

LES MICROBES: MENACE OU ESPOIR?

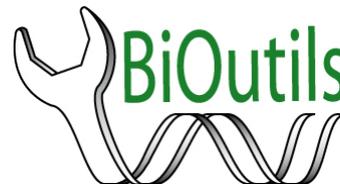




**UNIVERSITÉ
DE GENÈVE**



CEBUG Centre d'Excellence
de Bactériologie de l'Université de Genève



Avec le soutien de



FONDATION H. DUDLEY WRIGHT



Merck Serono
Living science, transforming lives

4^{èmes} journées de Microbiologie de l'Université de Genève

12 et 13 septembre, 2011

Conférenciers

Professeur **Patrick Forterre**, Institut Pasteur, Paris, France

Professeur **Dominique Belin**, Faculté de Médecine, Genève

Organisateurs

Dr Karl Perron

Prof. Jacques Schrenzel

Prof. Patrick Linder

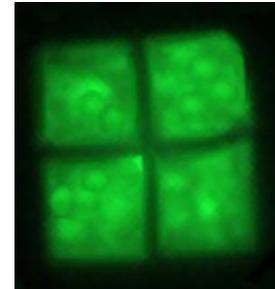
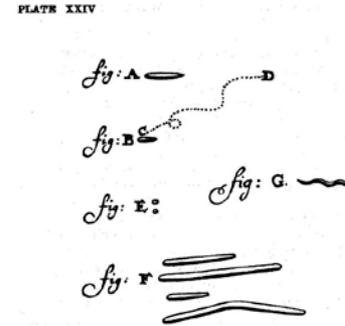
Collaborateurs

Véréna Ducret, Sophie Hulo, Philippe Le Mercier, Alexandra Mandofia-Gati

La microbiologie : un monde de diversité

La diversité microbienne est multiple avec des formes variées. Déjà Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723, époque de Louis XIV) a pu observer une diversité de formes chez des bactéries isolées à partir de sa bouche. En plus des coques (sphères), bacilles (bâtonnets), courbés, ou spiralés, il existe également dans certains environnements des micro-organismes carrés (*Haloquadratum walsbyi*)!

Les quelques bactéries vues par Leeuwenhoek ne représentent qu'une infime partie de notre flore buccale contenant entre 500 et 800 bactéries différentes! Et ne parlons pas de notre système intestinal dont la diversité microbienne est telle que les gènes bactériens dépassent le nombre de nos propres gènes d'un facteur de 100! Cette diversité phénoménale du monde microbien est aussi visible dans la variation des conditions de croissance en milieux extrêmes, de -12°C à 121°C ou encore en conditions à très forte concentration en sel ou dans des milieux extrêmement acides.



<http://en.citizendium.org/wiki/Microorganism>
http://fr.wikipedia.org/wiki/Bactéries_carrées_de_Walsby

La diversité microbienne est générée principalement par la dualité « mutations et sélections». A ces deux éléments essentiels de l'évolution viennent s'ajouter les bactériophages, qui contribuent de manière importante à cette merveilleuse diversité. Les bactériophages sont des virus capables d'infecter et de « manger » des bactéries. Ils peuvent également transporter de l'information génétique d'une bactérie à une autre et contribuent ainsi à l'évolution de ces micro-organismes omniprésents. En diminuant le nombre de bactéries présentes, ils contrôlent les épidémies comme le choléra et peuvent aussi être utilisés pour le traitement de maladies infectieuses résistantes aux traitements antibiotiques. L'étude des bactériophages a permis le développement de la biologie moléculaire et ainsi l'essor de la biologie moderne. Aujourd'hui encore, l'étude de ces virus permet de nombreuses applications médicales et industrielles prometteuses et contribue à l'avancement de notre connaissance.



Bactériophage T4. Modèle géant créé par l'artiste Gaelle Bauer pour les 4èmes journées de microbiologie.

Le monde de l'extrême

Nous sommes habitués à voir la vie dans un environnement proche du nôtre. Une température modérée, ni trop chaude ni trop froide, de l'oxygène, de l'eau disponible, peu d'éléments toxiques, l'absence de radiations dangereuses... un petit paradis. Pourtant de nombreux micro-organismes sont capables de vivre dans des environnements dignes de l'enfer. A des températures supérieures à 100°C, à des pressions importantes au fond des océans, au milieu de la glace, de supporter sans le moindre mal des radiations qui tueraient toute autre forme de vie...

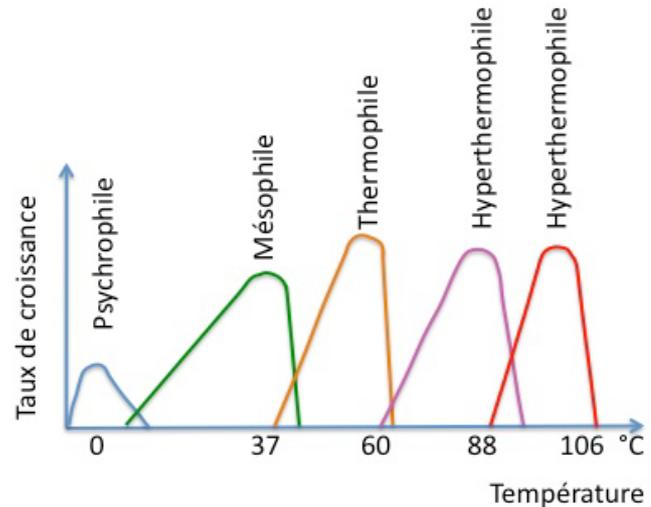
L'histoire des micro-organismes de l'extrême, microbes dit extrémophiles, est fascinante. Certains microbes supportent ces conditions infernales, d'autres en ont même besoin pour se développer. Dans les quelques lignes qui suivent, nous allons donner un petit aperçu de la découverte des Archaea. Pour les personnes désireuses d'en connaître d'avantage, nous conseillons le livre « Microbes de l'enfer » par Patrick Forterre (Belin - Pour la Science, Paris, 2007).

Une découverte majeure en microbiologie fut la mise en place de la stérilisation d'un bouillon de culture par Pasteur qui permit de rejeter définitivement la théorie de la génération spontanée de la vie. La pasteurisation consiste à chauffer un liquide au delà de 80°C pour tuer la plupart des organismes. La stérilisation standard utilisée actuellement pour éliminer tous les micro-organismes consiste en un passage du matériel à 120°C pendant 20 minutes. Cette technique a amélioré nos conditions de santé d'une manière impressionnante ! Et pourtant, nous savons aujourd'hui que certains microbes



se multiplient – ce n'est pas seulement une question de survie – à ces températures. Incroyable ! Imaginons tremper, même brièvement, un doigt dans l'eau bouillante. Imaginez un œuf dur...toutes les protéines du blanc d'œuf sont rapidement dénaturées et pourtant il existe des êtres vivants capables de se multiplier sous ces conditions.

Les premières bactéries thermophiles (capables de pousser à des températures élevées) furent découvertes dans des sources chaudes. La bactérie *Thermus aquaticus*, isolée par Thomas Brock en 1967, peut se diviser à 78°C, déjà une température très élevée ! Cette bactérie a été essentielle dans le développement de méthodes de biologie moléculaire. Elle fut la source d'une enzyme très importante (une polymérase à ADN) qui est utilisée pour la PCR (« polymérase chain réaction »). Cette méthode permet d'amplifier spécifiquement des fragments d'ADN. Elle est très utile en recherche, dans le diagnostic et dans l'analyse génétique en médecine légale.

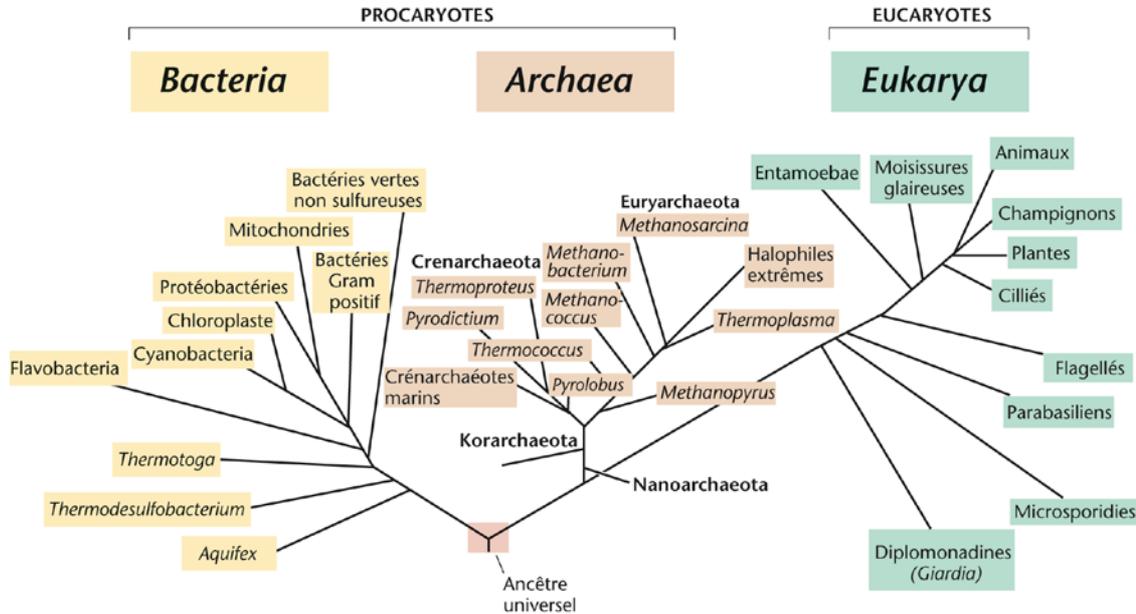


Une nouvelle branche sur l'arbre de la vie

Si les premiers micro-organismes isolés par Thomas Brock étaient de véritables bactéries, les hyperthermophiles, capable de pousser au delà de 80°C n'en sont pas. Leur forme, leur taille et leur absence de noyau (procaryote) est similaire aux bactéries. Cependant l'analyse de leur ARN ribosomique (une molécule impliquée dans la synthèse des protéines) montra une nette différence avec les bactéries ainsi qu'avec les cellules à noyau (les eucaryotes). Ce travail fut mené par Carl Woese, un physicien intéressé par l'origine de la vie, qui publia ces résultats en 1977. Il montra l'existence d'un troisième domaine du vivant, les archéobactéries, qui seront plus tard renommées en Archaea (archée).



Un chercheur, le professeur Patrick Forterre, à la recherche d'extrémophiles
(<http://www-archbac.u-psud.fr/labhome/pforterre/ePF.html>)



© Pearson Education France

Les 3 domaines du vivant. Les bactéries et les archées représentent les procaryotes (organisme sans noyau). Les animaux et les plantes se retrouvent dans le domaine des eucaryotes (organisme dont les cellules possèdent un noyau).

C'est principalement dans le domaine des Archées que l'on retrouve les micro-organismes de l'extrême dont voici quelques impressionnants records !

Chaud devant... !

Nous avons vu que la stérilisation utilise des conditions de 120°C pendant 20 minutes. Une archée dénommée *Pyrolobus fumarii* est capable de pousser à 113°C, avec un optimum de croissance proche des 106°C ! Où trouve-t-on des conditions pareilles ? Au fond des océans. A plus de 2000 m de profondeurs les fumeurs noirs, ces geysers sous-marin, expulsent une eau à plus de 300°C. La forte pression permet de maintenir l'eau sous forme liquide. En plus d'être hyperthermophiles, ces archées sont donc également barophiles : elles supportent des pressions 200 fois supérieures à celles présentes à la surface de la terre.

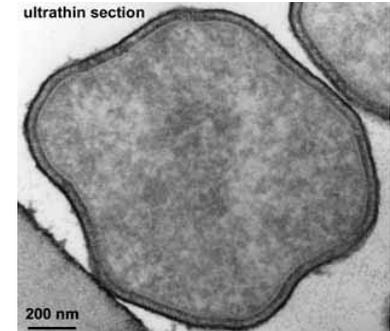
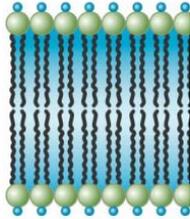


Photo Karl Stetter

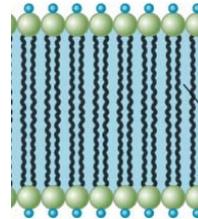
<http://www.biologie.uni-regensburg.de/Mikrobio/Thomm/Bilder/Pyrolobus.html>

On estime que la valeur limite maximale en température serait de 140 à 150 °C. Au-delà, l'instabilité des molécules ne permettrait plus de soutenir la vie.

Comment résister à de si fortes températures ? Les micro-organismes thermophiles possèdent des protéines thermostables et leur ADN est fortement protégé contre la dénaturation. Les bactéries possèdent des membranes riches en lipides gras saturés les rendant beaucoup plus stables à haute température. Les archées possèdent quant à elle une structure membranaire particulière composée d'une monocouche lipidique très résistante à la dénaturation par la chaleur.



Structure des membranes des bactéries et des eucaryotes, une bicouche lipidique.



Structure des membranes d'archée thermophiles, une monocouche lipidique avec biphytanyl

Couleur des marais salant...

Nos ancêtres – qui n’avaient pas de chaînes frigorifiques ni de congélateurs – savaient qu’il était possible de garder certains aliments dans des conditions salées pour éviter leur décomposition. Donc à priori, des conditions avec une forte teneur en sel devrait inhiber la croissance des micro-organismes. Et pourtant il y en a qui aiment le sel, même beaucoup de sel !

Ces micro-organismes sont des halophiles, ou des halophiles extrême comme la jolie archée dénommée *Halobacterium salinarum*. Celle-ci se développe dans les marais salants. Elle contient un pigment rose-rouge, la bactériorhodopsine, et est la principale responsable des merveilleuses couleurs des marais salants.



Photos: Marais salants - Etang de Berre – 13 France
<http://www.cmpb.net/en/sel.php>

Acidophilie

Les drainages miniers acides sont des écoulements de mines qui contiennent de l'acide sulfurique. Ces épanchements effacent toute vie sur leurs passages... sauf certaines archées qui y prolifèrent. C'est le cas de *Ferroplasma acidarmanus* qui se développe dans des pH proche de 0 ! Ces micro-organismes sont dits acidophiles. Ils résistent à des pH très bas grâce entre autre à des pompes qui expulsent les protons hors de la cellule.



L'archée *Ferroplasma acidarmanus*
<http://microbewiki.kenyon.edu/>

Les extrémozymes

Ces micro-organismes qui vivent dans des environnements exceptionnels sont une source providentielle d'enzymes fonctionnant dans des conditions extrêmes. Nous connaissons tous les enzymes glutons présentes dans les lessives. Il s'agit de protéases et de lipases, isolées principalement de micro-organismes, capables de dissoudre les taches sur notre linge. Outre un meilleur lavage, ces enzymes permettent de diminuer la quantité de détergents mais surtout de baisser la température et donc la quantité d'énergie utilisée.

D'autres enzymes tolérant l'acidité sont utilisées comme additifs alimentaires pour les volailles. En résistant à l'acidité gastrique ces enzymes permettent une meilleure digestion et assimilation des fibres. En recherche et en analyse médicale de nombreuses enzymes issues d'extrémophiles sont également utilisées.



Le monde de l'extrême est un monde rempli de nouvelles possibilités,... un monde encore à découvrir.

Il n'y aura certainement pas de développement durable sans la microbiologie.



Image aérienne du Grand Prismatic Spring (environ 75 x 91 mètres) situé dans le Parc national de Yellowstone aux Etats-Unis, <http://fr.wikipedia.org/wiki/Archaea>



http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Colourful_Thermophilic_Archaeobacteria_Stain_in_Midway_Geyser_Basin.jpg

Les bactériophages

Un phénomène de colonies bactériennes brillantes, lié à la présence de bactériophages, a été décrit en 1915 par Frederik Twort, un bactériologiste anglais. Peu de temps après Felix d'Herelle décrit « un microbe » produisant des zones de lyse dans des boîtes remplies de bactéries. En quelque sorte un germe qui « mange » des bactéries. Le terme bactériophage signifie d'ailleurs « mangeur de bactérie » (φαγος = phagos = le mangeur). Aujourd'hui nous savons que ces bactériophages sont des virus infectant exclusivement des bactéries.

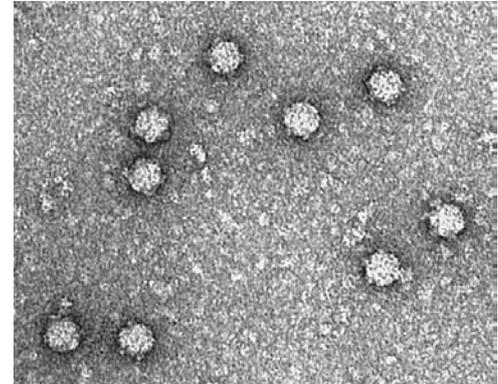


grand que le nombre de bactéries et
(10'000'000'000'000'000'000'000'000'000'000
Molecular Biology Review 68, 560 -602, 2004)

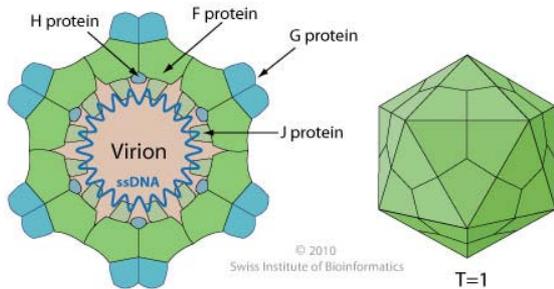
Les bactériophages – souvent appelés phages - sont des virus très typiques : leur matériel génétique, soit ADN, soit ARN, est entouré d'une capsidie protéique qui le protège. Les phages s'accrochent sur des récepteurs spécifiques situés sur les bactéries puis y introduisent leur matériel génétique. Dans la bactérie ce matériel génétique sera multiplié et permettra la synthèse de protéines phagiques. De nouvelles particules virales seront ainsi formées. On estime que le nombre de bactériophages sur terre est 10 fois plus grand que le nombre de bactéries et pourrait atteindre plus que 10^{31} particules phages !!!! Brüssow et al., Microbiology and

Des outils de recherche

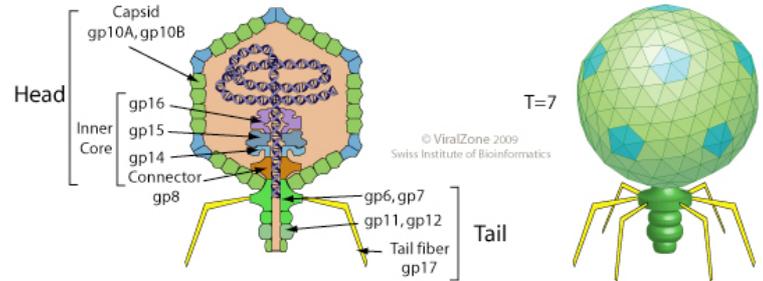
Les bactériophages sont très importants, pas seulement par leur nombre inimaginable. Leur étude a contribué d'une manière importante au développement de nos connaissances en biologie. Ces virus participent activement au transfert de matériel génétique entre bactéries et à leur évolution. Nombreux sont des cas où les bactériophages portent des gènes capables de rendre des bactéries très pathogènes. Mais l'activité de ces virus peut aussi contribuer à la régulation de la propagation de bactéries pathogènes et est parfois même considérée comme une solution miracle pour le jour où nous ne disposerons plus d'antibiotiques pour combattre des infections.



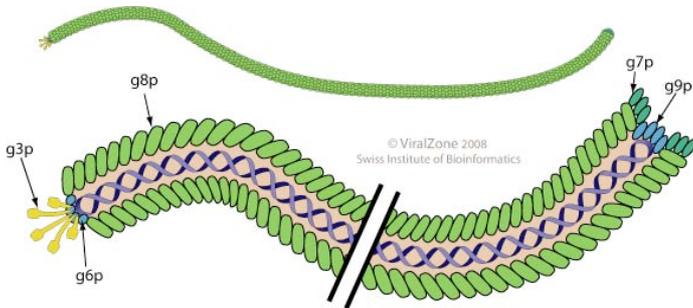
Bactériophage PhiX174. Le premier génome à ADN entièrement séquencé
<http://www.biochem.wisc.edu/faculty/inman/empics/virus.htm>



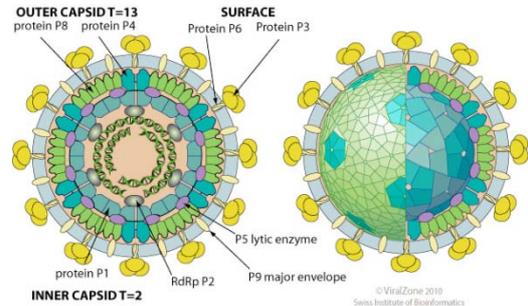
Microviridae, ssDNA, ex. *PhiX174*
Linear, single-stranded DNA of 4.4 to 6.1kb



Podoviridae, ex. *Staphylococcus* phage 44AHJD
Linear, dsDNA genome of about 40-42 kb



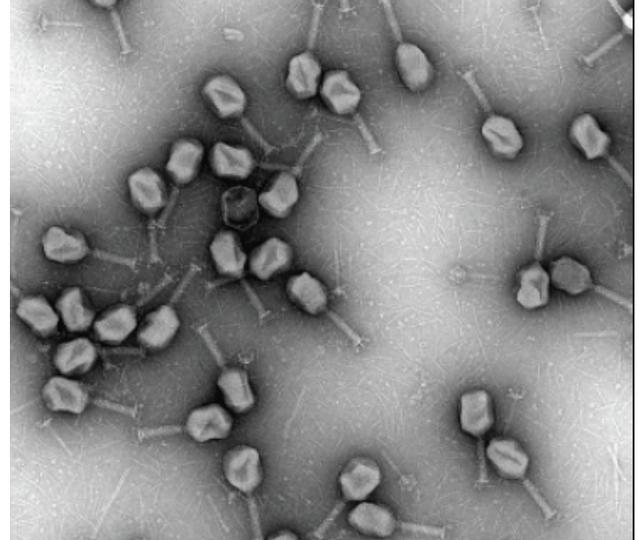
Inoviridae ssDNA, ex. *M13*
Circular, single-stranded DNA of 4.5 to 8kb



Cystovirus, *Pseudomonas*
Segmented dsRNA linear genome. Contains 3 segments:
Segments size range from 2.9 kb to 6.4 kb.

Information et dessin de : <http://viralzone.expasy.org/>; ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity.
Hulo C, de Castro E, Masson P, Bougueleret L, Bairoch A, Xenarios I, Le Mercier P. *Nucleic Acids Res.* 2011;39:D576-82.

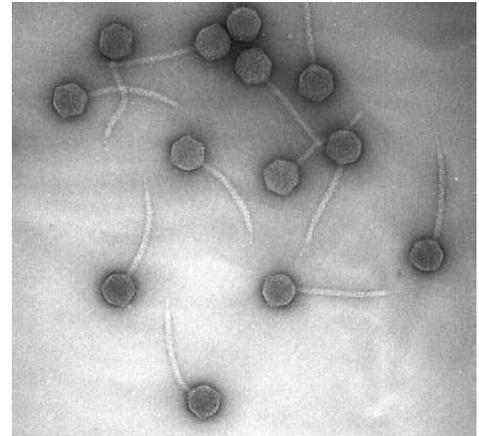
L'étude de la propagation des bactériophages dans différentes souches de la bactérie *Escherichia coli* a également permis de mettre en évidence les enzymes de restriction, ces ciseaux moléculaires qui ont révolutionné la biologie par la possibilité de recombinaison l'ADN *in vitro* et ont permis l'essor de la biologie moléculaire. On doit cette découverte à Werner Arber qui effectua sa recherche à l'Université de Genève avec les phages P1 et λ (lambda). Il fut honoré du prix Nobel en 1978.



Un exemple d'un bactériophage T4 comme modèle pour comprendre la génétique du vivant
<http://pages.unibas.ch/zmb/aktuell/Entwicklung%20der%20Elektronenmikroskopie.pdf>

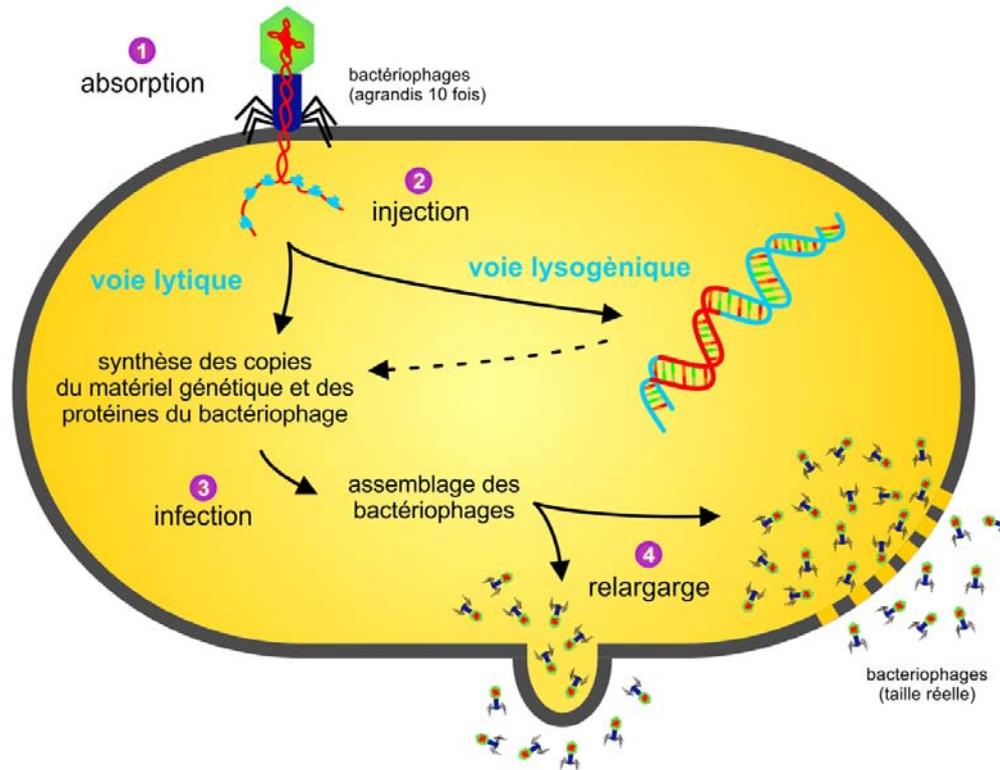
Manger ou ne pas manger son hôte – une question délicate

Tout comme les virus qui s'attaquent à nos cellules, les bactériophages peuvent infecter les bactéries, s'y multiplier puis les lyser en libérant ainsi leur progéniture. C'est un cycle lytique. Dans certains cas les virus peuvent également se mettre en veille et rester silencieux dans la bactérie pendant plusieurs générations. C'est alors un cycle dit lysogène. Dans cet état, le génome du virus peut conférer de nombreuses caractéristiques additionnelles aux bactéries qui l'hébergent. De nombreux systèmes de régulation de l'expression génique sont utilisés pour contrôler la production ou la lysogénie des phages. Dans la phase lytique, l'expression des gènes nécessaires à la multiplication du matériel génétique du virus commence. Ce n'est que plus tard que sont exprimés les gènes qui codent pour des protéines structurelles – celles qui vont former la particule. Durant le cycle lysogénique, l'expression de ces gènes est réprimée. Les bactériophages possèdent donc des systèmes de régulation très sophistiqués. Leur étude a permis la découverte de certains principes fondamentaux du vivant.



Bactériophage lambda: Un paradigme pour l'étude d'expression génique
<http://www.biochem.wisc.edu/faculty/inman/empics/virus.htm>

L'étude des bactériophages était, pour ne citer que les exemples des systèmes de régulation et des enzymes de restriction, primordiale dans le développement de nos connaissances en biologie.



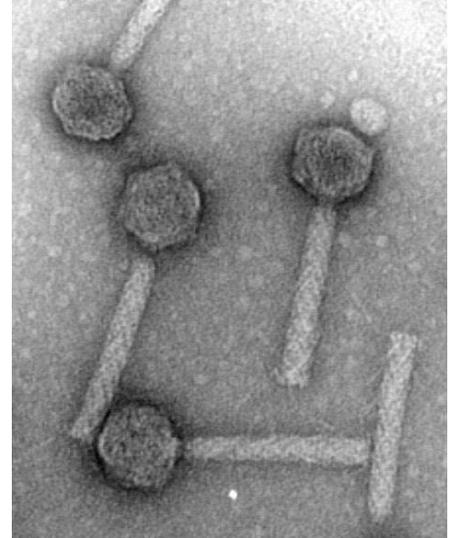
Suite à l'injection de l'ADN, deux voies sont possibles : la voie de lysogénie ou la voie lytique qui va aboutir à la formation de nouvelles particules phagiques.

Figure de Laurent Debarbieux, Institut Pasteur

<http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/recherche/departements-scientifiques/microbiologie/unites-et-groupes/unite-de-biologie-moleculaire-du-gene-chez-les-extremophiles/les-membres-de-l-equipe/laurent-debarbieux>
 Appl Microbiol Biotechnol. 2011; 90:851-9.

Un taxi pour l'ADN

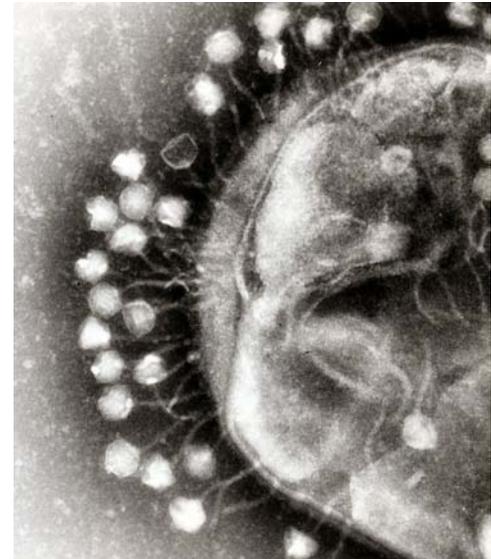
En plus de leur utilité dans la recherche fondamentale, les bactériophages jouent un rôle important dans l'évolution des bactéries. Un exemple frappant est le transfert d'ADN de bactérie à bactérie, le transfert horizontal de gènes. Normalement, un programme élaboré permet de remplir la capsid du bactériophage avec son ADN (ou ARN). Mais dans de rares cas, c'est l'ADN de la bactérie qui est encapsidé par erreur. Ainsi, quand le phage va infecter une autre bactérie, il ne lui injecte pas l'ADN phagique, mais un bout d'ADN d'une autre bactérie. La bactérie qui a reçu l'ADN peut ainsi acquérir de nouveaux gènes. Ce phénomène appelé transduction, peut également contribuer au transfert de gènes de résistance aux antibiotiques entre bactéries mais contribue surtout activement à la diversité des bactéries.



Bactériophage P2. Les bactériophages – acteurs importants dans le transfert du matériel héréditaire entre bactéries
<http://www.biochem.wisc.edu/faculty/inman/empics/virus.htm>

Les bactériophages comme cheval de Troie

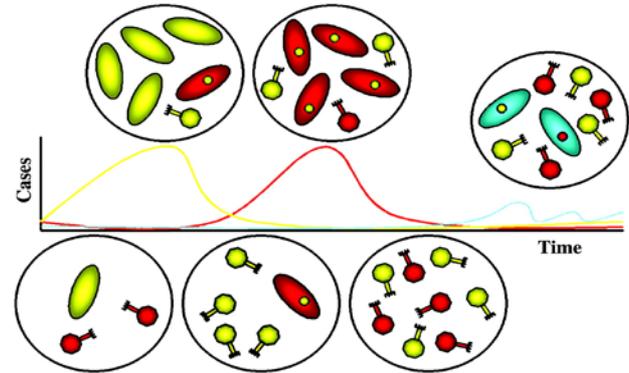
En plus de cette possibilité de transférer des gènes de résistance aux antibiotiques de bactérie à bactérie, certains bactériophages peuvent être porteurs de gènes de toxines ou de facteurs de virulence. Ceux-ci peuvent alors conférer une certaine dangerosité à des bactéries initialement inoffensives. Tout récemment, la fameuse bactérie *Escherichia coli*, qui a retenu l'attention à travers l'Europe pour ces nombreuses infections ayant parfois des issues fatales, porte dans son génome plusieurs bactériophages silencieux. Un de ces bactériophages code pour une toxine, qui est à l'origine des symptômes de ces infections. D'une manière similaire, la toxine produite par *Vibrio cholerae* responsable des symptômes du choléra est codée par un bactériophage. Une bactérie *Vibrio cholerae* qui ne porte pas ce phage est sans conséquence pour la santé de l'homme.



Des bactériophages de type T1 attachés à une bactérie
<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Phage.jpg>

Des régulateurs d'écosystèmes

Finalement, les bactériophages jouent probablement un rôle important de régulateurs dans les écosystèmes. Une hypothèse suggère que les bactériophages se multiplient lors des épidémies de choléra dans le Gange au Bangladesh et contribuent ainsi - ou seraient même responsables du déclin des épidémies. Pendant une épidémie, une souche particulière de *V. cholerae* se multiplie et va causer de nombreuses infections (diarrhées sévères) par la consommation d'eau contaminée. Les malades vont par la suite d'avantage contaminer l'eau par les déjections. Dans l'eau il y a un nombre élevé de bactériophages. Ils sont tous spécifiques pour une souche ou une autre. En raison du nombre élevé de bactéries, les bactériophages spécifiques pour la souche causant l'épidémie vont aussi pouvoir se multiplier et finalement lyser la plupart de ces bactéries. Ainsi se termine l'épidémie. Plus tard, d'autres épidémies peuvent arriver avec d'autres souches, pas sensibles aux premiers bactériophages, mais qui seront sensibles à la prochaine vague de bactériophages.



Faruque, Shah M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 1702-1707; 2005

Un espoir après les antibiotiques ?

De la même manière que les bactériophages peuvent limiter des épidémies, ces dévoreurs de bactéries peuvent être utilisés pour limiter ou guérir des infections. Déjà Félix d'Herelle, après avoir isolé des bactériophages des selles de patients souffrant de diarrhées, lançait l'idée de thérapie par les bactériophages en début du siècle passé (1921, "*Le bactériophage : Son rôle dans l'immunité*") Depuis, de multiples essais ont été effectués et des centres de traitement par les phages ont été créés en Géorgie et en Pologne. Les raisons pour lesquelles la thérapie par les bactériophages n'est plus actuellement disponible sont multiples. D'une part aussi longtemps que nous disposons d'antibiotiques, le traitement par ces derniers est préféré car il est bien établi et accepté. D'autre part, les bactériophages sont souvent très spécifiques pour une souche de bactérie. Si cela permet de sauvegarder la flore normale et de seulement cibler le pathogène en question, il est souvent nécessaire de cultiver d'abord le phage susceptible de lyser le pathogène. Ainsi, le « produit » thérapeutique est un médicament fait sur mesure. Ceci implique aussi que la thérapie par les phages est souvent expérimentale et manque de contrôles rigoureux. Néanmoins, certains essais cliniques en phase I ou II sont publiés (Maura et Debarbieux, Appl. Microbiol. Biotechnol. 90, 851-859, 2011).



Félix d'Herelle (1873-1949)
http://fr.wikipedia.org/wiki/Félix_d'Herelle

Contacts:

Dr Karl Perron

Département de biologie végétale
Sciences III
30, quai Ernest Ansermet
1211 Genève 4
karl.perron@unige.ch
www.bioutils.ch
www.kperron.ch

Prof. Jacques Schrenzel

Laboratoire central de bactériologie
Laboratoire de recherche génomique
Rue Gabrielle-Perret-Gentil, 4
Hôpitaux Universitaires de Genève
1211 Genève 14
jacques.schrenzel@genomic.ch
www.cebug.ch, www.genomic.ch

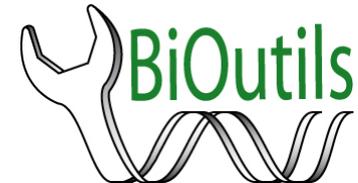
Prof. Patrick Linder

Département de microbiologie et médecine moléculaire
Centre Médical Universitaire
1211 Genève 4
patrick.linder@unige.ch
www.cebug.ch

CEBUG Centre d'Excellence
de Bactériologie de l'Université de Genève



**UNIVERSITÉ
DE GENÈVE**



HUG  
Hôpitaux Universitaires de Genève