouent un rôle inducteur dans la morpho-

genèse des organes lumineux (Montgomery & Mc Fall-Ngai, 1995). Un autre exemple d'association symbiotique utile pour la capture des proies est fourni par *Hapalochlaena*, une jolie pieuvre indo-pacifique dont la morsure est mortelle pour l'homme. Elle injecte en effet de la tetrodotoxine (TTX), destinée à paralyser ses proies. La toxine semble être produite par des bactéries symbiotiques, vivant dans les glandes salivaires de l'hôte (Sheumack *et al.*, 1978 ; Hwan *et al.*, 1989). Les résultats obtenus (par PCR et hybridation *in situ*) infirment la présence de bactéries chez *Hapalochlaena*, alors que des Vibrionacées peuvent être mises en évidence par culture sur milieu sélectif (Gaia *et al.*, in prep.).

*** Symbiose et reproduction**

Autre symbiose connue chez les Céphalopodes, l'association de diverses souches bactériennes avec les glandes nidamentaires accessoires (Bloodgood, 1977; Barbieri *et al.*, 1997 ; Grigioni *et al.*, 2000). Ces glandes (GNA) existent chez les seiches, les sepiotes et certains calmars, et semblent participer à l'élaboration des membranes de l'œuf. Elles sont incolores chez les individus immatures et acquièrent une coloration rouge-orangé intense pendant la maturation sexuelle. Cette coloration est due à l'accumulation de caroténoïdes par certaines souches bactériennes. Le rôle des bactéries dans l'association serait d'assurer la production de pigments et d'entourer l'enveloppe des œufs d'un feutrage bactérien protecteur. Des activités antimicrobiennes ont été mises en évidence dans des souches isolées des membranes des œufs de calmar. Chez *Sepia*, le rôle de cette association pourrait être, en plus, la transmission de bactéries symbiotiques à la génération suivante. En effet, plusieurs souches bactériennes présentes dans les GNA ont été identifiées aussi chez les embryons (Grigioni *et al.*, in prep.).

Les analyses déjà réalisées ont identifié par séquençage nucléotidique la présence de différentes souches bactériennes dans les glandes nidamentaires accessoires (Figure 1) chez les sepiidés (Grigioni *et al.*, 2000, Pichon *et al.*, in prep.) et les loliginidés (Barbieri *et al.*, 1996, 1997, 2001).

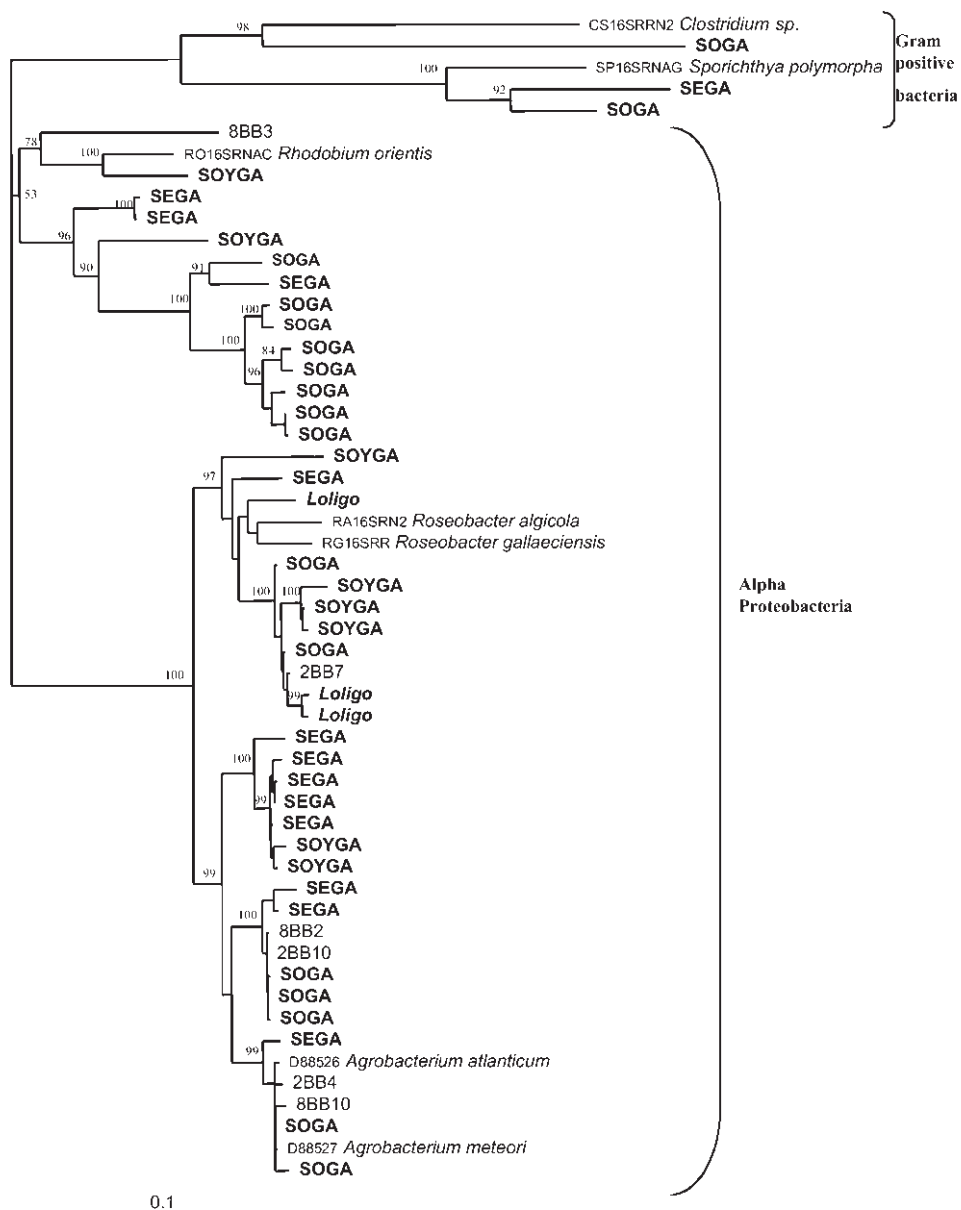


Figure 1 :
Arbre phylogénétique (méthode Neighbor-joining) de séquences sélectionnées de clones des glandes nidamentaires accessoires de sepiidés (Pichon et al. in prep.) et de loliginidés (banque de données EMBL). SOGA : *Sepia officinalis* ; SEGA : *Sepia elegans*; SOYGA : *Sepia orbignyana*; BB : embryons entiers de *Sepia officinalis*.

*** Symbiose et excrétion, croissance, flottabilité**

Enfin, des associations avec des bactéries ont été mises en évidence aussi dans des organes concernés par l'excrétion des produits azotés chez les espèces à coquille (seiches et nautilus).

Dans les sacs rénaux des seiches, outre les bactéries, vivent également d'autres symbiotes, les dicyémides, un groupe très particulier dans le règne animal. On pensait qu'il s'agissait d'organismes intermédiaires entre les protozoaires et les métazoaires, et on les a appelés mésozoaires. Ces organismes vermiformes vivent attachés aux appendices rénaux. Leur rôle semble être d'acidifier l'urine (Lapan, 1975), celui des bactéries de métaboliser l'azote (Grigioni *et al.*, in prep.) et en particulier l'ammonium (produit d'excrétion de l'hôte), pour assurer les besoins en azote gazeux au niveau de la coquille.

En effet, chez les Céphalopodes, la gestion de la flottabilité est un élément essentiel, et le métabolisme azoté, dont le produit terminal est l'ammonium, se révèle impliqué non seulement dans les processus digestifs et énergétiques (Boucher-Rodoni *et al.*, 1987) mais aussi dans la régulation de la flottabilité. L'étude de l'excrétion azotée de différentes espèces avait permis d'avancer des hypothèses concernant les relations entre l'utilisation des produits terminaux du métabolisme azoté et l'évolution du groupe (Boucher-Rodoni & Mangold, 1994). Les analyses récentes ont permis de confirmer les possibilités d'utilisation d'azote ammoniacal pour la flottabilité chez les seiches, en particulier par l'intermédiaire de symbioses bactériennes. L'analyse des séquences 16S de l'ADN bactérien extrait des appendices rénaux révèle la présence de plusieurs souches *Pseudomonas*-like, dont certaines peuvent produire de l'azote gazeux à partir de milieux enrichis en azote. Les mêmes souches sont présentes aussi dans les sacs coquilliers (Grigioni *et al.*, in prep.).

Bibliographie

- Barbieri E., Gullede J., Moser D., Chieng C.C. (1996) New evidence for bacterial diversity in accessory nidamental gland of the squid (*Loligo forbesi*). Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole 191 : 316.
- Barbieri E., Barry K., Child A., Wainwright N. (1997) Antimicrobial activity in the microbial community of the accessory nidamental gland and egg cases of *Loligo pealei* (Cephalopoda : Loliginidae). Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole 193 : 275-276.
- Barbieri E., Paster B.J., Hughes D., Zurek L., Moser D.P., Teske A., Sogin M.L. (2001) Phylogenetic characterization of epibiotic bacteria in the accessory nidamental gland and egg of the squid *Loligo pealei* (Cephalopoda: Loliginidae). Env Microbiol. 3 : 151-167.
- Bloodgood R.A. (1977) The squid accessory nidamental gland: ultrastructure and association with bacteria. Tissue and Cell 9 (2): 197-208.
- Boucher-Rodoni R., Boucaud-Camou E., Mangold K. (1987) Feeding and digestion. In: Cephalopod Life Cycles, vol.2, pp 85-108, P.Boyle ed., Academic Press.
- Boucher-Rodoni R., Mangold K. (1994) Ammonia production in cephalopods, physiological and evolutionary aspects. Mar. Freshwat. Behav. Physiol. 25 : 53-60.
- Gaia V., Grigioni S., Norman M., Boucher-Rodoni R. (in prep.). Bacteria associated to the blue-ringed octopus.
- Grigioni, S., Peduzzi R., Boucher-Rodoni R. (in prep.) Phylogenetic diversity of bacterial strains associated to The embryos of *Sepia officinalis* (Cephalopoda: Decapoda).
- Grigioni S., Boucher-Rodoni R., Demarta A., Tonolla M., Peduzzi R. (2000) Phylogenetic characterisation of bacterial symbionts in the accessory nidamental glands of the sepioid *Sepia officinalis* (Cephalopoda: Decapoda). Mar. Biol. 136 : 217-222.
- Hwan D.F., Arakawa O., Saito T., Noguchi T., Simidu U., Tsukamoto K., Shida Y., Hoshimoto K. (1989) Tetrodotoxin-producing bacteria from the blue-ringed octopus. Mar. Biol. 100 : 327-332.
- Lapan L.A. (1975) Studies on the biochemistry of the octopus renal system and an observation of the symbiotic relationship of the dicyemid mesozoa. Comp. Biochem. Physiol. 52 : 651-657.
- Montgomery M.K., McFall-Ngai M.J. (1994) Bacterial symbionts induce host organ morphogenesis during early postembryonic development of the squid *Euprymna scolopes*. Development 120: 1719-1729
- Pichon D., Grigioni S., Boucher-Rodoni R. (in prep.) Symbiotic associations in the Accessory Nidamental Glands of the European sepiids.
- Sheumack D.D., Howden M.E.H., Spence I. (1984) Occurrence of a tetrodotoxin-like compound in the eggs of the venomous blue-ringed octopus (*Hapalochlaena maculosa*). Toxicon 22 : 811-812.

LES RÉCIFS CORALLIENS: D'INCORTOURNABLES SYMBIOSES. EXEMPLE DE L'OUTRE-MER FRANÇAIS

Pascale Joannot

Les coraux sont les constructeurs essentiels des récifs coralliens qui se situent tout autour du globe entre 30° Nord et 30° Sud, à des températures de 19° à 30°C et à des profondeurs maximales de 45 à 50 m.

Dans ces régions tropicales, les récifs coralliens, les mangroves ainsi que les herbiers de phanérogames occupent environ le tiers des littoraux peu profonds. L'écosystème corallien, aussi complexe que la forêt tropicale présente une diversité spécifique élevée (Figure 1).

Le bon état de santé des récifs coralliens est d'autant plus important qu'ils jouent un rôle économique, culturel et social d'importance pour toutes les populations qu'ils baignent.



Figure 1. Récif corallien de Nouvelle Calédonie.

*** Présentation des récifs coralliens Français**

L'Outre-Mer Français est majoritairement tropical. Ses récifs coralliens sont distribués dans les Océans Atlantique (Martinique, Guadeloupe), Indien (Mayotte, Réunion, Iles éparses) et Pacifique (Nouvelle-Calédonie, Polynésie, Wallis et Futuna, Cliperton) et recouvrent une surface d'environ 55 000 km². Avec plus de 5000 km de linéaire de récifs coralliens, soit le double de celui de la grande barrière Australienne, la France est l'un des plus grands pays récifal de la planète (tableau 1). Cela lui confère une grande responsabilité de gestion de ces écosystèmes.

La répartition des populations est très hétérogène dans l'Outre-Mer Français et la densité est très variable. La Nouvelle-Calédonie, par exemple est très peu peuplée avec 11 hab./km², alors que Mayotte prévoit en 2010 une densité de 650 hab./km². Les populations sont le plus souvent concentrées dans les zones urbaines, essentiellement littorales.

Tableau 1 :
La répartition des récifs coralliens de l’Outre-Mer Français.
D’après IFRECOR.

Outre-Mer Français Géographie	Terre	Récifs et lagons	% Récif/Terre	Longueur récif	ZEE	Mangrove	Types de récifs				
	(km ²)	(km ²)		(km)	(km ²)	(ha)	B	DB	F	A	P
WALLIS et FUTUNA	215	65	25/75	50	300 000		■		■		
NOUVELLE CALEDONIE	18 585	40 000	70/30	> 2 000	1 740 000	20 000	■	■	■	■	
POLYNESIE FRANCAISE	3 430	12 800	80/20	> 2 000	5 500 000		■		■	■	
CLIPPERTON	2	4	70/30		425 000					■	
GUADELOUPE	1 806	200	10/90	200		3 000	■		■		
MARTINIQUE	1 100	150	10/90	70		1 850			■		
LA RÉUNION	2 512	12	10/90	25	318 300				■		
MAYOTTE	375	1500	80/20	197	73 600	668	■	■	■		
ILES EPARSEES	23	21	50/50		640 400					■	■
TOTAL	28 048	54 752		> 5 000	9 000 000	25 518					

B : Récif barrière ; DB : Double barrière ; F : Récif frangeant ; A : Atoll ;
P : Banc récifal.

* Diversité des types de récifs coralliens

Les récifs coralliens présentent une diversité de types géomorphologiques : récifs frangeants, récifs barrières, doubles-barrières, récifs à caye, atolls, bancs récifaux...

Les **récifs frangeants** bordent la côte. Souvent étroits ils sont présents dans toutes les îles et sont les formations dominantes à La Réunion et aux Antilles.

Les **récifs-barrières** sont beaucoup plus larges et éloignés de la côte. Ils délimitent des lagons de tailles variables, parfois larges de plusieurs kilomètres, et dont la profondeur varie de 10 à 70 m.

Des petits îlots coralliens peuvent se former sur les récifs et dans les lagons avec leur propre récif frangeant. Les récifs barrières existent en Nouvelle-Calédonie, à Wallis, autour des îles hautes de Polynésie Française, à Mayotte ainsi que sur la côte Est de la Martinique et en Guadeloupe (Grand Cul-de-sac Marin).

Les **doubles barrières**, formées par deux récifs barrières en parallèle, sont rares sauf à Mayotte et en Nouvelle-Calédonie.

L'atoll, récif corallien de haute mer, annulaire encerclant un lagon central généralement inférieur à 100 m de profondeur. L'accumulation de débris coralliens sur la couronne récifale peut constituer des îles plus ou moins continues, entrecoupées ou non de passes, lieu d'échange entre le lagon et l'océan.

Avec 80 km de long, l'atoll de Rangiroa en Polynésie, est le troisième plus grand au monde (le premier est celui de Kwajalein dans les îles Marshall).

Les atolls peuvent subir des variations du niveau de la mer, être soulevés par des mouvements tectoniques (atoll de Makatea en Polynésie française dont le fond de l'ancien lagon est à 60 mètres d'altitude) ou submergés, comme l'atoll de Portland en Polynésie Française, Fairway et Lansdowne en Nouvelle-Calédonie.

Le banc récifal, construction corallienne sur un haut fond en pleine mer formée par l'accumulation de sédiments. Ils sont représentés dans l'Océan Indien par les "cayes", des Glorieuses, de Juan de Nova ou de Tromelin.

* Les bâtisseurs de récifs

LES MADREPORES

Les organismes constructeurs des récifs coralliens sont les scléactiniaires ou madrépores, appartenant à l'embranchement des Cnidaires comme les méduses, les anémones, les gorgones, le corail noir ou encore les alcyons.

Tous ces organismes ont en effet en commun des cellules urticantes de quelques microns : les cnidoblastes. Particulièrement abondants au niveau des tentacules, ils ressemblent à un ballon de rugby dont l'une des extrémités est transformée en couvercle.

A l'intérieur de cette cellule, un harpon dentelé baigne dans un liquide toxique. Lorsqu'une proie ou un danger se présente à proximité des tentacules les couvercles des cnidoblastes se soulèvent tous en même temps, libérant une escadrille de flèches qui se plantent et paralysent la proie.

Les Madrépores sont des Anthozoaires hexacoralliaires pour la plupart coloniaux et quelquefois solitaires. La répartition des espèces ne se fait pas au hasard, certaines espèces dominantes luttent pour l'espace. Phénomène difficile à observer *in situ*, la lutte pour l'espace est en revanche visible en aquarium.

On distingue les grandes formes suivantes.

Les coraux branchus ex : *Acropora*, *Seriatopora*...

Les coraux boules ex : les *Porites*, les coraux de la famille des *Faviidae*

Les coraux tabulaires ex : certains *Acropora*

Les coraux en coupe ex : certains *Montipora*, ou *Turbinaria*

Les coraux encroûtants ex : certains *Montipora*

Les coraux solitaires (qui n'ont qu'un polype) : ex: *Fungia*, *Trachyphyllia*

LA REPRODUCTION

Le mode de reproduction chez les madrépores est relativement varié. On distingue :

- les espèces hermaphrodites qui s'auto-fécondent et libèrent des larves ;
- les espèces hermaphrodites qui libèrent des gamètes mâles et femelles dans l'eau et dont la fécondation est externe ;
- les espèces dioïques qui pratiquent la fécondation interne et libèrent des larves ;
- les espèces à sexes séparés libérant leurs produits sexuels dans l'eau et dont la fécondation est externe.

Le phénomène le plus spectaculaire est celui de la ponte en masse, décrit sur la Grande Barrière Australienne mais aussi en Nouvelle-Calédonie, où il a été observé à plusieurs reprises entre les mois d'octobre et février.

La ponte des coraux se fait quelques nuits après la première pleine lune d'été à l'échelle de marée basse et certainement lors d'une accalmie des vents (les alizés soufflent à cette période de l'année en Nouvelle-Calédonie).

Le spectacle est bref. Micro-sphères roses, blanches ou brunes, les millions de gamètes mâles et femelles libérés par les polypes de corail, montent en surface, se fécondent.

L'œuf se transforme en larve planula, de quelques microns, ciliée, de forme oblongue. La larve planula se laisse transporter au grès des courants pendant quelques heures ou quelques semaines.

Si elle a pu échapper au Zooplanctophages, elle se laisse couler, se fixe sur un support favorable (grain de sable, morceau de corail, coquille, épave...) et développe alors son premier polype protégé par un squelette calcaire.

LA SYMBIOSE

Les récifs coralliens ne sont autres que le résultat d'une symbiose entre les polypes et de microscopiques algues unicellulaires du genre *Symbiodinium spp.*, appelées Zooxanthelles. Ces Dinoflagellés endosymbiotes vivent à l'intérieur de la cellule endodermique de l'hôte. L'association des zooxanthelles et du corail constitue une symbiose parfaite, car elle profite aux deux partenaires. Il est à noter que les zooxanthelles sont déjà présentes après la fécondation, dans l'ectoderme de la planula qu'elles quittent pour migrer vers l'endoderme au moment où la larve se fixe.

La densité des Zooxanthelles, estimée par certains auteurs à 30000 algues/mm³ et leur répartition dans les tissus dépendent de la géométrie du polype, les parties fines et peu exposées à la lumière sont moins riches en zooxanthelles que les parties les mieux exposées à la lumière qui est le facteur le plus important dans le fonctionnement de la symbiose.

Comme tous les végétaux, le rôle des zooxanthelles est d'effectuer la photosynthèse qui peut être résumée simplement par la fabrication de composés carbonés complexes à partir d'eau et de gaz carbonique sous l'action énergétique de la lumière. La photosynthèse a une influence sur le métabolisme du corail qui héberge les algues, notamment dans le processus de calcification du squelette (Figure 2).

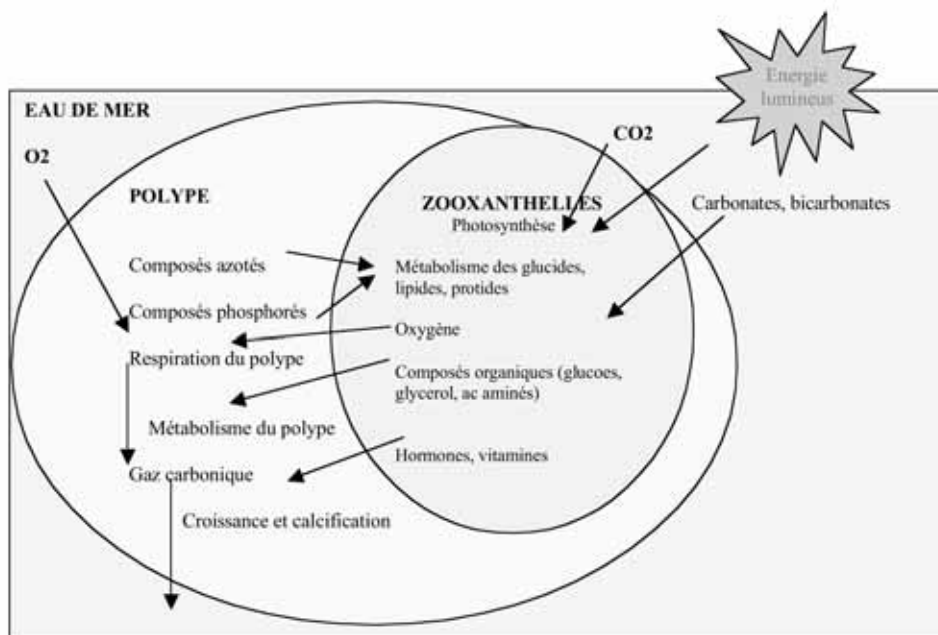


Figure 2 :
Le rôle des zooxanthelles dans le métabolisme et la calcification des madrépores.

Les zooxanthelles absorbent, dans la journée, du CO_2 pour la photosynthèse et rejettent de l' O_2 que le polype utilise pour sa propre respiration en plus de celui absorbé dans l'eau de mer.

Pendant la journée le bilan respiratoire est donc positif, c'est-à-dire que la production d'oxygène de l'association corail-Zooxanthelle est supérieure à la consommation.

Les échanges gazeux globaux dépendent de la lumière : la consommation maximale d'oxygène du groupe corail-algue a lieu au début de la nuit alors que la production d'oxygène est maximale vers la fin de la matinée. La production d'oxygène peut aussi diminuer avec la profondeur.

Les zooxanthelles jouent un rôle important dans la calcification des coraux, mais à ce jour si plusieurs théories ont été émises aucune d'entre elles n'a pu être validée expérimentalement.

Les zooxanthelles en absorbant le CO_2 de l'eau de mer pendant la photosynthèse permettraient la précipitation du carbonate de calcium $CaCO_3$ utilisé par le corail pour sa squelettogénèse (Figure 3).

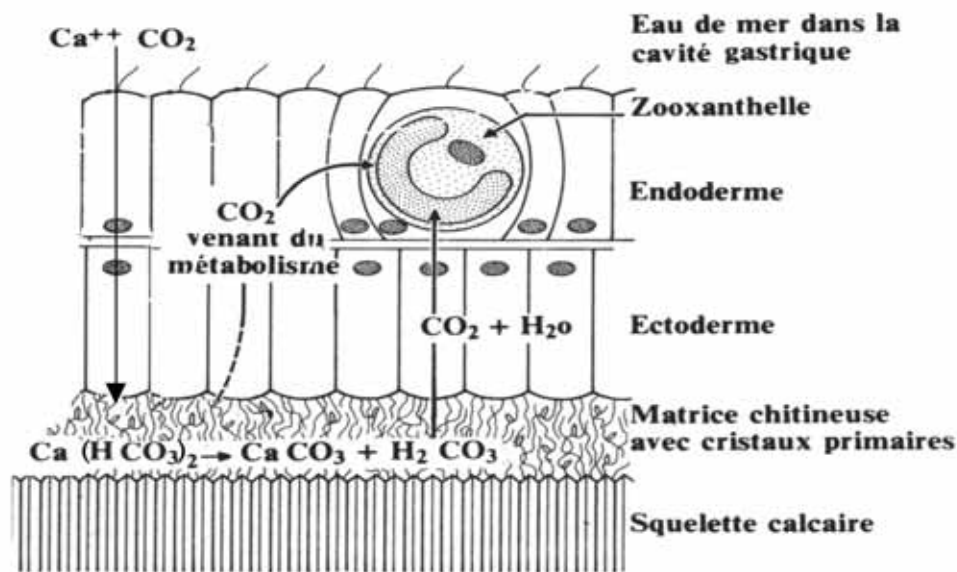


Figure 3 :
Formation du calcaire chez les madrépores (modifié d'après Schuhmacher, 1977).

De plus les zooxanthelles sécréteraient une " substance " (hormones ? vitamines ?) qui favoriserait la croissance du squelette du corail.

Le polype, zooplanctophage, produit des déchets organiques azotés et phosphorés que l'on peut considérer servir "d'engrais " aux zooxanthelles.

Cette association entre les Zooxanthelles et les coraux hermatypiques présente des avantages à la fois pour l'algue et l'animal ce qui caractérise bien une symbiose.

Cependant, dans certaines conditions, le symbiote algal peut être perdu, provoquant un phénomène de blanchissement pouvant affecter les coraux ainsi que certains alcyonaires et provoquer leur mort après quelques semaines si la re-colonisation n'a pas lieu. Ce phénomène de blanchissement semble être dû à une élévation excessive de la température de l'eau de mer. Mais certaines bactéries pourraient également participer aux processus de blanchissement (Kushmaro *et al.*, 1999).

Certains coraux réagissent à la lumière ultra-violette en émettant des couleurs fluorescentes. Ce phénomène a été découvert par le Dr. Catala à l'Aquarium de Nouméa en 1958. Les coraux fluorescents sont récoltés aussi bien sur des fonds de vase à 30 m de profondeur qu'à l'extérieur des lagons dans 10 m de profondeur.

Dans l'obscurité, sous éclairage ultraviolet, les coraux présentent une palette de couleurs fluorescentes allant du vert foncé au jaune lumineux en passant par toute une série de rouge et d'orangé.

Seules les parties vivantes de l'animal réagissent à l'éclairage U-V. Le squelette calcaire ne produit aucune fluorescence.

Dans les années soixante, quelques chercheurs (E. Lederer, Institut de biologie physico-chimique de Paris; M. Deribère, compagnie Mazda; Dr Destombes, Institut Pasteur de Paris et Y. Peloux, Institut Pasteur de Nouméa) s'étaient penchés sur le phénomène et avaient découverts que les pigments responsables des propriétés fluorescentes appartenaient aux groupes des Flavines, Urobilines et Ptérides et se situaient dans la chair de l'animal.

Il est fréquent de trouver sur un même site des colonies d'une même espèce : certaines fluorescentes, d'autres non.

De plus, il est intéressant de noter que dans une même espèce, il peut y avoir des fluorescences tout à fait différentes et c'est en particulier le cas des *Trachyphyllia geoffroyi*.

Par ailleurs, suite à un phénomène de blanchissement important en Nouvelle-Calédonie en 1996 (Joannot, 1998), on constate que des coraux habituellement non fluorescents sont, en période de blanchissement, c'est-à-dire avec un déficit fort de zooxanthelles, très fluorescents sous UV. Il est donc possible de penser que les zooxanthelles présentes dans la chair de l'animal pourraient jouer un rôle de masque permettant aux pigments de réagir à l'éclairage UV. Certaines espèces étant peu fluorescentes en période normale le sont particulièrement en période de blanchissement. Des recherches seraient à mener sur cette hypothèse qui tend à dire simplement que les coraux posséderaient tous des pigments réagissant à l'éclairage ultraviolet mais que la quantité de zooxanthelles présente dans leur chair pourrait jouer un rôle de masque ou capter prioritairement ces rayons lumineux.

CROISSANCE

Les madrépores calcifient relativement lentement mais le taux de croissance varie en fonction de l'espèce. Si les coraux branchus peuvent grandir de quelques centimètres de long par an, les coraux massifs tels que les *Favia sp* ou *Porites sp* ne grandissent que de 1 cm de diamètre par an. Il est fréquent de rencontrer des colonies dont le diamètre peut atteindre plus d'un mètre et dont l'âge peut donc être estimé à plus d'un siècle.

Une des particularités du squelette des madrépores est la porosité du squelette qui correspond à celle de l'os humain. Les greffes osseuses réalisées à partir de fragments de madrépores donnent d'excellents résultats.

Les récifs coralliens constituent cependant un biotope fragile, soumis à des pressions naturelles liées essentiellement à des facteurs physiques de l'environnement et à des prédateurs (*Acanthaster planci*). La Nouvelle Calédonie peut servir d'exemple pour illustrer les pressions et dégradations que peuvent subir les récifs coralliens.

Les cyclones ont un impact direct de destruction dû à la force des houles cycloniques

d'une part, et d'autre part ils favorisent une forte sédimentation en zone lagonaire au débouché des rivières. Par ailleurs, suite à une anomalie positive de température de l'eau de mer, un important phénomène de blanchissement (perte du symbiote algal) peut affecter les coraux ainsi que certains alcyonaires. Un tel phénomène a été observé pour la première fois en Nouvelle-Calédonie de janvier à mars 1996.

Certains récifs sont affectés par *Acanthaster planci*. Ce cas s'est produit en Nouvelle-Calédonie en 1980 mais il semblerait que les effets aient été limités. Des dégradations ponctuelles ont été observées mais aucune évaluation scientifique n'en a été faite. Un nouveau développement a été observé en 1998, qui s'est intensifié en 2000 et un suivi du phénomène est actuellement en cours.

Les pressions anthropiques sont plus variées. Des perturbations sont introduites par l'aménagement du littoral, remblais et dragages, par la pollution industrielle et domestique, par les exploitations minières et la sédimentation terrigène, l'exploitation des ressources. Parmi ces dernières il faut compter la pêche artisanale, la collecte de loisir d'organismes marins, l'exploitation des coraux, le tourisme et les activités de loisir, le trafic maritime dans le lagon et les risques de pollution, l'aquaculture et l'eutrophisation des eaux.

La gestion des récifs coralliens est souvent liée à l'insularité qui se caractérise par une problématique de bassin versant. Toute action sur le milieu terrestre induit en effet un impact en aval sur les lagons (érosion, sédimentation, assainissement, pollutions...). Les coûts de dépollution, traitement, recyclage, restauration sont importants.

Les récifs coralliens jouent donc un rôle majeur dans l'équilibre de la planète, mais ces récifs sont un biotope fragile, dont la survie est liée à l'association symbiotique avec des algues chaque partenaire étant sensible aux pressions de l'environnement.

Lectures recommandées

Catala R. (1979) Offrandes de la mer. Les éditions du Pacifique.

Catala R. (1964) Carnaval sous la mer. Les éditions R. Sicard.

Ifrecor Nouvelle-Calédonie (juin 2000) Groupe de travail du comité IFRECOR Nouvelle-Calédonie : Pascale Joannot ; Chantal Giraudon, Pierre Siapo ; Karell Henriot ; Richard Farman, François Devink ; Claire Garrigue ; Jean-Louis Dauzon, Louis Eschenbrener ; Michel Carrier.

Joannot P. (1990) Etude d'un récif exploité pour son corail: le récif Tetembia. Nouvelle-Calédonie. Thèse de doctorat. Université d'Aix-Marseille II .

Joannot P. (1995) La cité de corail. Editions Grains de Sable .

Robin B., Pétron C., Rives C. (1986) Les coraux. Les éditions du Pacifique.

Kushmaro A., Loya Y., Fine M., Rosenberg E. (1996). Bacterial infection and coral bleaching. Nature 380:396.

Schuhmacher H. (1977) L'Univers inconnu des coraux. Edition Elsevier Séquoia.

Veron J.E.N. (1993) Corals of Australia and the Indo-Pacific. Éditions Angus et Robertson.

II. Vie en eau douce et Symbiose

Les associations symbiotiques jouent aussi un rôle primordial dans les eaux douces, car sans ces associations certains organismes ne pourraient pas survivre. L'emplacement microbien dans un lac constitue le lieu privilégié pour la mise en évidence des symbioses. En général, dans le milieu aquatique, quatre zones d'activité bactérienne importante peuvent être différenciées :

La Surface de l'eau : C'est l'interface H₂O-Air avec des conditions particulières en ce qui concerne la lumière, l'oxygène, la température, la tension superficielle. Les bactéries se développant massivement à la surface forment un "film bactérien".

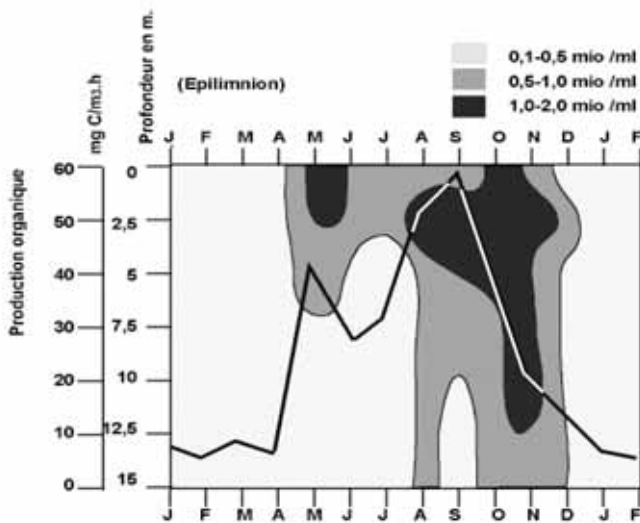
La Gaine périphytique : Les bactéries, avec d'autres organismes tels que les algues microscopiques, les protozoaires et les bryozoaires, enveloppent les macrophytes submergés.

L'Emplacement pélagique : On entend par emplacement pélagique, la partie éloignée du voisinage immédiat des rives et du fond. Les bactéries peuvent être libres en suspension (et font donc partie du nanoplancton) ou collées à des débris, tels que les dépouilles d'animaux en décomposition ou encore associées à des algues, fréquemment en condition de symbiose.

Le Sédiment : Il s'agit de l'emplacement microbien le plus important. En effet, la plupart des bactéries se trouvent dans le sédiment où il y a une concentration de matière organique souvent difficilement dégradable (par exemple la chitine ou les carapaces d'insectes), car pendant le processus de sédimentation, les composés les plus facilement attaquables par les microorganismes ont déjà été utilisés.

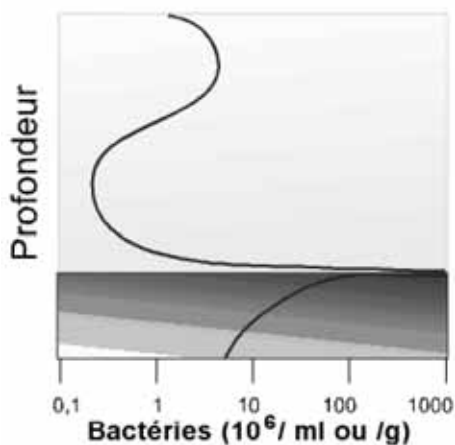
Au moyen de deux graphiques, nous pouvons synthétiser les paradigmes classiques de l'emplacement: l'offre de substrat et son rôle dans la distribution microbienne et l'endroit où l'activité microbienne est la plus élevée.

Dans le premier graphique, on peut mettre en évidence la corrélation entre l'activité photosynthétique et la densité bactérienne. Il est aisé de constater que les maxima de la production primaire sont corrélés avec les maxima de la concentration bactérienne. Il s'agit des mesures effectuées dans l'épilimnion du lac des Quatre Cantons, la production primaire est donnée en C/m³/h.



Lac des Quatre Cantons. Production primaire et nombre de germes en fonction des mois de l'année (d'après Schegg)

La "boucle microbienne" se déroule surtout à l'interface: eau-sédiment. Par l'intermédiaire du métabolisme microbien, les sédiments interviennent ainsi directement dans la vie aquatique. L'étude d'un écosystème aquatique (plan d'eau) doit s'intéresser aux sédiments pour être exhaustif, car souvent les espèces clés se trouvent à cet endroit. Les échanges eau-sédiment influencent l'état global de l'écosystème et son évolution. En effet, le lac étant le miroir du bassin versant, son sédiment est l'indicateur des pollutions au cours du temps. Pour estimer le relargage des éléments à partir des couches sédimentaires, l'étude du profil microbiologique du sédiment doit être complétée par une analyse physico-chimique.



Distribution verticale des bactéries dans l'eau et le sédiment d'un lac mésotrophe. Nombre relatif de bactéries (d'après Wetzel)

BACTERIES SULFATOREDUCTRICES ET BACTERIES PHOTOTROPHES DANS LE LAC DE CADAGNO: SYMBIOSE OU SIMPLE AGGREGATION ?

Mauro Tonolla et Sandro Peduzzi

Les lacs méromictiques représentent des modèles intéressants pour l'étude du bactérioplancton puisque des groupes de bactéries physiologiquement différentes se succèdent le long des gradients de lumière, d'oxygène et d'hydrogène sulfuré. Ces groupes représentent donc des modèles idéaux pour les études d'écologie microbienne des milieux hydriques. Dans la majorité des corps d'eau (lacs, océans,..) l'interface oxiq-anoxiq est confinée dans quelques centimètres à la surface du sédiment. La zone d'oxydoréduction dans les lacs méromictiques, au contraire, s'étend sur quelques mètres ce qui permet une analyse beaucoup plus aisée, sans les inconvénients dus à la présence des particules abiotiques et donc à l'hétérogénéité du milieu, mais surtout permettant de travailler sur une échelle en centimètres et non en micromètres. Ces avantages sont très importants soit pour les analyses chimiques, indispensables dans les études des bactéries dans leur milieu, soit pour les méthodes moléculaires de détection *in situ* qui utilisent des fluorochromes dont la qualité du signal dépend beaucoup du bruit de fond dû aux particules autofluorescentes.

*** Analyses *in situ* des populations bactérioplanctoniques**

Depuis 1992, à cause des difficultés de mise en culture des microorganismes de l'environnement, taux estimé entre 0.001% - 15% (Amann *et al.*, 1995), l'étude des populations bactériennes du lac méromictique de Cadagno a été focalisée sur des observations *in situ* avec d'une part des méthodes de coloration totale des acides nucléiques (DAPI et orange d'acridine) et d'autre part l'application des techniques moléculaires ainsi que la phylogénie basée sur les séquences des ARN ribosomiques (Demarta *et al.*, 1998; Tonolla *et al.*, 1998). Cette approche (*RNA approach*) a permis d'observer les distributions dans la colonne d'eau de différentes populations bactériennes à différentes périodes de l'année. L'analyse des morphotypes après coloration avec orange d'acridine ou DAPI s'est révélée efficace en tant qu'approche globale à l'écosystème microbien. De plus elle a permis d'établir la distribution de morphotypes caractéristiques et bien décelables comme *Chromatium okenii* et le morphotype R (Tonolla *et al.*, 1998; Bensadoun *et al.*, 1998).

La " RNA approach " (pour une revue voir Amann , 1995, 2000) et en particuliers l'hybridation cellulaire *in situ* a ouvert la possibilité d'une détection allant des gros domaines systématiques aux espèces et sous-espèces en permettant également l'analyse de plusieurs populations bactériennes à la fois.

L'application de sondes oligonucléiques s'hybridant avec les ARN ribosomiques 16S et 23S des groupes majeurs du *phylum Proteobacteria* a démontré la prédominance du groupe gamma dans le chemocline du lac de Cadagno. Ce dernier était représenté par des espèces appartenant à la famille des Chromatiaceae: en particulier par *Chromatium okenii*, *Lamprocystis roseopersicina*, *Amoebobacter purpureus* (récemment renommé *Lamprocystis purpurea*) et par au moins deux lignées phylogénétiques non décrites jusqu'à maintenant, représentées par les clones 136 et 371 (Figure 1).

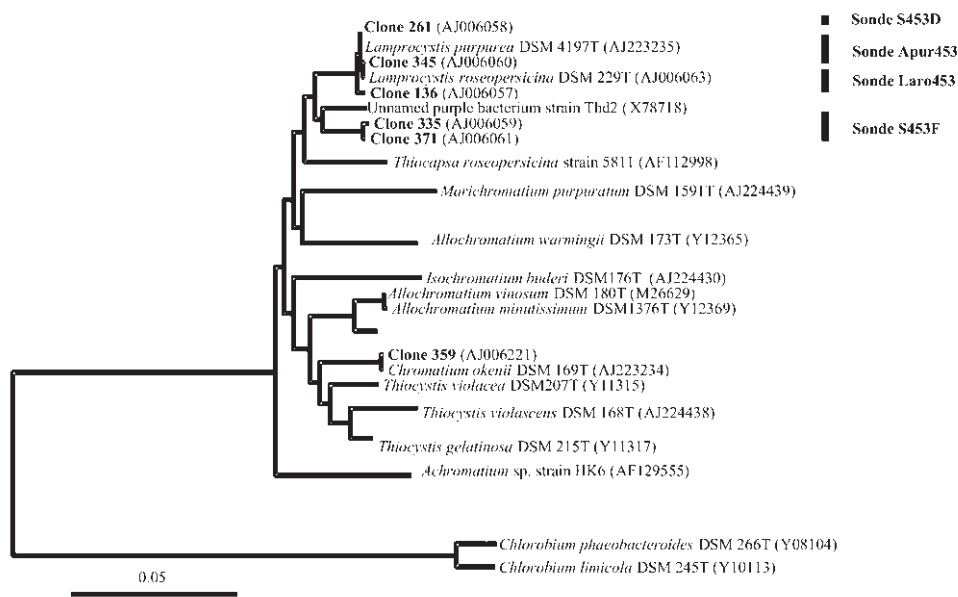


Figure 1 :
Arbre phylogénétique (méthode Neighbor-joining) de séquences sélectionnées des clones du lac de Cadagno (bactéries phototrophes) et de la banque de données EMBL/Genbank (avec numéros d'accès). Les barres verticales indiquent les groupes cibles des sondes oligonucléotidiques utilisées.

Grâce au développement de sondes spécifiques, il a été possible d'identifier l'espèce *Chromatium okenii* mais aussi de mettre en évidence la présence de quatre populations majeures de bactéries phototrophes ayant la même morphologie ("small celled phototrophs") et réunies dans un *cluster* avec les espèces *Lamprocystis purpurea* et *Lamprocystis roseopersicina* (Tonolla *et al.*, 1999).

Ces phototrophes sphériques et petits comparés à *Chromatium okenii* se présentent généralement sous forme d'agrégats composés de 200 à 900 cellules.

L'ASSOCIATION ENTRE BACTERIES PHOTOTROPHES ET BACTERIES SULFATOREDUCTRICES

Des hybridations *in situ* multiples avec la sonde SRB385 pour la détection des bactéries sulfatoréductrices et les sondes spécifiques pour la détection des quatre populations de phototrophes sphériques (Apu453, Laro453, S453D et S453F) ont permis d'identifier la présence d'un morphotype particulier de bactérie sulfatoréductrice à l'intérieur des agrégats (Tableau, 1 ; Figure 2). Cette association a été analysée ultérieurement afin de savoir si ces bactéries sulfatoréductrices représentaient également plusieurs populations et si elles étaient associées avec une seule population de phototrophes.

Tableau 1 : Sondes utilisées et régions cible sur les ARNr 16S.

Sonde ^{a)}	Spécificité	Séquence 5'-3'	Région cible (positions ARNr)	% FA ^{b)}	Ref.
SRB385	Proteobacteria: subdivision δ	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	16S rRNA (385-402)	20	Amaral R.L., <i>et al.</i> 1990
Apu453	<i>Aimochobacter purpureus</i>	TCCGCCAGGGTATTATCCCAAACGAC	16S rRNA (319-336)	35	Tonolla M., <i>et al.</i> 1999
Laro453	<i>Lamprocyctis roseopersicina</i>	CATCCAGGGTATTAACCCAAAATGC	16S rRNA (453-478)	30	Tonolla M., <i>et al.</i> 1999
S453D	Clone 2/61 Proteobacteria: subdivision γ	CAGCCAGGGTATTAACCCAAAGCCGC	16S rRNA (453-478)	40	Tonolla M., <i>et al.</i> 1999
S453F	Clones 3-35-3/71 Proteobacteria: subdivision γ	CCC'CA'ATGGGTATTARCCACAAGGCG	16S rRNA (453-478)	40	Tonolla M., <i>et al.</i> 1999
DSC213	Clone 1/13... (batonnets associés avec bactéries phototrophes). <i>Desulfocapsa thiozymogenes</i> Proteobacteria: subdivision δ	CCTCCTGTACGATAGCT	16S rRNA (213-230)	30	Tonolla M., <i>et al.</i> 2000
DSC441	Clone 1/13... (batonnets associés avec bactéries phototrophes). Proteobacteria: subdivision δ	ATTACACTTCTTCCCATCC	and (441-459)	30	Tonolla M., <i>et al.</i> 2000

- a) toutes les sondes ont un fluorochrome Cy3 en position 5'.
b) concentration de formamide dans le tampon de hybridation.

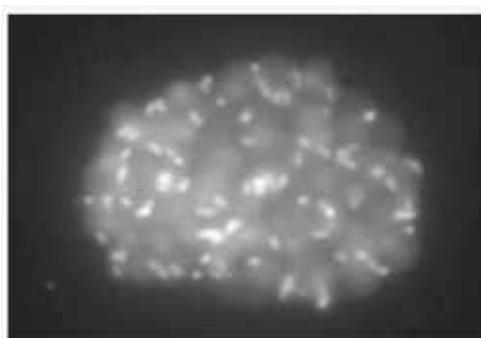


Figure 2 :
Hybridation in situ au moyen de la sonde SRB385, pour la détection de bactéries sulfatoréductrices du groupe delta dans les agrégats de bactéries phototrophes (small celled phototrophs). La sonde SRB385 a été marquée avec le fluorochrome Cy3 qui permet de la distinguer de l'auto-fluorescence des bactéries phototrophes.

Les 8 clones positifs après hybridation avec la sonde SRB385 et montrant un profil de restriction unique ont été ensuite réamplifiés et séquencés. L'analyse comparative des séquences a révélé la présence de deux clusters à l'intérieur du groupe delta des *Proteobacteria* (Tonolla. *et al.*, 2000). Les séquences d'un cluster constitué par six clones (Clones 113, 167, 348 et 368, 282, 330) étaient proches de celle de *Desulfocapsa thiozymogenes* (Janssen *et al.*, 1996) avec des pourcentages de similitude allant de 97.9 à 98.4% (Figure 3).

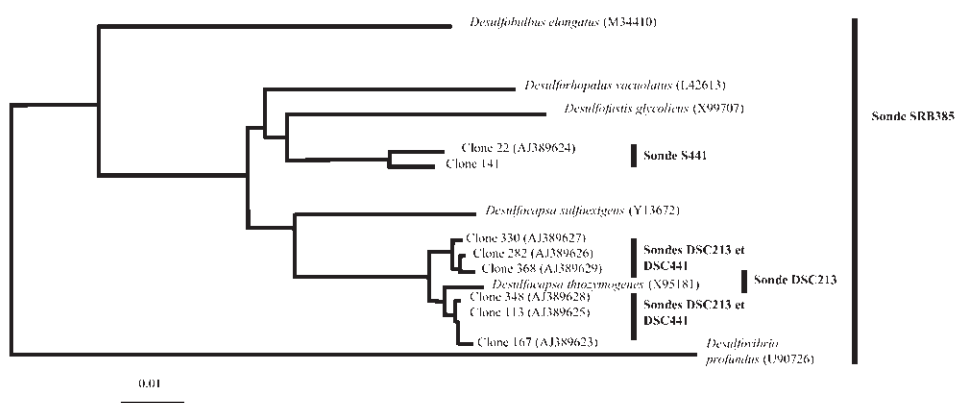


Figure 3 :
Arbre phylogénétique (méthode Neighbor-joining) de séquences sélectionnées des clones du lac de Cadagno (bactéries sulfatoréductrices) et de la banque de données EMBL/Genbank (avec numéros d'accès). Les barres verticales indiquent les groupes cibles des sondes oligonucléotidiques utilisées.

Seuls deux autres clones (22 et 141) étaient positifs à la sonde SRB385. Cela indique une complexité limitée des populations de bactéries sulfatoréductrices détectables par cette sonde, bien que cela pourrait ne pas refléter l'abondance de la séquence cible dans l'environnement car il est connu que l'approche par PCR pour l'analyse de la diversité microbienne dans des milieux hétérogènes est influencée par plusieurs facteurs (von Wintzingerode *et al.*, 1997).

Le développement et l'utilisation simultanée de deux sondes spécifiques (DSC441 et DSC213) aux six clones proches de *D. thiozymogenes* ont permis de mettre en évidence d'une manière optimale ces bactéries dans les agrégats de bactéries phototrophes en démontrant en même temps une association spécifique. En effet, la totalité des bactéries donnant un signal positif avec les sondes mentionnées était en association avec les bactéries phototrophes.

A l'occasion de l'Ecole d'été (Ecologie microbienne moléculaire: symbioses des organismes aquatiques et terrestres, 5 - 10 août, Centre de Biologie Alpine de Piors), il a

été possible de confirmer l'association entre les bactéries sulfatoreductrices proches de *D. thiozymogenes*, représentées par les clones 113, 167, 348, 368, 282 et 330, et les bactéries phototrophes proches du genre *Lamprocystis* représentées par les clones 335 et 371 (Figure 4).

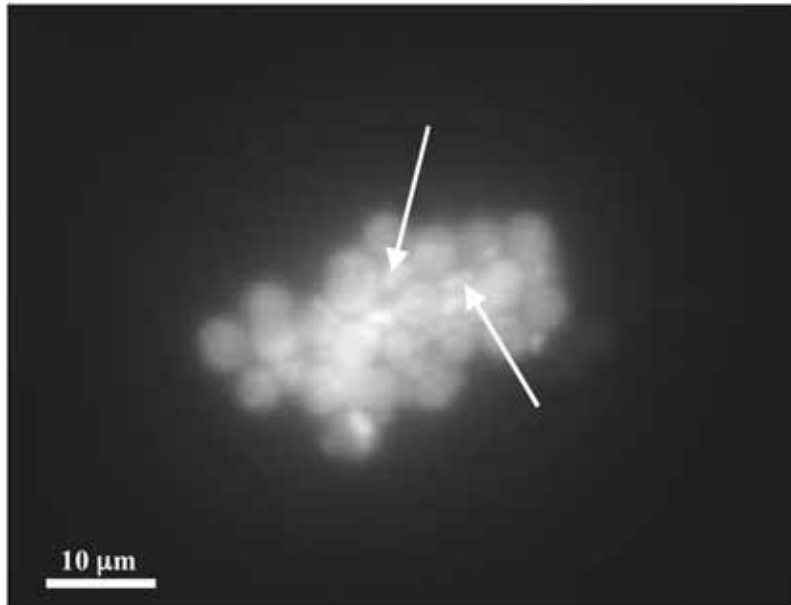


Figure 4 :
Hybridation *in situ* multiple en utilisant la sonde S453F pour la détection des bactéries phototrophes (représentées par les clones 335 et 371, figure 1) et les sondes DSC213 et DSC441 pour la détection des bactéries proches de *Desulfocapsa thiozymogenes* (clones 113, 167, 348, 368, 282 et 330, figure 3). A cause de l'autofluorescence des bactéries phototrophes, toutes les sondes ont été marquées avec le fluorochrome Cy3.

*** Interactions possibles à l'intérieur des agrégats**

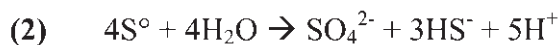
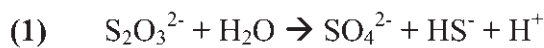
Le rapprochement phylogénétique des clones de Cadagno avec *D. thiozymogenes* DSM7269 n'indique pas nécessairement une similitude physiologique, toutefois les caractéristiques métaboliques de *D. thiozymogenes* sont utiles pour discuter la nature de cette association.

D. thiozymogenes est une bactérie sulfatoreductrice, poussant en conditions d'anoxie stricte par disproportionation du thiosulfate (réaction 1) et du sulfite en sulfate et sulfide. Le soufre élémentaire est également disproportionné (réaction 2) mais la réaction permet une croissance bactérienne seulement si le sulfide produit est enlevé du

milieu de culture. Cela rend la réaction de disproportionation du soufre exergonique. Disproportionation est un terme général utilisé pour décrire un processus par lequel un élément ou un composé dans un état d'oxydation intermédiaire est converti en deux produits ayant des états d'oxydations respectivement majeur et mineur. Pendant cette réaction d'hydrolyse du thiosulfate, l'atome S intérieur est converti en SO_4^{2-} , l'autre, extérieur est converti en HS^- , et le terme fermentation inorganique est aussi employé (Bak & Cypionka, 1987). Comme observé pour les espèces *D. sulfoexigens* DSM10523 et *Desulfobulbus propionicus* DSM2032 la disproportionation du soufre en sulfate et sulfide est en conséquence augmentée par la présence d'utilisateurs de sulfide (*scavengers*) comme l'hydroxide de fer ou de manganèse (FeCO_3 ou MnO_2).

Lamprocystis purpurea et *Lamprocystis* sp. photo-oxydent les composés du soufre réduits, tels que le sulfide, en sulfate (Eichler, 1988 ; Imhoff, 2001) et pourraient donc constituer des utilisateurs alternatifs aux composés oxydés de fer et de manganèse mentionnés ci-dessus (réaction 3). Les bactéries phototrophes pourraient donc fonctionner comme des *scavengers* biologiques. D'une part, en permettant la disproportionation des proches du *D. thiozymogenes*, les phototrophes pourraient en augmenter l'activité et la croissance. D'autre part les proches du *D. thiozymogenes* pourraient constituer une source continue de donneurs d'électrons (HS^-) pour les besoins des phototrophes, en fonctionnant comme un stockage externe de pouvoir réductant.

Réactions de disproportionation du thiosulfate (1) et du soufre (2) par *D. thiozymogenes*.

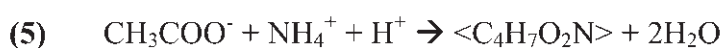
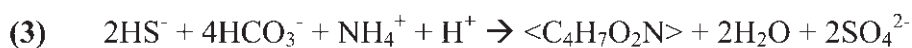


Réactions de *Lamprocystis purpurea* en présence de lumière.

Autotrophie:



Mixotrophie:



La diversité des capacités métaboliques des organismes concernés augmente les possibilités des interactions pouvant avoir lieu à l'intérieur des agrégats. En effet, *D. thiozymogenes* est également capable de pousser par réduction des sulfates et oxydation d'un nombre limité de composés organiques (ethanol, butanol et propanol) en leurs acides gras correspondants. D'autre part, en présence de sulfide une photo-assimilation de certains composés organiques (acétate, lactate, propionate et pyruvate) a été observée pour la souche LcCad1 (*Lamprocystis purpurea*) isolée du lac de Cadagno par Eichler et Pfennig en 1988. Les globules de soufre élémentaire, stockés intracellulairement durant la photo-oxydation, sont ultérieurement oxydés ou même réduits, à l'obscurité, par oxydation de produits de stockage internes comme le glycogène (Mas, 1995). De plus, dans l'obscurité et en conditions micro-oxygènes *L. purpurea* peut pousser en chimiolithotrophie par oxydation de thiosulfate et sulfide.

Le schéma de la figure 5 résume les interactions possibles entre les deux espèces.

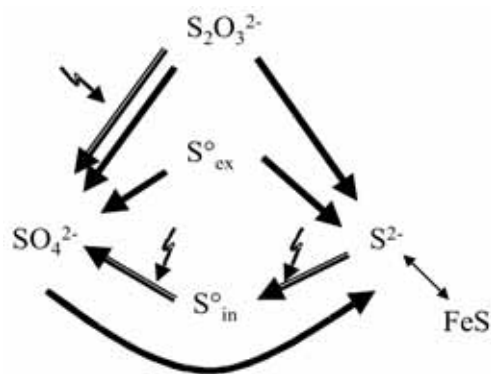


Figure 5 :
Possibles voies métaboliques de sulfate, thiosulfate, soufre et sulfide en présence de lumière, catalysées par les bactéries phototrophes (⇒) et par *Desulfocapsa sp.* (→).
⚡ : énergie lumineuse

Ce schéma met en évidence le rôle central du thiosulfate ainsi que la complexité des réactions (échanges) pouvant avoir lieu entre les bactéries composant les agrégats observés dans la zone d'oxydoréduction du lac. Les concentrations du thiosulfate dans les milieux hydriques sont généralement faibles et cela est dû au fait qu'il est métabolisé très vite par les micro-organismes (Jorgensen, 1990). D'autre part, le stockage du soufre (S°) par les membres du genre *Lamprocystis* est intracellulaire et ne devrait pas être disponible pour des utilisateurs externes. Il se pose donc la question de savoir s'il n'y a pas une carence soit de thiosulfate soit de soufre et donc

aussi une compétition interne aux agrégats entre les bactéries phototrophes et les bactéries proches du *Desulfocapsa thiozymogenes*. Toutefois dans un habitat riche en sulfide comme la chimiocline et le monimolimnion des lac méromictiques, tant le soufre que le thiosulfate pourraient être produits par oxydation chimique du HS⁻, assurant ainsi un apport constant des deux composés.

En conclusion, le nombre élevé d'échanges mutuels possibles (voir figure 5) ainsi que l'hétérogénéité des conditions environnementales rend une caractérisation stricte de la relation entre *Desulfocapsa* et les bactéries phototrophes pourpres difficile. L'agrégation pourrait constituer un moyen de survie dans un milieu hostile.

Une hypothèse possible serait que les deux organismes adoptent des comportements différents selon les conditions de vie particulières auxquelles ils doivent faire face. Par exemple en cas d'absence de H₂S la relation sera plutôt syntrophique ou symbiotique, en cas d'abondance de substrats la relation sera moins obligatoire (commensalisme ou protocoopération).

Bibliographie

- Amann R., Ludwig W. Schleifer K.-H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- Amann R.I., Binder B.J., Olsen R.J., Chrischold S.W., Devereux R., Stahl D.A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1919-1925.
- Bak F. Cypionka A. (1987) A novel type of energy metabolism involving fermentation of inorganic sulphur compounds. *Nature* 326: 891-892.
- Bensadoun J.-C., Tonolla M., Demarta A., Barja F., Peduzzi R. (1998) Vertical distribution and microscopic characterization of a non-cultivable micro-organism (morphotype R) of Lake Cadagno. In: Peduzzi, R., Bachofen and M. Tonolla (eds) Lake Cadagno: a meromictic alpine lake. *Documenta Ist. Ital. Idrobiol.* 63: 45-51.
- Eichler B., Pfennig N. (1988) A new purple sulfur bacterium from stratified freshwater lakes, *Amoebobacter purpureus* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 149: 395-400.
- Finster K., Liesack W. Thamdrup B. (1998) Elemental sulfur and thiosulfate disproportionation by *Desulfocapsa sulfoexigens* sp. nov., a new anaerobic bacterium isolated from marine surface sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 119-125.
- Imhoff J. F. (2001) Transfer of *Pfennigia purpurea* Tindall 1999 (*Amoebobacter purpureus* Eichler and Pfennig 1988) to the genus *Lamprocystis* as *Lamprocystis purpurea* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51(Pt 5):1699-1701.
- Janssen P. H., Schuhmann A., Bak F. Liesack W. (1996) Disproportionation of inorganic sulfur compounds by the sulfate-reducing bacterium *Desulfocapsa thiozymogenes* gen. nov., sp. nov. *Arch. Microbiol.*, 166: 184-192.
- Jørgensen B. B. (1990) A thiosulfate shunt in the sulfur cycle of marine sediments. *Science* 249: 152-154.

- Manz W, Amann R, Ludwig W, Wagner M, Schleifer K.-H. (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: Problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* 15: 593-600.
- Mas J, Van Gemerden H. (1995) Storage Products in Purple and Green Sulfur Bacteria, pp. 973-990. In: Blankenship R. E, Madigan M. T. and Bauer C. E. (eds): *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Tonolla M., Demarta A., Hahn D., Peduzzi R. (1998) Microscopic and molecular *in situ* characterization of bacterial populations in the meromictic lake Cadagno. In: Peduzzi, R., R. Bachofen and M. Tonolla (eds) *Lake Cadagno: a meromictic alpine lake*. *Documenta Ist. Ital. Idrobiol.* 63: 31-44.
- Tonolla M., Demarta A., Peduzzi S., Hahn D., Peduzzi R. (2000) *In situ* analysis of sulfate-reducing bacteria related to *Desulfocapsa thiozymogenes* in the chemocline of meromictic Lake Cadagno (Switzerland). *Appl. Environ. Microbiol.* 66, (2): 820-824.
- Tonolla, M., Demarta A., Peduzzi R., Hahn D. (1999) *In situ* analysis of phototrophic sulfur bacteria in the chemocline of meromictic Lake Cadagno (Switzerland). *Appl. and Environ. Microbiol.* 65, (3): 1325-1330.
- von Wintzingerode F, Göbel U. B. Stackerbrandt E. (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples; pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21: 213-229.
- Wallner G., Amann R. Beisker W. (1993) Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-target oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14:136-143.

III. Vie terrestre et Symbiose

Le sol est un milieu complexe constitué de plusieurs compartiments (gazeux, liquide, solide, organique et organismes vivants) qui interagissent entre eux de manière dynamique. L'activité biologique dans le sol est due à la fois, à des micro-organismes, aux racines des plantes et aux animaux telluriques. En particulier, les micro-organismes ont un rôle considérable dans la formation du sol et de son fonctionnement, notamment à l'égard du développement et du maintien d'une importante biodiversité du couvert végétal. On estime qu'un hectare de sol arable doit contenir au moins 10 tonnes de bactéries et champignons, dont la grande majorité des espèces nous est inconnue. Certains de ces micro-organismes sont des pathogènes de plantes mais la plupart interviennent dans la "boucle microbienne " des grands cycles biogéochimiques (carbone, azote, phosphore, soufre ...) et sont favorables à la croissance des végétaux.

Les végétaux hébergent habituellement des microorganismes très souvent favorables à leur croissance et à leur santé, tels que les bactéries (*Rhizobium*) qui améliorent la nutrition azotée des plantes ou certains champignons qui favorisent la germination des graines d'orchidées. D'autres champignons telluriques se sont associés aux racines des plantes dès leur apparition en milieu terrestre et ont ensuite co-évolué avec elles: cette association, appelée mycorhize, constitue aujourd'hui la symbiose racinaire la plus répandue du monde végétal (95% des espèces).

LES MICROORGANISMES SOURCE DE NOUVEAUX PRODUITS PHYTOSANITAIRES

Roland Beffa

L'agriculture durable n'est pas juste un concept à la mode, né des préoccupations écologistes modernes et des discussions sur la croissance de la population mondiale. Un des plus vieux traités relatifs aux pratiques agricoles, écrit un siècle avant J.-C. par Marcus Terentius Varro définit l'agriculture comme "la science nous enseignant quelle culture doit être plantée en fonction des différents sols, et quelles opérations doivent être réalisées pour obtenir la meilleure production, en quantité et qualité, à perpétuité ".

La population mondiale est en constante augmentation passant de 1 milliard en 1850 à 6 milliards en 1999, pour atteindre, selon des estimations moyennes, environ 8 à 9 milliards en 2025. Du fait de cette croissance numérique, mais également des efforts qui devront être réalisés pour améliorer les bases alimentaires dans de nombreuses régions du globe, il sera nécessaire de doubler la production agricole. Dans le même temps, il faudra protéger les ressources en eau et les surfaces utiles

pour l'agriculture ne pourront augmenter, en particulier pour garder les étendues de forêts nécessaires au maintien des équilibres écologiques de la planète. Un des grands défis sera donc d'obtenir de meilleurs rendements, de diminuer les pertes lors de la culture et du stockage des produits, tout en augmentant la sécurité pour l'environnement et l'alimentation. Pour y parvenir, outre l'amélioration des pratiques agricoles (e.g. développement de l'agriculture de précision), le contrôle des interactions entre la plante et les microorganismes est un élément clé. Ces derniers comme les champignons mycorhiziens peuvent avoir un effet positif significatif sur le rendement des cultures, mais les microorganismes sont malheureusement également la source de nombreuses maladies causant des pertes considérables. Aujourd'hui, même en utilisant des produits phytosanitaires des pertes très importantes sont encore observées, aussi bien pendant la croissance et la maturation des cultures que pendant le stockage des récoltes (pertes évaluées à plus de 10%). Dans les cas où ces produits sont moins ou pas utilisés, de 50% à 80% des récoltes peuvent être anéanties suite à l'apparition de maladies causées par des champignons, des bactéries ou des virus. D'autre part, la réglementation de plus en plus sévère demande d'utiliser des produits dont l'activité est de mieux en mieux ciblée sur les microorganismes phytopathogènes (i.e. de minimiser au maximum les effets secondaires) et de diminuer les doses appliquées. Dans ce contexte, la découverte de composés naturels, souvent produits par des microorganismes, constitue un domaine de recherche prometteur pour ces prochaines années.

Aujourd'hui, environ dix pour cent des produits utilisés comme pesticides sont d'origine naturelle, soit isolés directement, soit modifiés à partir de molécules de base purifiées dans des extraits de plantes, de microorganismes, voire d'animaux (Tableaux 1 et 2).

Tableau 1 :
Exemples de produits naturels utilisés comme pesticides.

Pesticides	Composés actifs	Sources
Insecticides	Abamectine	<i>Streptomyces avermitilis</i>
	Milbemectine	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> <i>spp. Aureolacvimosus</i>
	Spinosad	<i>Saccharopolyspora spinosa</i>
Herbicides	Bt-toxines	<i>Bacillus thuringiensis</i>
	Bilanafos	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>
Fongicides	Blasticidine-S	<i>Streptomyces griseochromogenes</i>
	Kasugamycine	<i>Streptomyces kasugaensis</i>
	Validomycin	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> <i>spp. limoneus</i>
	Polyoxines	<i>Streptomyces cacaoi</i> spp. <i>asoensis</i>

Tableau 2 :
Exemples de produits naturels modifiés utilisés comme pesticides.

Pesticides	Composés isolés / sources	Composés modifiés actifs
Insecticides	Pyrethrines / <i>Chrysanthemum</i>	Pyrethroïdes (33)*
Herbicides	Bilanafos / <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Glufosinate (1)
Fongicides	Strobilurines / <i>Strobiluria tenacellus</i>	Methoxyacrylates (4)
	Pyrrrolenitrine / <i>Pseudomonas pyrrocinia</i>	Fenpiclonile, Fludioxonile (2)

Le fait de ne pouvoir cultiver *in vitro* que 1 - 5% des microorganismes limite fortement notre capacité à découvrir de nouveaux composés naturels. Malgré cela environ 40000 molécules d'origine naturelle sont utilisées aujourd'hui dans différents domaines d'activité dont la protection des cultures. Le développement de nouveaux outils de biologie moléculaire, de la robotisation des méthodes de culture, de repiquage des microorganismes et de "screening" ouvrent de nouvelles possibilités (Figures 1 et 2). En particulier le fait de pouvoir extraire de grands fragments d'ADN de microorganismes vivant dans des biotopes présentant des caractéristiques particulières (chaleur, salinité, composition du sol, etc.) et de pouvoir exprimer leurs gènes dans des microorganismes cultivés en laboratoire (amélioration des technologies de transformation) ouvrent de nouveaux champs de recherche des plus prometteurs. De plus, les technologies permettant de modifier avec un haut débit les différents ADN, on peut parler de biologie combinatoire, augmente encore les possibilités d'accroître la diversité des composés synthétisés par les microorganismes.

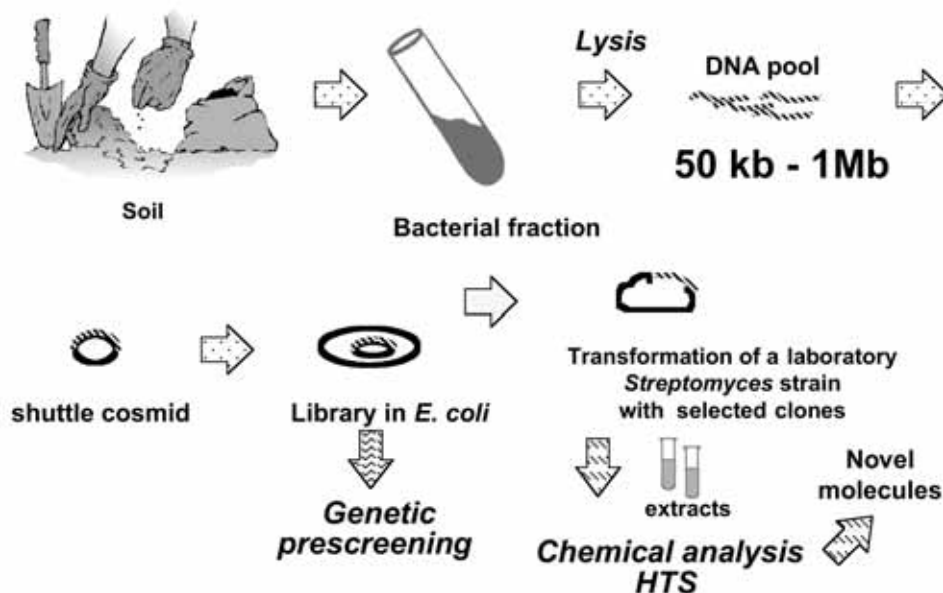


Figure 1 :
Small molecules recombinant libraries

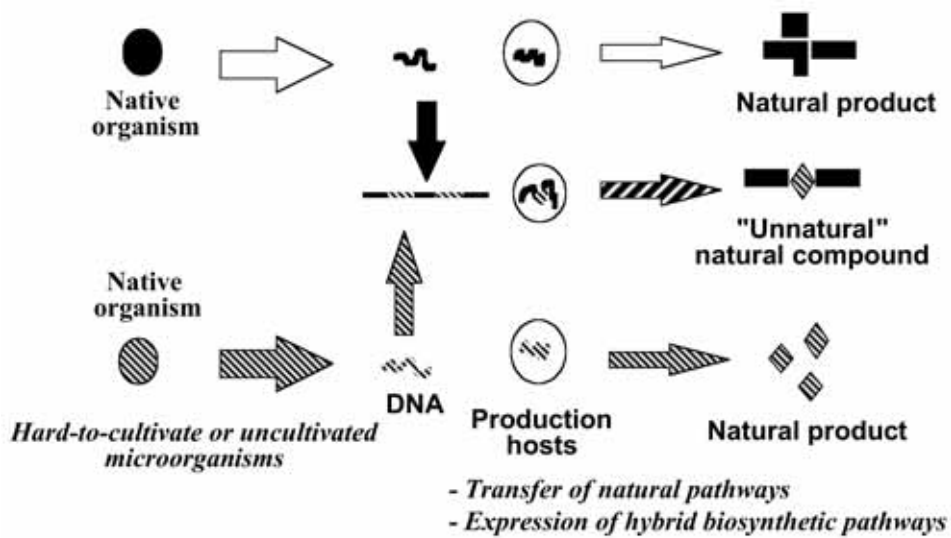


Figure 2 :
Combinatorial Biology

Bibliographie

Industrial Pharmaceutical Biotechnology. Klefenz, H. 2001. Lavoisier éd. 350 pp.

LES BASES MOLECULAIRES DES SYMBIOSES FIXATRICES D'AZOTE A LARGE SPECTRE D'HOTE

Xavier Perret et William John Broughton

De nombreuses bactéries (procaryotes) ont la capacité d'envahir (infecter) des organismes supérieures (eucaryotes) comme les animaux ou les plantes. L'issue de ces interactions varie suivant le couple hôte-microorganisme considéré. Dans le cas de bactéries pathogènes, les microorganismes infectieux se développent au dépens des tissus de l'hôte et cet envahissement aboutit souvent à une maladie typique (parasitisme). En revanche, dans le cas d'interactions symbiotiques les bactéries s'installent pendant de plus ou moins longues périodes dans les tissus ou même à l'intérieur des cellules de l'hôte, et ceci pour le bénéfice des deux partenaires. Symbioses ou parasitismes sont généralement des interactions très spécifiques, amenant à définir le "spectre d'hôte" comme l'ensemble des organismes pouvant être infectés par une bactérie donnée. Remarquablement, les agents infectieux, qu'ils soient pathogènes ou symbiotiques, échangent avec leur hôte de nombreux signaux chimiques. C'est le type de molécules transmises au partenaire mais aussi la séquence avec laquelle ces signaux seront échangés, qui déterminera si les procaryotes seront capables d'abaisser ou d'éviter les barrières de défense de l'hôte et ainsi d'envahir ses tissus.

Parmi les bactéries du sol, certaines peuvent être extrêmement nuisibles comme par exemple *Ralstonia solanacearum* (anciennement *Pseudomonas solanacearum*) qui provoque le flétrissement bactérien sur des plantes cultivées aussi importantes que la pomme de terre, le tabac ou la tomate. D'autres sont au contraire très bénéfiques, comme par exemple les souches de *Rhizobium* capables de s'associer symbiotiquement avec des plantes de la famille des légumineuses, dont plusieurs sont d'importance agronomique (cacahuète, haricot, luzerne, pois, pois chiche, soja). Dans ces symbioses, les rhizobia qui infectent les racines des plantes hôtes (processus de nodulation) induisent sur celles-ci la formation de nodosités à l'intérieur desquelles les bactéries pourront fixer l'azote atmosphérique. On parle alors de fixation symbiotique de l'azote et les plantes nodulées pourront ainsi prospérer sur des sols pauvres, même en l'absence d'engrais azotés. Contrairement à des souches comme (*Sino*)*Rhizobium meliloti* capables d'interagir avec quelques légumineuses des zones tempérées, *Rhizobium* sp. NGR234 possède un spectre d'hôte particulièrement étendu. NGR234 est non seulement capable de noduler plus de 112 genres de légumineuses, mais ce microsymbiote forme aussi des nodosités sur *Parasponia andersonii*, une plante non-légumineuse.

Le processus de nodulation, qui conduit les rhizobia du voisinage immédiat des racines des plantes hôtes jusqu'à l'intérieur de cellules des nodosités, comprend plusieurs étapes successives: (i) l'attachement des bactéries aux poils absorbants, (ii) la courbure spécifique du poil en "crosse de berger", (iii) la pénétration des rhizobia dans le poil absorbant et la formation d'un filament d'infection (FI), (iv) la progression du FI en direction du cortex racinaire, (v) la ramification du FI pour atteindre un maximum de cellules hôtes du nodule nouvellement formé, (vi) depuis l'extrémité du FI, la libération des rhizobia à l'intérieur du cytoplasme des cellules végétales hôtes, et finalement (vii) la différenciation des microsymbiotes en bactéroïdes fixateurs d'azote. Probablement

afin de restreindre l'infection aux seules bactéries les mieux adaptées à chacune des plantes hôtes, ces dernières sont capables de bloquer la progression des rhizobia à chacune des différentes étapes détaillées ci-dessus. C'est grâce à un échange séquentiel de différents signaux moléculaires par les deux partenaires symbiotiques que le processus infectieux est contrôlé.

Ce véritable dialogue moléculaire commence par la production au niveau des racines des plantes hôtes de nombreux composés phénoliques. Parmi ceux-ci, des flavonoides induisent chez les rhizobia présents dans la rhizosphère l'expression d'une série de gènes symbiotiques impliqués dans les étapes précoces de la nodulation. En réponse à ce premier stimulus, beaucoup des protéines Nod, Nol, et Noe ainsi exprimées sont impliquées dans la synthèse et la sécrétion de molécules particulièrement potentes: les facteurs de la nodulation (facteurs Nod). A leur tour, ces facteurs Nod vont provoquer chez les plantes hôtes la courbure en crosse de berger des poils absorbants, ainsi que la formation dans le cortex racinaire de nouveaux méristèmes à l'origine des nodosités. Actifs à des concentrations aussi faibles que 10^{-9} M même en l'absence de rhizobia, les facteurs Nod purifiés agissent donc comme de véritables hormones végétales capables de provoquer des changements morphologiques importants mais aussi d'induire la division de cellules corticales. Des bactéries mutantes incapables de synthétiser les facteurs Nod ne pouvant plus noduler, ces molécules sont donc essentielles à la pénétration des rhizobia dans les poils absorbants.

L'utilisation par les deux symbiotes de "codes" spécifiques, permet déjà dès les étapes précoces de la nodulation d'opérer une sélection stricte parmi les nombreux microorganismes qui se développent dans la rhizosphère des plantes hôtes. Ainsi l'expression des gènes *nod* des rhizobia est généralement sous le contrôle des protéines NodD, une famille de protéines régulatrices de la transcription du type LysR. Si NodD reconnaît les boîtes *nod* (éléments régulateurs conservés de 49 pb présents en amont des opérons *nod*, *nol* et *noe*) même en l'absence de flavonoides, seule la présence de flavonoides compatibles active l'expression spécifique des gènes *nod*. Certaines protéines NodD, comme par exemple NodD1 de NGR234 reconnaissent ainsi un large éventail de composés inducteurs différents, tandis que d'autres NodD ne sont activées que par un ou peu de composé(s) phénoliques. A leur tour, les facteurs Nod synthétisés par une souche de *Rhizobium* n'induisent une réponse que chez certaines plantes hôtes. Constitués d'un squelette de 3 à 6 molécules de N-acétyl-glucosamine, les facteurs Nod portent à leur extrémité non-réductrice une chaîne d'acide gras. La structure de cette chaîne (degré d'insaturation, position des doubles liaisons, etc.), ainsi que les diverses substitutions des extrémités réductrice et non-réductrice sont caractéristiques de chaque espèce de *Rhizobium*. Dans quelques cas, il a été démontré que la disparition (ou l'addition) d'un groupement de substitution pouvait notablement influencer le spectre d'hôte de la bactérie. Les protéines NodD et leur spécificité pour certains composés phénoliques ainsi que les facteurs Nod émis par les rhizobia en réponse aux flavonoides de la plante hôte, représentent donc les premiers composants moléculaires permettant d'expliquer le phénomène de spécificité d'hôte.

Pendant le développement du filament d'infection, les composants de la paroi des microsymbiotes semblent jouer un rôle particulièrement important dans la progression des rhizobia infectieux en direction des cellules du cortex racinaire. Par exemple, un mutant de *R. meliloti* 1021 incapable de synthétiser les exopolysaccharides (Exo) de

type succinoglycan (EPS I) forme des nodosités vides de tout bactéroïde sur son hôte *Medicago sativa*. Si la plupart des mutants Exo- continuent de provoquer une courbure normale des poils absorbants, des travaux de microscopie ont montré qu'en revanche les filaments d'infection formés par ces mutants avortent plus ou moins rapidement. Chez la souche à large spectre d'hôte NGR234, des résultats similaires sont obtenus en inoculant *Leucaena leucocephala*, une plante qui forme des nodosités indéterminées possédant un méristème nodulaire persistant. Toutefois des mutants Exo- de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* et *R. fredii* continuent de fixer symbiotiquement l'azote en association avec leurs plantes hôtes respectives *Phaseolus vulgaris* et *Glycine max*, qui produisent des nodules de type déterminé. Par ailleurs, d'autres composants de surface comme les lipopolysaccharides (LPS), les polysaccharides capsulaires (CPS et KPS) et les β -glucans cycliques jouent aussi un rôle important dans plusieurs associations symbiotiques. Quel que soit leur fonction exacte, EPS, LPS, CPS et β -glucans cycliques opèrent donc comme des codes moléculaires permettant aux rhizobia invasifs de gagner, depuis le point d'infection au niveau de l'apex du poil absorbant, le cytoplasme des cellules des nodosités. Une fois encore, le type de code utilisé (ou manquant) sera une des clés permettant de déterminer la spécificité de l'interaction.

La récente mise en évidence de mécanismes de sécrétion de type III (TTSS) dans des souches aussi diverses que *Bradyrhizobium japonicum*, *Mesorhizobium loti* MAFF303099, NGR234, et *R. fredii* USDA257 continue d'intriguer nombre de chercheurs. Originellement mis en évidence chez les pathogènes des animaux et des plantes, les TTSS permettent la translocation de protéines effectrices depuis l'agent infectieux jusque dans le cytoplasme des cellules eucaryotes hôtes. Essentielles au pouvoir pathogène de microorganismes comme *Yersinia pestis* (l'agent de la peste) ou *Ralstonia solanacearum*, ces véritables "seringues moléculaires" ne sont activées qu'en présence de l'hôte. L'activation du système de sécrétion de type III de NGR234 par les flavonoïdes et sa régulation même indirecte par le régulateur symbiotique principal NodD1, suggère son implication dans la relation symbiotique avec les plantes hôtes. Effectivement, l'inactivation par mutagenèse dirigée du TTSS de NGR234 et de plusieurs protéines sécrétées par ce système confirme l'importance de ces facteurs dans la nodulation de plantes telles que *Pachyrhizus tuberosus* et *Tephrosia vogelii*. Au même titre que les protéines NodD, les facteurs Nod, les composés de surface EPS, LPS, CPS et β -glucans cycliques, les protéines sécrétées par le TTSS de NGR234 contribuent donc aussi au dialogue moléculaire échangé avec les plantes hôtes potentielles et à déterminer la spécificité de la relation symbiotique.

Lectures recommandées

Perret X., Staehelin C., Broughton W.J. (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:180-201.

Viprey V., Perret X., Broughton W.J. (2000) Host-plant invasion by rhizobia. *Subcell. Biochem.* 33:437-456.

Broughton W.J., Jabbouri S., Perret X. (2001) Keys to symbiotic harmony. *J. Bacteriol.* 182:5641-5652.

Marie C., Broughton W.J., Deakin W.J. (2001) Rhizobium type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:336-342.

LES MYCORHIZES, LE SOL ET LE DEVELOPPEMENT VEGETAL

Silvio Gianinazzi, Diederik van Tuinen et Vivienne Gianinazzi-Pearson

Dans les sols, le site privilégié de multiplication des micro-organismes est la rhizosphère (zone à l'interface de la racine et du sol) très riche en nutriments exudés par les racines (sucres, acides aminés, acides gras, facteurs de croissance, ...), et qui représente au moins 20-30% du photosynthat. Uniquement pour les bactéries, on estime qu'elles sont 20 à 10000 fois plus nombreuses dans la rhizosphère que dans un sol nu. Toutefois leur importance relative varie en fonction du couvert végétal et de l'âge des plantes ; d'où les difficultés pour une gestion de ces ressources biologiques au profit de l'environnement et de l'homme. Certains de ces micro-organismes vivent en symbiose avec les racines et jouent un rôle très important dans le développement des plantes (Tableau 1). Parmi ceux-ci il y a les champignons mycorrhizogènes, dont la contribution à l'adaptation des végétaux aux écosystèmes terrestres au cours de l'évolution est amplement reconnue (Smith & Read, 1997). Ces champignons appartiennent aussi bien aux Basidiomycètes qu'aux Ascomycètes et aux Zygomycètes et ils forment des symbioses mycorrhiziennes avec les racines d'environ 95% de plantes terrestres. Les différents types de mycorhizes qui existent se distinguent à la fois par les groupes taxonomiques des partenaires symbiotiques impliqués (plantes et champignons) et par les structures typiques formées dans la symbiose (Tableau 2)

Tableau 1 :
Les symbioses racinaires

TYPE	TAXON MICROBIEN	TAXON VEGETAL	ASSOCIATION	FONCTION
MYCORHIZES	Champignons	Plantes terrestres (95% de familles)	Mycélium intra et/ou intercellulaire	Nutrition P. N. Bioprotection
BACTERIORHIZES	Bactéries (ex. <i>Sinorhizobium</i>)	Légumineuses principalement (~1% de plantes)	Bactéroïdes intracellulaires	Fixation d'azote
ACTINORHIZES	Bactéries (ex. <i>Frankia</i>)	<i>Aulnc.</i> , <i>Casuarina</i> , <i>Myrica</i> , (~1% de plantes)	'Hyphes' et vésicules intracellulaires	Fixation d'azote
CYANORHIZES	Cyanobactéries (ex. <i>Nostoc</i>)	Cycadales (~1% de plantes)	Bactéries intercellulaires	Fixation d'azote

Tableau 2 :
Les différents types de mycorhizes, les partenaires impliqués et leur mode de reconnaissance

Types de mycorhize	Plantes impliquées	Partenaires fongiques	Reconnaissance	Structure
<u>ECTOMYCORHIZES</u>	Espèces ligneuses exclusivement ; surtout des forêts en zones tempérées (Pinacées, Betulacées, Fagacées, Ulmacées,...)	Quelques milliers d'espèce appartenant aux BASIDIOMYCETES (<i>Boletus, Laccaria</i> ,...) ASCOMYCETES (<i>Tuber, Sarcosoma</i> ,...) ZYGOMYCETES (<i>Endogone</i>)	Morphologie caractéristique des racines	Manchon, réseau d'Hartig
<u>ENDOMYCORHIZES</u> <u>Orchidoides</u>	Orchidacées (<i>Goodyera, Vanilla, Dactylorhiza</i> , ...)	BASIDIOMYCETES (<i>Ceratobasidium, Armillaria, Tulashella, Thanatephorus</i> , ...)	Coloration spécifique des racines	Peloton fongique intracellulaire
<u>Ericoides</u>	Ericacées, Empetracées, Epacridacées (<i>Calluna, Vaccinium, Gaultheria, Rhododendron</i> , ...)	ASCOMYCETES (<i>Hymenoscyphus ericae</i>)	Coloration spécifique des racines	Peloton fongique intracellulaire
<u>À vésicules et arbuscules</u>	Environ 80% des espèces végétales, Pteridophytes, Gymnospermes et Angiospermes	ZYGOMYCETES (<i>Glomus, Gigaspora, Acaulospora, Sclerocystis</i> , ...) (non cultivés <i>in vitro</i>)	Coloration spécifique des racines	Vésicules et arbuscules fongiques (intracellulaires)
<u>ECTENDOMYCORHIZES</u> <u>Arbutoides</u>	<i>Arbutus, Pyrola, Arctostaphylos</i>	BASIDIOMYCETES Espèces formant les ectomycorhizes (<i>Pisolithus, Laccaria, Lactarius</i> , ...)	Morphologie caractéristique des racines	Manchon, réseau d'Hartig, peloton fongique intracellulaire
<u>Monotropoides</u>	Monotropacées (<i>Monotropa, Pterospora, Sarcodes</i> , ...)	BASIDIOMYCETES Espèces formant les ectomycorhizes (<i>Stropharia, Rhizopogon, Russula</i> , ...)	Morphologie caractéristique des racines	Manchon, réseau d'Hartig, ergot fongique intracellulaire

Parmi les mycorhizes, celles à arbuscules, constituent la symbiose végétale la plus répandue dans la nature, du fait de leur ubiquité et du nombre élevé d'espèces végétales concernées. A ce jour, on dénombre environ 120 espèces de champignons capables de former ce type de mycorhizes ; ils appartiennent tous à l'ordre des Glomales et ne peuvent pas être cultivés seuls, soit en absence de la plante-hôte. Leur cycle biologique dans le sol repose entièrement sur la présence de racines vivantes de plantes-hôtes (Figure 1). Associés aux plantes, très probablement depuis leur colonisation du milieu terrestre, il y a quelques 450 millions d'années, ils ont co-évolué avec elles et, à ce jour, environ 80% des plantes supérieures peuvent former ce type de symbiose. En association avec les Glomales, un nombre important de processus physiologiques des plantes sont améliorés : nutrition minérale, résistance aux stress biotique (maladies) et abiotiques (pollution ...), enracinement et floraison. Comme la plupart des plantes cultivées forment des mycorhizes arbusculaires, les champignons impliqués constituent un outil biologique de choix dans le développement d'une gestion de l'environnement et une production végétale durable (Figure 2) (Budi et al., 1998).

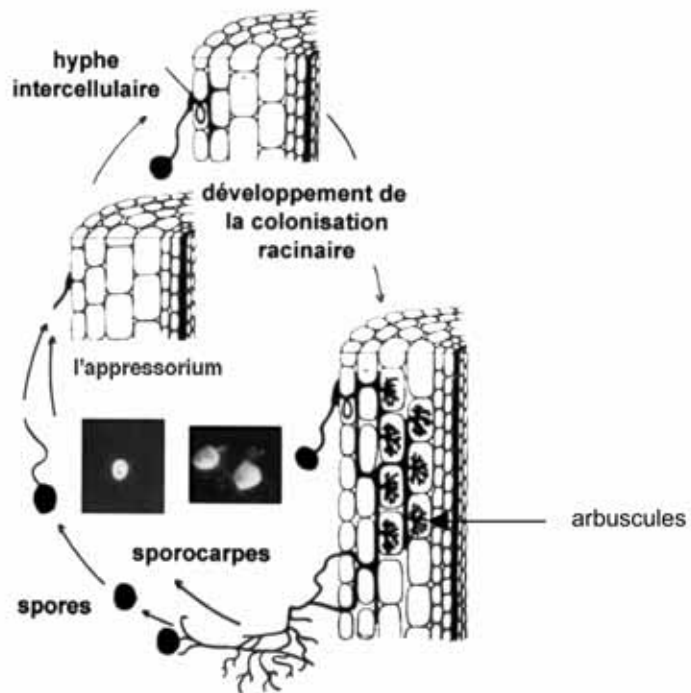


Figure 1 :
Cycle biologique des champignons mycorhizogènes à arbuscules

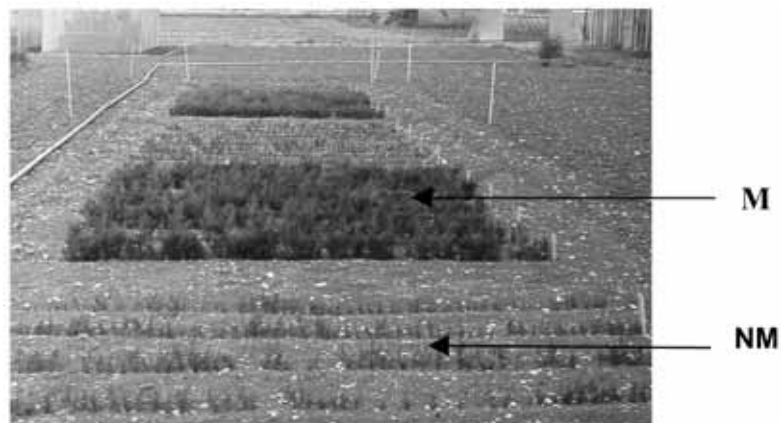


Figure 2 :
Impact de la mycorrhization (M) sur la croissance d'asperges au champ
(NM : plantes non mycorhizées)

L'utilisation optimale de ces champignons mycorrhizogènes à arbuscules et des symbioses qu'ils engendrent passe obligatoirement par une connaissance approfondie à la fois des mécanismes permettant la reconnaissance entre les deux partenaires (plante et champignon) et de leurs programmes génétiques et cellulaires respectifs régissant la formation et le fonctionnement des symbioses mycorhiziennes. Les différents processus doivent être régulés par des échanges de signaux entre les deux partenaires conduisant à des modifications dans l'expression de leurs gènes qui, à leur tour, induisent une cascade d'évènements dans les processus cellulaires des hyphes et des cellules des racines permettant la formation des mycorhizes (Figure 3). L'analyse du protéome symbiotique a confirmé que la mise en place des mycorhizes à arbuscules est accompagnée de modifications très importantes au niveau des protéines (Dumas-Gaudot *et al.*, 1998).

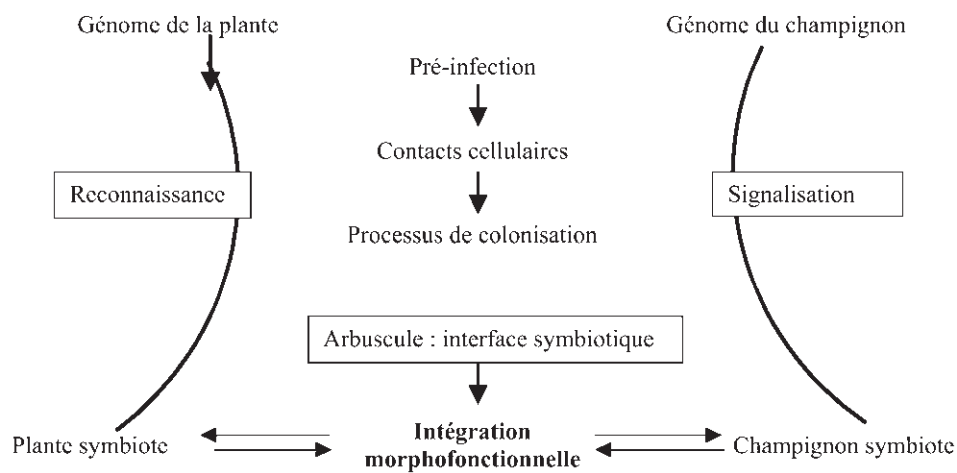


Figure 3 :
Dialogue moléculaire plante/champignon symbiotique

L'identification des gènes (et particulièrement de ceux ayant une importance agronomique) impliqués dans les interactions complexes plante/champignon dans les mycorhizes à arbuscules est donc une tâche majeure pour l'exploitation de ces systèmes symbiotiques en environnement durable. Des approches ciblées et non ciblées sont utilisées pour analyser le génome fonctionnel des mycorhizes arbusculaires en vue d'identifier les gènes de la plante et du champignon, ainsi que les protéines correspondantes, impliqués dans le processus symbiotique.

Les approches ciblées répondent à des questions pré-définies concernant l'expression génique ; elles utilisent des sondes moléculaires de gènes, ayant déjà été identifiés comme étant associés à d'autres systèmes biologiques ou à des processus métaboliques, pour suivre leur expression. Les gènes de la plante qui ont été les plus

étudiés chez les mycorhizes arbusculaires sont surtout ceux associés à d'autres interactions plante/microorganismes ou à des processus de transport trans-membranaire. Les analyses des événements moléculaires communs avec les autres interactions plante/micro-organisme ont été d'abord focalisées sur la réponse des gènes de défense à la colonisation des racines par les champignons mycorhizogènes à arbuscules, et plus tard étendues aux gènes associés aux programmes cellulaires de nodulation (Gianinazzi-Pearson, 1996 ; Gianinazzi-Pearson & Denarié, 1997 ; Journet *et al.*, 2001). L'expression de ces gènes est faible, transitoire et fréquemment localisée dans les cellules corticales contenant les arbuscules, suggérant que différentes associations plante/microorganismes utilisent des voies signalétiques communes. L'approche ciblée a aussi confirmé l'activation de gènes de la plante codant pour des fonctions membranaires comme l'H⁺-ATPase ou l'aquaporine, nécessaires pour les activités de transport dans les tissus symbiotiques (Roussel *et al.*, 1997 ; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 2000 ; Krajinski *et al.*, 2000).

Dans les approches non ciblées, il n'y a pas *d'a priori* sur les gènes qui seront identifiés ; elles visent l'identification du plus grand nombre de gènes différentiellement régulés et, en particulier, l'isolement de gènes nouveaux dont l'expression pourrait être spécifiquement nodulée dans les associations mycorhiziennes. De telles approches ont été au début basées à la fois sur l'hybridation différentielle de banques d'ADNc ou sur le tri différentiel d'ARNm de racines mycorhizées ou non (Tahiri-Alaoui & Antoniw, 1996 ; Martin-Laurent *et al.*, 1997 ; Roussel *et al.*, 2001). Bien que ces techniques aient apporté de nouvelles informations sur l'expression de gènes dans les symbioses, le nombre de gènes identifiés est resté assez limité. Toutes les approches ciblées et non ciblées mentionnées ci-dessus n'ont permis que l'identification d'environ 60 gènes de la plante et 10 gènes fongiques, dont l'expression est modulée au cours de la symbiose.

Récemment nous avons adopté deux voies alternatives pour étudier la génomique fonctionnelle des mycorhizes arbusculaires en vue d'obtenir une vue plus globale des gènes de la plante et du champignon impliqués dans ces symbioses. La première utilise la technique d'hybridation suppressive soustractive pour cloner et analyser les EST (marqueurs de séquences exprimés) correspondant aux gènes différentiellement exprimés dans les mycorhizes arbusculaires. La seconde consiste dans la comparaison, après séquençage à grande échelle, de banques de ADNc représentatives d'ESTs de racines symbiotiques et non symbiotiques. Un nombre très large d'ESTs de mycorhizes a été obtenu avec les deux méthodes. Les recherches de similitude avec les séquences répertoriées dans les bases de données montrent que la majorité d'ESTs est représentative de gènes codant principalement pour des enzymes du métabolisme primaire et secondaire, des protéines de défense ou de transport. Toutefois les deux méthodes ont permis d'identifier environ 100 gènes ayant des similitudes avec des séquences à fonctions inconnues ou ne présentant aucune similitude avec des gènes à fonction connue ; ces derniers pourraient donc être des gènes spécifiques de la mycorhization (résultats non publiés).

Afin d'avancer non seulement dans la connaissance des gènes impliqués dans la for-

mation des mycorhizes à arbuscules, mais aussi dans le fonctionnement symbiotique, l'approche protéomique est développée en parallèle (Dumas-Gaudot *et al.*, 2001). Ces travaux ont déjà conduit à identifier plusieurs dizaines de protéines différemment exprimées dans les symbioses des racines. Le séquençage par spectrométrie de masse des polypeptides d'intérêt obtenu après électrophorèse 2D et la recherche de similitudes dans les bases de données a révélé comme dans le cas des gènes, que la plupart de ces protéines sont impliquées dans des processus métaboliques connus. D'autres, par contre, ne correspondent à aucune séquence connue et pourraient bien être spécifiques de la mycorhization (Bestel-Corre *et al.*, 2001).

La confrontation des séquences d'ESTs et de protéines n'ayant pas d'analogie dans les banques de données devrait contribuer à l'identification des gènes et de leur produits spécifiques des mycorhizes arbusculaires. Des anticorps et des sondes nucléiques pourraient ensuite être synthétisés pour des études spatio-temporelles du programme cellulaire et tissulaire conduisant à la formation et au fonctionnement symbiotique. Toutefois la promotion de l'utilisation des champignons mycorhizogènes à arbuscules en développement (agriculture) durable nécessite aussi de forger des outils adaptés à l'identification et à la gestion de ces symbiotes obligatoires *in situ*, c'est-à-dire aussi bien dans le sol qu'en association symbiotique avec les racines des plantes. Des amorces taxon-spécifiques basés sur le polymorphisme nucléaire observé au niveau des domaines variables D1 et D2 de la grande sous-unité ribosomique des Glomales ont pu être élaborés (van Tuinen *et al.*, 1998). Ainsi la présence d'un champignon mycorhizogène donné peut être révélé par PCR en gigogne à partir d'ADN extrait du sol et/ou des racines (Figure 4) et leur importance relative estimée (Jacquot *et al.*, 2000). L'obtention de macro/micro-arrays pour détecter la présence de champignons mycorhizogènes dans la racine et le sol peut maintenant être envisagé.

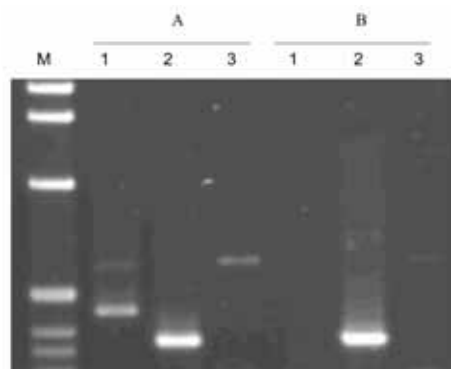


Figure 4 :
Détection par PCR en gigogne de 4 champignons mycorhizogènes à arbuscule (1, *Scutellospora castanea* et *Glomus intraradices* ; 2, *G. mosseae* ; 3, *Gigaspora rosea*) dans 2 fragments (A et B) de racines d'oignon prélevés au hasard. M, marqueurs moléculaires.

En conclusion, les recherches conduites, sur les mycorhizes, après avoir montré le rôle central que ces symbioses jouent dans le développement et la santé des plantes, se sont orientées vers l'utilisation des outils modernes de génomique et de protéomique pour analyser au niveau moléculaire les fonctions symbiotiques, définir les conditions optimales de leurs utilisations et ainsi contribuer à la promotion d'une gestion durable des écosystèmes naturels et agraires.

Bibliographie

- Bestel-Corre G., Dumas-Gaudot E., Poinso V., Dieu M., Dierick J.F., van Tuinen D., Remacle J., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (2001) Identification of symbiosis-related proteins from *M. truncatula* Gaertn. by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis* (sous presse).
- Budi S., Caussanel J., Trouvelot A., Gianinazzi S. (1998) The biotechnology of mycorrhizas. In : *Microbial interactions in agriculture and forestry* Subba Rao N.S., Dommergues Y.R. (eds), Science Publishers, Inc., New Dehli, Calcutta, Vol., 1, 149-162.
- Dumas-Gaudot E., Samra A., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (1998) Untargeted approaches to the analysis of gene expression in arbuscular mycorrhiza : analyses of polypeptides (*in vivo* and *in vitro*) and of translated mRNA products. In : "Mycorrhiza Manual", Varma A. (ed), Springer-Verlag, Berlin, 311-326.
- Dumas-Gaudot E., Bestel-Corre G., Gianinazzi S. (2001) Proteomics, a powerful approach towards understanding functional plant root interactions with arbuscular mycorrhizal fungi. In : *Recent developments in plant biology* Pandalai S. (ed), Research Signpost. (sous presse).
- Gianinazzi-Pearson V. (1996) Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi : getting to the roots of the symbiosis. *The Plant Cell* 8 : 1871-1883.
- Gianinazzi-Pearson V., Denarié J. (1997) Red carpet genetic programmes for root endosymbioses. *Trends in Plant Science* 10 : 371-372.
- Gianinazzi-Pearson V., Arnould C., Oufattole M., Arango M., Gianinazzi S. (2000) Differential activation of H⁺ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco. *Planta* 211 : 609-613.
- Jacquot E., van Tuinen D., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. (2000) Monitoring species of arbuscular mycorrhizal fungi *in planta* and in soil by nested PCR: application to the study of the impact of sewage sludge. *Plant and Soil* 226 : 179-188.
- Journet E.P., El-Ghachtouli N., Vernoud V., de Billy F., Pichon M., Dedieu A., Arnould C., Morandi D., Barker D.G., Gianinazzi-Pearson V. (2001) *Medicago truncatula* ENOD11 : a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14 : 737-748.
- Krajinski F., Biela A., Schubert D., Gianinazzi-Pearson V., Kaldenhoff R., Franken P. (2000) Arbuscular mycorrhiza development regulates the mRNA abundance of *Mtaqp1* encoding a mercury-insensitive aquaporin of *Medicago truncatula*. *Planta* 211 : 85-90.
- Martin-Laurent F., van Tuinen D., Dumas-Gaudot E., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S., Franken P. (1997) Differential display analysis of RNA accumulation in pea arbuscular mycorrhiza and isolation of a novel symbiosis-regulated plant gene. *Molecular*

and General Genetics : 256, 37-44.

Roussel H., Bruns S., Gianinazzi-Pearson V., Hahlbrock K., Franken P. (1997) Induction of a membrane intrinsic protein-encoding mRNA in arbuscular mycorrhiza and elicitor-stimulated cell suspension cultures of parsley. *Plant Science* 126 : 203-210.

Roussel H., van Tuinen D., Franken P., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. (2001) Signalling between arbuscular mycorrhizal fungi and plants: identification of a gene expressed during early interactions by differential RNA display analysis. *Plant and Soil* 232 : 13-19.

Smith S.E., Read D.J. (1997) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, Harcourt B. & Compagny, Publishers., 605 pages.

Tahiri-Alaoui A., Antoniw J.F. (1996) Cloning of genes associated with the colonization of tomato roots by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Agronomie* 16 : 699-707.

van Tuinen D., Jacquot E., Zhao B., Gollotte A., Gianinazzi-Pearson V. (1998) Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Molecular Ecology* 7 : 879-887.

LES LICHENS

Andrea Zocchi et Raffaele Peduzzi.

Les lichens sont des organismes "doubles", c'est-à-dire composés par deux ou plusieurs individus (champignons et algues), vivant en symbiose mutuelle stable. Les champignons lichénisés, aussi dits **mycobiontes**, appartiennent, dans 90% des cas aux *Ascomycetes*, dans 2% des cas aux *Basidiomycetes* et dans 8% des cas aux "*Fungi imperfecti*", dont le cycle reproductif sexuel est inconnu (Clauzade & Roux, 1986). Les algues, unicellulaires ou coloniales, appelées **phycobiontes** ou **photobiontes**, appartiennent aux *Chlorophytes* (*Trebuxia*, *Myrmecia*, *Pleurococcus*, *Stichiococcus*), aux *Xanthophytes* (*Trentepohlia*) ou aux Cyanobactéries (*Nostoc*, *Gloeocapsa*, *Chroococcus*, *Stygnosa*).

Quand les hyphes du champignon entrent en contact avec les parois des cellules algales il se produit une morphogénèse très spécifique qui donne au lichen son aspect typique.

Les rapports cytologiques entre le champignon et l'algue peuvent être plus ou moins étroits:

- a) les hyphes enveloppent les cellules algales, ou
- b) pénètrent leurs parois, ou bien
- c) pénètrent leurs parois et déforment leur membrane cellulaire en arrivant à proximité des chloroplastes.

C'est seulement après l'instauration d'une relation stable entre les deux organismes, que le champignon commence à produire les "substances lichéniques", très importantes non seulement pour la systématique, mais aussi pour la pharmacologie et la cosmétologie.

* Anatomie et morphologie

La systématique des lichens se base presque exclusivement sur la morphologie et sur la présence de quelques métabolites secondaires qui peuvent être mis en évidence par l'action de plusieurs réactifs chimiques.

Du point de vue anatomique, les lichens sont des organismes à thalle, c'est-à-dire sans la présence de vrais tissus. En effet, ce sont les hyphes, plus ou moins étroitement accolées, qui peuvent reproduire certaines fonctions propres des tissus. En général, on peut distinguer deux catégories fondamentales de structures de lichen :

STRUCTURE HOMOMERE

Homogène ou presque, dans toute l'épaisseur du thalle: algues et hyphes sont mélangées dans le thalle entier, même si on peut distinguer une zone supérieure et une zone inférieure, aux hyphes approchées, ayant une fonction d'épiderme.

STRUCTURE HETEROMERE

Bien plus fréquente, elle se distingue de la précédente par la différenciation de plusieurs couches superposées:

- **cortex supérieur**: constitué seulement d'hyphes très denses formant, parfois, un faux tissu épithélial. Ceci a la fonction de revêtement et de filtre passif dans les échanges avec l'extérieur;
- au-dessous du cortex supérieur on trouve la **couche algale**, formée d'un réseau d'hyphes moins dense, dont les mailles contiennent, dans une voile d'eau, les algues;
- au-dessous encore il y a la **médulle**, formée seulement d'hyphes, en général, très lâches;
- le **cortex inférieur** peut être présent ou pas; il montre des hyphes, un peu moins serrées que celles du cortex supérieur, et des modifications pour l'ancrage du thalle.

Les thalles des lichens peuvent être classés en plusieurs types morphologiques, parmi lesquels les trois premiers sont les principaux. A l'intérieur de chaque type, on peut observer des formes de transition:

- **lichen à thalle crustacé**: le thalle est étroitement attaché au substrat par la médulle, car le cortex inférieur n'existe pas. Le thalle peut être à l'intérieur du substrat (lichens endophytes, endolitiques, ou hypogés), ou à l'extérieur (lichens épiphytes, épilytiques, muscicoles, ou épigés);
- **lichen à thalle foliacé**: le thalle est formé de lobes plus ou moins plats, avec la face supérieure différente de la face inférieure qui a elle-même un cortex. Les lobes sont disposés parallèlement au substrat et, dans quelques espèces, leurs bords sont redressés. Le thalle est adhérent au substrat par des spécialisations de son cortex inférieur. Ce sont soit de fausses radicelles (**Rhizines**) jouant le seul rôle de moyen de fixation, soit une très petite surface (Crampon), le plus souvent près du centre du thalle, dit, dans ce cas, ombiliqué ;
- **lichen à thalle fruticuleux** : le thalle est constitué de lobes ou de lanières redressées, pendants ou étalés, ayant une section plate ou ronde. Il est attaché au substrat seulement par sa partie basale. Les "barbes de bois" sont des lichens fruticuleux typiques ;
- **lichen à thalle complexe** : les thalles complexes sont propres au *Cladonia* et au *Stereocaulon*. Ils sont formés de deux parties bien distinctes:
 - a) thalle primaire crustacé ou squamuleux;
 - b) thalle secondaire fruticuleux, formé d'éléments se développant plus ou moins perpendiculairement au substrat ;
- **lichen à thalle gélatineux** : chez beaucoup de lichens à cyanobactéries le thalle est noir ou noirâtre, et a une structure homomère; le plus souvent rigide et fragile à l'état sec, il gonfle et devient gélatineux sous l'action de l'eau.

La surface des lichens n'est pas régulière, mais peut montrer des structures à fonction différente qui aident la classification. Des exemples sont fournis par les **cils** (formés d'un faisceau d'hyphes), les **nodules**, **tubercules**, **fibrilles**, **papilles** et **spinules** qui favorisent les échanges gazeux et aqueux avec l'environnement en augmentant la surface du thalle

ORGANES REPRODUCTEURS

Le lichen, en qualité d'organisme double, ne se reproduit que végétativement, par des structures superficielles, dites **Isidies** et **Sorédies**.

Isidies: ce sont des excroissances du thalle de quelques dixièmes de millimètres. Toutes ont toujours les pseudo-tissus du lichen (cortex, couche algale, médulle) et un nouvel individu peut naître suite à leur fragmentation ou détachement du thalle.

Sorédies: ce sont des structures formées de l'excroissance d'hyphes médullaires par une fragmentation du cortex. Ces hyphes enveloppent quelques algues. Les sorédies ont, généralement un aspect pulvérulent ou granuleux et elles peuvent être répandues sur la surface du thalle ou accumulées en quelques points. Les agrégations de sorédies sont appelées SORALIES; celles-ci peuvent avoir les formes les plus différentes.

Sous certaines conditions écologiques le partenaire fongique peut se reproduire sexuellement, par la formation de méiospores à l'intérieur de corps fructifères.

Les principaux corps fructifères des champignons ascomycètes lichénisés sont les **Périthèces** et les **Apothécies**. La structure de ces organes est celle typique des Ascomycetes et les hyphes ascogènes se forment classiquement comme chez les champignons non-lichenisés.

* Aspects pratiques des lichens

Du point de vue pratique les lichens n'ont qu'une importance minime, même si croissante.

Dans les pays nordiques, des espèces de lichens servent de nourriture aux animaux (*Cladonia rangiferina* est une partie importante du régime alimentaire des rennes; en Islande *Cladonia stellaris* et *Cetraria islandica* sont employés comme fourrage pour les vaches). Dans le régime alimentaire humain, au contraire, les lichens ne jouent pratiquement aucun rôle même s'il y a des exemples au Japon où *Umbilicaria esculenta* est utilisée pour des salades, ou en Amérique du nord où les populations indigènes de la côte pacifique utilisent *Alectoria jumbata* (Nimis, 1986).

Beaucoup de lichens produisent des substances antibiotiques, mais peu d'entre eux sont employés dans la pharmacopée. Une tisane à base de *Cetraria islandica* est efficace comme antitussif et comme digestif. L'acide usnique, extrait de *Cladonia stellaris* et *Usnea spp.*, est la substance active d'une pommade vendue en Allemagne comme antibiotique et antifongique.

La *Letharia vulpina* produit l'acide vulpique, qui est très toxique. Il a été employé dans les pays du Nord pour les loups et les renards en le mélangeant à la viande qui était ensuite offerte comme appât aux animaux sauvages.

Les extraits de différents lichens sont employés pour la production de parfums (par

exemple la "mousse de chênes", extrait d'*Evernia prunastri*) ou pour la production de colorants (orseille, extraits de *Roccella*).

Enfin, les lichens sont d'excellents indicateurs des conditions environnementales. Par exemple, en étant les premiers organismes à coloniser les rochers, ils peuvent être utilisés pour contrôler si un glacier se rétrécit et, si c'est le cas, à quelle vitesse. De plus, les lichens peuvent fournir des données sur la composition en micronutriments de leur environnement ou encore le degré de pollution atmosphérique, car leur croissance est bien corrélée avec la teneur en oxydes de soufre et d'azote de l'air (De Slover, 1964 ; Hawksworth & Rose, 1970).

* Les lichens et le biomonitorage

La méthode la plus commune pour évaluer la pollution dans un milieu, est une analyse chimique et physique, par appareillages automatiques, des éléments qui habituellement ne devraient pas être présents. Le relevé est très précis, mais ponctuel dans le temps et dans l'espace.

Pour évaluer la situation environnementale d'une région étendue, on utilise un modèle mathématique et statistique des données, même si ces modèles donnent peu de renseignements sur les effets de la pollution sur les écosystèmes.

Cependant dans l'atmosphère, dans l'eau et dans le sol, il y a des organismes plus sensibles que d'autres aux contaminations anthropiques. Ces organismes réagissent de manière caractéristique lorsqu'ils se trouvent en conditions peu ou pas favorables. Quelques-uns, par exemple, subissent de graves dommages métaboliques et meurent, d'autres réduisent leurs activités physiologiques et reproductives, d'autres encore montrent une accumulation de polluants particuliers dans leurs tissus et organes (De Slover, 1964).

Selon ces considérations, il est évident qu'il est possible d'obtenir des renseignements plus soignés à propos des effets de la pollution, si, à côté des analyses conventionnelles de l'air, de l'eau ou du sol, on réalise aussi des tests biologiques. Ces tests sont en mesure de révéler les éventuels effets synergiques lorsque dans un milieu il y a plus d'un polluant.

Les lichens peuvent être utilisés pour évaluer la qualité de l'air selon deux principaux axes de recherche:

- **comme bioindicateurs**: c'est une approche indirecte qui corrèle l'intensité des perturbations anthropiques, avec les paramètres floristiques ou morphophysiologiques, ou
- **comme bioaccumulateurs**: en exploitant leur capacité d'absorption de substances de l'atmosphère (les particules fines se déposent dans les espaces inter-hyphaux de la médulle). C'est une approche directe, basée sur des méthodes analytiques qui déterminent les concentrations de ces substances dans le thalle lichénique (Bargagli,

1989a, b ; Herzig *et al.*, 1989 ; Nimis *et al.*, 1991).

L'utilisation des lichens comme bioindicateurs est une intégration valide des mesures directes de la pollution parce qu'elle permet un monitoring rapide de vastes zones sans l'achat d'appareillages coûteux. Cependant le biomonitorage ne pourrait pas être une alternative aux mesures directes car il ne relève pas les cas de contamination atmosphérique aigus. Par contre, les lichens, étant des organismes vivants, modulent et intègrent, par leur métabolisme les effets des polluants présents, même à basses concentrations, sur une longue période de temps: ils constituent, donc, un "appareil de mesure" efficace lors de pollutions chroniques (Turian & Desbaumes, 1975 ; Roella *et al.*, 1992 ; Zocchi *et al.*, 1997).

*** Quelques lichens fréquents dans la région de Piora**

Aspicilia cinerea : lichen épilitique crustacé, gris foncé avec bord noir. Il est typique des substrats cristallins non tamponnés.

Cetraria islandica : lichen très répandu dans toute la zone alpine, facile à reconnaître par son thalle foliacé-buissonneux, cilié.

Cladonia & *Stereocaulon spp.* : on les trouve sur le bois ou le sol, rarement sur les rochers.

Letharia vulpina : ce lichen buissonneux est très facile à reconnaître par sa couleur jaune-verte. Il se trouve seulement sur les troncs des conifères, surtout sur les mélèzes.

Peltigera spp. : un lichen foliacé très fréquent dans les bois, sur les mousses, avec des thalles atteignant parfois 30-40 cm de diamètre. Les apothécies peuvent atteindre 1 cm de diamètre et contiennent des spores brunes biseptées.

Physcia caesia : lichen épilitique foliacé aimant les substrats calcaires.

Pseudevernia furfuracea : très fréquent sur les conifères de haute altitude, ce lichen est facile à identifier par la couleur du côté inférieur du thalle, qui varie en général entre le pourpre et le noir, et l'aspect pulvérulent, gris farineux, du côté supérieur. Il contient une essence utilisée pour la production du parfum "musk".

Rhizocarpon geograficum : lichen épilitique crustacé, jaune avec bord noir. Typiques des substrats cristallins non tamponnés, il peut couvrir des surfaces importantes en formant des dessins rappelant des cartes de géographie.

Umbilicaria spp. : sur les roches non calcaires, très faciles de reconnaître à cause de leur façon de s'attacher au support par une espèce de bouton au centre du thalle foliacé. Ce lichen est souvent utilisé pour dater l'émergence des rochers d'un sol ou d'un glacier.

Xanthoria elegans : lichen jaune-orange poussant sur les roches et les murs riches en calcaire. Il a un aspect croûteux. Il contient des anthraquinones qui réagissent avec KOH en donnant une coloration rouge pourpre.

Comme les autres éléments du biosystème du Val Piora, les lichens aussi, avec leur variété en espèces et leur répartition, témoignent de la particularité de la conformation géologique de la région où un écosystème "basique et tamponné" coexiste avec un écosystème "acide".

Bibliographie

- Bargagli R. (1989a) Assessment of metal air pollution by epiphytic lichens: the incidence of crustal materials and of the possible uptake from substrate barks. *Studia Geobot.* 10 : 97-103.
- Bargagli R. (1989b) Determination of metal deposition pattern by epiphytic lichens. *J. Toxicol. Environ. Chem.* 18 : 249-256.
- Clauzade G., Roux C. (1986) *Likenoj de okcidenta Europo. Ilustrita determini libro.* S.B.C.O. Royan.
- De Slover J. (1964) Vegetaux epiphytes et pollution de l'air. *Revue Quest. Scient.* 25 : 531-561.
- Hawksworth D.L., Rose L. (1970) Qualitative scale for estimating sulfur dioxide air pollution in England and Wales using epiphytic lichens. *Nature* 227 : 145-148.
- Herzig R., Liebendorfer L., Urech H., Ammann K., Cuecheva M., Landolt W. (1989) Passive biomonitoring with lichens as a part of an integrated biological measuring system for monitoring air pollution in Switzerland. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 35 : 43-57.
- Nimis P. L. (1986) I macrolicheni d'Italia, chiavi analitiche per la determinazione. *Gortonia.* 8 : 101-220.
- Roella V., Battioli M. T., Gervasini E., Guidetti L. (1992) Lichens as bioindicators of air quality in the area surrounding lake Maggiore. *Habitat e Salute, Atti, Montecatini T.* 381-388.
- Turian G., Desbaumes P. (1975) Cartographie de quelques lichens indicateurs de la pollution atmosphérique à Genève. *Saussurea* 1975. 6 : 317-324.
- Zocchi A., Peduzzi R. (1996) Valutazione della qualità dell'aria nel Canton Ticino, attraverso l'utilizzo di licheni epifiti: confronti transfrontalieri. *Boll. Soc. Tic. Sci. Natur. (Lugano)*, 1996, 84(1): 25-40.
- Zocchi, A., et al., (1997) Air quality bioassessment by epiphytic lichens, in some Northern Italy and Southern Switzerland areas. *Lagascalia* 19(1-2) : 505-512.

IV. Pathogénicité et Symbiose

Certaines associations symbiotiques peuvent présenter des implications pathogènes pour l'homme. Tel est le cas dans la légionellose, maladie dont l'agent bactérien *Legionella* vit en association avec des protozoaires dans le milieu aquatique. Cet état constitue une phase d'adaptation symbiotique bactérie/protozoaire, phase préalable à l'état infectieux basé sur la symbiose bactéries/macrophages dans l'organisme humain.

Cet exemple met en évidence l'action de l'homme sur la création de nouvelles niches écologiques (lieux humides et chauds) et sur la capacité d'adaptation d'une population bactérienne : en effet on a dû attendre l'ère de la climatisation pour que la *Legionella* puisse exprimer son pouvoir pathogène.

Les différents nouveaux usages et destinations de l'eau ont certainement influencé les interactions microbiennes dans le milieu hydrique et stimulé une biodiversité prouvée par un grand nombre d'études taxonomiques : actuellement 44 espèces du genre *Legionella* ont été décrites, dont 17 ont une implication pathogène pour l'homme.

BIOLOGIE ET SYMBIOSE DE *LEGIONELLA*

Colette Harf-Monteil et Henri Monteil

Les *Legionella*, agents de pneumopathies graves, étaient inconnus jusqu'en 1977, en raison de leur écologie unique dans le milieu naturel, où elles vivent en symbiose avec des protozoaires au sein des biofilms (Rowbotham, 1980).

Actuellement, plus de 40 espèces et plus de 60 sérogroupes sont décrits dans le genre *Legionella* dont plus de 15 sérogroupes dans l'espèce *L.pneumophila*. Le sérotype 1 est le principal responsable des cas de légionelloses ; son principal facteur de virulence est la multiplication intracellulaire.

*** Habitat**

En milieu naturel les habitats des *Legionella* sont hydriques et telluriques principalement. Les *Legionella* y sont vraisemblablement présentes depuis longtemps, mais la main de l'homme a élargi leur environnement naturel, en créant des installations hydriques que les *Legionella* contaminent. Ainsi les *Legionella* représentent 48% de la flore bactérienne dans les biofilms des réseaux d'adduction d'eau potable. De plus les progrès technologiques récents ont apporté des moyens d'amplification et de transmission d'aérosols à des populations croissantes d'immunodéprimés.

* Symbiose *Legionella* - protozoaires

La présence ubiquiste des *Legionella* dans les eaux environnementales oligotrophes contraste avec les difficultés de leur isolement au laboratoire : culture lente, concurrence par d'autres bactéries de l'environnement exigeant des conditions rigoureuses de pH, la présence de cystéine et de CO₂.

Les *Legionella* sont souvent viables mais non cultivables sur milieux solides. Ce paradoxe peut être expliqué par leur vie intracellulaire dans des protozoaires, amibes libres, mycétozoaires et ciliés, présents dans les mêmes niches écologiques que les *Legionella* au sein des biofilms, et qui servent à la fois de réservoir, de vecteurs et de protection aux *Legionella* (Harf & Monteil, 1988 ; Field, 1991).

En effet les amibes libres en particulier présentent des kystes très résistants aux conditions extérieures défavorables et aux biocides et ont été comparées au cheval de Troie pour leur rôle de vecteur de *Legionella*.

Certaines espèces de *Legionella* ne sont détectées que par leur association avec des amibes. Ainsi ont été décrits les LLAP (*Legionella* like amoebal particles) d'abord considérés comme des endosymbiotes, puis identifiés comme de nouvelles espèces de *Legionella*. De plus, la vie intra-amibienne des *Legionella* leur permettrait de s'adapter à la vie intracellulaire chez les eucaryotes (Abu Kwaik *et al.*, 1998 ; Cirillo *at al.*, 1998).

Les travaux de notre équipe ont montré la croissance des *L.pneumophila* au sein des amibes, mais également comment la flore commensale peut jouer un rôle favorisant ou inhibiteur sur leur croissance (Harf & Monteil, 1988 ; Hagneré & Harf, 1993 ; Harf *et al.*, 1997). Nous avons décrit la persistance et la multiplication intra-amibienne, ainsi que la détection par amplification génique de *L.pneumophila* à partir d'amibes isolées d'eaux et de sédiments.

MECANISMES D'ENDOCYTOSE

Nous avons précisé certains mécanismes d'endocytose de *L.pneumophila* par des amibes par microscopie électronique et par cytométrie en flux. Il s'agit d'une internalisation rapide (<5 minutes) par phagocytose sans intervention du cytosquelette, dont les ligands sont peu connus. Des pili de type IV de *L.pneumophila* seraient impliqués dans l'adhésion. L'endocytose de *L.pneumophila* par des amibes (*Hartmannella vermiformis*) est inhibée par les sucres monovalents, Galactose et N-acétyl-galactosamine.

Par contre, la phagocytose par les macrophages est affectée par des inhibiteurs du cytosquelette (colchicine et cytochalasine). Les *L.pneumophila* adhèrent par liaison de MOMP (major outer membrane protein) à des récepteurs du complément ou au fragment C₃ du complément. Une phagocytose assymétrique (coiling phagocytosis) est provoquée par l'internalisation de *L.pneumophila* préalablement cultivées dans des amibes.

VIE INTRACELLULAIRE

Macrophages et amibes, au cours de la phagocytose, ont en commun des caractères tels que la production de radicaux oxygénés et la fusion du phagosome avec des lysosomes avec pour résultat le plus souvent la digestion des microorganismes internalisés. Dans le cas de l'internalisation de *L.pneumophila* (mais non pour d'autres espèces de *Legionella*) il y a blocage de la fusion phagolysosome chez les amibes et les macrophages. Le phagosome s'entoure de reticulum endoplasmique rugueux, et un pH neutre est maintenu au sein du phagosome. La cytotoxicité est liée à la formation de pores à laquelle s'ajoute l'apoptose pour les macrophages mais non pour les amibes.

Si on compare les *L.pneumophila* cultivées dans des amibes à celles cultivées sur milieu solide BCYE α , leur taille est inférieure, leur mobilité supérieure ; leurs propriétés de surface et leurs mécanismes d'entrée sont modifiés. De plus, leur virulence est initiée par le passage intra-amibien et elles y sont préservées des biocides et des antibiotiques.

En conclusion, les interactions amibes-*Legionella* sont un modèle de symbiose procaryote-eucaryote. Les amibes ont un rôle dans la dispersion de *L.pneumophila* mais aussi dans leur adaptation à la vie intracellulaire, principal facteur de virulence de ces bactéries responsables de pneumopathies graves.

Bibliographie

- Abu Kwaik Y., Venkataraman C., Harb O., Gao L. (1998) Signal transduction in the protozoan host *Hartmannella vermiformis* upon attachment and invasion by *Legionella micdadei*. Appl. Env. Microbiol. 64 : 3127-3133.
- Cirillo J.D., Cirillo S.L.G., Yan L., Bermudez L.E., Falkow S., Tompkins L.S. (1999) Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. Infect. Imm. 67 : 4427-4434.
- Fields B.S. (1991) The role of amoebae in Legionellosis. Clin. Microbiol. Newslett. 13 : 92-93.
- Harf C., Monteil H. (1988) Interactions between free-living amoebae and *Legionella* in the environment. Water Sci. Technol. 20 : 235-239.
- Hagneré C., Harf C. (1993) Symbiotic interactions between free-living amoeba and harboured mercury-resistant bacteria. Eur. J. Protistol. 29 : 155-159.
- Harf, C., Goffinet S., Meunier O., Monteil H., Colin D.A. (1997) Flow cytometric determination of endocytosis of viable labelled *Legionella pneumophila* by *Acanthamoeba palestinensis*. Cytometry 27 : 269-274.
- Rowbotham T.J. (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. J. Clin. Pathol. 33 : 1179-1183.

DETECTION DE *LEGIONELLA* DANS DES ECHANTILLONS CLINIQUES ET ENVIRONNEMENTAUX

Valeria Gaia et Raffaele Peduzzi

Une série de causes qui portent à l'infection de l'homme a été proposée par Fraser *et al.*(1984) dans le but d'étudier les sources et les voies de transmission de la Légionellose. Ce schéma, repris par Breiman (1993) préconise que pour contracter une infection à *Legionella* il faut que les six conditions suivantes soient remplies: présence d'un réservoir environnemental contaminé par *Legionella*, facteurs d'amplifications qui permettent à la *Legionella* de se multiplier et de rejoindre de hautes concentrations et un mécanisme de dissémination dans cet environnement et de transmission à l'homme. En outre, il est nécessaire que la souche soit virulente, qu'elle soit inoculée dans une partie de l'organisme hôte dans laquelle elle soit capable de causer l'infection et enfin que l'hôte soit susceptible à l'infection.

*** Réservoir environnemental**

Les membres de la famille des *Legionellaceae* sont des bactéries ubiquitaires de l'environnement naturel hydrique et des sols. Même si une épidémie récente en Australie a pu être reliée avec du terreau de jardin (Steele, 1993), l'eau semble être le réservoir plus important pour les *Legionella*. On les retrouve dans les lacs, les rivières, les étangs et les eaux thermales.

Les *Legionella* sont présentes dans la nature dans des eaux généralement tièdes avec un pH neutre ou légèrement acide. Elles se multiplient entre 20 et 43°C mais elle survivent à des conditions extrêmes: on les retrouve dans des eaux avec des températures entre 0°C et 63°C et des valeurs de pH entre 2.5 et 8.5. Leur taux de survie diminue lorsqu'on passe la barre des 50°C et au dessus de 60°C elles meurent rapidement (Yu, 1990).

*** Amplification de *Legionella***

La concentration des *Legionella* dans l'eau est strictement liée à la température. En général dans l'environnement naturel hydrique on retrouve des faibles concentrations de ces germes (Grothuis *et al.*, 1985).

Durant ces derniers vingt ans, grâce au développement des techniques sanitaires, les conditions générales de vie ont été améliorées, et on a pu profiter de plusieurs commodités et confort. Dans les habitations, les réseaux de l'eau potable deviennent de plus en plus complexes. L'eau est en outre employée pour améliorer notre style de vie: les conditionneurs à évaporation, les tours de refroidissements sans oublier les

stations de cure thermale, les " whirlpools " et les fontaines ornementales, utilisent de l'eau parfois en circuit clos. Dans ce nouveau compartiment hydrique créé par l'homme, la *Legionella*, protégée des conditions atmosphériques hostiles et aidée par des températures favorables à sa croissance, semble avoir trouvé une nouvelle niche écologique où elle peut, grâce à son pouvoir de résister à de hautes températures, se développer librement et atteindre de hautes concentrations, à l'abri des conditions environnementales et des compétitions avec d'autres micro-organismes plus invasifs. Ces systèmes jouent un rôle important dans la prolifération et la dissémination de *Legionella* dans l'environnement et sont de grande importance pour comprendre l'épidémiologie de la maladie du légionnaire.

Les *Legionella* peuvent survivre entre 3 et 12 mois dans l'eau potable (non stérile): il semble donc y avoir une contradiction entre l'ubiquité des *Legionella* dans les eaux potables, dont la température varie entre 5 et 60°C et les exigences en facteurs de croissance, les restrictions de pH et de température nécessaires pour une croissance *in vitro* sur des milieux synthétiques. La découverte du rôle de certains protozoaires dans la multiplication et la survie des *Legionella* a permis de mieux comprendre cette contradiction et par conséquent l'écologie de ces bactéries. Les protozoaires contenus dans les gouttelettes et remplis d'un nombre important de *Legionella* intracellulaires constituent autant un réservoir qu'un véhicule pour le pathogène (Rowbotham, 1986).

*** Dissémination de *Legionella* dans l'environnement et transmission à l'homme**

De toute évidence, la voie d'infection la plus fréquente de la maladie du légionnaire, semble être l'inhalation de gouttelettes d'aérosols contaminées par *Legionella* (Yu, 1990). Pour que les gouttelettes d'aérosols puissent être inhalées profondément, elle doivent avoir une taille entre 1 et 5 µm. Il semble cependant que des gouttes de 100 µm de diamètre puissent, même si avec quelques difficultés, rejoindre les alvéoles. Le pouvoir infectieux d'un aérosol est lié à la stabilité de *Legionella* dans les gouttelettes et à la quantité de bactéries présentes.

Plusieurs investigations épidémiologiques ont démontré que les tours de refroidissement (Bhopal *et al.*, 1991) et les condenseurs évaporatifs (Breiman *et al.*, 1990) ont servi de sources pour des cas de légionellose. Les conditions présentes dans ces installations (qui comportent une circulation d'eau chaude) sont idéales pour le développement de *Legionella* et en effet un grand nombre de ces systèmes semble en être contaminé. Ces équipements produisent des aérosols qui peuvent être inhalés directement ou indirectement (par exemple par l'air conditionné des bâtiments desservis par la tour de refroidissement). D'autres sources d'aérosols sont les whirlpools, les fontaines décoratives et les humidificateurs (Mahoney *et al.*, 1992).

L'aérosolisation de l'eau potable peut aussi constituer une source de légionellose

(Hood *et al.*, 1994). Les aérosols dégagés par les pommes des douches et les robinets ont été mis en relation avec plusieurs cas de maladie du légionnaire. Un autre véhicule de transmission à partir de l'eau potable est constitué par les équipements respiratoires comme les nébuliseurs, et les autres outils employés dans les soins respiratoires.

*** Virulence de la souche**

En 2001 on connaît 44 espèces de *Legionella*. La majorité des espèces est représentée par des souches isolées de l'environnement, mais un grand nombre d'entre elles sont retenues être pathogènes.

Environ 90 % des légionelloses déclarées aux USA et en Europe sont causées par *L. pneumophila*. De ces cas 82 % sont dus au seul sérotype 1. Les autres sont causés principalement par *L. pneumophila* sérotypes 4 et 6 et *L. micdadei* et *L. lonbeachae* (Breiman, 1993).

*** Inoculation au bon endroit**

Comme déjà mentionné, la voie d'infection la plus fréquente semble être l'inhalation d'aérosols contaminés. Après la découverte des manifestations extra pulmonaires de la maladie du légionnaire (Sire *et al.*, 1994), nous sommes obligés de considérer l'existence d'autres portes d'entrée. L'inoculation directe de plaies chirurgicales semble en être une, tout comme l'aspiration directe d'eau par des personnes venant de subir des opérations chirurgicales au niveau du cou et de la tête, ou même par voie endo-trachéale (par exemple en cas de patients intubés).

Chez des sujets particulièrement faibles ou fortement immunodéprimés il apparaît que l'ingestion d'eau puisse aussi causer des malaises de type respiratoire (Yu, 1990 ; Sire *et al.*, 1994).

Il n'y a en tout cas jusqu'à maintenant aucune évidence d'une contamination inter-humaine.

*** Susceptibilité de l'hôte**

Un facteur clef de la chaîne d'infection de la maladie du légionnaire est la susceptibilité de l'hôte. Des personnes immunodéprimées comme par exemple les receveurs de transplantations d'organes (Proding *et al.*, 1994), les patients traités avec des corticostéroïdes ainsi que les patients atteints de SIDA sont à considérer à risque.

D'autres facteurs prédisposants peuvent être les maladies pulmonaires chroniques, les maladies rénales et cardiaques, la cirrhose hépatique ainsi que le tabagisme et l'alcoolisme. L'âge avancé est à considérer comme un facteur à risque additionnel. Chez les enfants la maladie est très rare et apparaît seulement en cas de sujets fortement immunodéprimés.

En conclusion, dans la situation actuelle de l'évolution des légionelloses et de la connaissance de l'agent infectieux, toutes les nations industrialisées disposent d'un centre de référence pour *Legionella*, et un système d'alerte au niveau européen pour la surveillance des légionelloses liées aux voyages a été établi par le European Working Group on *Legionella* Infections de Londres (EWGLI).

Bibliographie

- Bhopal R.S., Fallon R. J., Buist E. C., Black R. J., Urquhart J. D. (1991) Proximity of the Home to a Cooling Tower and Risk of Non-Outbreak Legionnaires' Disease. *BMJ.* 302 : 378-383.
- Breiman R. F. (1993) Modes of Transmission in Epidemic and Nonepidemic *Legionella* Infection: Direction for Further Study. In: J. M. Barbaree, R. F. Breiman and A. P. Dufour (eds.), *Legionella: Current Status and Emerging Perspectives*.
- Breiman R.F., Cozen W., Fields B. S., Mastro T. D., Carr S. J., Spika J. S., Mascola L. (1990) Role of Sampling in Investigation of an Outbreak of Legionnaires' Disease Associated with Exposure to Aerosols from Evaporative Condenser. *J. Infect. Dis.* 161 : 1257-1261.
- Fraser D.W. (1984) Sources of Legionellosis. In: C. Thornsberry, A. Balows J.C. Feelel and W. Jakubowski (eds.), *Legionella: Proceedings of the 2nd International Symposium*. American Society for Microbiology, Washington D.C., pp 277-280.
- Grothuis D.G., Veenendaal H. R., Dijkstra H. L. (1985) Influence of Temperature on the Number of *Legionella pneumophila* in Hot Water Systems. *J. Appl. Bacteriol.* 59 : 529-536.
- Hood J., Hay J., Gillepsie T., Seal D.V. (1994) A Fatal Case of Community-Acquired Legionnaires' Disease Acquired from Potable Water. *J. Infect.*, 28(2) : 231-233.
- Mahoney F.J., Hoge C. W., Farley T. A., Barbaree J. M., Breiman R. F., Benson R. F., McFarland L. M. (1992) Community wide Outbreak of Legionnaires' Disease Associated with a Grocery Store Mist Machine. *J Infect Dis.* 165(4) : 736-739.
- Prodinger W.M., Bonatti H., Allerberger F., Wewalka G., Harrison T.G., Aichberger C., Dierich M.P., Margreiter R., Tiefenbrunner F. (1994) *Legionella* Pneumonia in Transplant Recipient: a Cluster of Cases of Eighth Years' Duration. *J. Hosp. Inf.* 26 : 191-202.
- Rowbotham T.J. (1986) Current Views on the Relationship Between Amoebae, *Legionellae* and Man. *Israel. J. Med. Sci.* 22 : 678- 689.
- Sire S., Staub T., Christmann D. (1994) Manifestations extra-pulmonaires des légionelloses. *Méd. Mal. Infect.* 24 : 874-880.
- Steele T.W. (1993) Interactions Between Soil Amoebae and Soil *Legionellae*. In: J. M. Barbaree, R. F. Breiman and A. P. Dufour (eds.), *Legionella: Current Status and Emerging Perspectives*. American Society for Microbiology, Washington D. C., pp 140-142.
- Yu V.L. (1990) *Legionella pneumophila* (Legionnaires' Disease). In: Mandell G.L., Douglas R.G., and Bennett J.E. (eds.), *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 3rd Edition. Churchill Livingstone, London, pp 1764-1774.

LA LEGIONELLOSE, UNE INFECTION BACTERIENNE LIEE A L'EAU ET AUX SYSTEMES DE CLIMATISATION

Raffaele Peduzzi et Valeria Gaia

En microbiologie clinique nous sommes souvent confrontés à des infections causées par des germes opportunistes d'origine hydrique. Ainsi, l'eau constitue directement ou indirectement le véhicule principal de la contamination humaine.

La constatation de la recrudescence des infections provoquées par des bactéries dont l'habitat est aquatique, (comme p.ex. *Legionella*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, etc.) se base sur les résultats de l'analyse de routine en microbiologie clinique. En général, ces nouvelles affections ne sont pas liées à des "nouveaux" germes infectieux, mais à des modifications du mode de vie de l'homme.

En effet, les nouvelles utilisations de l'eau ont contribué à amplifier le contact de bactéries "anciennes" avec l'homme. La création d'une interface plus vaste entre l'homme et l'eau a élevé le niveau des contacts homme-bactéries permettant à des germes comme *Legionella* d'accéder à la "fortune épidémiologique": "*Il a fallu attendre l'ère des climatiseurs pour que les Legionella manifestent leur pouvoir pathogène*" (Grimont, et al., 1995).

La légionellose et l'écologie du genre *Legionella* sont un exemple frappant des nouvelles implications hygiéno-sanitaires.

*** Epidemiologie et typage moléculaire**

Depuis son apparition inattendue en 1976 à Philadelphie (Fraser et al., 1977), *Legionella* constitue une préoccupation de santé publique à cause de son potentiel épidémique, lié à une nouvelle niche écologique hydrique favorable à la prolifération des *Legionella* malgré les exigences écologiques très strictes du germe. En effet, la diffusion ubiquitaire de la bactérie est souvent en "contraste" avec ses besoins rigides pour la mise en culture, en particulier les facteurs physiques, chimiques et biologiques, et leur interaction avec son écologie complexe.

Aujourd'hui 44 espèces de *Legionella* sont connues, dont seulement une partie sont pathogènes pour l'homme; 17 espèces ont été isolées chez l'homme.

Les sources de contamination dangereuses pour l'homme sont les systèmes hydriques de bâtiments fortement contaminés par *Legionella* et pouvant générer des aérosols. En outre, un environnement chaud et humide peut conduire à une multiplication importante de germes. Ainsi, il a été possible de démontrer que beaucoup de sources, comme les circuits d'eau (robinets, douches, etc.) constituent des réservoirs importants pour la diffusion de la maladie du légionnaire.

Au point de vue de l'investigation épidémiologique, le typage moléculaire des souches d'origine humaine et d'origine environnementale permet de retracer le parcours infectieux de *Legionella*. Ainsi, dans la surveillance épidémiologique il est souvent possible de remonter à la source de la contamination humaine dans le système hydrique. L'utilisation de techniques de "fingerprinting" des souches s'est révélée importante dans le dépistage du lieu d'infection et pour délimiter la propagation de la souche spécifique. En effet, les méthodes du Ribotyping, du AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) et du PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), permettent de mettre en évidence l'identité entre les souches de l'environnement et les souches cliniques (Gaia *et al.*, 1994; Valsangiacomo *et al.*, 1995).

*** Relation de *Legionella pneumophila* avec les amibes et les macrophages alvéolaires**

Le destin des *Legionella* implique une "intracellularité" stricte dans des protozoaires et dans des macrophages (Swanson & Hammer, 2000). La relation de *Legionella pneumophila* avec d'une part les amibes et d'autre part les macrophages alvéolaires représente un modèle assez rare en biologie fondamentale, avec un aspect évolutif intéressant.

En effet, la bactérie se trouve dans une situation de symbiose dans le milieu aquatique et de parasitose dans l'organisme humain : sa propriété de bactérie strictement intracellulaire est exploitée dans les deux compartiments: hydrique et clinique. Il existe en effet un parallélisme entre le comportement de *Legionella* dans l'environnement hydrique comportant une association symbiotique *Legionella*-protozoaires et dans les infections humaines impliquant une association parasitaire au niveau du macrophage.

L'examen de la relation symbiotique permet d'évaluer le rôle des protozoaires comme réservoir, vecteur de diffusion et de protection de la *Legionella* qui se trouve en association avec d'autres microorganismes ("consortium") dans les biofilms qui colonisent les circuits de distribution de l'eau chaude.

Les *Legionella* phagocytées par des amibes sont confinées dans les vacuoles et peuvent, sous des conditions favorables, se multiplier en grand nombre jusqu'à provoquer la lyse de la cellule hôte et leur libération dans le milieu hydrique.

*** Situation de la légionellose en Suisse et en Europe**

Au niveau européen, il existe un système de surveillance des légionelloses "European Working Group for *Legionella* Infections London (EWGLI)", qui doit avoir un interlocuteur national. Ainsi, dans tous les pays industrialisés, on a créé des centres nationaux pour la surveillance de la *Legionella*.

Depuis 1997, l'Institut cantonal de Microbiologie du Tessin a reçu mandat de l'Office Fédéral de la Santé Publique (OFSP) d'organiser le Centre national Suisse de Référence pour la *Legionella*. Les axes de recherche développés dans cet Institut depuis 1987 ont permis d'acquérir une vaste expérience dans le milieu clinique et aussi environnemental.

En résumé, pour les deux compartiments pris en compte (clinique et hydrique), nous pouvons actuellement donner les indications suivantes :

Souches cliniques

Les souches cliniques provenant de toute la Suisse permettent une vue d'ensemble de la fréquence des divers sérogroupes de *L.pneumophila* sur le territoire national.

Année 2000 : 89% des *Legionella* isolées appartenaient à l'espèce *L.pneumophila* (dont 37% séro groupe 1)

Année 2001 : 95% des *Legionella* isolées appartenaient à l'espèce *L.pneumophila*

(dont 38% séro groupe 1)

Souches hydriques

Les analyses d'eau provenant de divers Laboratoires permettent d'avoir une image globale de la diffusion hydrique de la *Legionella* sur le territoire national.

20-25% des eaux analysées étaient positives pour la *Legionella*.

Evolution des cas de légionelloses en Suisse dans le contexte européen.

La figure 1 montre que l'incidence moyenne de la légionellose en Suisse dans les dernières années est d'environ 70 cas par année. Mais en 2001 les cas dénombrés s'élevaient à 115, ce qui correspond à 15,8 cas par million d'habitants, alors qu'en 2000 l'incidence était de 9,2 cas par million d'habitants. Ce résultat est plus élevé que la moyenne européenne qui correspond à 5,5 cas par million d'habitants en 2000 et 7,6 en 2001. La Suisse se situe ainsi, avec l'Allemagne, le Danemark, l'Espagne et la Suède, parmi les pays avec une incidence supérieure à la moyenne européenne, mais avec un taux de mortalité de 8%, qui est inférieur à la moyenne européenne (12%).

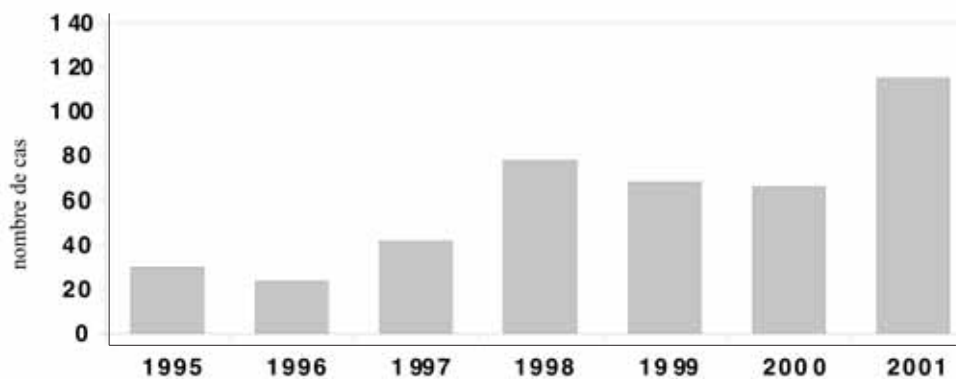


Figura 1 :
Cas de légionellose en Suisse de 1995 à 2001 (données de l'OFSP, basées sur les déclarations obligatoires).

Un autre axe de recherche concerne la stricte " intracellularité " de *Legionella* et en particuliers, le rôle de la symbiose dans l'évolution du processus d'infestation. Les questions majeures sont :

- * La symbiose est-elle indispensable à la pathogénicité de *Legionella* ?
- * Le transit dans l'amibe : s'agit-il de mutualisme ou parasitisme ?
- * Les avantages de la symbiose pour la *Legionella* : le protozoaire constitue un véhicule, il offre protection contre les agressions et en outre joue-t-il un rôle ultérieur aussi dans l'acquisition de la pathogénicité ?
- * L'expulsion de la *Legionella* par l'amibe est-elle une conséquence du fait que le protozoaire ne réussit pas à digérer ce type de bactéries ? S'agit-il d'une symbiose récente ?
- * En comparant la situation environnementale et clinique, la question qui se pose est : pourquoi le macrophage ne réussit-il pas à se débarrasser des cellules bactériennes avec un mécanisme analogue à celui de l'amibe ?

Les implications à la fois cliniques et environnementales soulignent l'importance de l'étude de modèles tels que les *Legionella* pour la compréhension de l'adaptation des organismes à vivre en association symbiotique et à l'acquisition de la pathogénicité par des souches bactériennes. La connaissance des besoins écologiques et métaboliques de la *Legionella* permettra donc de mieux lutter et prévenir sa pathogénicité.

Bibliographie

- Fraser D.W., Tsai T.R., Orenstein W. *et al.* (1977) Legionnaire's disease description of an epidemic of pneumonia. N. Eng. J. Med. 297 : 1189-1197.
- Gaia V., Poloni C., Peduzzi R. (1994) Epidemiological typing of *Legionella pneumophila* with ribotyping *Report of two clinical cases* Eur. J. Epidemiol. 10: 303-306.
- Grimont P.A.D., Grimont F., Dauga C., Koblavi S., Regnault B., Lefèvre M. (1995) Méthodes moléculaires d'identification des bactéries en Ecologie Microbienne. In : Actes du 54^e Congrès de la Société Suisse de Microbiologie, Lugano 1995 : 47.
- Swanson M.S., Hammer B.K. (2000) *Legionella pneumophila* pathogenesis : a fateful journey from amoebae to macrophages. Ann. Rev. Microbiol. 54 : 567-613.
- Valsangiacomo C., Baggi F., Gaia V., Balmelli T., Peduzzi R., Piffaretti J.C. (1995) Use of Amplified Fragment Length Polymorphism in Molecular Typing of *Legionella pneumophila* and Application to Epidemiological Studies. J. Clin. Microb. 33(7): 1716-1719

CONCLUSION GENERALE

L'École d'Été a permis d'illustrer la présence d'associations symbiotiques dans les milieux terrestre, aquatique et marin. Chaque milieu a ses spécificités mais les symbioses sont présentes partout. Elles peuvent être de type pathogène, commensal ou mutualiste, et elles interviennent entre des espèces proches ou très éloignées qui peuvent interagir en une multitude de façons. Quelques associations sont plus intimes que d'autres. Certaines sont intracellulaires, d'autres extracellulaires, et certaines ont lieu entre partenaires séparés. Quelques associations sont facultatives, d'autres obligatoires, et cette caractéristique peut changer au cours de la vie de l'hôte, de même que ces associations ont pu varier en fonction de l'histoire évolutive des partenaires.

Mais souvent les interactions sont mal connues ou trop complexes pour établir la véritable fonction de la symbiose. La symbiose confère-t-elle un avantage adaptatif? L'avantage peut concerner chacun des protagonistes, l'hôte (nodules racinaires), le symbiote (*Legionella*), voire les deux partenaires (organismes des sources hydrothermales). Dans le dernier cas, la symbiose est obligatoire, au moins pour l'hôte qui n'a pas de tube digestif. Dans d'autres cas, les partenaires peuvent vivre séparément, mais l'association leur confère un avantage pour survivre dans certains milieux inhospitaliers (lichens) ou pour les activités de chasse et de défense (sépioles). Mais si la survie des deux organismes séparés est possible, l'association confère souvent un avantage métabolique (nodules racinaires) et peut favoriser la mise en œuvre d'activités différentes chez l'un des partenaires au moins. C'est le cas d'une association symbiotique remarquable qui a été documentée au cours de ce stage : l'acquisition de la pathogénicité des légionelles après association avec des amibes ou des protozoaires. Les amibes se nourrissent de bactéries : les légionelles ont donc développé des défenses pour survivre et se multiplier dans leur hôte et elles sont en effet plus résistantes après multiplication dans les amibes. Dans ce cas, il s'agit d'une symbiose de type parasitaire, aboutissant, par l'acquisition de capacités spécifiques, à faire éclater les cellules-hôtes chez l'homme. Les légionelles possèdent des gènes de virulence spécifiques pour chaque hôte.

C'est dans le milieu marin que l'on rencontre une grande variété d'associations symbiotiques, plus étranges les unes que les autres. Ainsi, certains invertébrés marins abritent des bactéries chimiosynthétiques, qui permettent la survie près des cheminées des sources hydrothermales, en présence de sulfure et d'oxygène, cette association étant le témoin d'un mutualisme remarquable dans un milieu extrême et " primitif ". Par ailleurs, les récifs coralliens, les plus grands édifices biologiques actuels connus, sont le résultat d'une association symbiotique avec des algues unicellulaires photosynthétiques intracellulaires (zooxanthelles), dont les chloroplastes produisent des nutriments utiles aux deux partenaires. Ces cellules algales sont vitales également pour la calcification, cette dernière étant deux à trois fois plus rapide les jours ensoleillés que les jours nuageux.

Des algues unicellulaires ont des relations symbiotiques avec beaucoup d'autres ani-

maux marins et d'eau douce, tels que anémones de mer, méduses, coraux mous, mollusques, tuniciers et hydres d'eau douce. Comme les coraux, le bivalve géant *Tridacna* devrait sa grande taille et sa croissance rapide à une calcification favorisée par la lumière en présence du symbiote algal.

En milieu terrestre, les lichens sont les témoins d'un partenariat réussi entre un champignon et une algue ou une cyanobactérie, voire les deux. Le partenaire champignon représente 90-95% de la biomasse. Les lichens poussent dans des zones inhospitalières, capables de s'isoler métaboliquement, ils peuvent survivre à des conditions extrêmes de température et de sécheresse. Mais chacun des partenaires peut vivre seul dans un environnement plus favorable. Est-ce que le lichen est un organisme en soi ou est-ce un organisme composite de 2 individus appartenant à des taxons différents ? Les lichens mettent en cause le concept d'espèce. Généralement, dans la plupart des associations symbiotiques, chaque partenaire est désigné spécifiquement. Or, on a donné des noms aux lichens (plus de 15 000 espèces)...

De nombreux végétaux (95% des plantes) ont des associations symbiotiques avec des champignons, parmi lesquelles les mycorhizes à arbuscules. Ces champignons (symbiotes racinaires obligatoires) sont une source d'aliments (N et P) et assurent la bio-protection de leurs hôtes, ils ont un rôle bénéfique sur la croissance et la santé des plantes.

Tous les organismes vivants ont besoin d'azote qu'ils trouvent soit dans leurs aliments ou qu'ils prélèvent dans le milieu. Dans les océans, cette fonction est remplie par des microorganismes extraordinaires qui sont les seuls à réaliser à la fois la photosynthèse et la fixation d'azote : les cyanobactéries. Dans le milieu terrestre, l'azote est fourni par l'éclaircissement, par les microorganismes qui décomposent les organismes morts et leurs excréments et par des bactéries particulières qui savent extraire l'azote directement de l'air, grâce à des nitrogenases capables de casser la triple liaison de N_2 . Certaines des bactéries fixant l'azote forment un partenariat avec des plantes vertes, qui leur procurent un abri spécialisé, les nodules racinaires. Ces nodules fournissent un environnement pauvre en oxygène nécessaire à la réduction d'azote en ammoniac. Les rhizobies (bactéries du sol formant une symbiose avec des légumineuses) sont les principaux fixateurs d'azote sur terre. Mais des associations avec des bactéries participent également au métabolisme azoté dans le monde animal. Ainsi, chez les Céphalopodes, ce sont des Pseudomonacées qui utilisent l'ammonium produit par le catabolisme des protéines et fournissent l'azote gazeux, nécessaire à la flottabilité de l'hôte.

Il est remarquable de constater que les mêmes types de symbioses se retrouvent dans différents milieux. La communication chimique entre symbiote et hôte se retrouve par exemple aussi bien dans l'association céphalopode-bactérie qu'entre les bactéries fixatrices d'azote et leur légumineuse-hôte. Une conversation moléculaire réciproque s'établit entre les partenaires, le premier message moléculaire induisant un gène bactérien à synthétiser un morphogène, qui déclenche la formation du nodule racinaire chez les plantes ou de la glande lumineuse chez les Céphalopodes. Comme chez les végétaux, la sépiole contrôle la croissance bactérienne. Nodules racinaires, lichens, glandes lumineuses de sépiole sont des structures spécifiques de la symbiose qui ne se forment que lorsque les partenaires se rencontrent.

Les exemples illustrés au cours de l'Ecole d'Eté ont montré que dans le monde végétal, animal et bactérien, des associations symbiotiques sont impliquées dans des processus biologiques fondamentaux (morphogenèse de certains organes, activités métaboliques vitales). Elles peuvent être une solution permettant la survie dans des conditions de vie difficiles, voire extrêmes, et peuvent participer à l'acquisition de la pathogénicité chez des souches bactériennes. Les perspectives concernent essentiellement l'étude des modulations moléculaires intervenant dans la relation réciproque au cours des mécanismes de la mise en place et du fonctionnement de l'association symbiotique.

Liste et adresse des intervenants

Raffaele Peduzzi
Professeur, Université de Genève
Faculté des sciences
Institut cantonal de bactériologie (*)
Via G. Buffi 6
6900 **Lugano**

Roland Beffa
Privat Docent Université Genève
Aventis Cropsscience
Centre de Recherches de la Dargoire
Dép. de Biologie Moléculaire et Biochimie
14-20, Rue Pierre Baizet
69009 **Lyon**

Valeria Gaia
Collaboratrice scientifique
Institut cantonal de bactériologie (*)
Centre national de référence Legionella
Via G. Buffi 6
6900 **Lugano**

Vivienne Gianinazzi-Pearson
Directeur de Recherche au CNRS
UMR INRA/UBOURGOGNE BBCE-IPM
INRA-CMSE
BP 86510
21065 **Dijon Cedex**

Colette Harf-Monteil
Professeur, Université Louis Pasteur
Institut de Bactériologie de la Faculté de Médecine
3, Rue Koeberlé
67000 **Strasbourg**

Henri Monteil
Professeur, Université Louis Pasteur
Institut de Bactériologie de la Faculté de Médecine
3, Rue Koeberlé
67000 **Strasbourg**

Mauro Tonolla
Collaborateur scientifique
Université de Genève
Institut cantonal de bactériologie (*)
Via G. Buffi 6
6900 **Lugano**

Andrea Zocchi
Collaborateur scientifique
Université de Neuchâtel
Faculté des sciences
Institut de chimie
Av. de Bellevaux 51
2007 **Neuchâtel**

Renata Boucher-Rodoni
Chargé de Recherche au CNRS
BOME-MNHN
55, rue Buffon
75005 **Paris**

William Broughton
Professeur, Université de Genève
Laboratoire de Biologie Moléculaire
des Plantes Supérieures
1, ch. de l'Impératrice
1292 **Chambésy**

Silvio Gianinazzi
Directeur de Recherche au CNRS
UMR INRA/UBOURGOGNE BBCE-IPM
INFRA-CMSE
BP 86510
21065 **Dijon Cedex**

Sveva Grigioni
Collaboratrice scientifique
Laboratoire d'Ecologie Microbienne
Université de Genève
1200 **Genève**

Pascal Joannot
Chargé de mission au MNHN
57, rue Cuvier
75005 **Paris**

Sandro Peduzzi
Collaborateur scientifique FNSRS
Department of Biological Sciences
Rutgers University
Smith Hall 135
101 Warren Street
Newark, NJ 07102-1811 (USA)

Xavier Perret
Collaborateur scientifique
Laboratoire de Biologie Moléculaire
des Plantes Supérieures
1, ch. de l'Impératrice
1292 **Chambésy**

Diederik van Tuinen
Chargé de Recherche à l'INRA
UMR INRA/UBOURGOGNE BBCE-IPM
INFRA-CMSE
BP 86510
21065 **Dijon Cedex**

(*) A partir du 1er janvier 2003, nouvelle adresse:
Centre de Biologie Alpine, Piora
Institut Cantonal de Microbiologie
Via Mirasole 22A - 6500 **Bellinzona**