

L'ARN: Un traceur pour identifier des microorganismes

Le groupe «Ecologie moléculaire» de l'EAWAG à Kastanienbaum utilise entre autres l'ARNr 16S, un élément constitutif des ribosomes, comme traceur pour étudier certains aspects du cycle du carbone dans des sédiments anaérobies. Deux exemples d'application sont présentés ici. Grâce à l'hybridation *in situ* à fluorescence, il a été possible d'identifier des bactéries actives dans des sédiments du Baldeggersee âgés d'environ 150 ans. Une étude des sédiments du Rotsee a permis de caractériser deux populations d'archéobactéries méthanogènes dont la répartition en fonction de la profondeur dans les sédiments dépendait de la matière organique disponible.

L'ARN comme traceur moléculaire

On estime aujourd'hui que moins de 1% des procaryotes présents dans la nature (bactéries des domaines Bacteria et Archaea) peuvent être identifiés à l'aide de cultures. Il est cependant possible de localiser des bactéries jusqu'à présent non cultivables avec des traceurs moléculaires.

La famille des acides ribonucléiques (ARN) comprend les ARNm, les ARNt et les ARNr

qui se distinguent par leur structure et leur fonction. Quand une protéine doit être synthétisée, l'ARNm (ARN messenger) transporte l'information génétique sous la forme d'une copie jusqu'aux ribosomes, lieux de la biosynthèse protéique. Les ARNt (ARN de transfert) acheminent les acides aminés nécessaires jusqu'aux ribosomes où ils seront reliés entre eux pour former la protéine voulue. Les ribosomes sont en partie constitués d'ARNr (ARN ribosomiques) de différentes

tailles (ARNr 5S, 16S ou 23S; S = Unité de Svedberg; vitesse de sédimentation de molécules biologiques en suspension au cours d'une centrifugation réalisée en conditions standard).

L'ARNr 16S (Fig. 1) constitue un traceur de choix dans le domaine de l'écologie moléculaire [1]. L'analyse comparée des séquences d'ARNr 16S isolées à partir de divers procaryotes a montré qu'il existait des séquences conservées mais également des régions très variables [2]. Certains domaines conservés ont p.ex. la même séquence chez toutes les eubactéries alors que les régions variables sont typiques de certains groupes bactériens. Sur la base de ces informations, il est possible de définir des sondes nucléiques de sélectivité variable. Les sondes nucléiques sont des chaînes d'acide nucléique d'une longueur d'environ 20 nucléotides qui sont complémentaires de régions de l'ARNr que l'on souhaite identifier. Il existe maintenant un très grand nombre de sondes nucléiques publiées [3] permettant l'identification sélective des groupes de bactéries les plus variés (exemples Fig. 1). Pour l'hybridation *in situ* à fluorescence [4], les sondes nucléiques sont marquées avec un colorant fluorescent puis un nombre important de copies est mélangé à l'échantillon à étudier. Les sondes diffusent dans les cellules procaryotes et se lient (ou s'hybrident) à l'ARNr sans altérer la structure des cellules. Les cellules ainsi marquées peuvent alors être

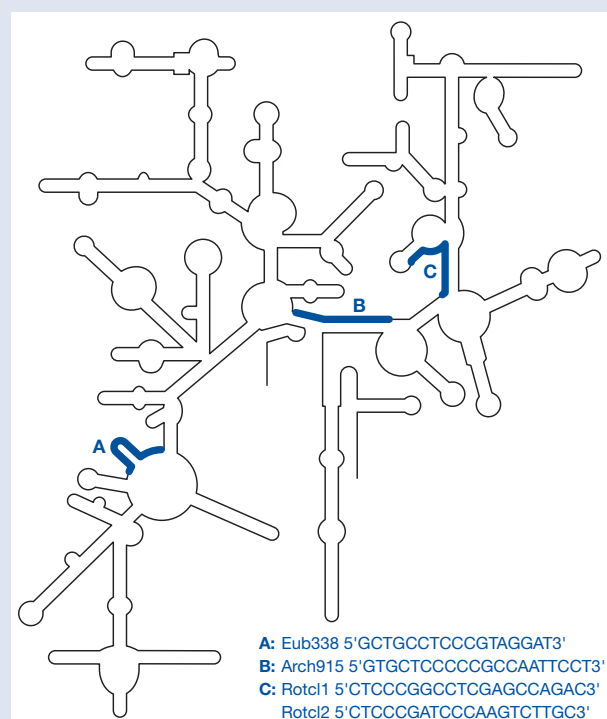


Fig. 1: Structure bidimensionnelle de l'ARNr 16S d'*Escherichia coli* présentant des domaines conservés (A et B) et un domaine variable (C) sur lesquels viennent se fixer les différentes sondes nucléiques. Eub338 détecte des bactéries du domaine Bacteria, Arch915 met en évidence des bactéries du domaine Archaea et les sondes Rotc1 et Rotc2 marquent deux populations différentes d'archéobactéries méthanogènes.



Fig. 2: Hybridation *in situ* d'un échantillon de sédiments à l'aide de la sonde spécifique des archéobactéries Arch915 [5]. Les archéobactéries détectées sont indiquées par des flèches.

mises en évidence au microscope à fluorescence et quantifiées par comptage (Fig. 2).

Des bactéries actives dans des couches sédimentaires âgées de 150 ans

A l'aide de l'hybridation *in situ* à fluorescence, nous avons étudié des bactéries au métabolisme encore actif dans une carotte prélevée dans les sédiments du Baldeggersee. Pour cela, nous avons entre autres employé la sonde nucléique Eub338 [5] qui permet de détecter toutes les bactéries du domaine Bacteria (Fig. 1). La densité de bactéries est maximale dans les premiers centimètres de sédiment et diminue de

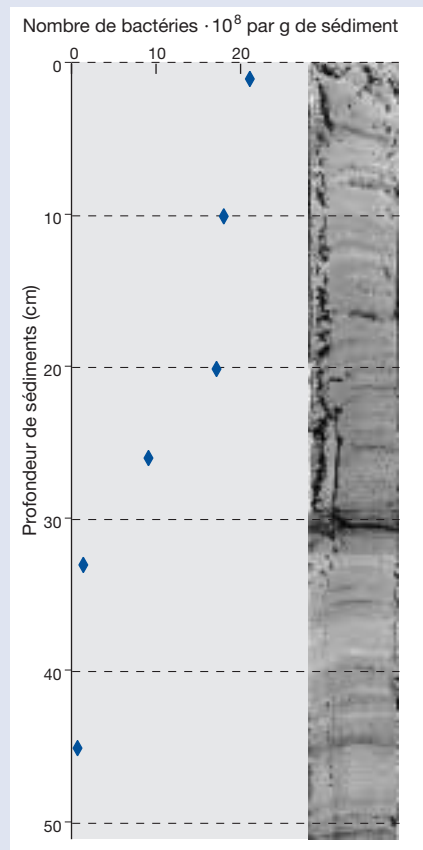


Fig. 3: Nombre de bactéries dans les 50 cm supérieurs d'une carotte de sédiments du Baldeggersee (rapporté à la masse sèche de sédiments). Les bactéries ont été rendues visibles par hybridation *in situ* à fluorescence plus comptées au microscope à fluorescence. Sonde nucléique utilisée: Eub338 [5].

manière continue avec la profondeur. Les couches situées en dessous de 40 cm, c'est à dire âgées de plus de 150 ans, présentent très peu de cellules (Fig. 3). Lors d'essais de cultures, il nous a été possible de démontrer que même des couches sédimentaires âgées de près de 6000 ans pouvaient contenir des bactéries encore activables et en état de dégrader totalement la matière organique.

Des bactéries méthanogènes dans les sédiments du Rotsee

Dans le cadre d'une autre étude, nous avons cherché à identifier les archéobactéries méthanogènes spécifiques impliquées dans les processus de dégradation anaérobies de la matière organique dans les sédiments du Rotsee [6]. Pour ce faire, il a tout d'abord fallu trouver des sondes nucléiques spécifiques de ces archéobactéries méthanogènes. On a donc commencé par isoler l'ensemble de l'ADN contenu dans les 10 cm supérieurs d'une carotte sédimentaire. Cet ADN nous a servi de matrice pour effectuer une réaction en chaîne de la polymérase (PCR) au cours de laquelle les gènes de l'ARNr 16S des archéobactéries méthanogènes contenus dans le sédiment ont été répliqués [7]. Après séquençage consécutif des fragments obtenus par PCR, deux sondes nucléiques spécifiques ont pu être synthétisées: Rotcl1 permet d'identifier un groupe d'archéobactéries méthanogènes qui forment du méthane (CH₄) à partir de CO₂ et de H₂, alors que Rotcl2 localise des archéobactéries méthanogènes qui transforment l'acétate en CH₄ et CO₂ (Fig. 1).

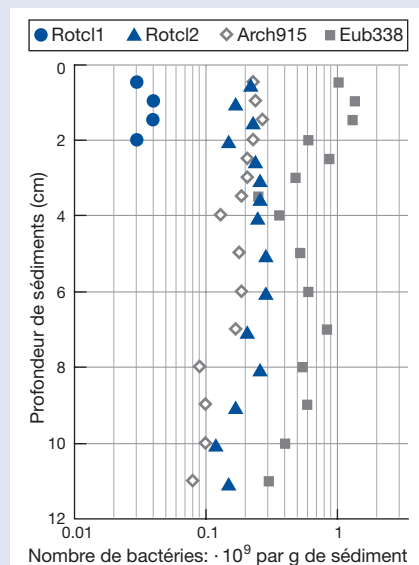


Fig. 4: Répartition de différents groupes de bactéries dans les sédiments du Rotsee (rapporté à la masse sèche de sédiments). Identification par hybridation *in situ* à fluorescence à l'aide de différentes sondes nucléiques.

Les sondes nucléiques Rotcl1 et Rotcl2 ont ensuite été utilisées pour étudier par hybridation *in situ* à fluorescence la répartition des deux populations dans la carotte de sédiments en fonction de la profondeur (Fig. 4). Le résultat a montré que les archéobactéries qui transforment l'acétate étaient les plus représentées quelle que soit la profondeur. Par contre, la présence des archéobactéries méthanogènes qui forment du méthane à partir de CO₂ et de H₂ était limitée aux 2 cm supérieurs des sédiments. Il semble donc que ces bactéries soient subordonnées à la présence de matière organique récemment sédimentée.

Voici nos objectifs

Les projets présentés ici illustrent bien la diversité du champ d'application des ARNr en tant que traceurs. Dans une approche pluridisciplinaire, le groupe «Ecologie moléculaire» de l'EAWAG à Kastanienbaum applique ces méthodes en complément d'analyses chimiques pour caractériser les habitats bactériens des systèmes aquatiques de la manière la plus complète possible.



Kornelia Zepp, biologiste, dirige le groupe de travail «Ecologie moléculaire» au sein de la division «Eaux de surface» de l'EAWAG. Domaine de recherche: Dynamique des populations d'archéobactéries méthanogènes et de bactéries sulfatoréductrices et importance

de ces microorganismes pour la dégradation anaérobie de la matière organique.

- [1] Olsen G.J., Lane D.J., Giovannoni S.J., Pace N.R., Stahl D.A. (1986): Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Review of Microbiology* 40, 337–365.
- [2] Woese C.R. (1987): Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51, 221–271.
- [3] Larsen N., Olsen G.J., Maidak B.L., McCaughey M.J., Overbeek R., Macke T.J., Woese C.R. (1993): The ribosomal database project. *Nucleic Acids Research* 21, 191–198.
- [4] Amann R.I., Ludwig W., Schleifer H.-H. (1995): Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Review* 59, 143–169.
- [5] Stahl D.A., Amann R.I. (1991): Development and application of nucleic acid probes. In: Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Inc., New York, p. 205–248.
- [6] Zepp Falz K., Holliger C., Grosskopf R., Liesack W., Nozhevnikova A.N., Müller B., Wehrli B., Hahn D. (1999): Vertical distribution of methanogens in the anoxic sediment of Rotsee (Switzerland). *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2402–2408.
- [7] Grosskopf R., Janssen P.H., Liesack W. (1998): Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 960–969.