

Les stratégies biomoléculaires dans le domaine de l'environnement

135 ans d'une recherche captivante

La biologie moléculaire est devenue une discipline à part entière au milieu du siècle dernier. C'est dans le domaine de la microbiologie qu'il faut chercher ses racines, cette dernière s'attachant à ses débuts à décrypter les processus vitaux élémentaires et donc aussi à étudier le fonctionnement des écosystèmes. Alors qu'à l'heure actuelle l'implication de la biologie moléculaire dans les domaines des biotechnologies ou de la médecine va de soi pour le plus grand nombre, son rôle dans celui de la recherche environnementale appliquée reste méconnu. Ce n'est pas lui rendre justice car elle peut apporter une contribution précieuse à la résolution de problèmes d'actualité dans ce domaine qui nous concerne tous.

Des chercheurs se sont intéressés dès le milieu du XIX^e siècle à la transformation par voie biologique de certains composés par le biais des microorganismes. La plupart des études de l'époque étaient basées sur la théorie de la génération spontanée selon laquelle la vie pouvait indéfiniment apparaître à partir du monde inerte. Dans le même temps et presque par inadvertance, ces travaux fournirent les premières connaissances d'ordre biomoléculaire sur le métabolisme des microorganismes. Le chercheur français Béchamp [1], un contemporain de Louis Pasteur, était lui aussi adepte de la théorie de la génération spontanée. Il étudia la capacité de transformation de substances définies dans divers échantillons prélevés dans le milieu naturel et fit entre autres état d'une formation de méthane à partir d'éthanol. Les agents responsables de cette réaction étaient d'après lui des microorganismes qui étaient apparus de toute pièce au laboratoire dans les solutions étudiées et il leur donna le nom de *Microzyma cretea*. C'est grâce aux expérimentations remarquables de Pasteur qu'il a été permis de réfuter la théorie de la génération spontanée, qui s'avéra en réalité d'une multiplication de microorganismes déjà présents dans les échantillons.

Au cours de la deuxième moitié du XIX^e siècle, le scientifique allemand Felix Hoppe-Seyler poursuivit assidûment la voie biomoléculaire dans la recherche environnementale. En tant que premier professeur de Chimie physiologique de l'Université de

Strasbourg, il fit le lien entre les aspects biomoléculaires et énergétiques des processus biologiques. Il s'aperçut en effet que chaque transformation biochimique s'accompagnait d'une libération d'énergie, elle-même utilisée par les microorganismes pour assurer leur croissance et leur métabolisme cellulaire. Ceci est particulièrement remarquable étant donné que la thermodynamique classique, telle qu'elle est unanimement reconnue aujourd'hui, n'en était qu'à ses balbutiements (ce n'est qu'en 1878 que Josiah Gibbs introduisit la notion d'énergie libre) [2]. L'approche scientifique de Hoppe-Seyler devait être encore affinée au cours des années qui suivirent.

Des isotopes radioactifs pour marquer les métabolites

La découverte dans les années trente et quarante du siècle dernier des isotopes ¹¹C et ¹⁴C par le chimiste Samuel Ruben et le physicien Martin Kamen [3] constitua un autre tournant décisif dans l'histoire de la biologie moléculaire. Les deux chercheurs ont tout de suite compris quel était l'intérêt de tels isotopes pour la recherche. L'emploi expérimental du ¹¹C s'avéra cependant délicat et problématique, étant donné que la demi-vie de cet isotope n'est que de 21 minutes. C'est le recours au ¹⁴C, dont la demi-vie est d'environ 5700 ans, qui permit de suivre les produits transitoires des transformations biochimiques même dans les systèmes complexes ainsi que d'identifier les organismes responsables de la synthèse

de certains produits d'assimilation dans un écosystème. La micro-autoradiographie permet de visualiser directement les organismes qui catalysent une certaine transformation biochimique dans un écosystème (Fig. 1). C'est au couple de chercheurs Luise et Thomas Brock que l'on doit d'avoir ouvert la voie de cette méthode [4].

La mise en évidence de microorganismes spécifiques

Dans les années 70 et 80, les biologistes, et en particulier les écologues microbiologistes, se consacrent en priorité au développement de méthodes permettant d'identifier directement les microorganismes dans les échantillons complexes prélevés dans le milieu naturel.

Des composés spécifiques: Certaines substances ne sont présentes que chez des groupes de microorganismes bien précis. C'est le cas du coenzyme transporteur d'électrons F_{420} que l'on ne trouve à une exception près que chez les bactéries méthanogènes. Cette substance est particulièrement intéressante car elle possède des propriétés fluorescentes qui peuvent être mises à profit pour mettre en évidence les bactéries qui la renferment (Fig. 2).

Procédés immunologiques: La mise en évidence d'espèces données de bactéries par voie immunocytochimique qui était déjà largement pratiquée dans le domaine de la

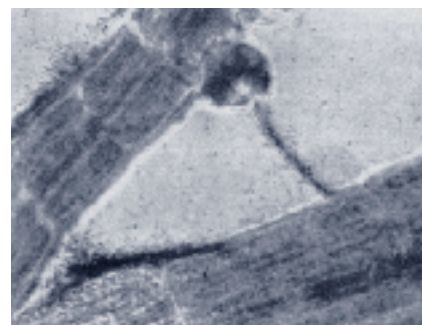
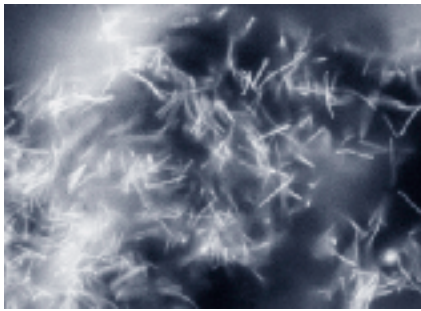


Fig. 1: Autoradiogramme de bactéries épiphytes (visibles en bas à gauche sous la forme de colonies noires) vivant sur des rhodophycées marines. Les bactéries ont été alimentées avec du glutamate au ¹⁴C comme source de carbone [tiré de 4].



A. Zehnder, EAWAG

Fig. 2: F_{420} , un coenzyme transporteur d'électrons que l'on rencontre presque exclusivement chez les bactéries méthanogènes. Cette substance devient fluorescente après excitation par de la lumière ultraviolette. Cette propriété permet une identification directe des bactéries méthanogènes dans les populations naturelles, comme ici des cellules de *Methanobacterium formicicum*.

microbiologie médicale voit son champ d'application s'étendre aux systèmes naturels vers la fin des années 70. Il existait alors déjà de multiples possibilités de marquage permettant de visualiser des anticorps précis dans un organisme cible (Fig. 3). Ces techniques allaient du marquage radioactif à l'emploi de métaux lourds spécifiques et de colorants fluorescents en passant par celui d'enzymes catalysant des réactions particulières (méthode ELISA). Le recours aux anticorps permet même de mettre en évidence des protéines isolées, en général des enzymes, dans une cellule donnée au sein d'un système complexe. L'inconvénient des techniques immunocytochimiques, c'est que les organismes ou les protéines qui doivent être reconnus par les anticorps doivent tout d'abord être isolés. Ils sont en effet indispensables à la production des anticorps.

Sondes à ARN et à ADN: La recherche a effectué un véritable bond en avant avec le développement dans la première moitié des années 80 des sondes à ARN et à ADN. Deux conditions étaient nécessaires à ce progrès. Il fallait tout d'abord que l'on réalise que l'ARN était une molécule universelle permettant d'établir des liens de parenté entre organismes et que l'on approfondisse les recherches à ce sujet. Carl Woese [5] et Norman Pace [6] furent les pionniers dans ce domaine. Il fallait ensuite que l'ADN puisse être multiplié *in vitro*, c'est-à-dire en dehors de la cellule. En découvrant la réaction en chaîne de la polymérase ou PCR («polymerase chain reaction»), Kary Mullis permit en 1985 de s'engager dans cette voie [7] (Fig. 4). Les sondes sont construites de manière à reconnaître des séquences spécifiques d'ARN ou d'ADN. Selon qu'il s'agit de régions variables ou conservées, cette technique permet une identification au niveau des espèces ou de groupes entiers d'organismes. Si, de plus, les sondes sont

combinées à des colorants fluorescents, les microorganismes marqués peuvent être directement visualisés au microscope à fluorescence. A l'aide de la PCR, il est d'autre part possible d'isoler des séquences de gènes inconnues issues d'un écosystème quelconque pour les comparer par la suite avec des séquences d'ADN connues et cataloguées. Etant donné l'immensité des banques de données déjà établie, il y a de grandes chances que les séquences inconnues puissent être rattachées à des fonctions spécifiques ou bien des groupes d'organismes définis.

Identifier les facteurs et éléments défavorables aux organismes

Au-delà de la question de comprendre les processus – qui fait quoi, où et comment – se pose depuis quelques décennies celle d'évaluer les causes et les conséquences de dommages causés à l'environnement. Au sein de cette thématique complexe, un domaine de recherche porte sur l'étude des produits chimiques toxiques susceptibles de se retrouver dans le milieu naturel et de porter atteinte aux organismes qui le peuplent. L'urgence avec laquelle il convenait d'aborder ces questions a d'un côté généré des progrès considérables au niveau de la chimie analytique – on est aujourd'hui en mesure de doser une multitude de polluants à des concentrations même infimes dans une matrice complexe. D'un autre côté, nos connaissances sur la régulation des processus biomoléculaires constituent une base précieuse pour la construction de ce que l'on appelle des biosenseurs. Ceux-ci per-

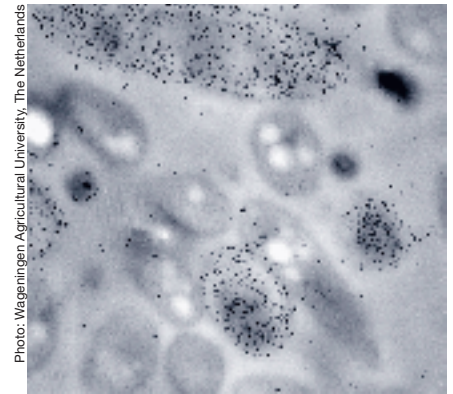


Photo: Wageningen Agricultural University, The Netherlands

Fig. 3: Des anticorps marqués avec des particules d'or colloïdal (points noirs) permettent d'effectuer au microscope électronique à transmission une identification immunocytochimique de bactéries préparées en coupes ultra-fines. La photo ci-dessus illustre le marquage de *Methanosaeta concillii*, une bactérie consommatrice d'acide acétique, sur un biofilm obtenu sur acide propionique.

mettent de mettre en évidence des concentrations infimes de polluants par l'expression d'enzymes spécifiques ou de protéines fluorescentes. En outre, le séquençage de génomes entiers donne la possibilité de rassembler des groupes de gènes spécifiques pour les reporter sur ce que l'on appelle des puces à ADN. A l'aide de ces puces, il est alors possible d'étudier les réactions des gènes face aux produits chimiques et autres nuisances écologiques.

Au cours des 150 dernières années, nous avons parcouru un long chemin sur la voie de la compréhension des aspects moléculaires de la vie dans un environnement en évolution permanente. Les dernières 20 années en particulier ont été marquées par une véritable explosion des connaissances dans le domaine de la recherche appliquée.

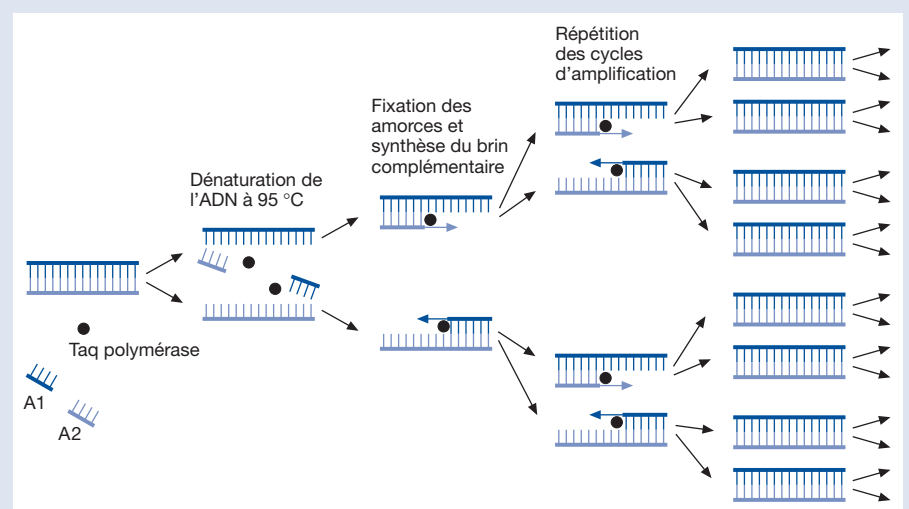


Fig. 4: Multiplication de fragments donnés d'ADN par la technique de la PCR. Le morceau d'ADN à amplifier est mis en solution avec deux amorces (A1 + A2) et une enzyme, la Taq polymérase. Le brassage est effectué de manière automatisée pendant 30 cycles de température dans un thermocycleur. Un cycle de température dure environ 4 minutes et se compose de trois étapes. 1^{ère} étape: L'ADN est dénaturé à 95 °C; 2^{ème} étape: La température est baissée jusqu'à 37 °C maximale pour que les amorces puissent se fixer à l'ADN; 3^{ème} étape: A une température de 75 °C, la Taq polymérase synthétise le brin complémentaire d'ADN.

L'EAWAG a été largement impliqué dans ce phénomène comme l'illustrent les exemples de travaux présentés dans ce numéro.

Effets et mise en évidence des toxiques

L'arsenic constitue une nuisance ressentie dans le monde entier. Il s'agit en effet de l'un des polluants les plus importants de l'eau potable. Au Bangladesh et au Vietnam, des millions de personnes souffrent des suites de contaminations par l'arsenic. Le dosage de cet élément par des méthodes classiques de chimie analytique est cependant loin d'être évident et pratiquement impossible sans un bon équipement de laboratoire. J.R. van der Meer et J. Stocker (voir p.12) ont mis au point un biosenseur bactérien facile à utiliser et sensible à des concentrations même très faibles d'arsenic (un millionième de gramme par litre). Les bactéries génétiquement modifiées sont porteuses de ce que l'on appelle un gène rapporteur dont l'activation en présence d'arsenic est suivie de la synthèse d'une protéine rapporteur. Cette enzyme catalyse une réaction associée à la libération d'une coloration bleue. Selon la concentration en arsenic, la quantité d'enzyme produite sera plus ou moins grande et donc la quantité de colorant bleu plus ou moins importante. Toute personne même profane est donc en mesure à l'aide de papier indicateur de constater si un puits donné est contaminé ou non par de l'arsenic.

Pendant de nombreuses années, l'écotoxicologie était dominée par une approche plutôt phénoménologique. Les nouvelles méthodes de biologie moléculaire permettent aujourd'hui d'étudier l'expression de gènes spécifiques et la synthèse des protéines correspondantes en réponse à des stimuli précis. Quand un organisme entre en contact avec un produit toxique, différents gènes se trouvent activés. Les produits de ces gènes sont impliqués dans les systèmes de défense des cellules contre le toxique. Dans leur article de la page 15, B. Fischer et R. Eggen montrent que l'activité des gènes de défense peut être mise à profit pour mettre en évidence certains polluants. La réaction d'une cellule à un toxique ne constitue cependant qu'une partie de la réponse au problème. Il importe également de comprendre de quelle manière les produits toxiques provoquent des dommages, ce qui signifie qu'il est également impératif de disposer d'informations sur les réactions des polluants avec les structures biologiques. B. Escher (voir p. 9) et ses collaborateurs ont étudié toute une série de réactions induites par les polluants

et décrivent les mécanismes d'action primaires de tels réactifs.

Élimination de l'azote et pureté de l'eau potable

Un groupe d'ingénieurs et de microbiologistes (voir l'article de C. Fux et collaborateurs p. 20) ont étudié de concert de nouvelles voies d'élimination de l'azote dans les eaux usées. Le processus Anammox découvert aux Pays-Bas dans lequel l'ammonium est directement transformé en azote atmosphérique en présence de nitrites mais sans apport d'oxygène se prête particulièrement bien au traitement des eaux polluées à forte teneur en ammonium. Mais pour pouvoir l'employer, il fallait tout d'abord identifier les microorganismes responsables de cette transformation. C'est à l'aide de sondes génétiques spécifiques que l'on y est parvenu. La bonne applicabilité pratique du procédé Anammox a ensuite été testée dans un réacteur pilote, ce qui fait que plus rien ne s'oppose à sa mise en œuvre à grande échelle dans les stations d'épuration.

La qualité sanitaire de l'eau potable est encore actuellement contrôlée à l'aide de la méthode de culture en boîte de gélose en grande partie élaborée au XIX^e siècle. Le problème, c'est que cette méthode de culture est très demandeuse en temps. Elle ne livre généralement de résultats qu'au bout de 72 heures, 24 heures dans le meilleur des cas. Les contaminations aiguës ne peuvent donc pas être détectées à temps pour être endiguées comme il se doit. Une méthode basée sur la PCR permettrait d'effectuer un grand pas en avant. Les contaminations pourraient être identifiées au bout d'environ quatre heures, les mesures nécessaires pouvant être engagées de manière précoce. Dans leur article de la page 18, A. Rust et W. Köster montrent comment cette méthode de contrôle de la qualité sanitaire des eaux potables peut être appliquée.

Transfert de gènes et diversité génétique

Deux autres articles sont consacrés à des aspects évolutifs. L'équipe de J.R. van der Meer (voir p. 6) a été la première à montrer comment de gros morceaux d'ADN étaient échangés entre bactéries. Ces morceaux d'ADN sont appelés îlots génomiques; ils peuvent représenter plus de 10% du patrimoine génétique total et doter les bactéries réceptrices de propriétés supplémentaires, comme p. ex. celle de dégrader certains polluants. Le transfert de gènes alors qualifié d'horizontal permet aux bactéries de franchir des étapes importantes de l'évolution en l'espace de quelques généra-

tions avec de grandes chances de succès. M. Winder et P. Spaak (voir p. 22) ont étudié la diversité génétique des puces d'eau dans des lacs alpins situés à différentes altitudes. Ce faisant, ils cherchaient à savoir si l'idée communément admise selon laquelle plus les lacs sont élevés, plus la diversité spécifique des communautés planctoniques est faible, était également valable au niveau de la diversité génétique des populations. Les auteurs concluent de leurs travaux que la diversité génétique ne diminue pas avec l'altitude, mais qu'elle peut encore être considérable dans des lacs très élevés.

«More is different»

Les progrès très rapides réalisés au niveau des méthodes de biologie moléculaire comportent le risque de nous faire perdre la vision d'ensemble, nous incitant par exemple à essayer d'expliquer le fonctionnement de tout un écosystème à partir d'une poignée d'informations détaillées. L'important, c'est d'adopter les stratégies de biologie moléculaire pour décrypter les phénomènes du vivant au niveau des processus et de reporter ensuite cette perception à la globalité du système. Dès 1972, Philip W. Anderson constate dans son article intitulé «More is different» que la décomposition d'un système en ses différents éléments ne suffit pas à comprendre le fonctionnement de l'ensemble [8]. Les deux approches sont nécessaires et, à l'EAWAG, nous en sommes bien conscients.



Alexander Zehnder, microbiologiste, directeur de l'EAWAG et professeur de protection des eaux et de technologie de l'eau à l'EPF de Zurich. Ses intérêts scientifiques se portent sur la microbiologie de l'environnement, sur l'application des processus microbiens aux biotechnologies de l'environnement et sur des questions de développement durable.

- [1] Béchamp A. (1868): Lettre de M. Béchamp à M. Du-mas. *Annales de Chimie et de Physique* 13, 103-111.
- [2] Hoppe-Seyler F. (1887): Die Methangährung der Essigsäure. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift der Physiologischen Chemie* 11, 561-568.
- [3] Kamen M.D. (1963): Early history of carbon-14. *Science* 140, 584-590.
- [4] Brock T.D., Brock M.L. (1966): Autoradiography as a tool in microbial ecology. *Nature* 209, 734-736.
- [5] Woese C.R., Fox G.E. (1977): Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74, 5088-5090.
- [6] Pace N.R., Stahl D.H., Lane D.J., Olson G.J. (1985): Analyzing of natural populations by RNA sequences. *ASM News* 51, 4-12.
- [7] Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Ehrlich H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-Polymerase. *Science* 239, 487-491.
- [8] Anderson P.W. (1972): More is different. *Science* 177, 393-396.