

La diversité microbienne

Jacques Balandreau

L'intérêt pour la biodiversité microbienne croît de manière exponentielle à en juger par l'augmentation du nombre des articles qui lui sont consacrés chaque année dans la littérature scientifique (figure 1). En France, une réflexion sur ce sujet s'est développée depuis 1992, l'année de la signature de la Convention de Rio sur la Biodiversité. Elle a pris en 1994 la forme d'un réseau "Biodiversité et Ecologie Microbienne" qui a impliqué plus de deux cents microbiologistes de divers statuts dans l'une ou l'autre de ses activités : ateliers thématiques, groupes de réflexion et de travail sur des méthodes ou des concepts nouveaux, diffusion de techniques, etc. Cet article est, pour l'essentiel, le résultat de cette réflexion concertée.

Parmi les groupes de travail du réseau « Biodiversité et Ecologie Microbienne », un groupe animé par C. Morris, de l'INRA d'Avignon, a retracé l'émergence de l'intérêt pour la Diversité Microbienne à travers une analyse de la littérature de 1975 à 1999 dans six domaines : la phytopathologie, le sol, la rhizosphère, la microbiologie aquatique, la microbiologie alimentaire et la microbiologie des industries alimentaires. La figure 1 est tirée d'une présentation qui en sera faite à la troisième rencontre d'Aussois du réseau « Biodiversité et Ecologie Microbienne », du 2 au 5 Mai 2000.

Les six revues qui publient le plus d'articles sur la biodiversité microbienne sont, dans l'ordre décroissant : *Applied and Environmental*

Jacques Balandreau
DR1 CNRS, Ecologie Microbienne,
UMR 5557 CNRS-Université Lyon1
43 boulevard du 11 Novembre,
69622 Villeurbanne cedex,
e-mail : balandreau@univ-lyon1.fr

Microbiology, Phytopathology, Soil Biology and Biochemistry, Canadian Journal of Botany, Plant and Soil, Mycological Research. Dans ces revues, les articles sur la biodiversité microbienne représentaient 0,24 % du nombre total des articles en 1978. Ce pourcentage était monté à 2,71 % en 1996 (C. Morris, communication personnelle)

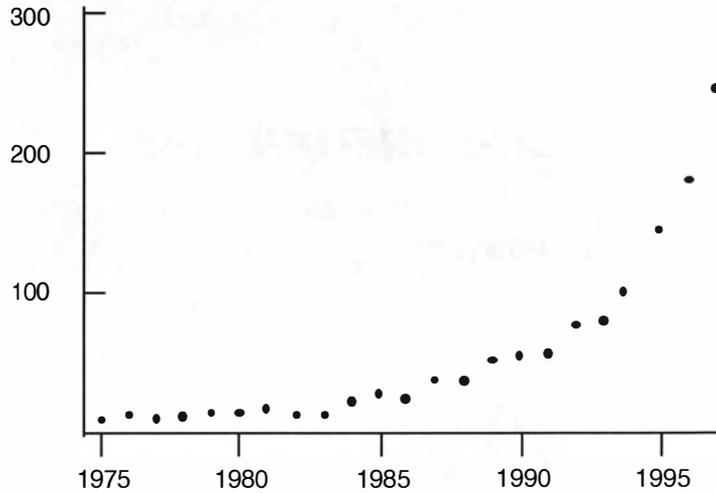


Fig. 1 : Evolution du nombre annuel d'articles traitant de diversité microbienne de 1975 à 1997

Les micro-organismes sont seuls à pouvoir assurer des fonctions tellement essentielles que, sans leur cortège microbien, les animaux et les plantes ne pourraient pas vivre

Des acteurs discrets mais essentiels

Les micro-organismes sont les agents invisibles de fonctions essentielles qu'ils sont seuls à pouvoir assurer :

- ces fonctions sont tellement essentielles que sans leur cortège microbien, les êtres vivants supérieurs, animaux et plantes, ne pourraient pas vivre et se nourrir. C'est ainsi que la respiration de nos cellules et la photosynthèse des plantes sont assurées par des structures intracellulaires (mitochondries et chloroplastes) dont on s'accorde à penser qu'il s'agit d'anciennes bactéries symbiotiques. La plupart des insectes vivent en symbiose avec des champignons et des bactéries. Pratiquement toutes les plantes établissent des symbioses à champignons au niveau des racines. Certaines plantes, en particulier les Légumineuses, établissent des symbioses racinaires avec des bactéries fixatrices d'azote. En plus des symbioses, tous les êtres vivants hébergent des quantités considérables de micro-

organismes commensaux dans leur tube digestif (100 milliards par gramme de contenu intestinal, chez l'homme) ou à leur surface. Chez les végétaux il y a toute une microflore spécialisée qui occupe en particulier la surface des racines : ces micro-organismes jouent un rôle important dans la protection ou même la stimulation de la croissance de leur hôte ;

- les micro-organismes assurent, après leur mort, le recyclage des éléments qui composent la matière organique des êtres vivants : ils dégradent les protéines et la cellulose, ils libèrent l'azote, le soufre et le phosphore sous des formes assimilables par d'autres êtres vivants ;

- des éléments n'entrent dans les écosystèmes que par l'intervention des micro-organismes : c'est le cas de l'azote, qui n'entre naturellement dans les sols que sous l'action de bactéries spécialisées ;

- ils interviennent aussi dans la formation ou la disparition de composés qui jouent un rôle dans l'effet de serre : méthane, oxydes d'azote ;

- enfin, la dégradation de nombreux polluants se fait grâce à l'équipement enzymatique de certains micro-organismes.

Des propriétés telles que fertilité, résilience, pouvoir épurateur, attribuées au sol ou au milieu aquatique, sont en fait des propriétés liées à leur microflore.

Les micro-organismes sont donc nécessaires pour garantir le fonctionnement équilibré, la fertilité, l'habitabilité et la pérennité de l'environnement où nous vivons.

UNE IMMENSE DIVERSITÉ

Diversité d'espèces

Ils sont présents partout, et en grand nombre : dans la valeur d'une cuillère à café de terre, il y a bien plus de bactéries que d'hommes sur la terre entière.

Leur diversité est immense : on estime que la biodiversité, sur terre, réside essentiellement chez les micro-organismes. Encore ne les connaissons-nous pas tous : il est en effet difficile, voire impossible, de cultiver la plupart des micro-organismes de l'environnement naturel, spécialement les bactéries. Plusieurs méthodes d'étude de l'ADN ont cependant permis de mettre en évidence la présence de ces « non-cultivables » : elles ont révélé que souvent la microflore des sols, par exemple, est dominée par des bactéries appartenant à des ensembles d'espèces apparentées

Actuellement, il est difficile, voire impossible, de cultiver la plupart des micro-organismes de l'environnement naturel, spécialement les bactéries

On connaît des séquences de l'ADN de ces bactéries mais on ignore tout de leurs propriétés

La diversité microbienne, c'est aussi la diversité des propriétés des souches, à l'intérieur d'une espèce, c'est-à-dire la diversité infra-spécifique

-des phylums- totalement inconnus, pour lesquels il n'existe pas de milieux de culture adéquats (le phylum *Acidobacterium* par exemple). On connaît des séquences de l'ADN de ces bactéries mais on ignore tout de leurs propriétés.

Nos connaissances sur la diversité des espèces microbiennes augmentent aussi grâce à l'exploration des milieux extrêmes. C'est ainsi que la microflore des sources hydrothermales des grands fonds océaniques a fourni un grand nombre d'espèces nouvelles pour la science (et aux propriétés souvent intéressantes pour les biotechnologies).

Bien sûr, la nomenclature est complètement débordée face à l'immensité de sa tâche et plus de 90 % des micro-organismes des environnements naturels n'ont jamais été décrits.

Diversité infra-spécifique

La diversité microbienne, ce n'est pas seulement la diversité en termes de nombre d'espèces qui existent, c'est aussi la diversité des propriétés des souches, à l'intérieur d'une espèce, c'est-à-dire la diversité infra-spécifique. A ce propos les dernières décennies ont vu une remarquable évolution de l'approche des microbiologistes : en microbiologie classique prévalait le concept de souche type ; chaque espèce était définie par une souche déposée dans une collection internationale, et tout isolat était décrit en référence à cette souche type.

Dans cette logique, tout écart à l'identité, toute dissemblance était ressentie comme une difficulté, un problème. L'expérience, cependant, montre bien qu'il y a toujours quelques différences et un isolat nouveau n'est jamais strictement identique à une souche type. Cette diversité infra-spécifique était visible à travers la diversité des propriétés métaboliques, elle l'est encore bien plus quand on caractérise les génomes eux-mêmes : des techniques simples permettent de mettre en évidence cette diversité à une échelle très fine ; elles sont souvent dérivées de la PCR (réaction en chaîne de duplication de séquences d'ADN dont le nombre d'exemplaires est multiplié par plusieurs millions, ce qui en facilite l'étude ultérieure).

La population, nouvel objet d'étude

Dans le passé, les microbiologistes étudiaient des souches, des souches en petit nombre, vu la difficulté de leur isolement. Cependant si l'on veut prendre en compte la diversité infra-spécifique, il faut considérer non pas quelques isolats mais un nombre important d'isolats. Ce nombre va dépendre des propriétés que l'on cherche à étudier. Si l'objectif est de caractériser une espèce, ce nombre peut être

considérable, à la dimension de la diversité infra-spécifique. Un objectif, de plus en plus souvent affiché dans les publications d'Ecologie Microbienne, est de caractériser la diversité d'une population, c'est-à-dire l'ensemble des individus appartenant à une même espèce et présents au même endroit. Dans un tel cadre, le nombre d'isolats à prendre en compte peut être plus réduit. Encore faut-il noter, à ce sujet, un grave déficit de l'utilisation des statistiques pour justifier du nombre d'isolats considérés : on voit encore trop d'articles alliant une grande puissance d'analyse moléculaire de la diversité avec une grande naïveté dans l'appréciation de la représentativité des échantillons pris en compte. Les choses évoluent cependant et on peut dire que dans les études d'Ecologie Microbienne, l'objet pertinent est, de plus en plus, la population et non plus la souche.

Cette prise en compte de la population est une nécessité pour répondre à certaines questions, surtout quand il s'agit de micro-organismes doués d'une certaine sexualité.

C'est le cas quand il s'agit d'étudier l'adaptation. En effet, les pressions de sélection, dans l'environnement, s'exercent non pas sur des individus isolés mais sur des ensembles d'individus vivant à proximité les uns des autres. Par le biais des échanges génétiques facilités par cette proximité, les gènes nécessaires à l'adaptation peuvent être fournis par différents individus puis recombinaisonnés, dans un clone cellulaire, qui rassemble dans son génome l'ensemble de la réponse génétique à la pression de sélection. Le clone qui a accompli cette adaptation envahit alors la population. L'adaptation apparaît alors comme une tâche coopérative dépendant de la diversité préexistante dans la population. Les possibilités d'adaptation d'une espèce bactérienne apparaissent dans la diversité inhérente aux populations naturelles qui la composent. On peut même parler, pour certaines espèces au moins, d'un génome virtuel, ensemble des gènes qui peuvent être exprimés dans des souches de cette espèce, bien qu'aucun isolat, à lui seul, ne puisse les posséder tous.

Les pressions de sélection, dans l'environnement, s'exercent non pas sur des individus isolés mais sur des ensembles d'individus vivant à proximité les uns des autres

La cellule individuelle

Cette approche populationnelle a aussi braqué le projecteur sur le comportement des cellules individuelles, en tant que composantes de cette diversité collective. Là encore, de nouvelles technologies ont opportunément fourni les outils nécessaires : on peut révéler, sur des cellules prises individuellement, la présence d'un ou de plusieurs gènes, l'intensité de la synthèse des protéines, l'activité de diverses enzymes. On peut même trier des cellules une à une selon qu'elles possèdent telle ou telle de ces propriétés grâce à la cytométrie de flux.

LA VARIABILITE

La diversité infra-spécifique existe même à l'échelle d'un clone, ensemble des individus issus d'un même ancêtre. Les cellules filles ne sont pas les répliques exactes de la cellule mère. La fidélité de la réplication de l'ADN n'est pas totale. Là encore une évolution importante des concepts s'est produite : l'écart à la cellule mère, la mutation, a été longtemps considéré comme un accident, une anomalie. Un point de vue très différent est possible : l'écart est nécessaire à la survie, il est une propriété essentielle de la vie elle-même. Non seulement la génération systématique de variants permet de survivre dans un milieu changeant, mais elle permet aussi une stratégie de conquête ininterrompue de nouvelles niches. La vie, comme les gaz parfaits, occupe tout l'espace disponible.

Environnement et variabilité

Il y cependant des conditions dans lesquelles la variabilité n'apporte rien : c'est le cas d'un organisme bien adapté à sa niche écologique. Le cas extrême est illustré par les micro-organismes parasites obligatoires chez qui les populations sont souvent très clonales : les souches isolées, même à des distances considérables, sont identiques. Une telle stratégie permet de faire l'économie de l'adaptation, mais elle est très risquée : le sort du micro-organisme est lié à celui de son hôte et il disparaît avec lui.

Le cas le plus fréquent correspond à des micro-organismes dont les populations traversent des phases de prolifération dans un milieu favorable, entrecoupées de périodes où des changements imposent une adaptation. Dans le premier cas, la clonalité est la meilleure stratégie, elle serait catastrophique dans le second. Une avancée considérable a été réalisée chez *Escherichia coli*, une bactérie intestinale qui est en fait la bactérie la mieux connue : on a pu démontrer que, chez *Escherichia coli* au moins, le degré de fidélité de la réplication de l'ADN est dépendant de l'équilibre entre deux systèmes enzymatiques (SRM et SOS) agissant, l'un dans le sens d'une grande clonalité, l'autre dans le sens d'une grande variabilité. De plus ces deux systèmes enzymatiques sont soumis à des régulations sous l'effet de l'état physiologique de la cellule ou de facteurs de l'environnement. Le degré d'adaptation des cellules à leur environnement module donc le degré de variabilité d'une population. Voir, à ce sujet, l'article très pédagogique de Taddei, Radman et Matic, dans *La Recherche*, Septembre 1996.

La variabilité apparaît donc comme une composante essentielle de l'adaptation chez *E. coli*. Une population naturelle passe par

L'écart à la cellule mère, la mutation, est une propriété essentielle de la vie elle-même

Chez *Escherichia coli*, le degré d'adaptation des cellules à leur environnement module le degré de variabilité des populations

une succession de phases de clonalité traduisant une bonne adaptation aux conditions de milieu, et de phases de variabilité traduisant une inadaptation à des conditions nouvelles.

Mieux encore, il semble que dans toute population microbienne existent des individus, les mutateurs, qui entretiennent constamment une variabilité énorme dans leur descendance à la suite d'une inactivation de leur système SRM de réparation des mutations ; cette variabilité des mutateurs est le plus souvent inutile et contre-sélectionnée, mais elle prend valeur adaptative en cas de changement brutal : dans les variants générés, des individus peuvent en effet présenter des mutations avantageuses et être ainsi plus adaptés que la souche initiale qu'ils finissent par remplacer.

Mutateurs et adaptation

Une collaboration s'est mise en place, grâce au réseau « Biodiversité et Ecologie Microbienne » entre le laboratoire de Mutagenèse de Paris VI (Pr Radman) et l'Unité d'Ecologie et de Physiologie du Système Digestif de l'INRA à Jouy en Josas (M. Fons). Au cours de son DEA en co-direction, A. Giraud a testé le rôle de l'état mutateur dans l'adaptation : des souris maintenues en conditions stériles, ont été inoculées par un mélange 50/50 d'une souche d'*Escherichia coli* et d'un clone de cette souche qui mute 100 fois plus souvent (phénotype mutateur déterminé par une inactivation du gène *mutS*). Ainsi mis en compétition avec la souche d'origine, le mutateur s'adapte plus rapidement au tube digestif de la souris et au bout de quarante jours, il y est plus de 10 000 fois plus abondant (figure 2).

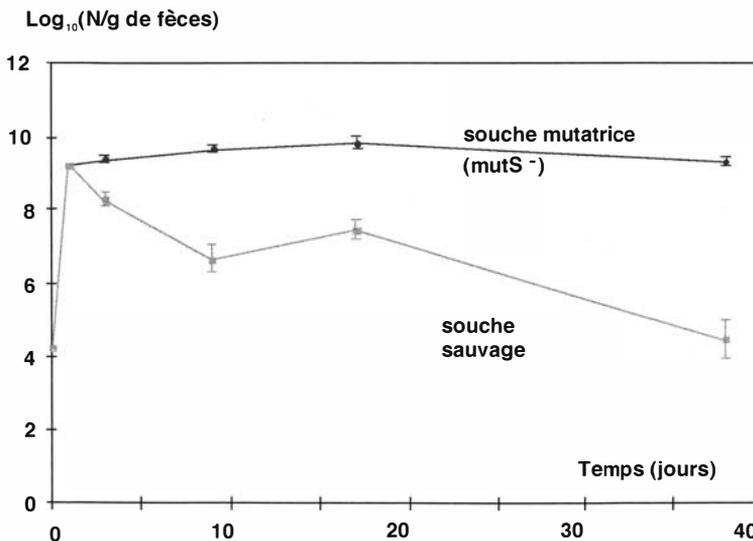


Figure 2 : mise en compétition d'une souche d'*Escherichia coli* et de son mutant *mutS*⁻ dans le tube digestif d'une souris axénique (élevée en l'absence de bactéries). Lorsqu'on les inocule à la même densité, elles croissent de la même façon pendant un jour (les deux premiers points des courbes sont superposés) puis, très vite, la mutatrice l'emporte : elle est dix à cent mille fois plus abondante au bout d'un mois, dans les fèces (excréments) de la souris (DEA A. Giraud, 1997).

Une évolution à notre échelle

Chez les micro-organismes, l'adaptation et l'évolution procèdent souvent à une vitesse comparable à celle des changements auxquels ils sont confrontés

Une partie importante de la réflexion des biologistes sur la diversité est centrée sur la conservation des espèces : en effet, chez les êtres vivants supérieurs confrontés aux changements rapides de leur environnement - changements naturels ou causés par l'homme - l'adaptation procède trop lentement et la disparition est souvent inéluctable, sauf action volontariste de protection par l'homme. Chez les micro-organismes, il en est tout autrement : en raison de leurs effectifs faramineux et de leurs temps de génération très courts, de l'ordre de l'heure, leur adaptation et leur évolution procèdent souvent à une vitesse comparable à celle des changements auxquels ils sont confrontés.

La figure 3 montre l'évolution d'un virus en quarante ans, telle qu'elle a été estimée par Hayashida et al. (1985). Il s'agit du virus de la grippe humaine. A chaque épidémie de grippe, des isolats du virus responsable ont été obtenus et conservés. Les auteurs de l'article ont comparé deux à deux des souches isolées à différentes dates, depuis 1934, en s'attachant à la caractérisation de gènes de protéines de l'enveloppe du virus. Ces gènes subissent des mutations (substitution d'une base nucléique par une autre), a priori aléatoires, que l'on peut classer en deux types, correspondant aux deux droites de la figure 3 : certains changements des bases nucléiques constituant ces gènes sont des mutations silencieuses car elles n'entraînent pas de changement de la composition en acides aminés des protéines correspondantes (droite du haut) et les propriétés du virus qui porte une telle mutation ne sont donc pas modifiées ; quand, au contraire, une mutation entraîne un changement d'acide aminé dans une protéine, les propriétés de cette dernière peuvent être modifiées ; si cette modification entraîne une amélioration de ses propriétés elle a de fortes chances de donner un avantage au virus muté qui va éventuellement remplacer le virus d'origine ; dans la plupart des cas, cependant, une mutation de la protéine ne conférera aucun avantage, ou donnera même un handicap au virus qui la porte, dont la descendance sera donc réduite, voire nulle.

La figure 3 montre qu'en comparant des isolats obtenus sur quarante ans, on peut mesurer l'accumulation des changements de cette protéine, c'est à dire mesurer sa vitesse d'évolution. Cette vitesse est supérieure pour les mutations silencieuses (courbe du haut) ; pour celles-ci la vitesse d'évolution de ce virus est environ deux millions de fois plus rapide que celle d'un animal. Elle est visible à l'échelle de temps d'une vie humaine.

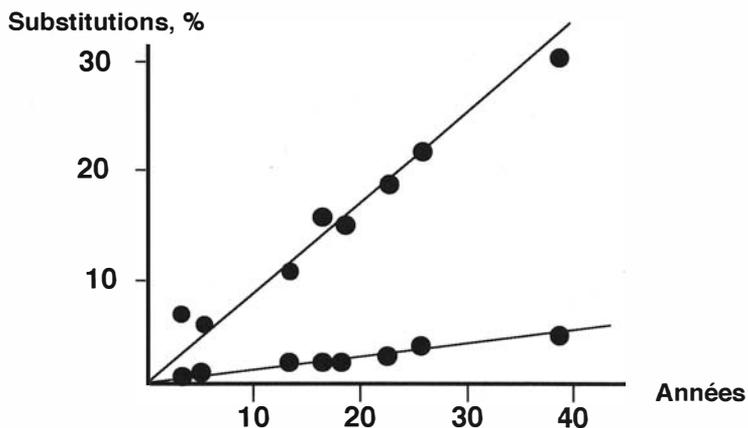


Figure 3 : vitesse d'évolution de la séquence nucléotidique codant pour des protéines de surface de l'enveloppe du virus de la grippe.

Les séquences de nombreuses souches ont été comparées. Pour chacune de ces comparaisons, on a déterminé le pourcentage de différences (substitutions de bases nucléiques) entre les deux séquences comparées. Ce pourcentage de substitutions a été reporté sur le graphique en fonction du temps séparant l'isolement des deux souches comparées. La courbe du haut traduit les substitutions « silencieuses », ne se traduisant pas par un changement d'acide aminé dans les protéines produites ; celle du bas représente les substitutions aboutissant à des changements d'acides aminés, pouvant affecter les propriétés de ces protéines : de tels changements peuvent avoir des effets négatifs sur la survie du virus et ils s'accumulent beaucoup plus lentement.

Une évolution provoquée par l'homme

Un exemple classique d'évolution visible chez les micro-organismes est celui des bactéries qui s'adaptent à la présence d'antibiotiques : là encore, à une échelle de temps qui se chiffre en dizaines d'années, on a vu apparaître des souches bactériennes résistantes à la plupart des antibiotiques, poussant en avant la recherche pharmaceutique, qui doit sans cesse s'efforcer de trouver de nouvelles substances actives.

L'introduction par l'homme de substances nouvelles dans l'environnement (xénobiotiques) donne lieu aussi à des évolutions très rapides de la microflore. Il a suffi d'une dizaine d'années pour que les sols français s'adaptent à l'utilisation de l'atrazine : tous les sols sous maïs contiennent maintenant des bactéries capables de dégrader cet herbicide.

Cette évolution peut être très rapide, comme le montrent les travaux de l'équipe de Chakrabarty à Chicago, à propos du 2,4,5-T, un composé aromatique chloré utilisé comme défoliant au Viet Nam. Les chercheurs de cette équipe ont réuni dans un fermenteur une vingtaine de souches bactériennes capables de dégrader des composés « difficiles » (toluène, camphre, etc). Aucune de ces

souches ne pouvait dégrader le 2,4,5-T. Après huit mois de culture en présence de concentrations croissantes en 2,4,5-T, ils ont obtenu dans ce « pot d'évolution » une souche de *Burkholderia* capable de pousser sur cette substance comme seule source de carbone. Cette souche avait acquis cette fonctionnalité nouvelle - la dégradation du 2,4,5-T - en « récupérant » des gènes des bactéries voisines codant pour les diverses enzymes nécessaires et en les recombinant pour en faire un ensemble fonctionnel.

On connaît de plus en plus d'exemples de ce génie génétique naturel par lequel les bactéries s'adaptent très rapidement aux changements, mais on a rarement comme ici une mesure du temps nécessaire.

Un autre exemple, dans un autre domaine, est celui du soja, une légumineuse chinoise introduite et améliorée en Amérique du Nord, sans que sa bactérie symbiotique fixatrice d'azote soit introduite. En quelques dizaines d'années, des bactéries américaines se sont adaptées et sont devenues des symbiotes du soja tout aussi efficaces que ceux de son pays d'origine.

La relation de l'homme avec le monde microbien a donc ceci de particulier qu'elle est moteur d'évolution pour ce dernier, car les réactions d'adaptation et d'évolution des micro-organismes se font à la même échelle de temps que les actions de l'homme. Là où animaux et plantes disparaissent faute de savoir s'adapter à temps, les micro-organismes évoluent et se diversifient sous la pression des activités humaines. Alors peut-on dire que tout est pour le mieux dans le meilleur des mondes puisque, pour une fois, l'action de l'homme n'a pas pour effet de faire disparaître des organismes mais au contraire de les faire évoluer ?

UNE ÉVOLUTION QUI N'EST PEUT-ÊTRE PAS SANS DANGER

La façon dont l'homme multiplie les changements rapides de l'environnement où vivent les micro-organismes pousse ceux-ci non seulement à évoluer mais à évoluer très vite, de plus en plus vite. Par exemple, la course infernale s'accélère entre l'industrie, qui met au point de nouveaux antibiotiques, et les bactéries, qui génèrent des variants résistants. Le temps n'est peut-être pas loin où les investissements nécessaires pour mettre au point une nouvelle molécule ne seront pas rentabilisables par une durée de vie commerciale suffisante du produit.

La pression de sélection exercée par l'homme sur le monde microbien a une autre conséquence : elle favorise probablement

Alors qu'animaux et plantes disparaissent faute de savoir s'adapter à temps, les micro-organismes évoluent et se diversifient sous la pression des activités humaines

les micro-organismes aux stratégies d'adaptation les plus efficaces. C'est ainsi qu'on a assisté à la prolifération de résistances aux antibiotiques codées par des plasmides (petits ADN) transmissibles, à larges spectres d'hôtes, dans les hôpitaux. Dans l'environnement, les bactéries qui s'adaptent à des pressions de sélection chimiques appartiennent le plus souvent à un petit nombre de genres. R. Fulthorpe et al. (1995) ont montré par exemple que l'adaptation au 2,4-D était essentiellement le fait de *Burkholderia* et *Sphingomonas*. Dans certains déblais de mines de plomb et zinc, *Ralstonia* est quasiment la seule bactérie qu'a pu mettre en évidence l'équipe de M. Mergeay (van der Lelie et al., 1992). *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus* et *Bacillus* sont aussi quelques genres trouvés fréquemment associés à des pollutions.

Faut-il s'étonner de retrouver plusieurs de ces genres mêlés à des pathologies nouvelles en milieu hospitalier ?

Dans les milieux hospitaliers en effet règne aussi une pression de sélection forte en faveur de bactéries au potentiel adaptatif élevé, capables d'accumuler très vite des gènes de résistance aux antiseptiques et antibiotiques. On voit effectivement se multiplier les problèmes hospitaliers dus à des souches multirésistantes : infections nosocomiales (acquises en milieu hospitalier), contaminations de matériel, de solutions diverses, septicémies dues à des bactéries considérées comme « environnementales ».

Est-ce pure coïncidence ou bien y a-t-il un rapport de cause à effet ? Peut-on parler d'un niveau de variabilité-adaptabilité plus élevé des micro-organismes des environnements stressés, les rendant plus aptes à coloniser une nouvelle niche écologique (hôpital, corps humain) ?

Surtout dans les niches vides

De plus, dans les hôpitaux, non seulement nous imposons une pression de sélection forte par l'utilisation d'antibiotiques et d'antiseptiques de toutes sortes, mais aussi, depuis quelques années, nous multiplions les niches vides, c'est-à-dire des lieux où un envahisseur microbien accidentel se trouve sans barrière : patients immunodéprimés ou sortant d'antibiothérapie, milieu intérieur (contamination accidentelle au cours d'une pratique invasive), salles stériles, salles de soins intensifs. On suspecte qu'un micro-organisme entrant accidentellement dans une telle niche vide va pouvoir se mettre à varier très vite : aucun compétiteur, aucune pression de sélection n'est là pour éliminer les variants produits. Ce sont probablement des sites où l'adaptation procède à toute allure (voir l'encadré sur les tubes de Rainey). On commence d'ailleurs à mettre

On voit se multiplier les problèmes hospitaliers dus à des souches multirésistantes

Dans les hôpitaux, nous multiplions les niches vides, c'est-à-dire des lieux où un envahisseur microbien accidentel se trouve sans barrière...

en évidence des situations hospitalières qui favorisent les mutateurs : c'est ainsi que A. Oliver et al. (1999) ont montré que, dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose, 43 % des *Pseudomonas aeruginosa* sont des mutateurs.

GÉRER LA DIVERSITÉ MICROBIENNE ?

On voit donc apparaître des questions et des problèmes pratiques pour lesquels on comprend que la réponse ne réside pas dans les propriétés de telle ou telle souche mais bien dans la capacité des populations microbiennes à varier et à générer de la diversité en réaction à l'action de l'homme. Ces problématiques sont encore très nouvelles et leur développement se heurte encore parfois à des limitations technologiques. Dans le domaine agro-alimentaire, la réflexion et l'expérimentation sont plus avancées, mais d'autres secteurs d'activité devront aussi intégrer une approche basée sur la gestion de la diversité.

Gérer la diversité microbienne des productions agro-alimentaires

L'homme gère la diversité microbienne depuis des milliers d'années, dans la fabrication des produits fermentés traditionnels. Sans voir ni même connaître les micro-organismes, les hommes de diverses cultures ont élaboré des représentations mentales des processus à l'œuvre dans la fabrication de divers produits traditionnels, et ces représentations étaient suffisamment opérationnelles pour aboutir à des produits reproductibles et typés.

Les tubes de Rainey

P. Rainey et M. Travisano ont publié récemment (Nature, 1998, 394, p. 69-72) un article qui illustre bien les effets des niches vides sur la vitesse d'évolution. Les auteurs ont simplement comparé deux tubes de milieu de culture liquide inoculés par la même souche SBW25 de *Pseudomonas fluorescens*. Un tube de milieu de culture est une niche vide au moment où on l'inocule. Un des tubes à essais fut gardé agité de façon à homogénéiser le milieu en permanence. Par contre, l'autre tube fut laissé statique et très rapidement les auteurs y ont vu apparaître une certaine diversité des bactéries, correspondant à la colonisation des différentes niches vides (surface aérée, fond du tube carencé en oxygène, parois, sein du liquide) où, localement, certains variants avaient un avantage sélectif. Dans le premier tube, le caractère homogène du milieu correspondait à une seule niche et des variants de la souche initiale n'avaient pas de raison d'être sélectionnés ; dans le second tube, au contraire, la structuration du milieu a permis à la variabilité de la souche de s'exprimer, et de produire des sous-populations différentes adaptées aux différentes parties du tube. C'est un exemple de micro-évolution rapide permise par l'effet de niche vide (« ecological opportunity »).

La France fabrique de nombreux produits fermentés traditionnels (pains, vins, fromages, charcuterie) ; leur richesse en goût est liée à la diversité des microorganismes utilisés, ce qui pose quelques problèmes quand la production doit passer à l'échelle industrielle. La connaissance des voies métaboliques fermentaires de quelques micro-organismes a permis d'obtenir une représentation rationnelle de certaines fabrications. Des produits ont même été fabriqués grâce à des souches pures sélectionnées. Cependant, le plus souvent, un produit fini basé sur cette stratégie « une souche/un produit » est de piètre qualité gustative.

Dans la pratique, un produit fermenté comme le fromage est fabriqué en conjugant des souches pures sélectionnées et un inoculum complexe (comme « Flora-Danica » qui rassemble des bactéries obtenues dans des centaines de fabrications antérieures). Le plus souvent d'ailleurs, les super-souches introduites disparaissent en cours de fabrication, bien que leur présence s'avère utile, de façon inexplicable. Cela n'empêche pas les industriels de l'agro-alimentaire de réunir des trésors de guerre constitués de collections énormes de souches, chacune étant caractérisée au niveau des goûts et saveurs qu'elle produit.

Le maintien de ces productions se heurte à 3 types d'obstacle :

- l'industrialisation des processus de fabrication implique une exigence de reproductibilité qui oriente vers des produits « monosouche », souvent bien tristes ;

- les exigences de santé publique poussent aussi à un contrôle total de la microflore afin d'écartier la possibilité de contaminations (*Listeria*) ;

- enfin la mise en place des réglementations européennes tend à aligner les réglementations sur les plus contraignantes (celles des pays du Nord de l'Europe), ce qui va encore favoriser des produits de piètre qualité.

Les produits de type traditionnel sont donc en danger de disparition, malgré une demande sociale d'autant plus forte que beaucoup de ces produits participent à l'identité culturelle française. Il s'agit d'un domaine où la perception des enjeux de la diversité est très grande dans le public.

En fait, il semble bien que la qualité de ces produits de type traditionnel soit liée à la qualité de la gestion empirique de la diversité, bien plus qu'aux propriétés métaboliques des super-souches sélectionnées utilisées. Une gestion rationnelle de la diversité en cours de fabrication est encore impossible. Cependant, la mise au point des « puces à ADN » devrait fournir, dans un avenir proche – moins de cinq ans ? – des outils utilisables pour suivre, en temps réel, la diversité de la microflore à l'œuvre tout au long d'une production.

La France fabrique de nombreux produits fermentés traditionnels ; leur richesse en goût est liée à la diversité des microorganismes utilisés

Exigence de reproductibilité, volonté de contrôle total de la microflore et réglementation européenne très contraignante mettent les produits traditionnels en danger de disparition

Il semble bien que la qualité de ces produits de type traditionnel soit liée à la qualité de la gestion empirique de la diversité

Gérer la diversité microbienne des ateliers de production

La prise en compte de l'importance de la diversité et de l'écologie des micro-organismes est reflétée de manière exemplaire dans l'évolution des concepts des participants aux programmes récemment cofinancés par le Ministère de la Recherche et des industriels de l'agro-alimentaire. Dans un premier programme (« Usine propre ») la priorité était donnée à la réalisation d'ateliers de production aussi aseptiques que possible. Il s'est avéré que cette stratégie de diversité minimum ne mettait pas à l'abri d'accidents causés par la pénétration accidentelle de germes indésirables dont la prolifération était d'autant plus rapide que l'usine était une « niche vide » (cf supra). Le programme « UNIR » a permis d'élaborer un concept différent, celui d'« écologie dirigée » : la stratégie est alors d'implanter dans les ateliers de production des micro-organismes capables de coloniser les surfaces, micro-organismes choisis pour leur innocuité et, dans la mesure du possible, pour leur effet barrière vis-à-vis des indésirables. Une telle évolution des stratégies se fera probablement dans d'autres secteurs d'activité industrielle, voire même en milieu hospitalier.

la réalisation d'ateliers de production aussi aseptiques que possible ne met pas à l'abri d'accidents ... une autre stratégie consiste à implanter des micro-organismes inoffensifs et si possible à effet barrière vis-à-vis des indésirables

Biodiversité microbienne et environnements stressés

En provoquant des stress, en particulier chimiques, l'homme multiplie les variations brusques de milieu, il introduit une pression de sélection forte en faveur des micro-organismes qui semblent capables d'évoluer plus vite que d'autres (*Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Acinetobacter*, Mycobactéries, *Bacillus*). C'est probablement leur instabilité, c'est-à-dire leur haut niveau de variabilité, qui permet à ces bactéries de s'adapter au stress qui leur est appliqué (à tel point qu'on pourrait envisager d'utiliser la quantification de l'abondance ou de l'instabilité de l'un ou l'autre de ces micro-organismes pour évaluer le degré de stress de leur milieu).

Or nous rejetons dans notre environnement des tonnages de plus en plus importants de substances pharmacologiques diverses, dont certaines franchissent sans encombre les stations de traitement des eaux ; par ailleurs de nouveaux composés s'ajoutent régulièrement à la liste des rejets industriels majeurs. Est-il sage de compter sur le pouvoir épurateur des sols, sur l'adaptation spontanée des micro-organismes de l'environnement ? Le risque est de favoriser certains indésirables, en provoquant des flambées de variabilité incontrôlée d'où pourraient résulter des micro-organismes plus aptes à envahir l'environnement proche de l'homme. Un exemple : nos carburants contiennent des proportions importantes (plus de 10 %) d'additifs

Nous rejetons dans notre environnement des tonnages de plus en plus importants de substances diverses ... Est-il sage de compter sur le pouvoir épurateur des sols, sur l'adaptation spontanée des micro-organismes de l'environnement ?

non biodégradables et fortement hydrosolubles. Faut-il faire l'autruche, compter sur l'adaptation spontanée de bactéries de nos nappes phréatiques, alors qu'on sait bien qu'en Californie cette adaptation n'a pas eu lieu et que la pollution des nappes y est telle que tout additif est désormais interdit ? Ne vaudrait-il pas mieux sélectionner et inoculer des souches microbiennes non pathogènes adaptées à la dégradation de ces produits lors de leur rejet accidentel, ou dans les nappes elles mêmes ?

Agriculture et diversité microbienne

Les sols de cultures intensives s'appauvrissent en matière organique, progressivement mais inexorablement, et ressemblent de plus en plus à de simples supports physiques où il devient nécessaire d'apporter tous les éléments indispensables à la croissance des plantes, la microflore ne pouvant plus jouer son rôle de recyclage des éléments.

De plus, l'agriculture « moderne » est basée sur l'utilisation d'un tout petit nombre de cultivars et cette diminution de la diversité des plantes cultivées est aussi un facteur d'appauvrissement de la microflore associée. C'est particulièrement grave pour les symbioses racinaires à champignons, spécialement les endomycorhizes, qui ne semblent pas capables de s'adapter assez vite : c'est ainsi que Yeshurun et Carrasco (*Nature*, 1998, 396, p. 69-72) ont montré qu'en sols de prairie, la faible diversité de la flore endomycorhizienne était synonyme de faible productivité et de faible diversité végétales. En Champagne, le taux de mycorhization du blé est devenu très faible (Trouvelot et al., 1982).

Biodiversité microbienne en milieu hospitalier

On voit apparaître des pathologies liées à des micro-organismes de l'environnement qui s'adaptent au milieu hospitalier, grâce à leur variabilité : leur multirésistance aux antibiotiques n'est probablement que la partie la plus repérable des adaptations dont ils sont capables. Considérer l'hôpital comme un écosystème microbien complexe, faire une étude écologique des interactions qui s'y produisent entre micro-organismes (transferts de gènes, en particulier), repérer les pratiques de nature à augmenter la variabilité, éviter les effets de niche vide, repérer et surveiller les micro-organismes qui donnent facilement des mutateurs, c'est toute une évolution des mentalités qui est nécessaire pour éviter, là aussi, les points chauds de variabilité d'où pourraient résulter de nouveaux micro-organismes pires que ceux qu'on voulait traiter.

Les sols de cultures intensives s'appauvrissent en matière organique

Dans l'agriculture « moderne », la diminution de la diversité des plantes cultivées est aussi un facteur d'appauvrissement de la microflore associée. La productivité peut s'en trouver réduite.

A l'hôpital, toute une évolution des mentalités est nécessaire pour éviter les points chauds de variabilité d'où pourraient résulter de nouveaux micro-organismes pires que ceux qu'on voulait traiter

Protection industrielle, variabilité et diversité microbienne

Dans de nombreux secteurs des biotechnologies, gérer la diversité microbienne signifie surtout la rendre aussi faible que possible. Mais comment se prémunir contre la variabilité ? Comment empêcher une souche de varier, de perdre ses propriétés ? Pire, comment breveter l'utilisation d'une souche, si cette souche est capable de varier abondamment, même au cours d'un processus normal d'utilisation ? Quels outils employer pour la suivre et la reconnaître ? Comment prouver qu'un concurrent l'a utilisée frauduleusement ? Autour de ces questions, il sera nécessaire de développer de nouvelles techniques d'identification et de traçage insensibles à la variabilité.

CONCLUSION

Le monde de l'infiniment petit est invisible à nos yeux, mais nous dépendons de lui beaucoup plus que nous le pensons. Sans lui nous ne pourrions pas vivre et il est responsable de la pérennité de notre environnement.

A la différence des animaux et des plantes, les micro-organismes ne disparaîtront pas à la suite de l'inconscience écologique de l'homme. Ils se satisfont parfaitement de ces coups de pouce que l'homme donne à leur évolution. Ils s'en satisfont peut-être trop bien et nous ne contrôlons pas ce qui peut résulter de ces « pots d'évolution » que nous multiplions autour de nous.

Gérer cette diversité et cette variabilité de nos microscopiques auxiliaires ne consiste pas seulement à se protéger de leurs effets néfastes : leur diversité est souvent nécessaire à la qualité de nos productions agro-alimentaires, mais nous ne savons pas encore vraiment comment la quantifier, la contrôler et la diriger.

Beaucoup reste à faire pour acquérir une connaissance opérationnelle des liens de cause à effet entre les changements du milieu et ceux de la diversité microbienne. Mais seule cette connaissance peut nous donner la maîtrise nécessaire des processus microbiens qui gouvernent la pérennité de notre environnement, l'efficacité de certaines biotechnologies et la qualité de beaucoup de nos productions agro-alimentaires.

Jacques Balandreau