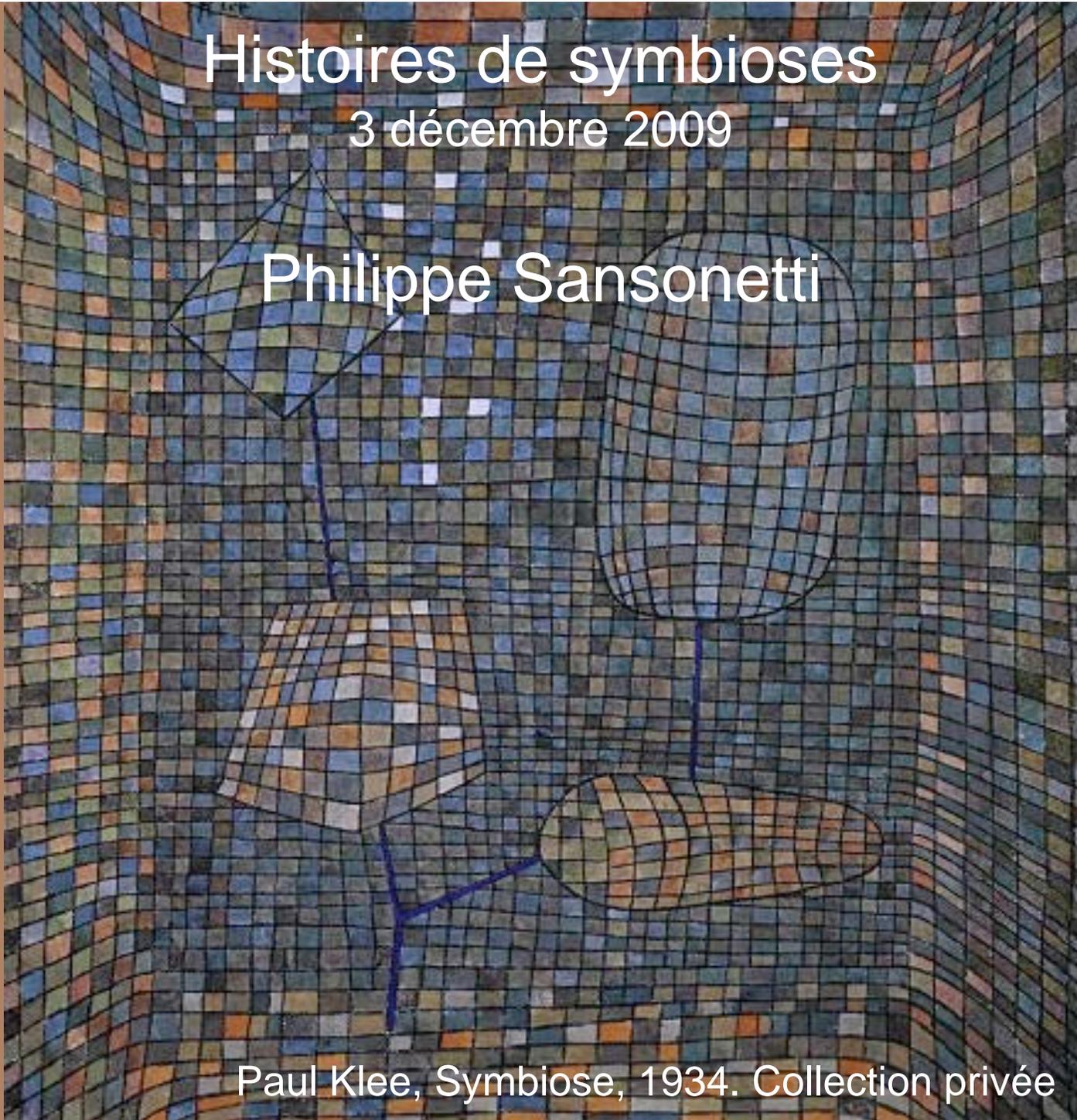


Histoires de symbioses

3 décembre 2009

Philippe Sansonetti

Paul Klee, Symbiose, 1934. Collection privée





Anton de Bary (1831-1888)
Père de la phytopathologie
et de la mycologie

Définitions

Le terme de symbiose a été introduit en premier par Anton de Bary au milieu du 19ème siècle comme la règle de vie commune plusieurs espèces.

L'association symbiotique est souvent construite autour d'un grand partenaire appelé hôte et de plus petits partenaires appelés symbiontes.

Vue très subjective car pour la symbiose homme-microbes, les microbes dépassent largement l'homme en nombre d'individus et nombre de gènes, même si les volumes respectifs ne sont pas en rapport. Le plus petit n'est pas celui qu'on pense...

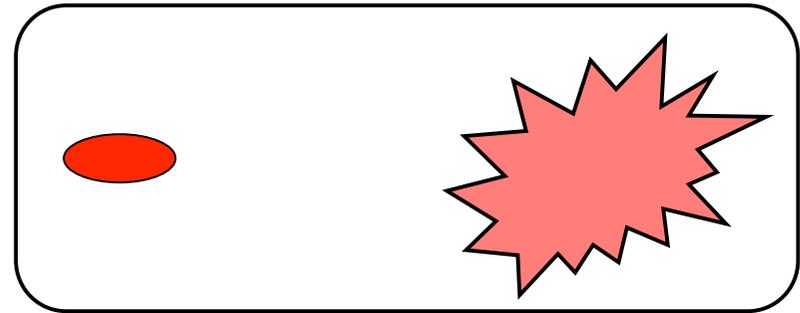
Symbiose hôte-microbes

On utilise le terme de symbionte pour caractériser une variété de bactéries qui établissent une interaction/infection soutenue avec leur hôte au cours de laquelle la colonisation et la multiplication sont contrôlées sans compromettre la vitalité de l'hôte.

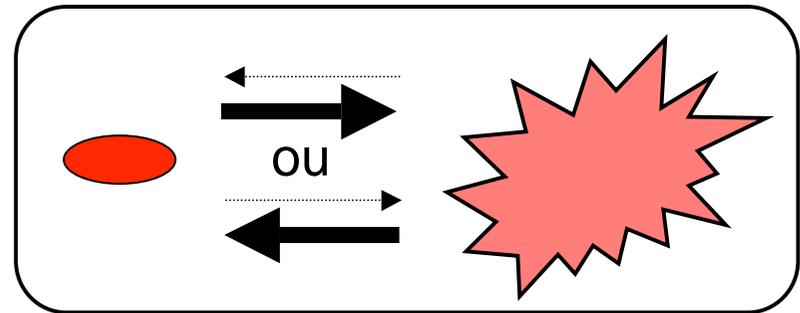
Cette symbiose peut être mutualiste si elle bénéficie au microbe et à l'hôte.

Elle a souvent abouti à une endosymbiose prolongée, vitale pour les deux espèces. Un exemple extrême est la mitochondrie chez les cellules animales et le chloroplaste chez les plantes.

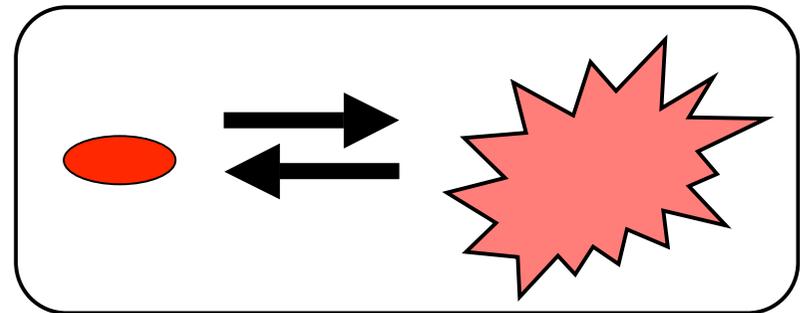
Commensalisme

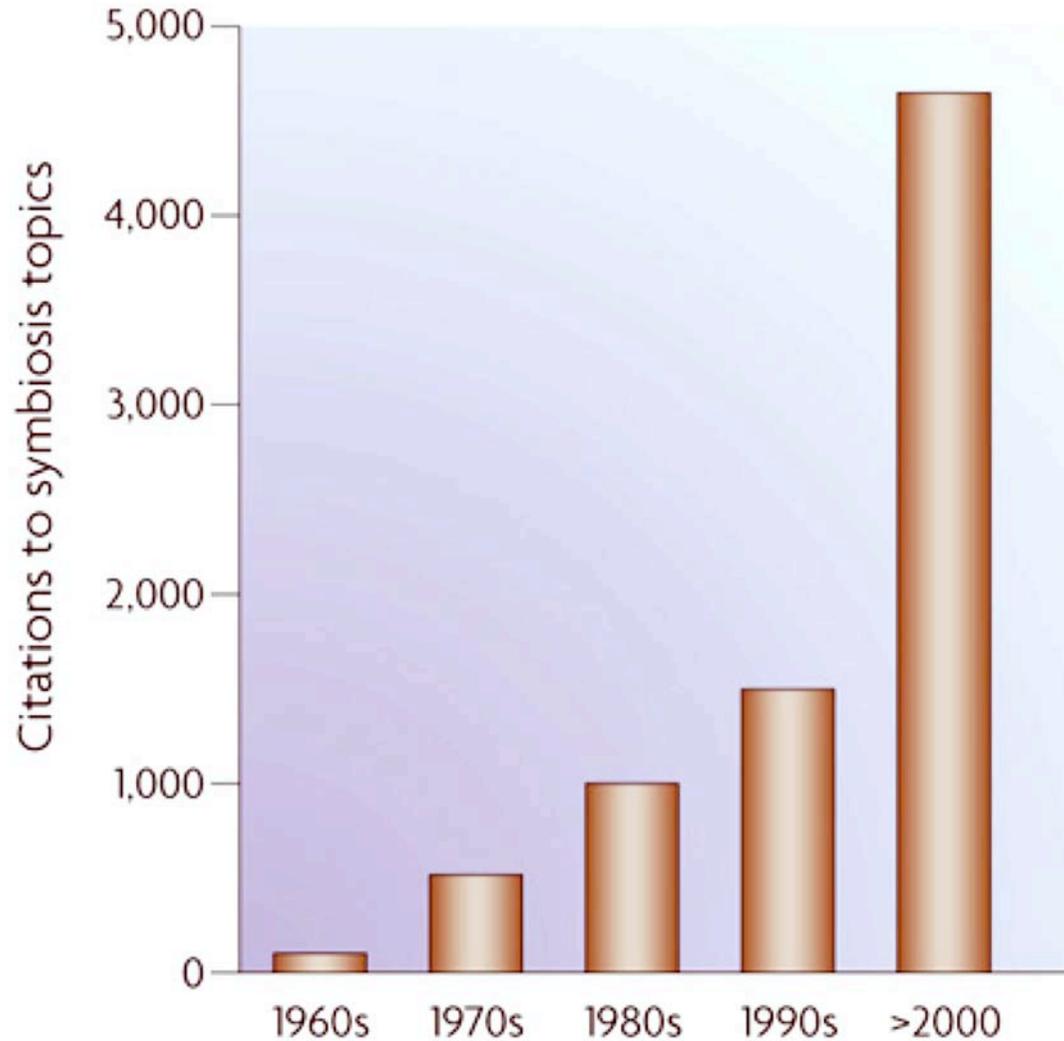


Symbiose

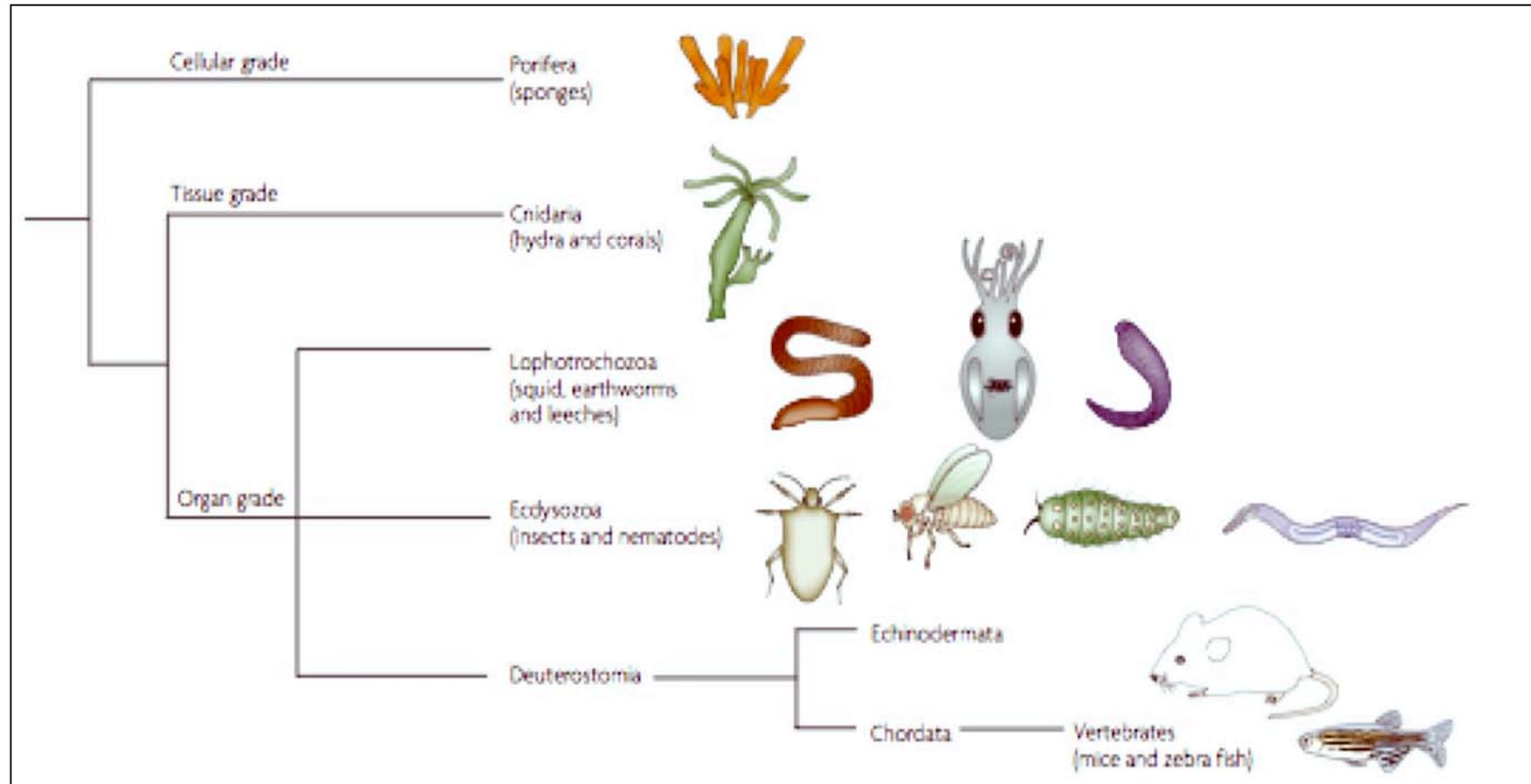


Mutualisme





Croissance rapide du nombre des publications dans le domaine de la symbiose ces 40 dernières années (McFall-Ngai M. 2008. *Nat.Rev.Microbiol.*, 6:789-792)

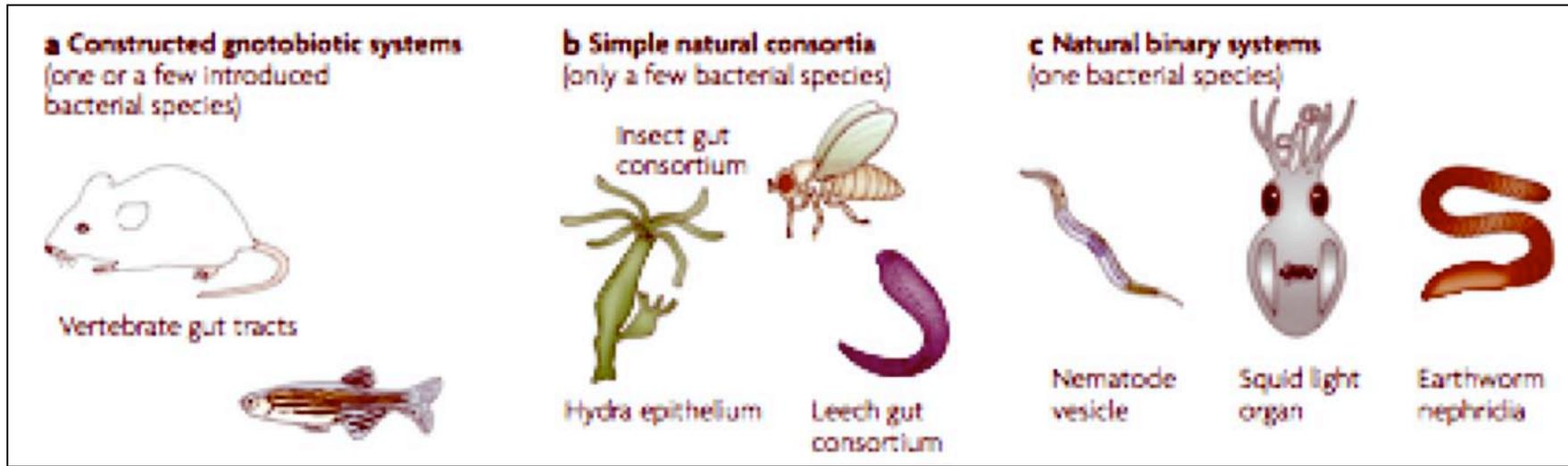


La diversité des associations symbiotiques touche l'ensemble des phyla du monde vivant (Ruby EG. 2008. Nat.Rev.Microbiol., 6:752-762).

La diversité peut inclure:

- Des associations dans lesquelles les bactéries assurent des fonctions conservées communes à de nombreux êtres vivants (ex.: digestion, immunité innée...)
- Des associations assurant des fonctions inhabituelles et très limitées à une espèce hôte (rétroillumination/bioluminescence)

Les 3 grandes classes de modèles de symbioses



a - Consortia complexes:
Flore intestinale/orale/cutanée/vaginale
nécessité de simplifier (axénie → gnotoxénie)

b - Consortia naturels « simples »

c - Interactions binaires

Les bactéries symbiotiques sont ubiquitaires dans le monde animal. Elles affectent:

Le développement (Braendle C et coll. 2003. PLoS Biol., E21
Koropatnick JA et coll., 2004. Science, 306:1186-1188)

La nutrition (Baumann P. 2005. Ann.Rev.Microbiol., 59:155-189
Backhed S et coll. 2005. Science, 315:1915-1920)

La reproduction et la spéciation (Hurst GD, Werren JH. 2001. Nat.Rev.Genet., 2:597-606;
Baudi C et coll. 2001. Trends Parasitol., 17:88-94)

La défense contre des ennemis naturels = effet de barrière
(Ducluzeau R, Raibaud P. 1969. Ann.Inst.Pasteur, 116:345-369;
Oliver KM et coll. 2005. PNAS, 102:12795-12800)

Le développement et la régulation de l'immunité
(Mac donald T & Monteleone G. 2005. Science, 307:1920-1925
Sansonetti PJ & Medzhitov R. 2009. Cell, 138:416-420)

Catégories de symbiotes

Deux paramètres importants:

L'ancienneté apparente de la co-dépendance hôte-symbiote.
L'intensité et l'étendue de cette co-dépendance.

Deux pôles:

Les symbioses anciennes dites « **symbioses primaires** » où le microorganisme vit dans un véritable « bactériome », un organe spécialisé au sein de l'hôte et dédié à l'exécution du processus symbiotique.

Les symbioses facultatives dites « **symbioses secondaires** » au cours desquelles le symbiote ne vit pas dans un organe spécialisé et n'est pas indispensable à la vie de l'hôte.

Situations intermédiaires +++

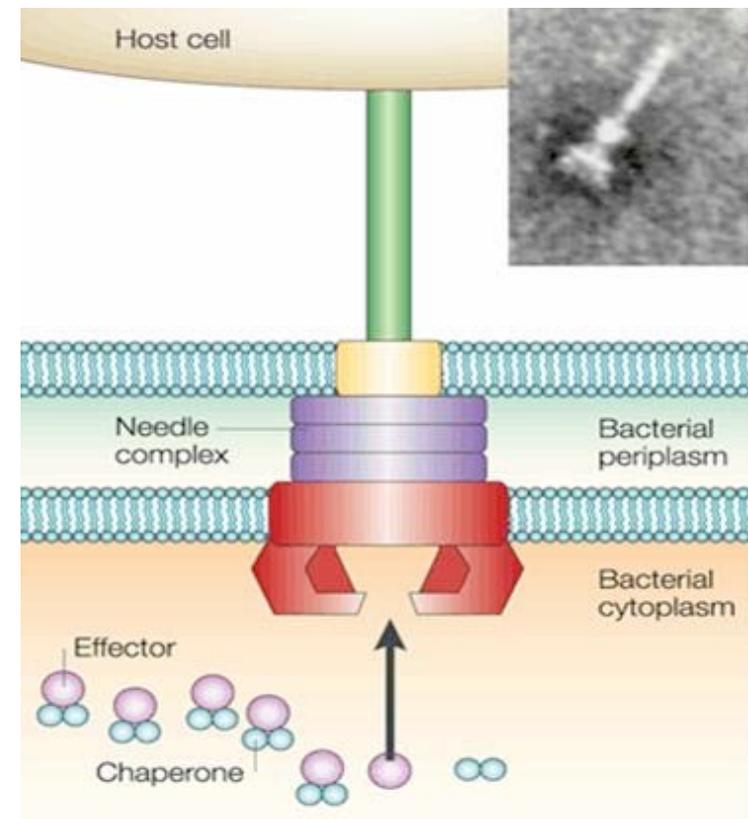
Plusieurs espèces symbiotiques peuvent co-exister chez le même hôte.

L'étude des bases génétiques, moléculaires et cellulaires du dialogue symbiotique est une nouvelle frontière de la biologie

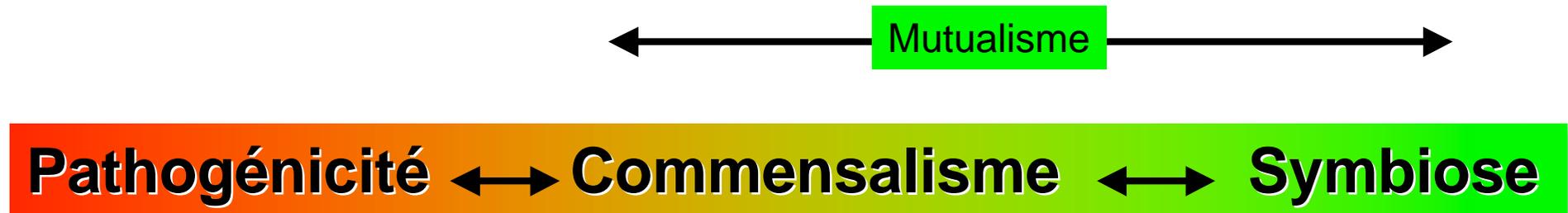
Devant le nombre croissant de relations symbiotiques découvertes, la distinction entre pathogénicité et mutualisme devient complexe à établir.

L'infection par une bactérie particulière peut être bénéficiaire dans certaines circonstances et délétère dans d'autres (autre hôte, autre environnement)

Les bactéries pathogènes et les symbiotes peuvent utiliser le même « noyau » de mécanismes moléculaires pour établir pathogénicité ou symbiose (ex.: appareils de sécrétion de type III ou de type IV)



Les bactéries symbiotiques et pathogènes partagent les mêmes logiques en regard de l'évolution



- Des mutations ponctuelles peuvent affecter la pathogénicité (Sokurenko et al., 1998, PNAS),
- L'acquisition horizontale de gènes est la base essentielle de l'évolution vers un phénotype pathogène: concept d'îlots de pathogénicité (Hacker & Kaper, 2000, Ann.Rev.Microbiol.)

- Ilôt de symbiose de 500-kb chez *Mesorhizobium loti* (Sullivan et al., 1998, PNAS)
- Ilot de symbiose codant pour un TTSS chez *Sodalis glossinidius*, assurant la symbiose avec la mouche Tse-Tse (Dale et al., 2001, PNAS)
- **Appareil de sécrétion de type IV chez *Wolbachia***

Symbiontes secondaires

La symbiose est récente et facultative

Transmission horizontale (comme une infection, mais survenant de manière quasi obligatoire dans l'environnement concerné)

L'hôte est naïf et viable à la naissance

Il va cependant tirer un avantage sélectif ultérieur à l'établissement de cette symbiose par rapport à des congénères non engagés dans la relation symbiotique. Ces effets positifs peuvent se faire sentir à court et à long terme:

- Effet métabolique et nutritionnel facilitant la survie dans une niche où certains nutriments sont en quantité limitante.

- Protection contre un certain nombre de stress et contre des pathogènes bactériens, fongiques, viraux, parasitaires

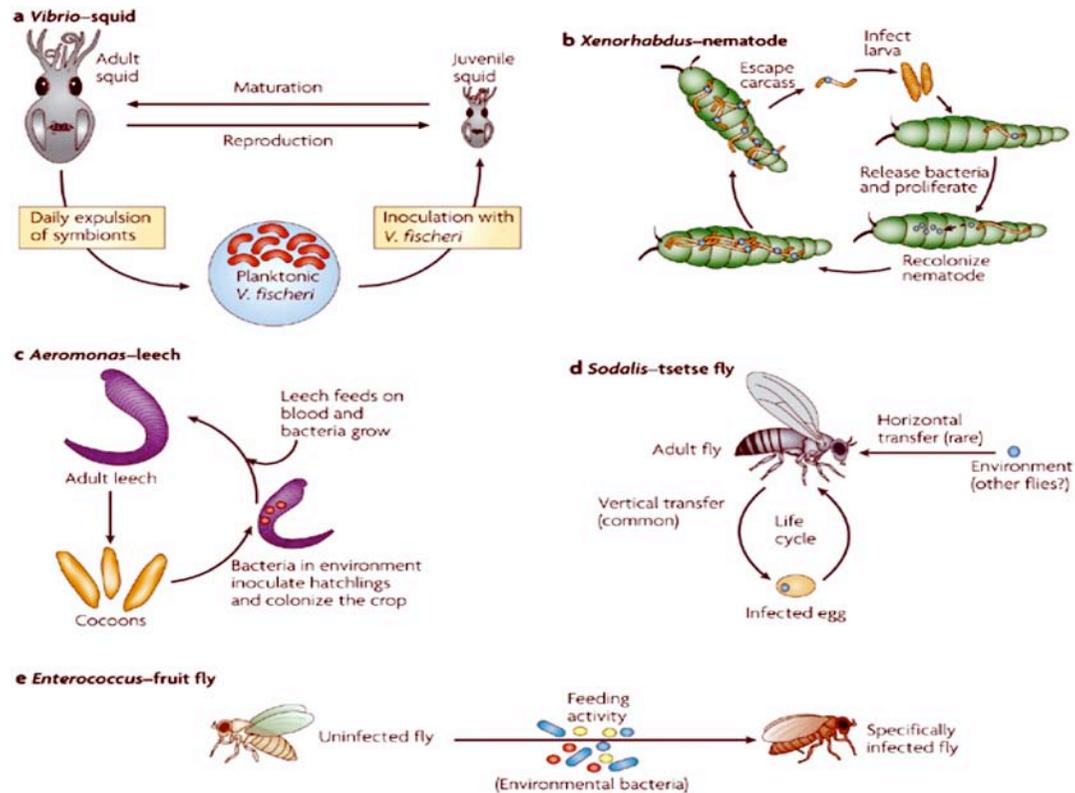
- Protection contre des prédateurs

- Effet sur la reproduction

Certains de ces modèles sont susceptibles d'analyse génétique tant chez l'hôte que chez le symbionte.

Ces modèles ont permis de faire considérablement progresser la compréhension des bases moléculaires des symbioses

Les 5 grands exemples de symbioses susceptibles d'analyse (bactéries cultivables *in vitro*), hôte viable en conditions axéniques



Dans chacune de ces symbioses, l'animal acquiert un symbiote spécifique qui colonise l'hôte dans un site Particulier.

a - Le calmar obtient ses symbiotes du milieu marin ambiant

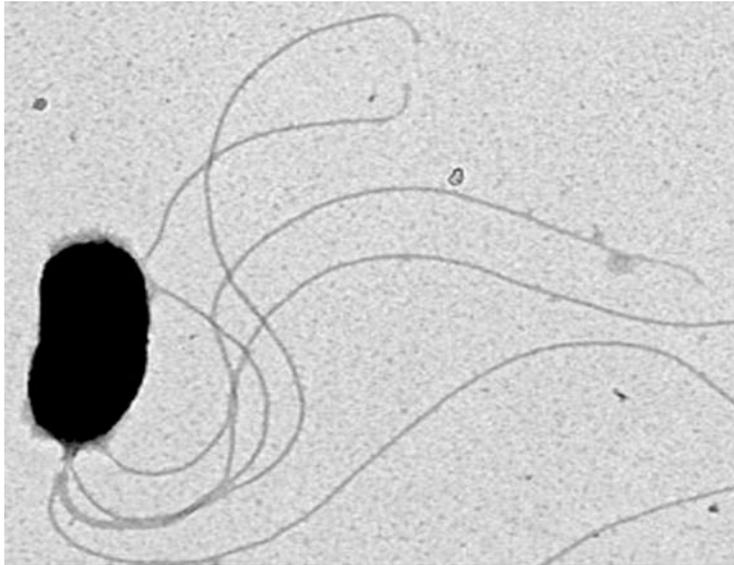
b - Le nématode apporte son symbiote dans la larve de l'insecte au sein de laquelle les deux prolifèrent.

c - Les jeunes sangsues obtiennent leur symbiotes du milieu ambiant à la sortie du cocon (peut être du cocon lui même), puis élisent résidence dans le bétail où elles vivent de leur repas sanguin.

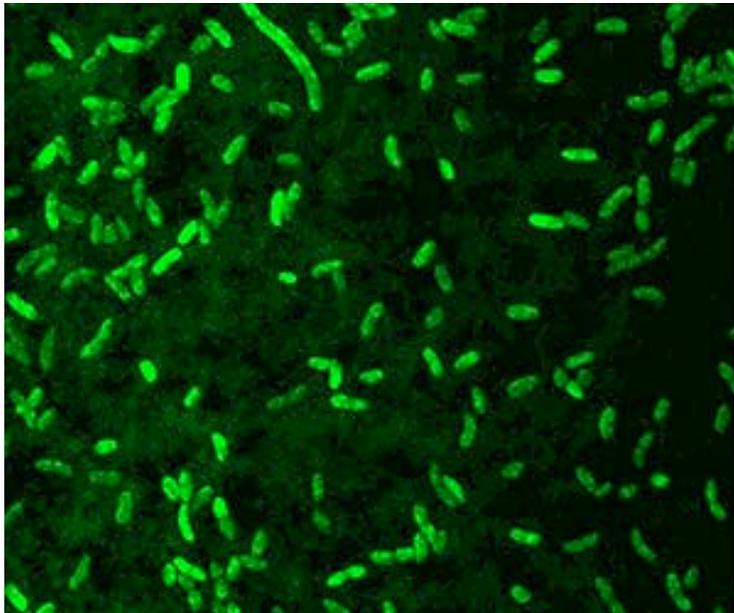
d - La mouche Tsé Tsé peut soit transmettre le symbiote via la mère par les œufs, ou récupérer de nouveaux symbiotes de l'environnement.

e - Chez la drosophile, des symbiotes spécifiques sont acquis à partir des fruits et colonisent le tube digestif de la mouche

Vibrio fischeri et *Euprymna scolopes* (Calmar sépiolide)



Vibrio fischeri



Euprymna scolopes



Les calmars sont aposymbiotiques, ils naissent sans *V. fischeri*.

V. fischeri est acquis secondairement par transfert horizontal à partir de l'environnement.

La viabilité des animaux axéniques jointe à la possibilité de cultiver *V. fischeri* et d'y développer une approche génétique (génomé séquencé, mutagénèse possible), en font un modèle de choix d'étude des symbioses secondaires

(Stable EB & Ruby EG. 2002. Meth.Enzymol., 358:413-426;
Ruby et coll. 2005. 2005. PNAS, 102:3004-3009;
Mandel MJ et coll. 2008. BMC Genomics, 9:138-142).

Vibrio fischeri et *Euprymna scolopes* (Calmar sépiolide)

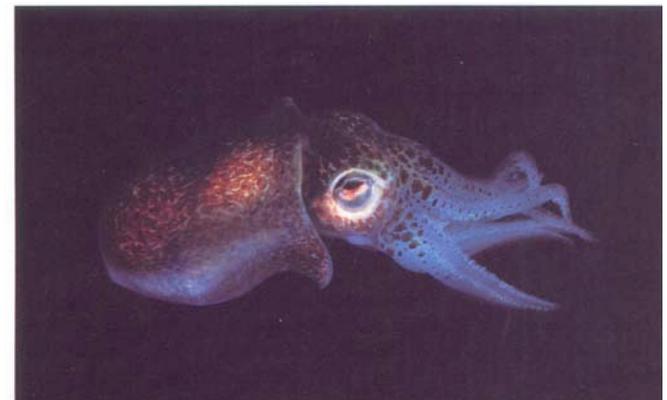
De nombreuses espèces animales sont bioluminescentes. La moitié génèrent leur lumière grâce à une activité symbiotique avec des bactéries luminescentes du genre *Vibrio* ou *Photobacterium*.

Euprymna scolopes utilise la luminescence émise grâce à l'**enzyme luciférase** produite par *Vibrio fischeri* pour un processus appelé contre-illumination (Jones BW et coll. 1998. Mar.Biol.,144:1151-1155).

Dans la journée le calmar vit enfoui dans le sable. Il sort la nuit pour se nourrir, son ombre entre deux eaux par rapport à la luminescence ambiante sous l'illumination de la lune en fait une proie, d'où l'avantage sélectif d'avoir établi une symbiose lui permettant d'émettre une luminescence qui le cache aux prédateurs.



La **luciférase** oxyde des composés organiques comme des aldéhydes à longues chaînes et la flavine mononucléotide (FMN) réduite, entraînant la libération d'énergie libre sous forme de lumière dans le vert



Trois éléments caractéristiques de la symbiose

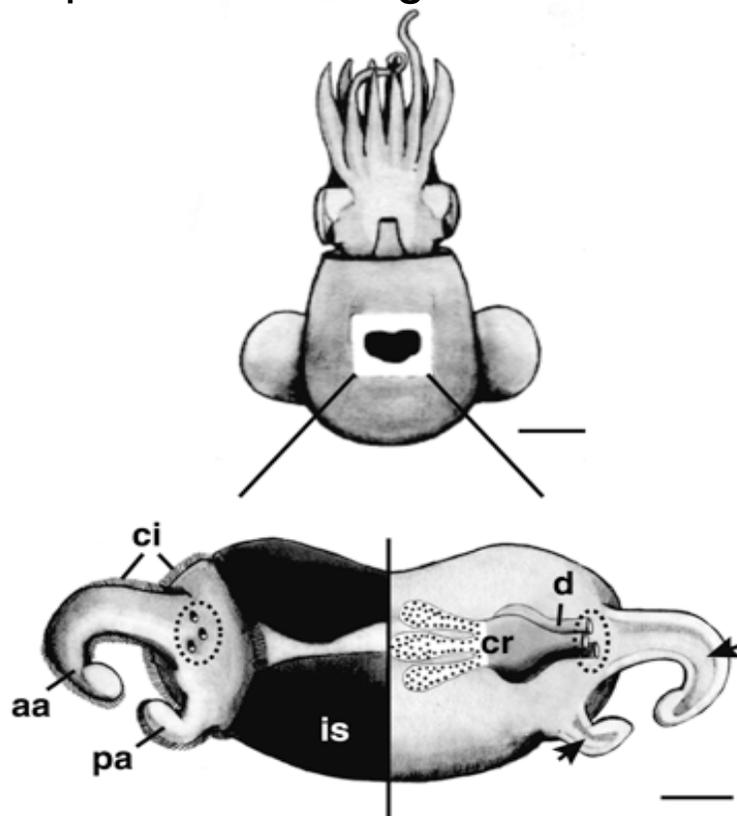
Spécificité de la colonisation de *E. scolopes*

Morphogénèse de l'organe lumineux induite par *V. fischeri*.

Régulation de l'émission de luminescence par quorum sensing



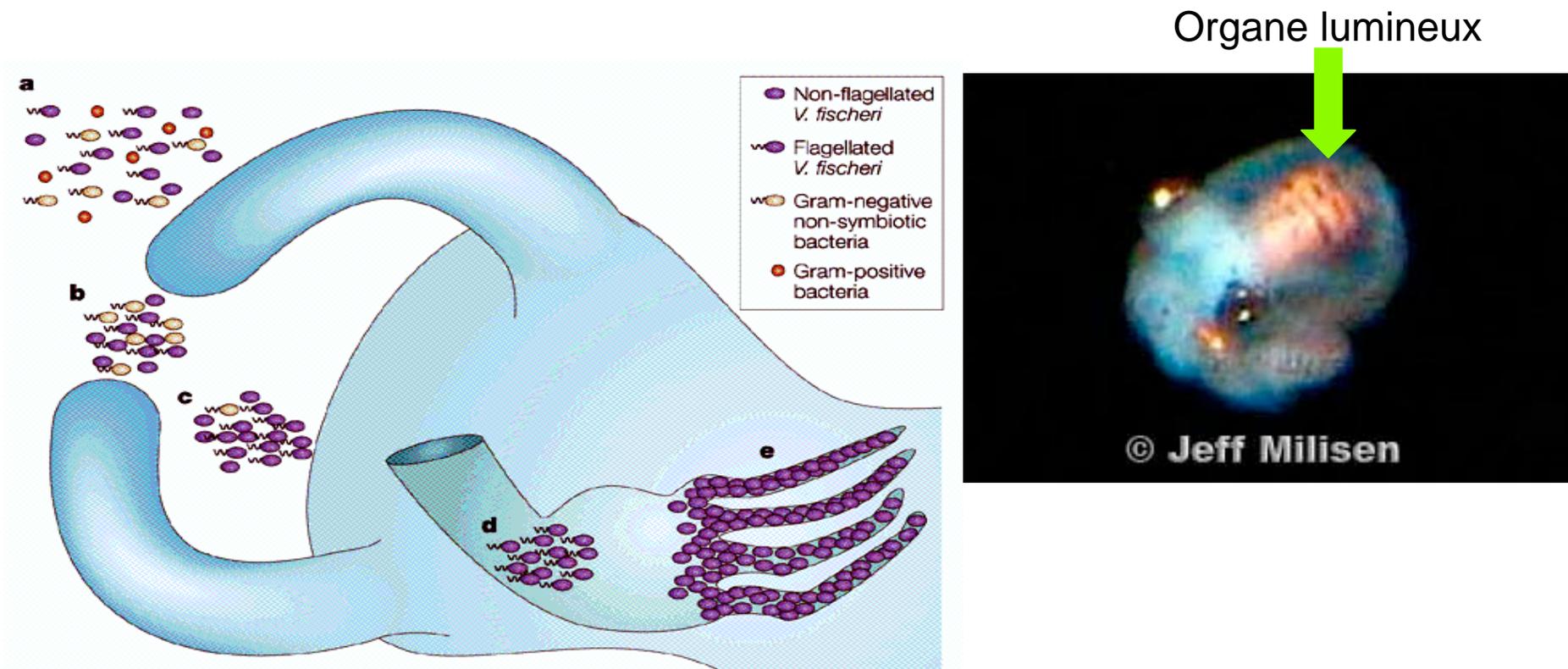
Margaret McFall-Ngai



Détails de la morphologie de l'organe lumineux:

A gauche: surface épithéliale ciliée (ci) composée d'excroissances antérieure (aa) et postérieure (pa) et d'une base avec trois pores s'ouvrant à la surface.

A droite: section frontale, montrant les cryptes (cr) contenant les bactéries qui vont coloniser les diverticules (d). La relation entre cryptes et conduits vers les pores (cercle). La section montre aussi (flèches) les sinus dans les excroissances. Barre = 150 μ m



Progression de la colonisation de l'organe lumineux par *V. fischeri* vue comme une série d'étapes aboutissant à la sélection du symbionte comme colonisateur unique.

a - En présence des bactéries Gram+ ou Gram- (vivantes ou mortes), le peptidoglycane bactérien entraîne un signal causant la sécrétion de mucus par la surface de l'épithélium cilié du jeune calmar non colonisé.

b - Seules les bactéries à Gram- viables planctoniques forment des agrégats denses dans le mucus excrété.

c - Dans ces agrégats, *V. fischeri* prend progressivement le dessus, à l'orifice des pores (*rcsS/syp*).

d - Seules les bactéries de l'espèce *V. fischeri* sont capables de migrer à travers les pores et les conduits pour coloniser les tissus de l'hôte.

e - Suivant la réussite de ce trajet, les symbiontes perdent l'expression de leur flagelle, deviennent immobiles et entraînent le gonflement des cellules épithéliales de l'hôte. Seuls les *V. fischeri* luminescents seront susceptibles de maintenir colonisation et symbiose sur le long terme.

La reconnaissance du calmar et non d'un autre hôte marin par *V. fischeri* est un phénomène spécifique.

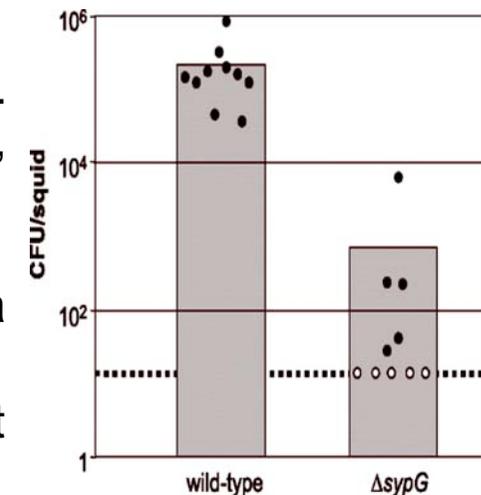
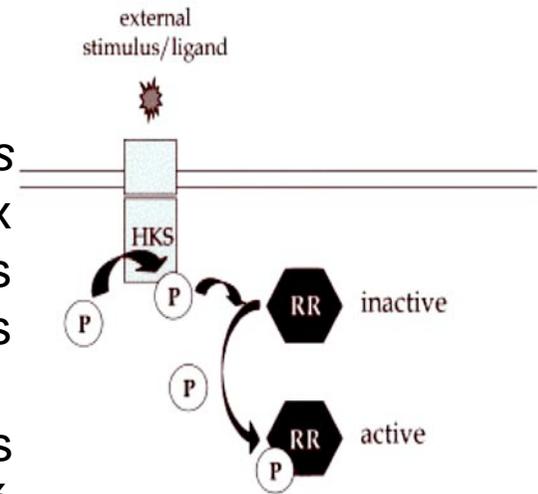
Les souches de *V. fischeri* adaptées à/colonisant *E. scolopes* possèdent un gène, *rcsS*, codant pour un système à deux composants RcsS (kinase) qui est absent du génome des souches de *V. fischeri* adaptées à des poissons vivant dans des environnements marins similaires.

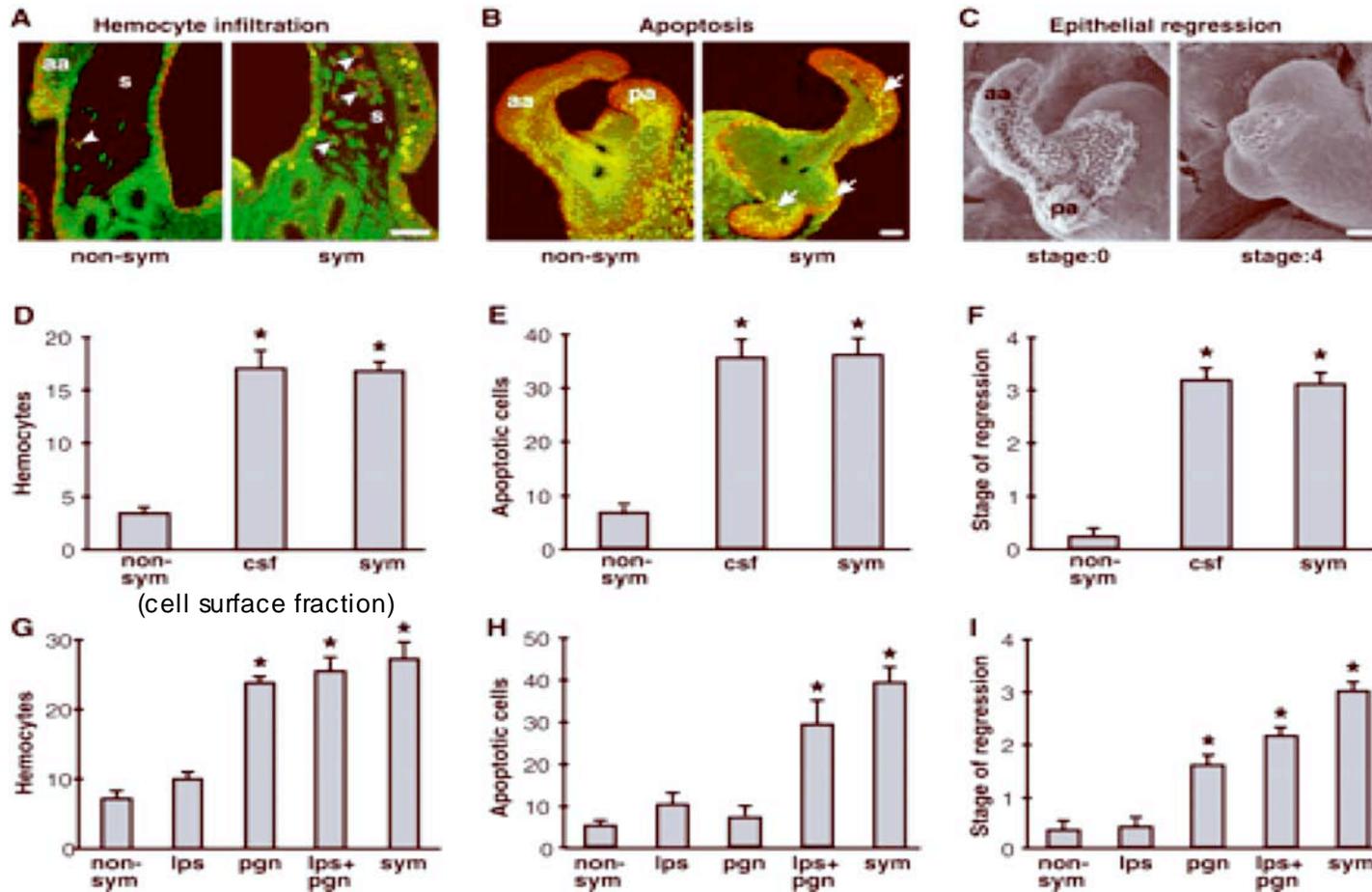
Ce système contrôle l'expression du gène *sypG* présent dans TOUTES les souches de *V. fischeri*, mais peu ou pas exprimé en l'absence de RcsS qui code pour l'expression d'un polysaccharide complexe sécrété (exopolysaccharide) qui participe à la formation des agrégats et à leur adhérence spécifique à l'orifice des pores (équivalent d'un biofilm).

(Yip ES et coll. 2005. Mol.Microbiol., 52:1586-1600; Hussa EA et coll. 2007. J. Bacteriol., 189:5825-5838; Hussa et coll. 2008. J.Bacteriol., 190:4576-4583; Mandel MJ et coll. 2009. Nature, 458:215-218)

D'autres modifications caractérisent le passage à la symbiose de *V. fischeri*:

- Modification de longueur des chaînes latérales du LPS et d'acylation du lipide A
- Perte de l'expression du flagelle



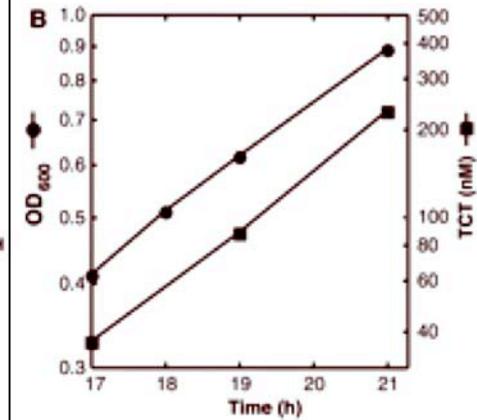
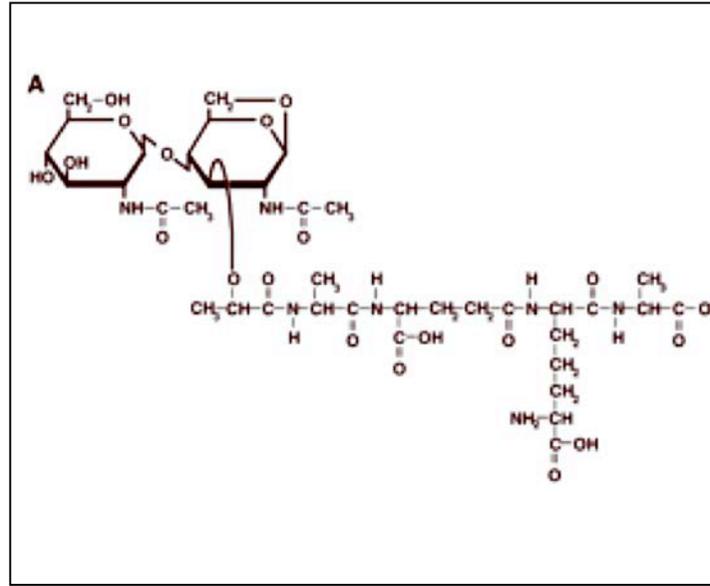
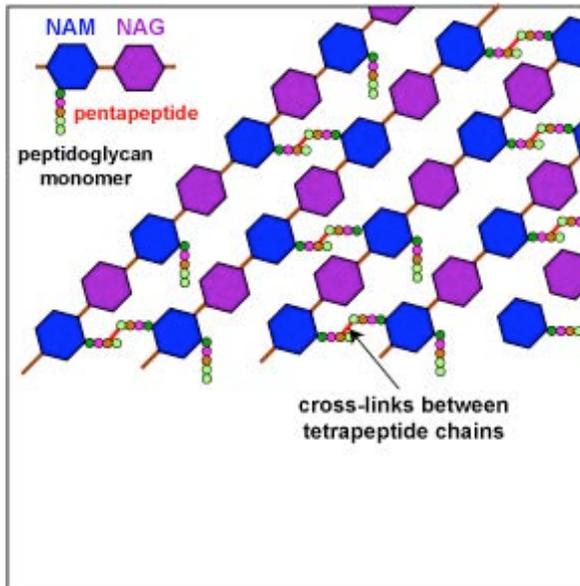


Koropatnick TA et coll. 2004. Science, 306:1186-1188)

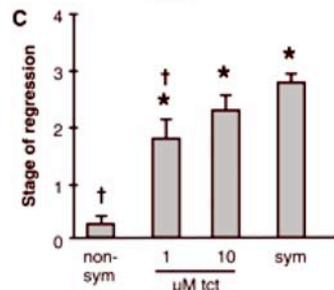
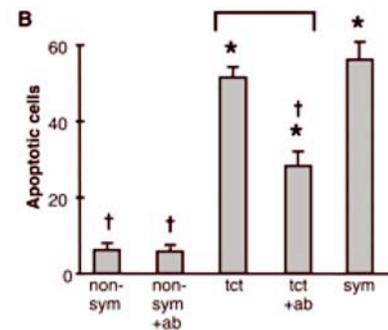
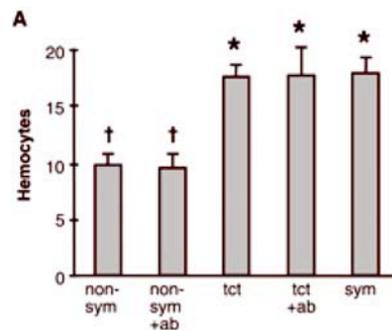
Effet des composants bactériens sur la morphogénèse de l'organe lumineux (effet conjugué du PGN et du LPS).

Recrutement des hémocytes dans l'organe lumineux.

Induction de l'apoptose entraînant la régression de l'épithélium cilié.



TCT (tracheal cytotoxin) est un mucopeptide (muramyl-tétrapeptide) libéré par le remodelage du peptidoglycane par la transglycosidase lytique.



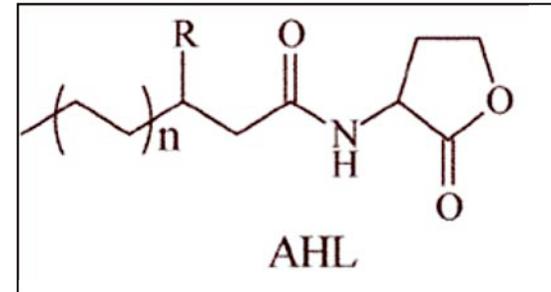
TCT induit la morphogénèse de l'organe lumineux.

En A & B, les animaux ont été exposés à TCT (10 μM) seul ou TCT et un anticorps monoclonal anti-LPS (ab, 1:500) afin de lier et séquestrer le LPS exogène. Scoring pour infiltration par les hémocytes (A) et l'apoptose cellulaire (B).

(C) Animaux exposés au TCT : scoring pour la régression épithéliale.

Les changements brutaux d'environnement et les conséquences physiologiques qui en découlent sont gérés par deux types de systèmes régulateurs:

- Les systèmes à deux composants
- **Le quorum sensing (QS)**



V. fischeri possède deux systèmes principaux de QS utilisant tous deux l'homosérine-lactone comme médiateur (Lupp C & Ruby EG. 2005. J.Bacteriol., 187:3620-3629).

AinS-AinR et LuxI-LuxR agissent séquentiellement avec un certain degré de recouvrement.

Les mutations dans ces deux système annulent la symbiose:

- Les mutants *ainS-R* colonisent plus lentement l'organe lumineux et à très faible niveau. 280 gènes sont régulés par la mutation *ainS* (flagelles, Acétyl CoA synthétase). Opère précocément, à faible densité, agit sur les étapes initiales de la colonisation.
- Les mutants *luxI-R* régulent positivement la luminescence. Leur mutation, ou celle d'un gène codant pour la luciférase (*luxA*) entraînent une perte du phénotype symbiotique. Effet au delà de la « rétroillumination »: induction du développement normal de l'hôte et de la capacité de coloniser de façon persistante. 18 gènes régulés par luxI-R (OMPs, protéases,...). Adaptation aux défenses de l'hôte ?

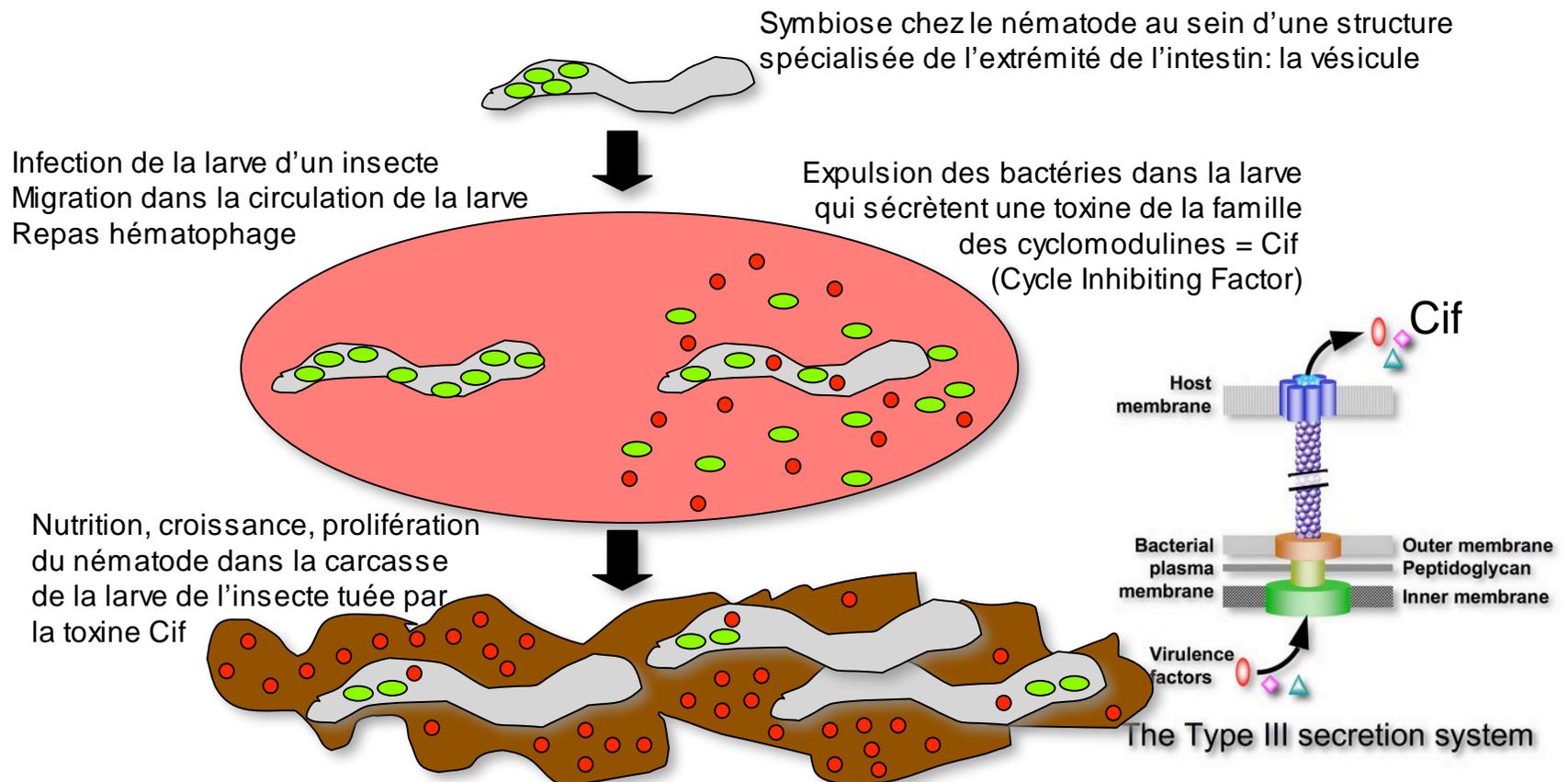
Xenorhabdus - *Photorhabdus* et nématodes

L'un des systèmes les plus adaptés à l'étude de symbioses bénéfiques est l'interaction entre les vers nématodes et deux genres bactériens appartenant à la famille des entéobactéries, *Xenorhabdus* et *Photorhabdus*.

- *Xenorhabdus* - *Steinernema* (Herbert EE et coll. 2007. Nat.Rev.Microbiol., 5:634-646)

- *Photorhabdus* - *Heterorhabditis* (Hallem EA et coll. 2007. Curr.Biol., 19:898-904)

Photorhabdus luminescens et nématode (Joyce SA et coll. 2006. Curr.Opin.Microbiol., 9:127-132)



Symbiontes primaires

La symbiose est ancienne: 30-270 millions d'années.

Leur arbre phylogénique suit étroitement celui de leur hôte.

Leur transmission est verticale (mère-enfants).

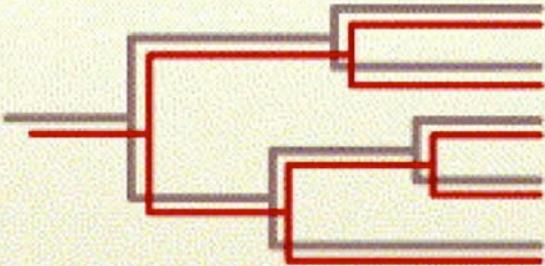
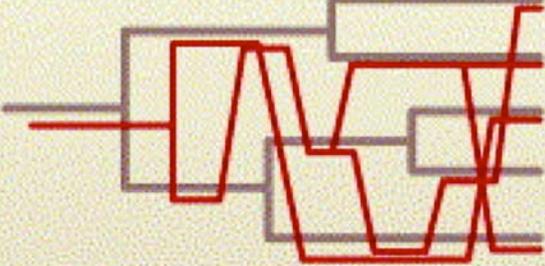
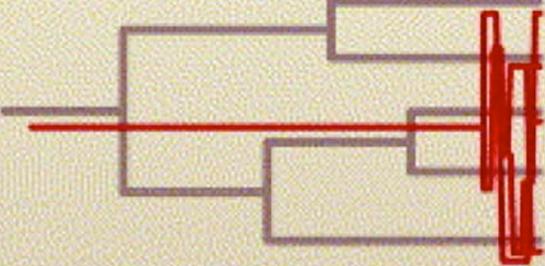
De nombreuses symbioses (insectes) précèdent l'apparition des mammifères

La conséquence « visible » est une altération massive de leur génome traduisant largement l'histoire naturelle de leur processus adaptatif.

Les génomes de petite taille ne semblent pas correspondre à une adaptation pour vivre dans l'hôte, mais plutôt la conséquence neutre, voire délétère, d'une co-évolution dans des conditions imposées par ce mode de vie: extinction de voies métaboliques devenues inutiles (anabolisme, catabolisme), réparation de l'ADN, transcription, traduction, etc...

Les hôtes se sont aussi adaptés pour ne pas rejeter et tolérer ces symbiontes, d'où des mécanismes différents d'adaptation par rapport à la pathogénicité.

Les processus adaptatifs à un symbionte peuvent même induire un état de résistance à des pathogènes (Scarborough CL et coll.2005. Science, 310:1781)

Evolutionary history	Features	Examples
	<p>Bacteriome-associated obligate symbiont Ancient codiversification of host and symbiont, no symbiont exchange among lineages</p>	<p><i>Buchnera aphidicola</i> <i>Wigglesworthia glossinidia</i> <i>Blochmannia</i> species <i>Baumannia cicadellinicola</i></p>
Symbioses primaires		
	<p>Ancient reproductive parasite Occasional horizontal transfer and recombination between hosts</p>	<p><i>Wolbachia pipientis</i> <i>Spiroplasma</i> species <i>Rickettsia</i> species</p>
	<p>Facultative symbiont Occasional horizontal transfer Recent coalescence of symbiont lineages Recent symbiotic origin</p>	<p><i>Hamiltonella defensa</i> <i>Regiella insecticola</i> <i>Serratia symbiotica</i> <i>Arsenophonus</i> species</p>
Symbioses secondaires		
<p>Time in millions of years → — Host lineage — Symbiont lineage</p>		



Profils distincts d'évolution des bactéries symbiotiques héritables chez les insectes

Les symbiotes primaires appartiennent pour l'essentiel à la famille des γ -protéobactéries

(Oliver KM et coll. 2003. PNAS, 100:1803-1807; Moran NA et coll. 2005.

Appl.Environment.Microbiol., 71:3302-3310; Scarborough et coll. 2005. Science, 300:1781)

Dans certains cas des symbiotes primaires (endosymbiotes) comme *Wolbachia*, *Spiroplasma*, *Rickettsia* manipulent la reproduction de l'hôte, ayant pour résultante d'augmenter la transmission verticale de ce symbiote par la mère:

Ceci peut s'effectuer en entraînant de véritables modifications du mode de reproduction:

- Parthénogénèse
- Mort sélective des embryons mâles (« son killing »)
- Féminisation des mâles génétiques
- **Incompatibilité cytoplasmique (CI) = incompatibilité de reproduction**

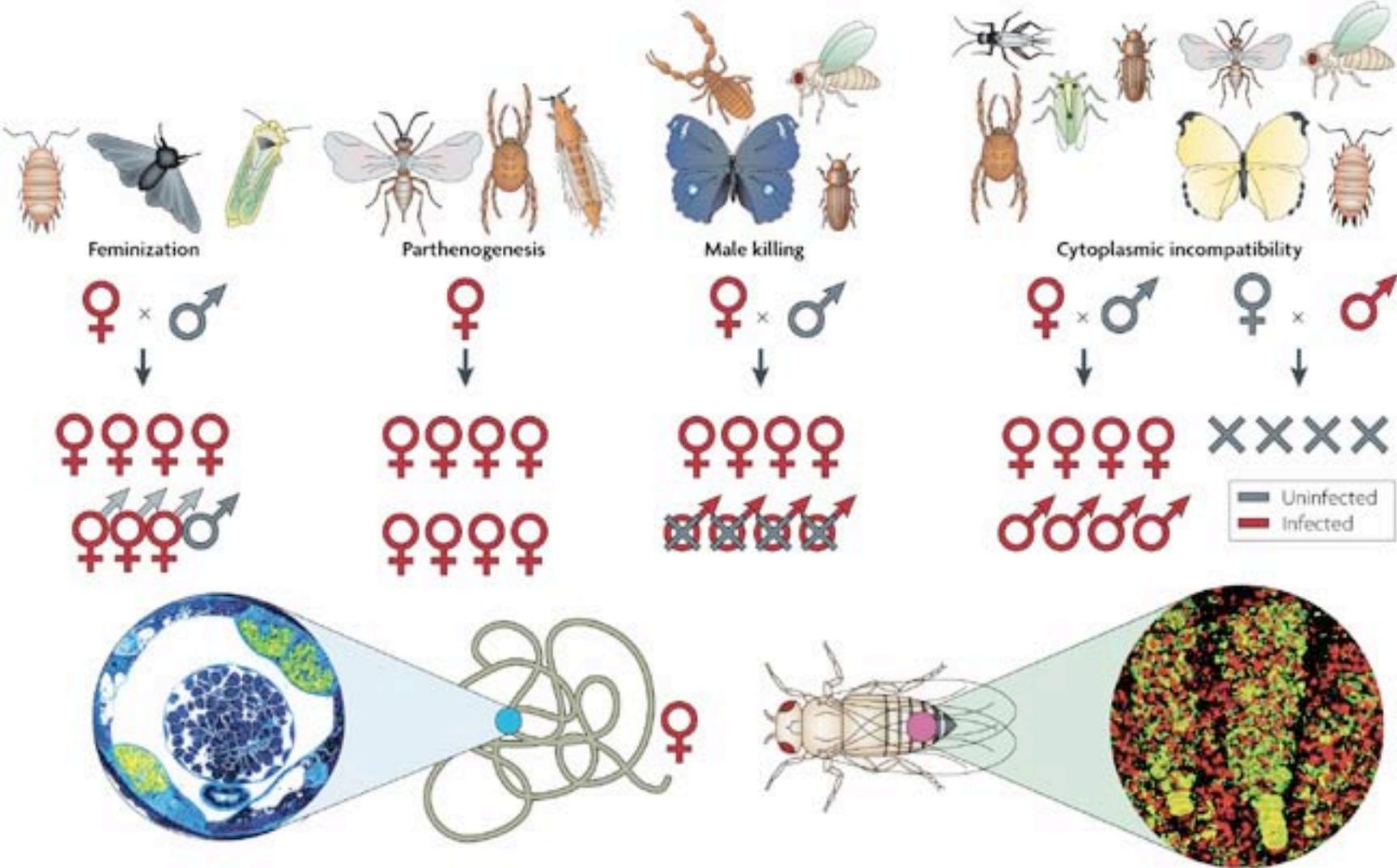
(Stouthamer R et coll. 1999. Ann.Rev.Microbiol., 53:71-102

McGraw EA & O'Neill SL. 2004. Curr.Opin.Microbiol., 7:67-70)

Augmentation de la représentation des lignages femelles qui portent l'agent microbien donc avantage d'augmenter la persistance du symbiote.

Par contre, perte de la contribution génétique des mâles, donc de l'apport de diversité génétique qui favorise la capacité d'adaptation, donc la survie de l'espèce hôte: « symbiotes égoïstes »

Modifications du mode de reproduction des insectes par les endosymbiontes



Génomes des symbiontes primaires

Bactéries non cultivables, parasites intracellulaires obligatoires.
Analyse génétique exceptionnellement possible. L'analyse des facteurs de la symbiose repose sur la connaissance du génome rendue possible par les progrès des techniques de séquençage et de culture de cellules d'insectes.

Les symbiontes primaires appartiennent essentiellement à la famille des γ -protéobactéries (proches des entérobactéries comme *E. coli*) et présentent une dégradation et une réduction massive de leur génome.

Exemples:

Buchnera aphidicola (590 gènes) →

Hôte = aphides (Shigenobu et coll. 2000)

Candidatus blochmania

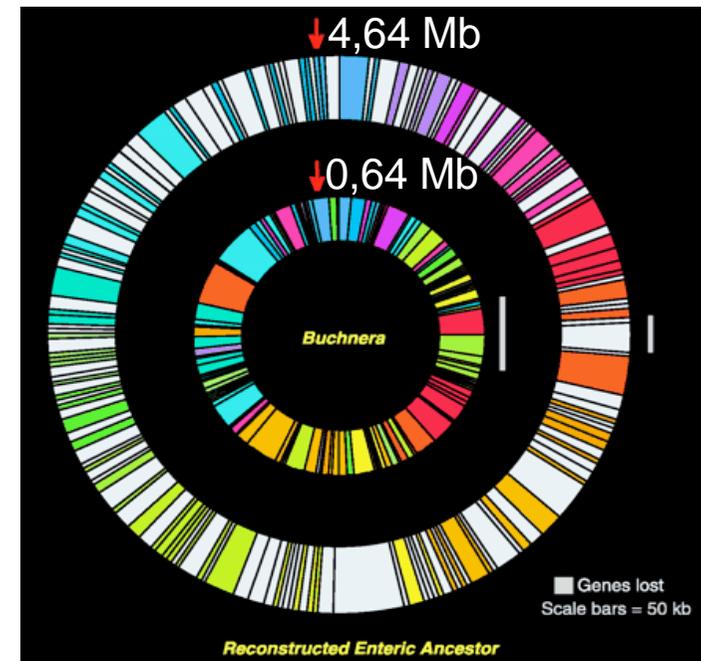
Hôte = fourmi (Gil et coll. 2004; Degnan et coll. 2005)

Wigglesworthia glossinidia

Hôte = mouche Tsé Tsé (Ackman et coll. 2002)

Candidatus banannia cicadenilicola

Hôte = sauterelle (Wu et coll. 2006)



Délétion génomique massive

Génome *d'E. coli*: environ 5 Mb soit 5000 gènes

Génome des endosymbiontes appartenant à la famille des γ -protéobactéries : environ 1 Mb soit 500 gènes, voire moins (Gomez-Valero L et coll. 2004.

J.Bacteriol., 186:6626-6633).

Par rapport au génome *d'E. coli*:

Pas de bactériophages ou résidus de génomes de bactériophages

Pas de séquences d'insertion

Pas d'évidence d'acquisition d'ADN étranger (GC % différent)

Pas d'évidence de gènes acquis

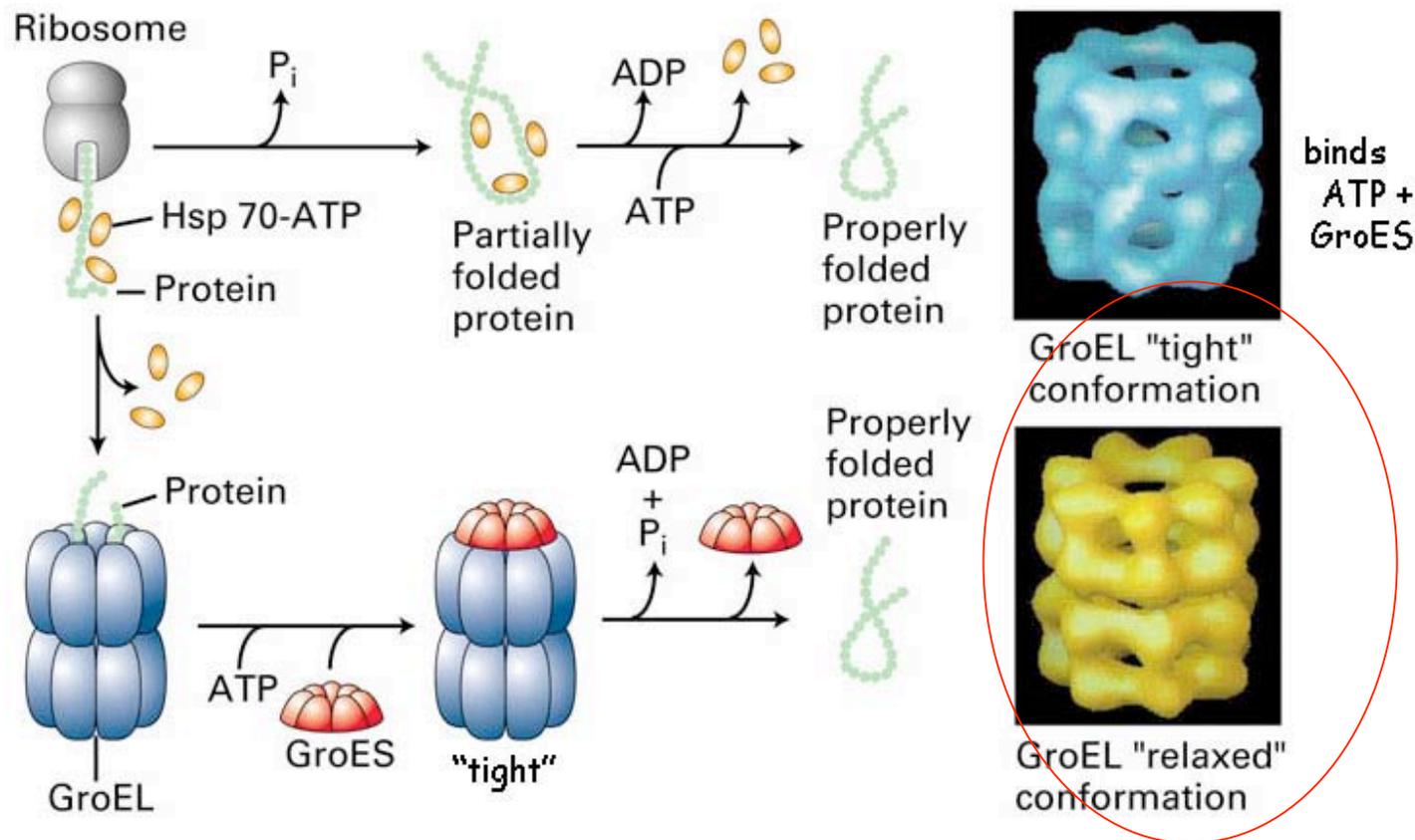
Peu de gènes de régulation

	régulateurs transcriptionnels	voies biosynth. acides aminés	régulateurs voies biosynth. aa
<i>E. coli</i>	200	10	16
<i>Buchnera</i>	<10	10	0 - 1

(Moran NA. 2005. J.Bacteriol., 187:4229-4237)

GroEL représente 10 % de la totalité des protéines synthétisées par *Buchnera*, même en conditions de non stress. Augmentation constitutive de la transcription d'autres chaperones (Wilcox JL et coll. 2003. Mol.Microbiol., 48:1491-1500). Cette observation indique qu'un contrôle très serré de la stabilité et du repliement des protéines est essentiel à la survie de ces microorganismes à génome minimum.

Rôle des chaperons GroEL et GroES dans le repliement des protéines



Le pool de « gènes vitaux » d'*E. coli* (gènes dont la mutagenèse est impossible car létale pour le mutant en culture) représente 10 % du génome (ou un peu plus), soit environ 500 gènes.

Nombre proche du génome des endosymbiontes.

Le génome des symbiontes est-il réduit à un « core génome » correspondant au pool de « gènes vitaux » d'*E. coli* ?

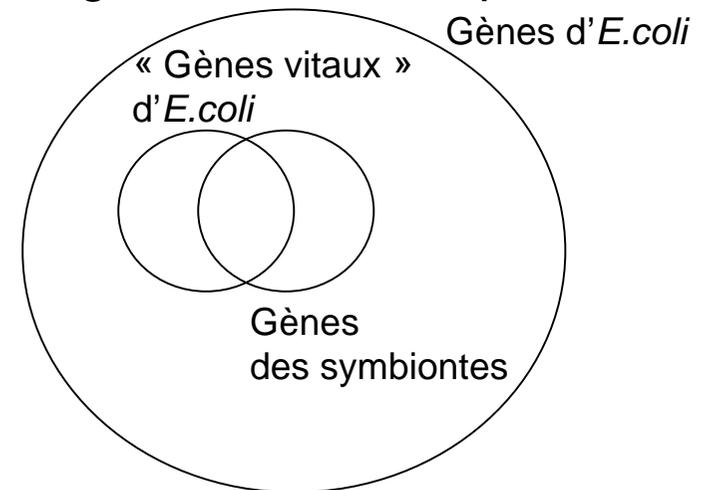
OUI et NON...

Beaucoup des « gènes vitaux » sont présents chez les symbiontes, mais des pourcentages variés en sont absent au profit d'autres gènes.

Partant du principe de parcimonie

et considérant que dans un environnement

stables les gènes inutiles vont être à terme éliminés, on peut dire que le pool de « gènes vitaux d'*E. coli* représente le pool de gènes nécessaires à la croissance *in vitro* en milieu de culture, alors que les gènes des symbiontes représentent les gènes nécessaires à la vie dans les conditions environnementales où se situe la symbiose.

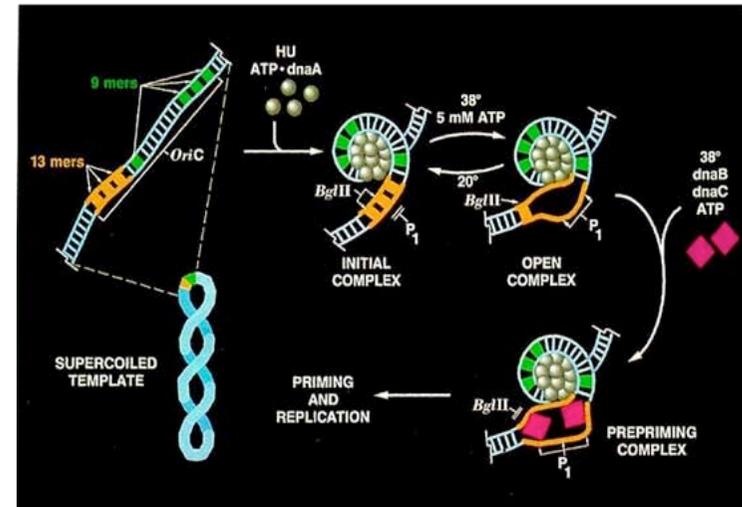


Exemples de différences entre les « gènes vitaux » d'*E. coli* et le génome minimum des symbiontes:

- *dnaA* est un « gène vital » chez *E. coli* qui permet l'initiation de la replication du chromosome chez la bactérie. Ouverture des 2 brins à *oriC* (ATP-dépt.), région riche en AT.

- *dnaA* est absent chez *Wigglesworthia* et *Blochmannia*.

- Survie microbienne assurée par un mécanisme enzymatique de l'hôte ?
- Transfert de gènes microbiens et expression dans le noyau des cellules de l'hôte ?
- Autres ?



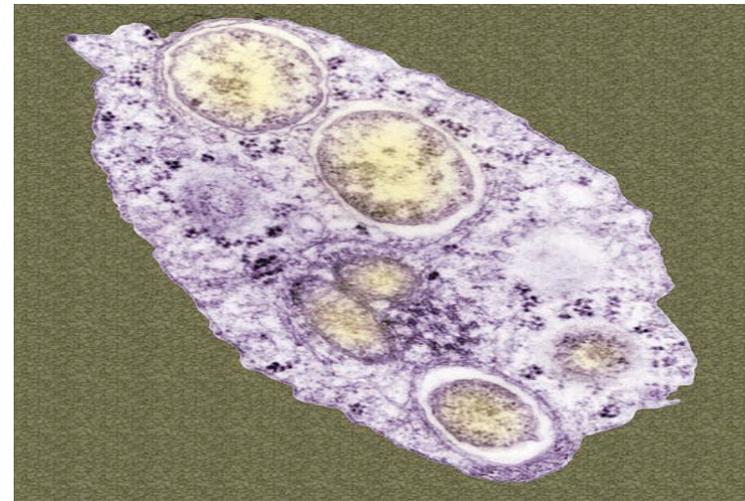
Buchnera n'a ni *recA*, ni gènes de synthèse des phospholipides.

Les bactéries du genre *Wolbachia* (BG-) sont des parasites intracellulaires obligatoires (endosymbiontes) retrouvées:

Chez les nématodes (filaires)

Chez les arachnidées

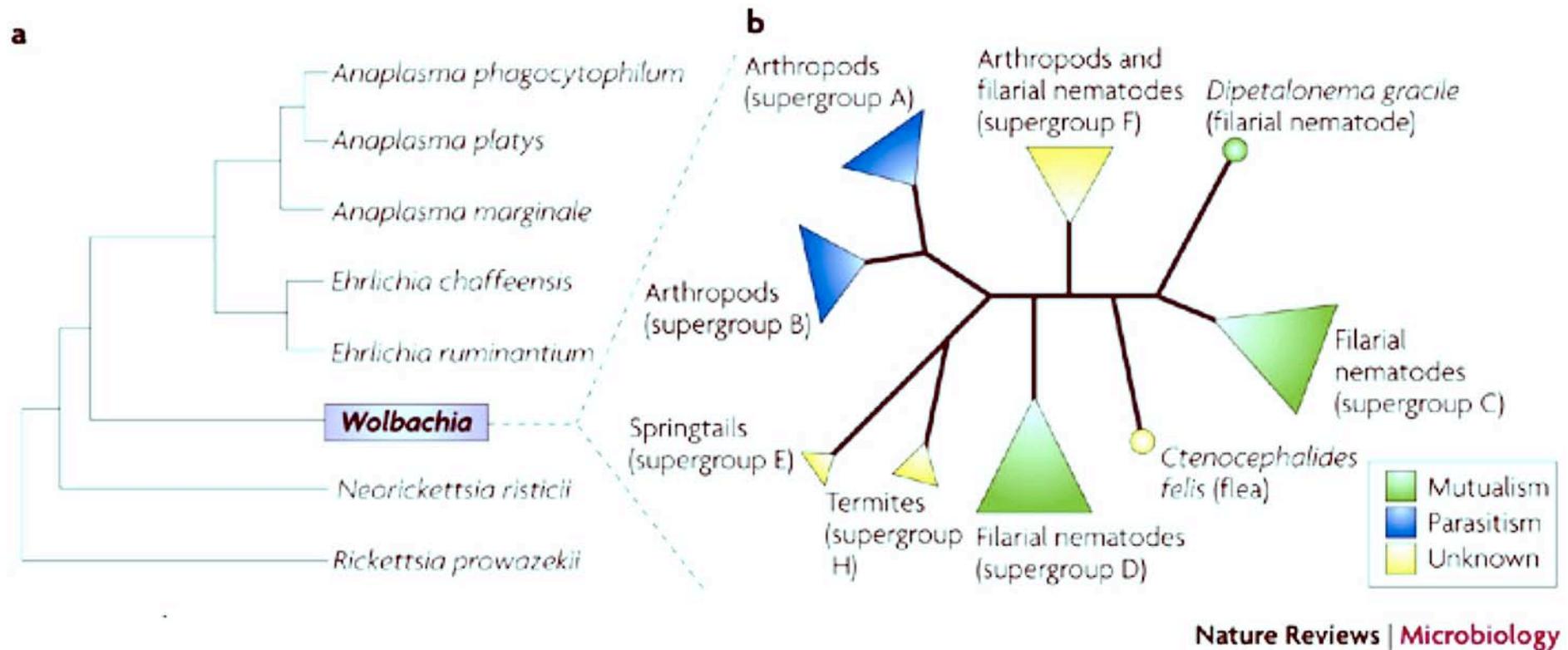
Chez les crustacés



Chez les insectes (60 % de l'ensemble des espèces connues !)
Wolbachia infecte de nombreuses espèces de moustiques,

Mais curieusement pas les « grandes espèces vectrices » de maladies transmissibles à l'homme comme *Aedes aegypti*.

Distribution des bactéries du genre *Wolbachia* chez les insectes



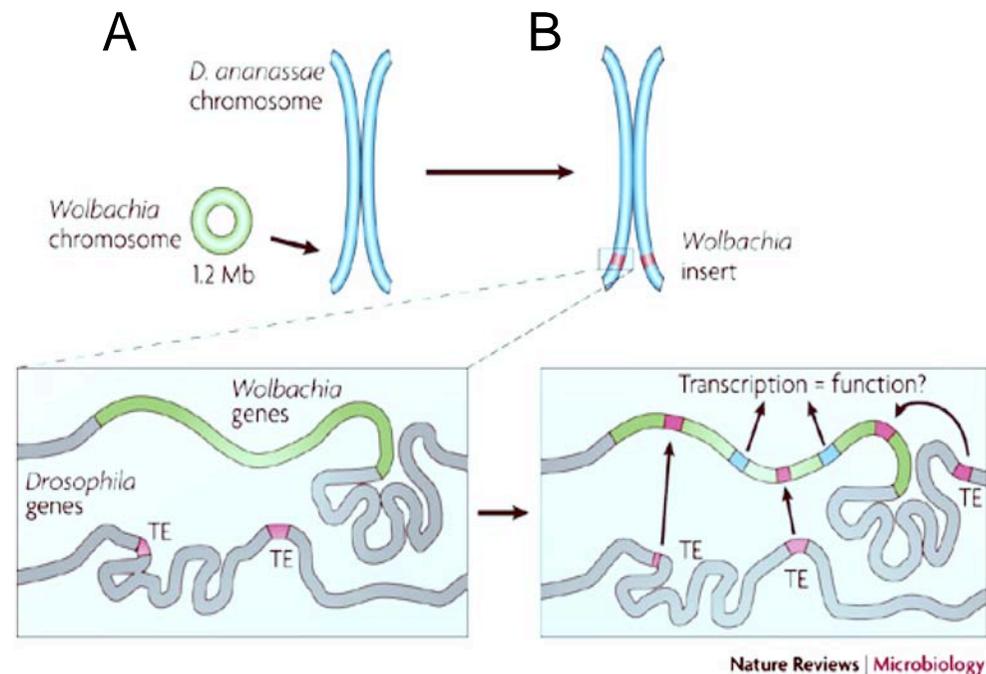
Présence de *Wolbachia pipientis* dans les lignées germinales de nombreux insectes avec les conséquences observées sur la fécondité et la féminisation indiquait la possibilité d'échanges horizontaux

Evidence par mégaséquençage de la présence de fragments de génomes de *Wolbachia* chez quatre espèces d'insectes et trois espèces de nématodes. Depuis 500 bp (1 gène) jusqu'à 1 Mb (génome entier)

Conséquences ?

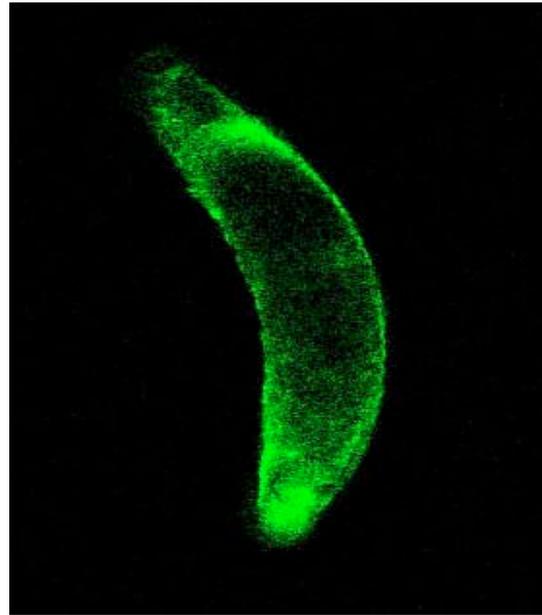
A - Dégradation progressive par mutations neutres. Pas de rôle dans l'évolution du génome.

B - Apport de nouvelles fonctions: promoteurs ou signaux de processing de l'ARN.

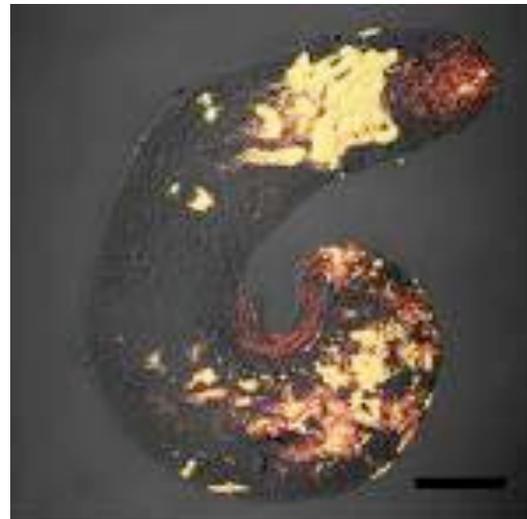
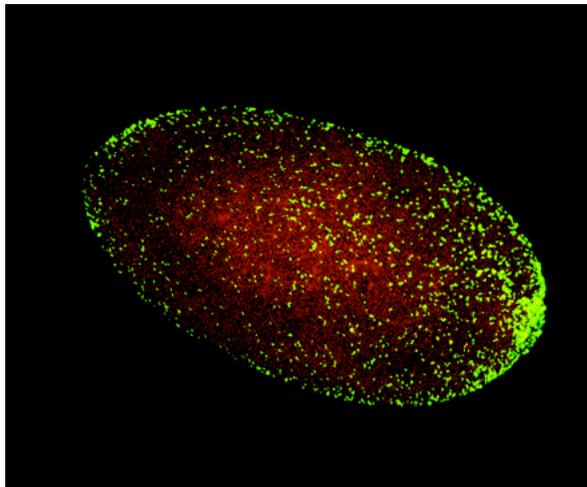


Drosophila ananassae a intégré une copie complète d'un génome de *Wolbachia* dans son propre génome. Travail collaboratif de l'Université de Rochester et TIGR (Hotopp JC et coll., 2007. Science, 317:1753-1756).

Préalablement, le groupe de Fukatsu à Tokyo avait montré la présence d'un gène de *Wolbachia* dans le génome d'une coccinelle (*Callosobruchus chinensis*) chromosome X (Kondo N. 2002.PNAS, 99:14280-14285).



GFP-*Wolbachia*
Dans un embryon de
sauterelle



GFP-*Wolbachia*
Dans les testicules d'un
embryon de drosophile

***Wolbachia* est un endosymbionte hérité maternellement qui infecte une large gamme d'invertébrés.**

Wolbachia est associée à plusieurs types d'altération de la reproduction =

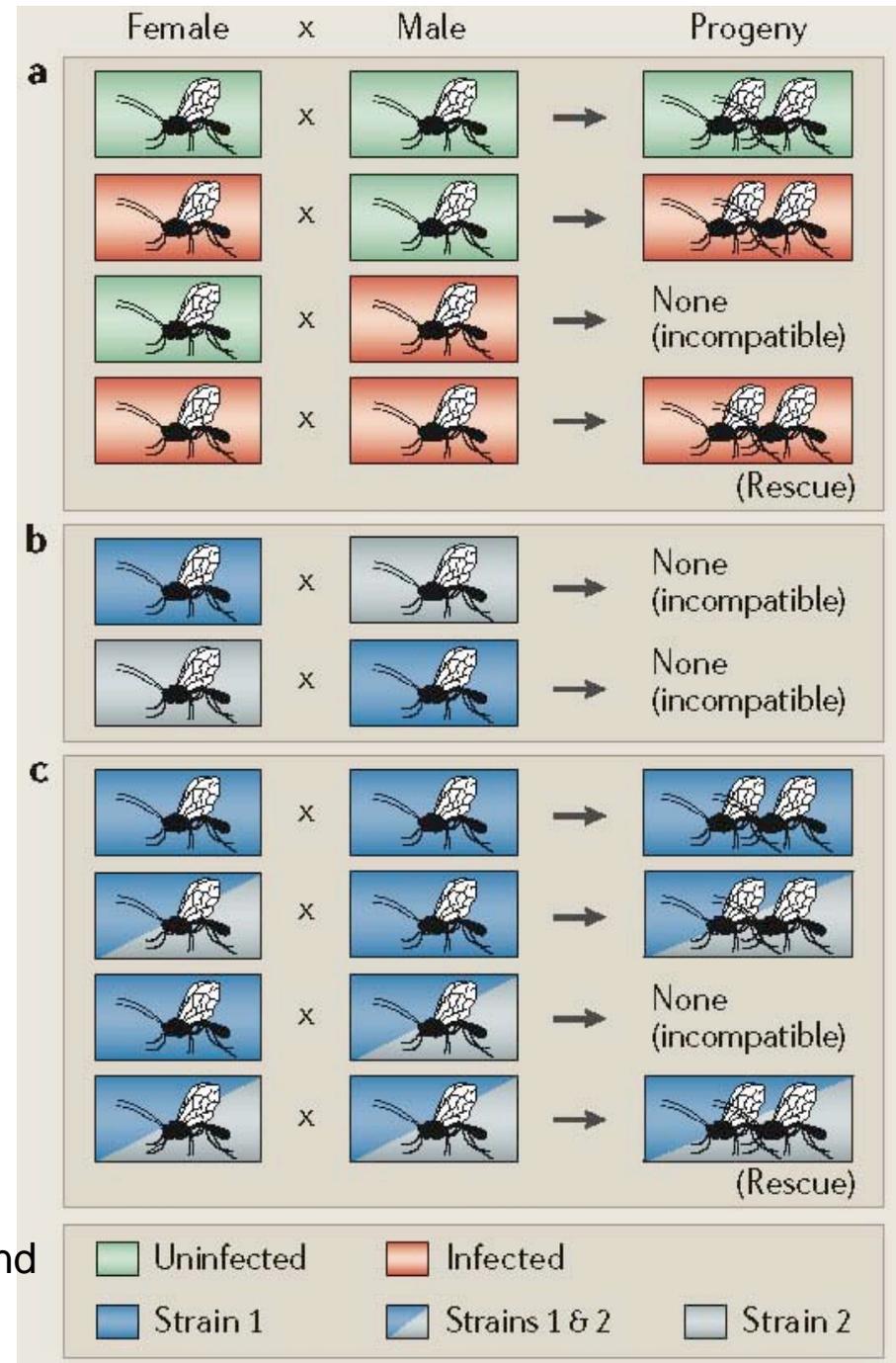
Incompatibilité cytoplasmique (CI)

- La descendance résultant du croisement de mâles infectés et de femelles non infectées est partiellement, voire complètement stérile.
- Les croisements impliquant des femelles infectées produisent toujours une descendance infectée.
- Ceci engendre un ratio en faveur des animaux infectés au sein de la descendance.
- Au total, *Wolbachia* est capable de disséminer rapidement au sein d'une population d'insectes en dépit d'un coût d'adaptation.

a - CI unidirectionnel

b - CI bidirectionnel

c - Une surinfection par une seconde souche de Wolbachia va permettre la dissémination du second microorganisme comme un CI unidirectionnel (a)



Bases moléculaires du CI mal connues...

Les *Wolbachia* sont de véritables biologistes cellulaires. En interagissant avec les microtubules des oocytes de l'insecte porteur, elles régulent leur nombre et position subcellulaire (Ferree et coll. 2005. PLoS Pathogens, 1 e14)

Wolbachia exprime deux fonctions distinctes et dépendantes du sexe:

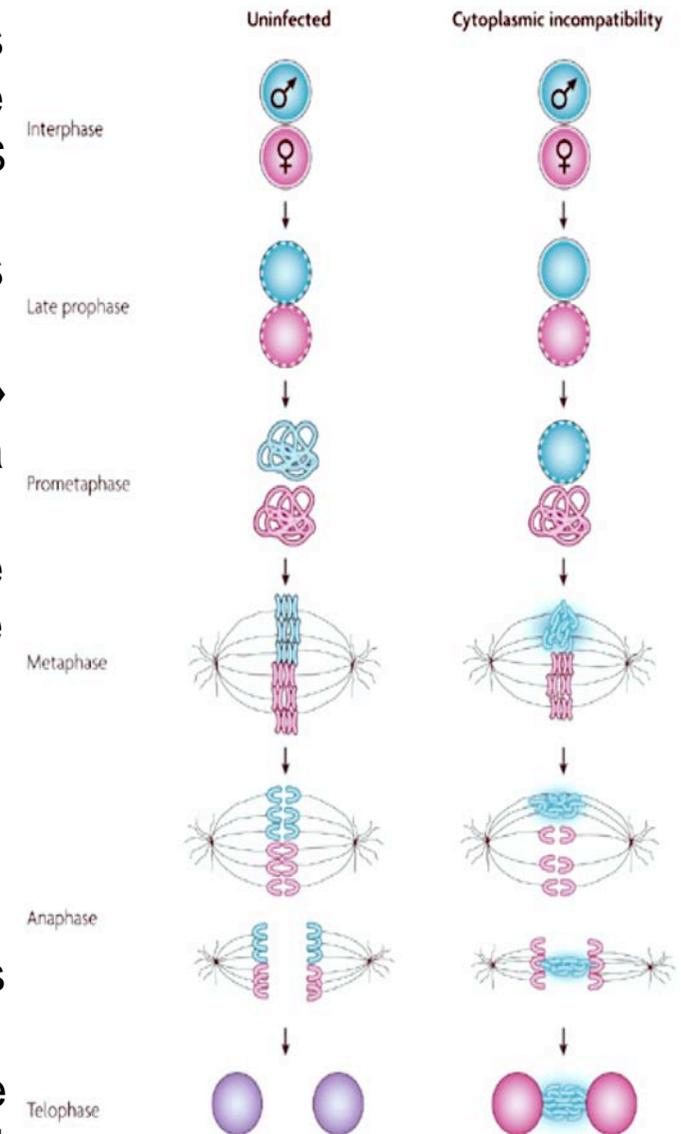
- Chez les mâles, *Wolbachia* assure une « empreinte » sur les chromosomes paternels au moment de la spermatogénèse (fonction *mod*).

- Chez les femelles, la présence de la même souche de *Wolbachia* est capable de restaurer la viabilité embryonnaire (fonction *resc*).

Sur la base de la capacité d'une souche de *Wolbachia* d'induire *mod* ou *resc* chez un hôte donné, chaque souche peut être classée dans une de ces 4 catégories: *mod+* *resc+*, *mod-* *resc+*, *mod-* *resc-* et *mod+* *resc-*.

Le dernier phénotype « suicide » n'existe pas naturellement.

Les capacités *mod* et *resc* de différents isolats de *Wolbachia* ne correspondent pas à des variations d'une seule paire de gènes. Il existerait de nombreux déterminants de *rescue/resc* (Zabalou S et coll. 2008. *PLoS Pathogens* 4(11): e1732-1745-1746)

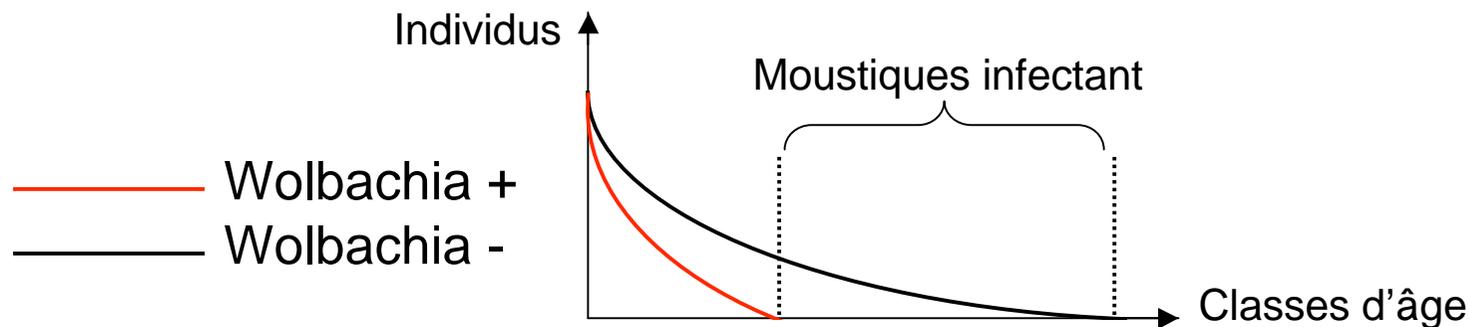


Utilisation de *Wolbachia* dans la lutte antivectorielle

Contrôle de la densité des vecteurs:

- Construction et production de mâles incompatibles avec les populations naturelles.
- Dissémination de transgènes.

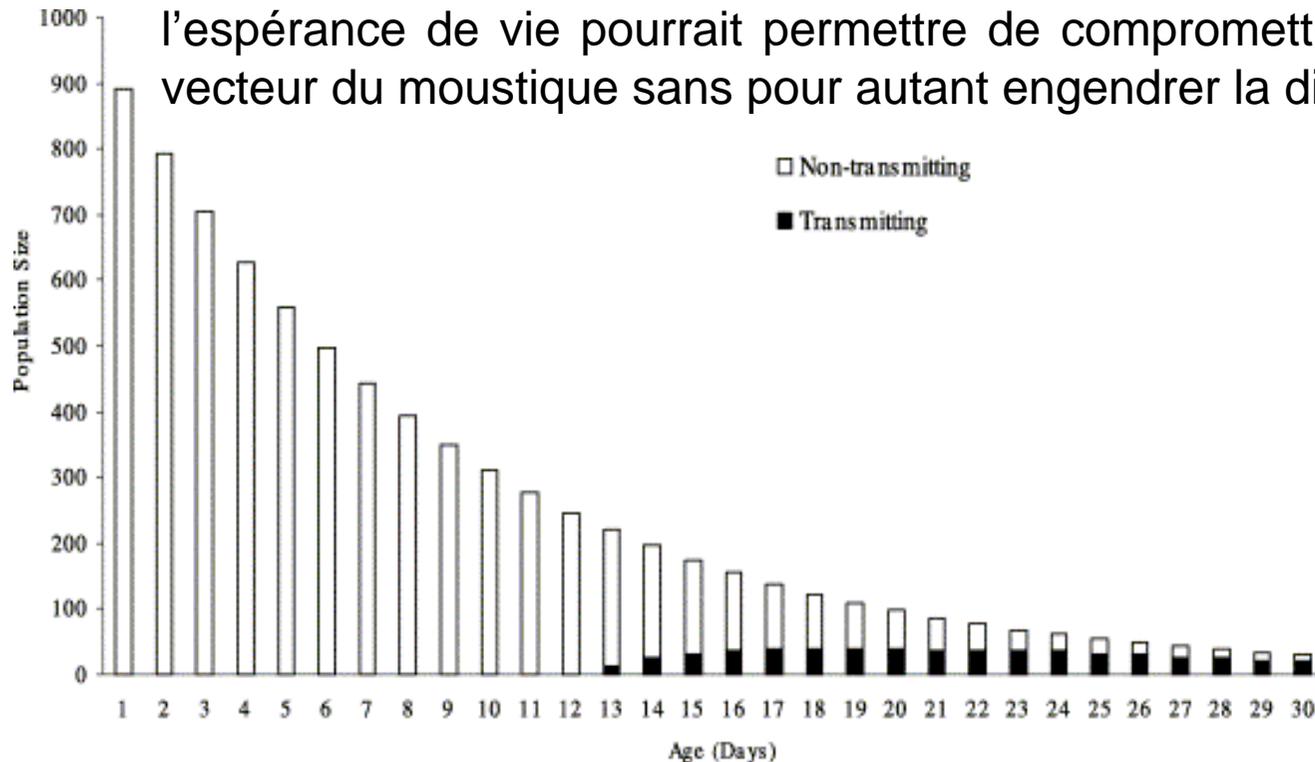
- Diminution de l'espérance de vie des vecteurs par *Wolbachia* pathogène. Les vecteurs arthropodes de maladies humaines virales et parasitaires (arbovirus, *Plasmodium*...) n'hébergent pas en général l'endosymbionte *Wolbachia*.



- Augmentation des défenses innées du moustique retardant l'implantation de l'agent infectieux vectorisé (virus, parasite)

La période d'incubation des virus et des parasites dans les moustiques vecteurs comme *Aedes aegypti* est longue par rapport à l'espérance de vie de l'insecte.

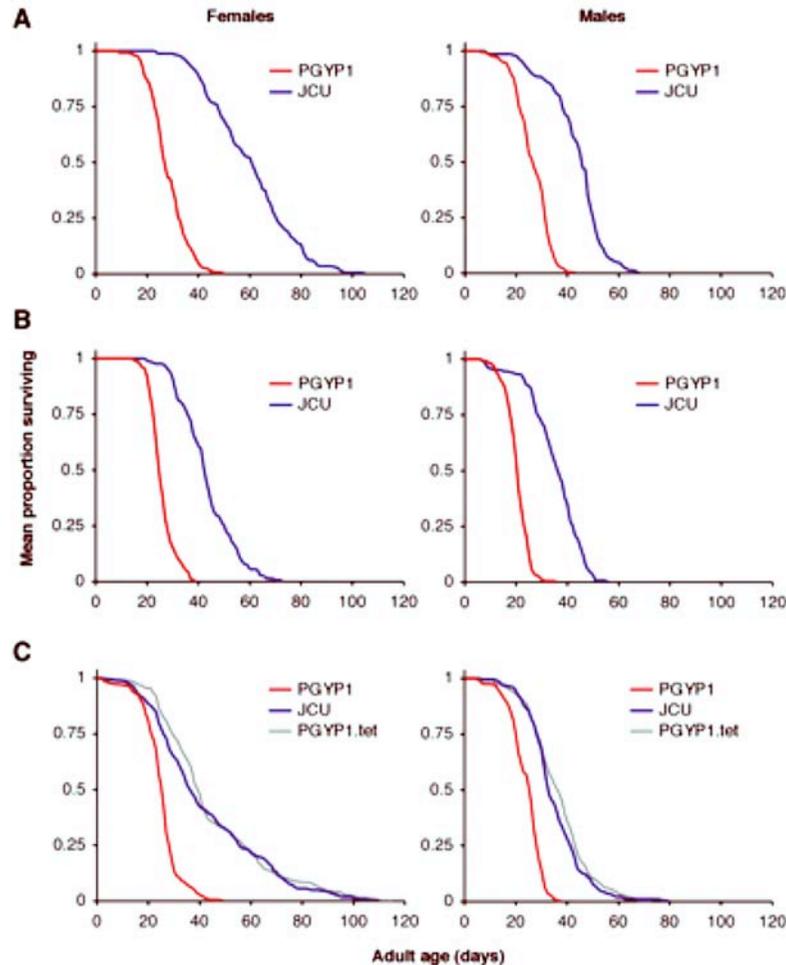
Wolbachia qui peut infecter la population d'*A. aegypti* et en réduire l'espérance de vie pourrait permettre de compromettre les compétences de vecteur du moustique sans pour autant engendrer la disparition de l'espèce.



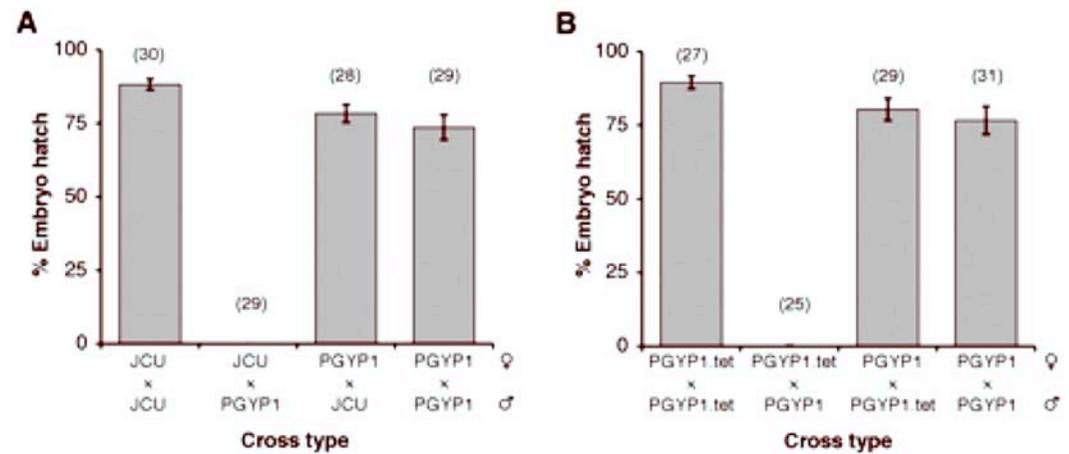
Courbe de survie de *A. aegypti* montrant la relation entre l'âge adulte et la proportion de la population de moustiques capable de transmettre le virus de la dengue. On assume une population initiale de 1000 femelles, une survie quotidienne de 89 %, une période d'incubation du virus de 12 jours et la probabilité de rencontrer un hôte virémique de 6 %.

Brownstein JS et coll. 2003. J.Invertebr.Pathol., 84:24-29

A. aegypti a été infecté avec succès par une souche de *Wolbachia* de Drosophile: wMelPop-CLA.



Survie de la souche d'*A. Aegypti* PGPY1A infectée par la souche wMelPop de *Wolbachia* (rouge), de la souche non infectée (bleu) et d'une souche infectée traitée par la Tétracycline (gris)



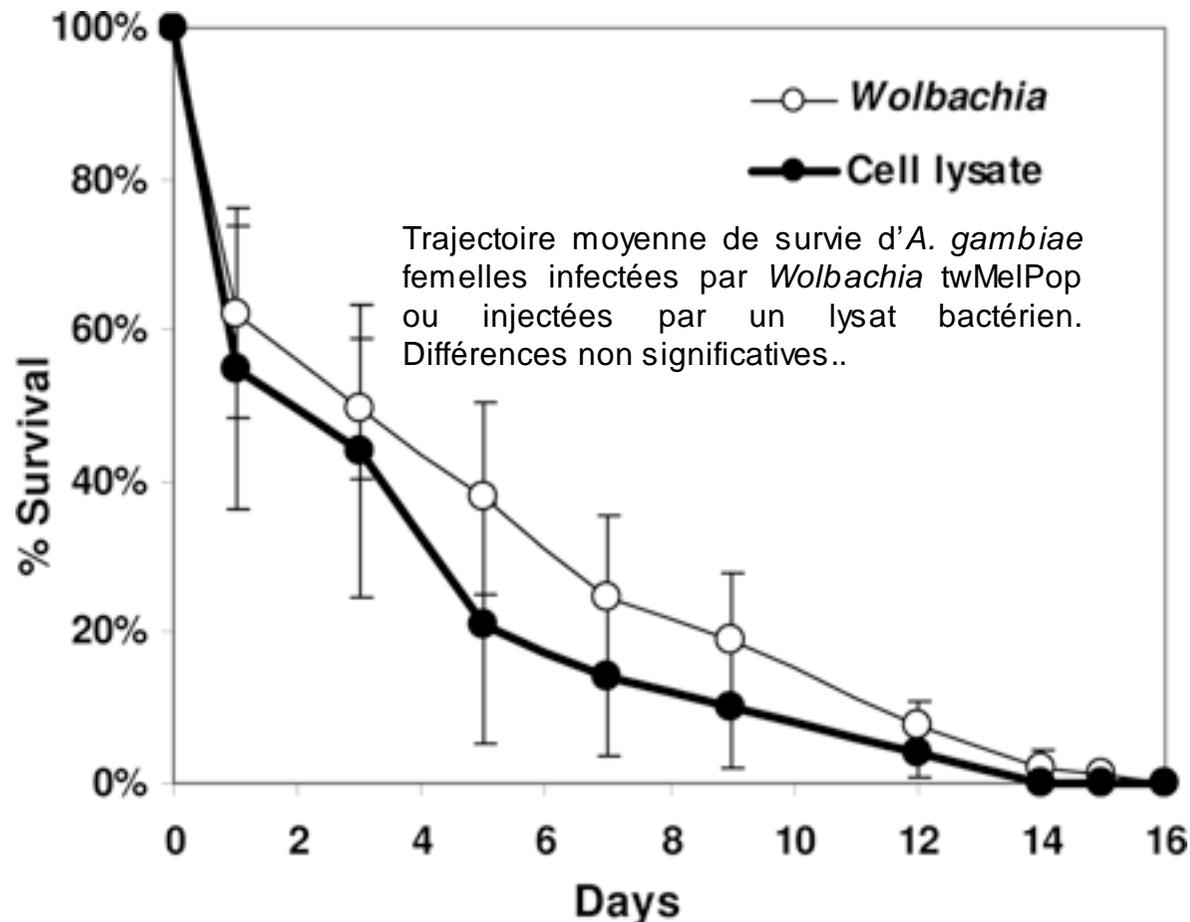
CI induite par *Wolbachia* PGPY1A au cours du croisement de la souche d'*A. aegypti* infectée par la souche wMelPop avec:

- (A) La souche JCU naturellement non infectée.
- (B) Une souche traitée par la tétracycline.

Introduction d'une souche de *Wolbachia pipientis* (wMelPop) capable de réduire la durée de vie d'*A. aegypti*, le moustique vecteur du virus de la Dengue.

Mais...

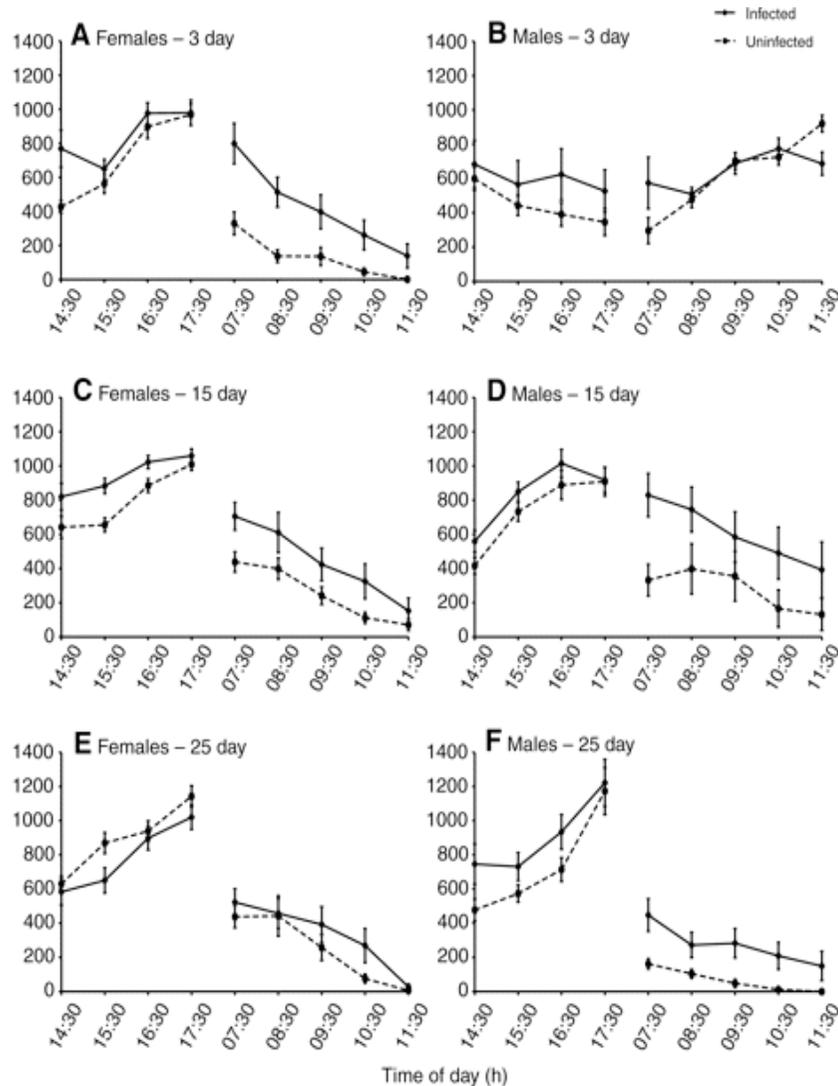
Des exceptions apparaissent: chez *Aedes albopictus* (vecteur du Virus Chickungunya), une souche de *Wolbachia* augmente la fécondité des femelles (Dobson SL et coll. 2002. Genetics, 160:1087-1094)



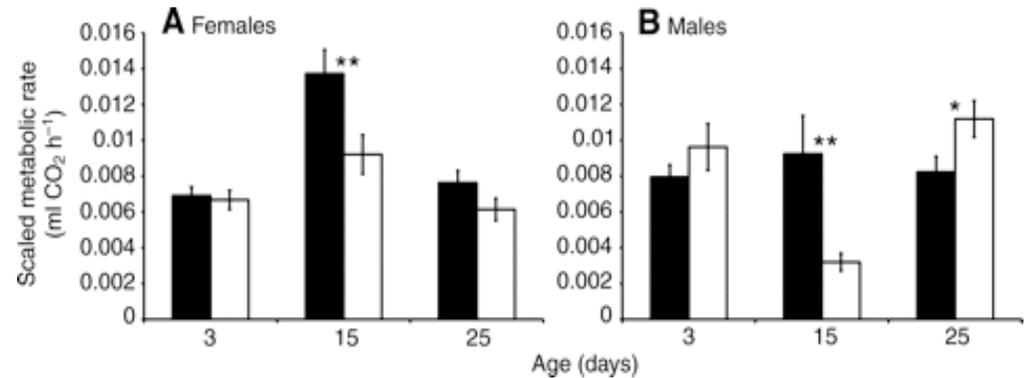
La souche virulente de *Wolbachia pipientis* wMelPop établit une infection somatique chez le moustique vecteur de *Plasmodium falciparum*, *Anopheles gambiae*.

Mais sans réduction de la durée de vie !!!

Mais encore...



Temps moyen d'activité / h
de femelles et males infectés
à trois ages adultes différents



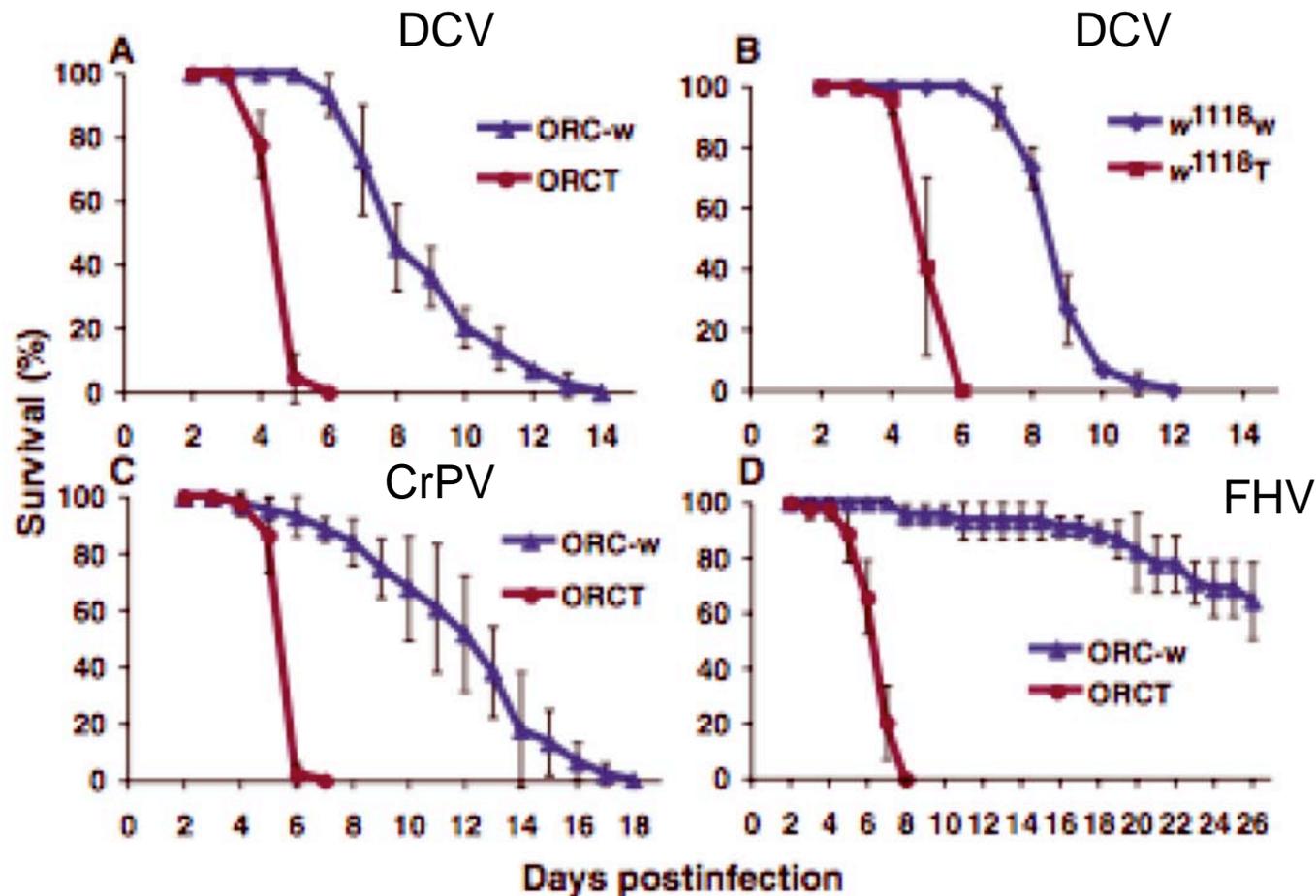
Activité métabolique moyenne mesurée sur la base de
2 fenêtres de 4 h. pour des moustiques males et femelles
de trois ages adultes différents:

Infectés: ■

Non infectés: □

Paradoxe: augmentation de l'activité locomotrice et du métabolisme d'*A. aegypti* Infectés par une souche de *Wolbachia pipientis* assurant une diminution de la durée de vie du moustique.

L'infection par *Wolbachia pipientis* protège la mouche *Drosophila melanogaster* contre l'infection induite par des virus (Hedges LM et coll., 2008, Science, 322:702)

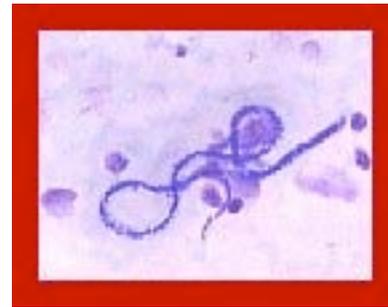


DCV = Drosophila C Virus (Famille des Dicistroviridae) est un pathogène naturel de la Drosophile retrouvé chez 30 à 40 % des mouches sauvages ou élevées au laboratoire.
CrPV = Cricket Paralysis virus (Famille des Dicistroviridae) est un pathogène naturel de la Drosophile.
FHV = Flock House Virus Famille des Nodaviridae) n'est pas un pathogène naturel de la Drosophile, mais il induit la mort rapide de la mouche après injection.

Mécanismes de la symbiose *Wolbachia*-filaires et approches thérapeutiques

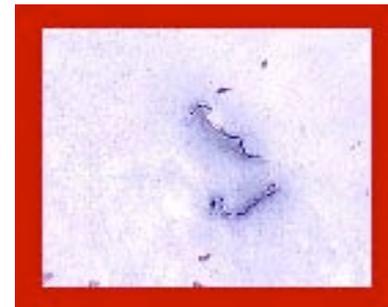
Les filarioses sont dues à des vers filiformes, nématodes tissulaires, transmis par des arthropodes et font partie des grandes endémies tropicales. Les espèces filariennes pathogènes entraînent:

Les filarioses lymphatiques
(*Wucheria bancrofti*, *Brugia malayi*,...)



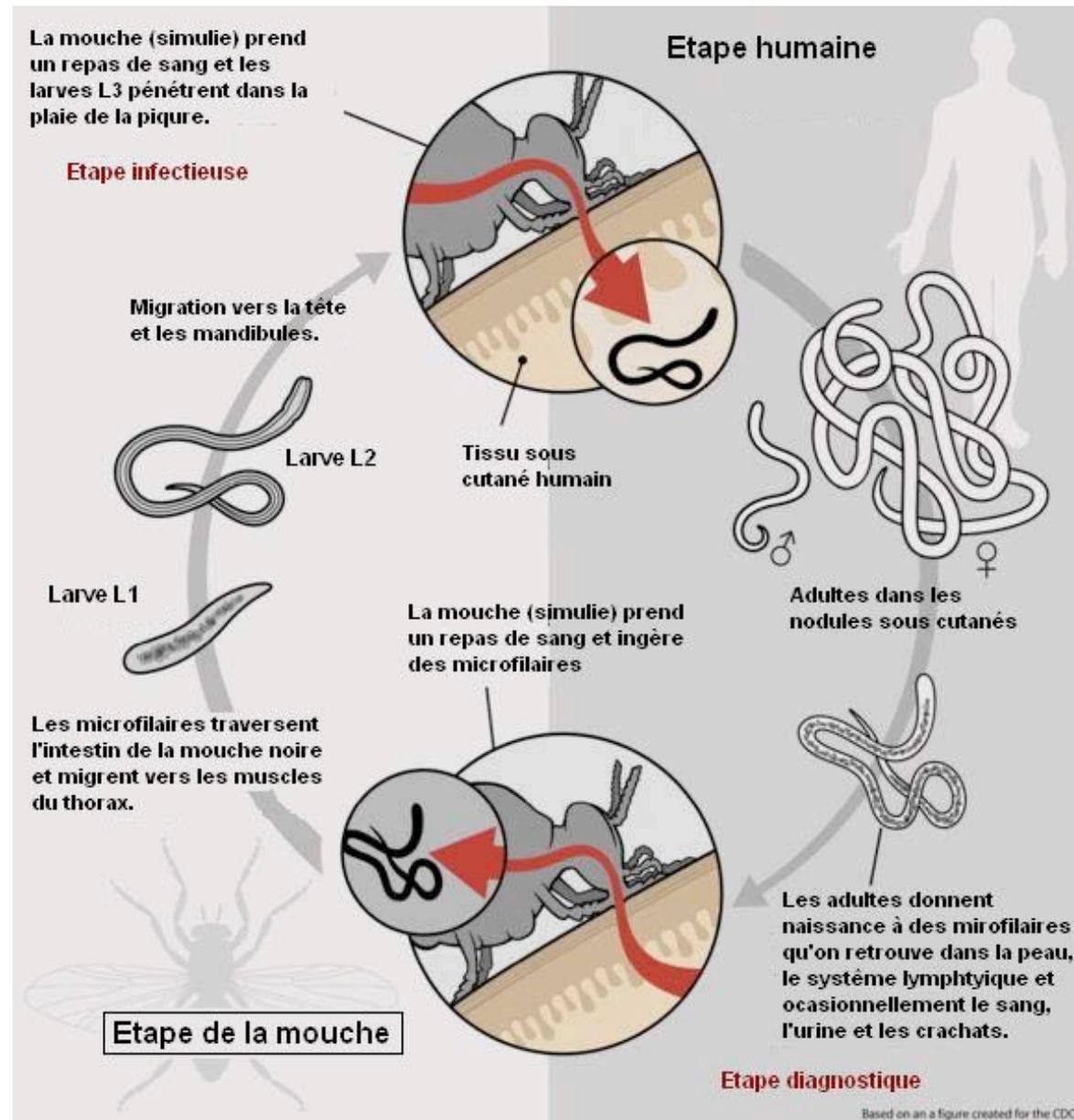
Filariose lymphatique

Les filarioses dermiques :
- onchocercose (*Onchocerca volvulus*),
- loase (loa loa),
- dracunculose ou filaire de Médine (*Dracunculus medinensis*).



Onchocercose

Cycle de l'Onchocercose

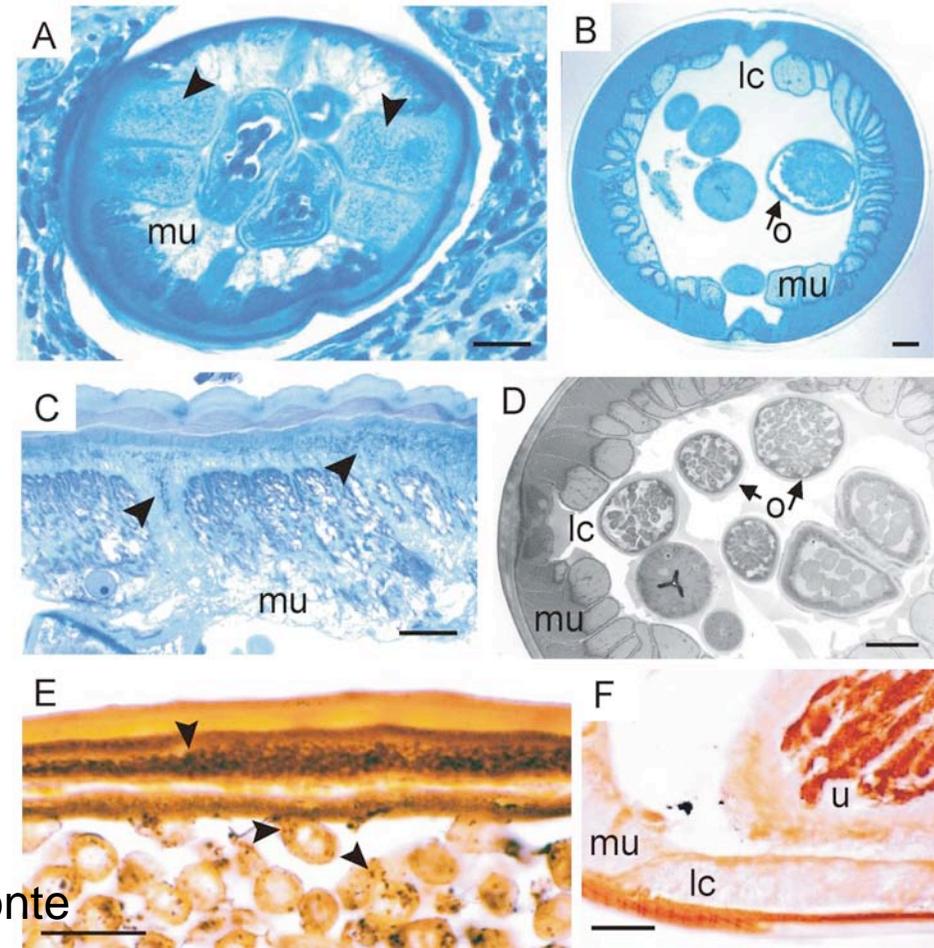


Wolbachia est un endosymbionte des nématodes, y compris des filaires pathogènes pour l'homme comme *Oncocerca volvulus* responsable de l'onchocercose (cécité des rivières).

A,C: section d'une femelle d'*O. volvulus* montrant (flèches) des bactéries du genre *Wolbachia* dans l'hypoderme du parasite.

E: section d'une femelle d'*O. jakutensis* (imprégnation argentique) montrant la présence de bactéries du genre *Wolbachia* dans l'hypoderme et les oocytes.

B,D,F: en contraste, absence d'endosymbionte visible chez une femelle de *Loa loa*.



Des bactéries du genre *Wolbachia* sont présentes chez *Wuchereria bancrofti* (filariose lymphatique de Bancroft), *Brugia malayi* (Filariose lymphatique de Malaisie/orientale) et *Oncocerca volvulus*, mais pas chez *Loa loa* (Loase).

Wolbachia joue chez les filaires un rôle important dans le développement du nématode, sa viabilité et sa fertilité. Elle entraîne aussi chez l'hôte infecté une réaction inflammatoire et d'autres effets secondaires qui contribuent très significativement à la gravité de la maladie.

Les *Wolbachia* parasitant les nématodes diffèrent dans leur comportement par rapport à celles parasitant les arthropodes en trois domaines qui suggèrent une histoire co-évolutive significativement différente (Taylor MJ et col. 2005. *Adv.Parasitol.*, 60: 245-283).

- 1 - L'efficacité de transmission verticale bien supérieure chez les nématodes. Chez les arthropodes la perte d'association n'est pas un événement rare.
- 2 - La fréquence d'évènements de transmission horizontale bien plus élevée chez les arthropodes (véritables épidémies) que chez les nématodes.
- 3 - La multiplicité des souches infectieuses chez les arthropodes (véritable promiscuité) en comparaison d'associations stables et spécifiques d'espèce chez les nématodes.

L'ensemble de ces observations et un moindre impact sur la physiologie du nématode que sur celle de l'arthropode indiquent un état plus avancé de passage du parasitisme au mutualisme, donc la mise en place d'une symbiose plus « élaborée ». Un argument complémentaire est l'absence d'évidence de mutations non synonymes dans les souches de nématodes en comparaison des souches d'arthropodes (*Wolbachia* surface protein, WSP). La sélection de ces mutations est considérée comme la marque d'un conflit et la cicatrice de stratégies d'échappement (Baldo L et coll. 2002. *Parasitologia*, 44:179-187).

Wolbachia-Nématodes: une symbiose apaisée ?

Effet des antibiotiques sur le traitement des filarioses humaines

- Traitement 6 semaines par Doxycycline (200 mg/j) contre *O. volvulus*:
déplétion des bactéries parasites de la filaire avec pour conséquence un blocage dans l'embryogénèse et une diminution soutenue de la microfilarémie cutanée persistant 2 ans après l'arrêt du traitement

(Hoerauf A et coll. 2001. Lancet, 357:1415-1416; Horeauf A et coll. 2003. Microbes and Infection, 5:261-273).

Aucun effet sur les microfilaires non associée à *Wolbachia*, nécessité de combiner à un traitement par l'Ivermectine pour être totalement microfilaricide.

- Traitement 6/8 semaines par Doxycycline (200 mg/j) contre *W. bancrofti*:
mêmes résultats, diminution de >95 % de la charge de *Wolbachia*. Diminution chronique de la charge en microfilaires menant à une amicrofilarémie entre 1 et 2 ans après le traitement. Diminution/disparition des gites scrotaux

(Hoerauf A et coll. 2003. Medical Microbiol.Immunol., 192:211-216; Taylor MJ et coll. 2005. Lancet, 365:2116-2121)

Le rôle de *Wolbachia* s'exprime aussi dans le degré de gravité des lésions observées tant au cours de l'Onchocercose que de la Filariose de Bancroft.

Des extraits d'*O. volvulus* et de *W. bancrofti* entraînent une inflammation TLR4-dépendante chez la souris. Des extraits préparés après traitement des parasites par la Doxycycline n'induisent virtuellement pas d'inflammation.

Conclusion: le LPS de *Wolbachia* intervient de manière significative dans les dégâts inflammatoires causés par les filaires cutané-sanguines ou lymphatiques. Il est probable que d'autres PAMPs (PGN) produisent des effets complémentaires (Taylor MJ et coll. 2005. Adv.Parasitol., 60:245-283)

Rôle des microorganismes dans l'évolution du monde animal (et des plantes)

Théorie de l'Hologénome proposée par Rosenberg, initialement fondée sur une analyse de la résistance/sensibilité des coraux aux microorganismes qui les colonisent (Rosenberg E et coll. 2007. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat.Rev.Microbiol.*, 5:355-362) et rapidement élargie à l'ensemble du monde vivant (Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. 2008. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of Evolution. *FEMS Microbiol.Rev.*, 32:723-735)

Théorie du « superorganisme » proposée par Wilson & Sober

(Wilson DS, Sober E. 1989. Reviving the superorganism. *J.Theor.Biol.*, 136:337-356)

Concept de l' « organe oublié » chez l'homme pour la flore intestinale

(O'Hara AM, Shanahan F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Repts.*, 7:688-693)

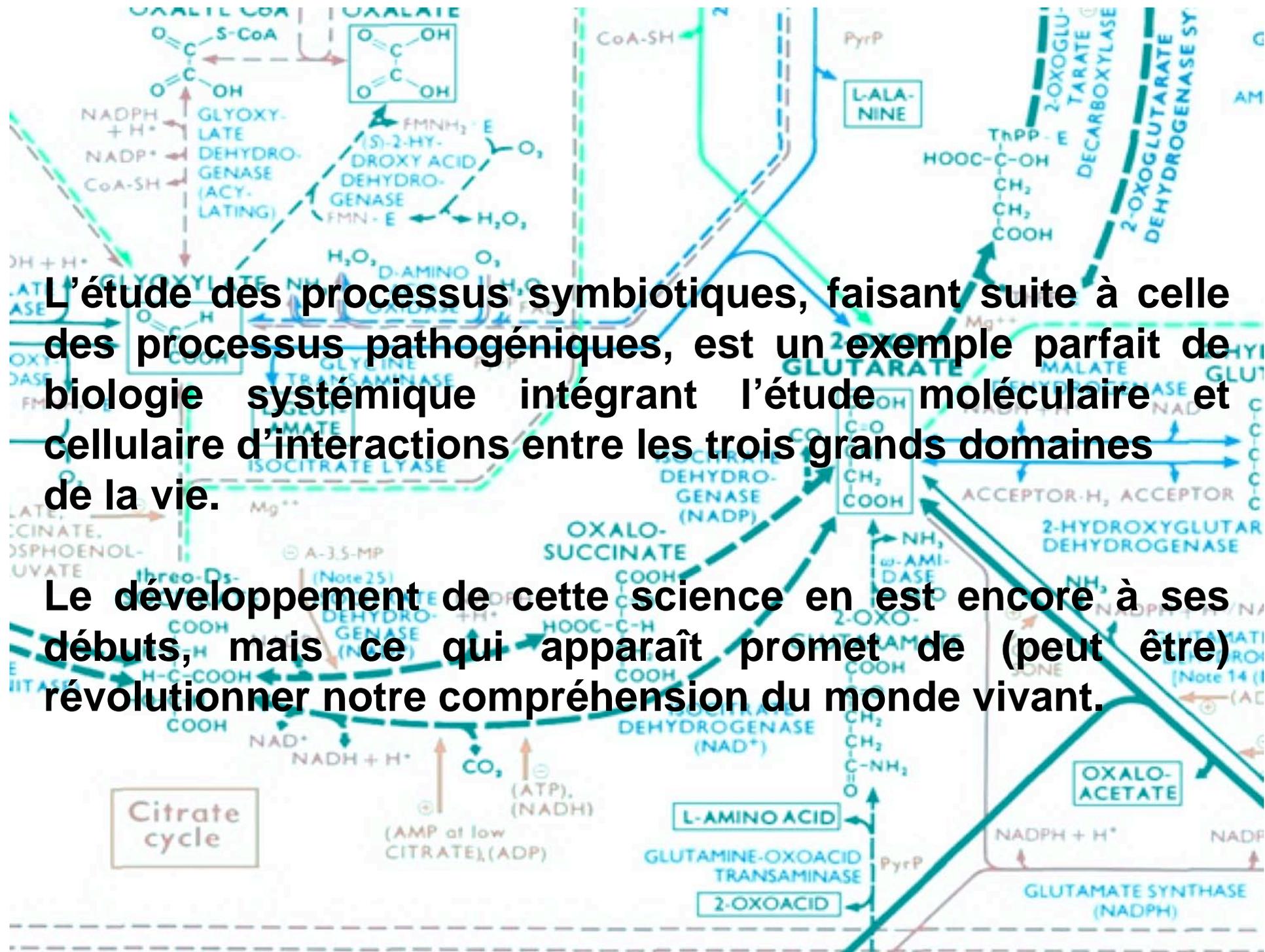
Nécessité de considérer un second degré de programme de génome humain considérant ses flores endogènes

(Relman DA, Falkow S. 2001. The meaning and impact of the human genome sequence for Microbiology. *Trends Microbiol.*, 9:206-208)

Concept maintenant concrétisé dans la US NIH Roadmap Initiatives:

« Human Microbiome Project »

(<http://nihroadmap.nih.gov/hmp/>)



L'étude des processus symbiotiques, faisant suite à celle des processus pathogéniques, est un exemple parfait de biologie systémique intégrant l'étude moléculaire et cellulaire d'interactions entre les trois grands domaines de la vie.

Le développement de cette science en est encore à ses débuts, mais ce qui apparaît promet de (peut être) révolutionner notre compréhension du monde vivant.

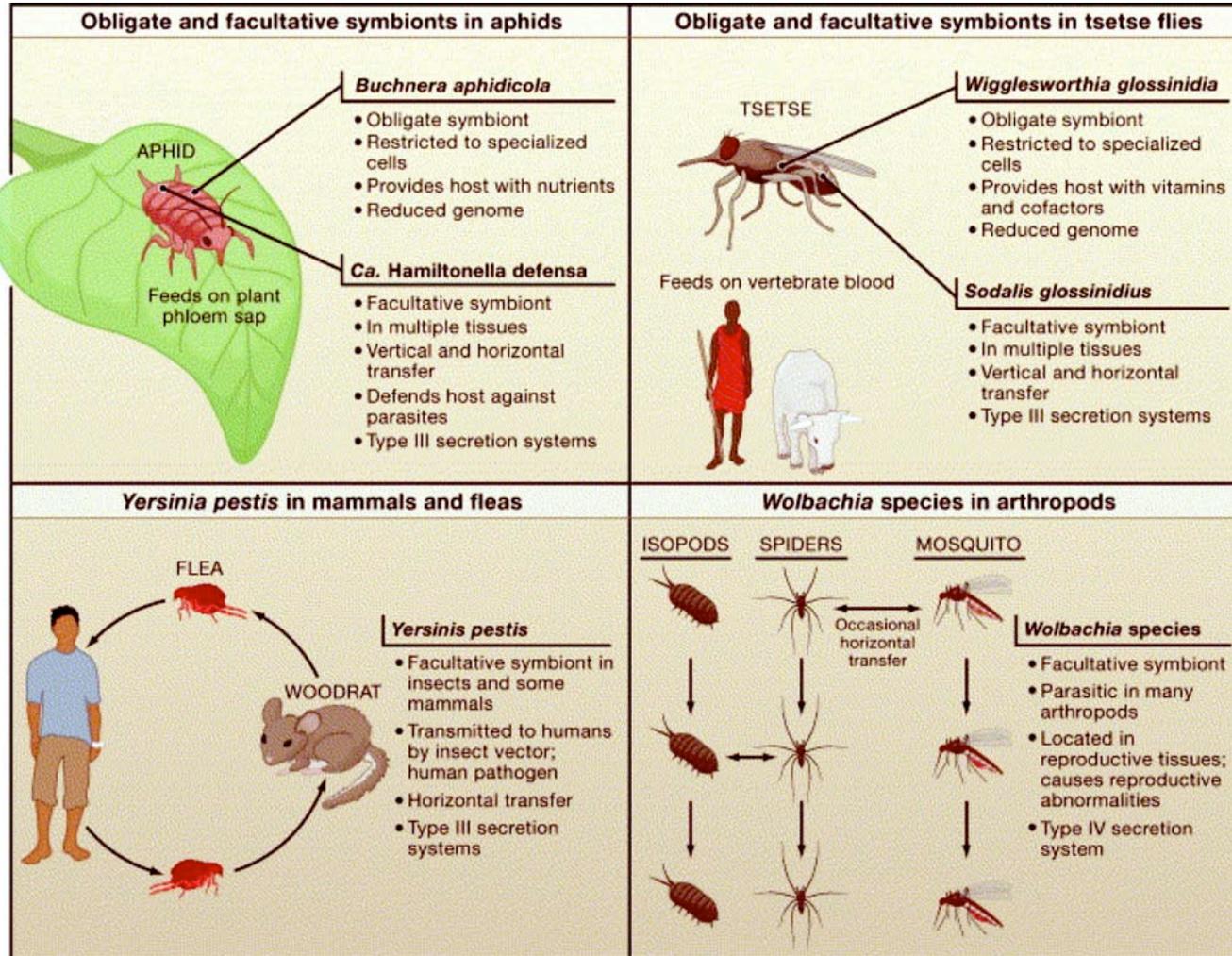
Les eucaryotes sont très probablement issus des procaryotes et sont demeurés depuis lors en grande proximité/promiscuité

(Margulis L. 1993. Symbiosis in cell evolution: microbial communities in the archaean and proteozoric Eons. 2nd Edition. WH Freeman and co., New York)

Les surface des animaux et des plantes contiennent une grande variété et abondance de microorganismes. Ces microorganismes sont le plus souvent extracellulaires, mais peuvent parfois se présenter comme des parasites intracellulaires. On parle alors d'endosymbiontes.

Le nombre de bactéries constituant ces microbiotes et leur information génétique combinée excède en général (c'est le cas chez l'homme et les mammifères) celle de l'hôte lui même.

Parasites intracellulaires obligatoires vs parasites intracellulaires facultatifs



Chez de nombreux hôtes invertébrés les symbiontes sont intracellulaires (endosymbiontes) et subissent une transmission verticale par infection des œufs ou des embryons. Ces symbiontes obligatoires affectent des interactions très spécifiques avec certaines populations cellulaires durant la colonisation de la progénie et le développement précoce des individus. Certaines de ces bactéries se sont adaptées de manière telle qu'elles ont peu ou pas d'effet négatif sur la santé de leur hôte;

Deux ruptures et deux convergences permettent de comprendre comment les hôtes multicellulaires (animaux, plantes) vivent avec leur microbiote.

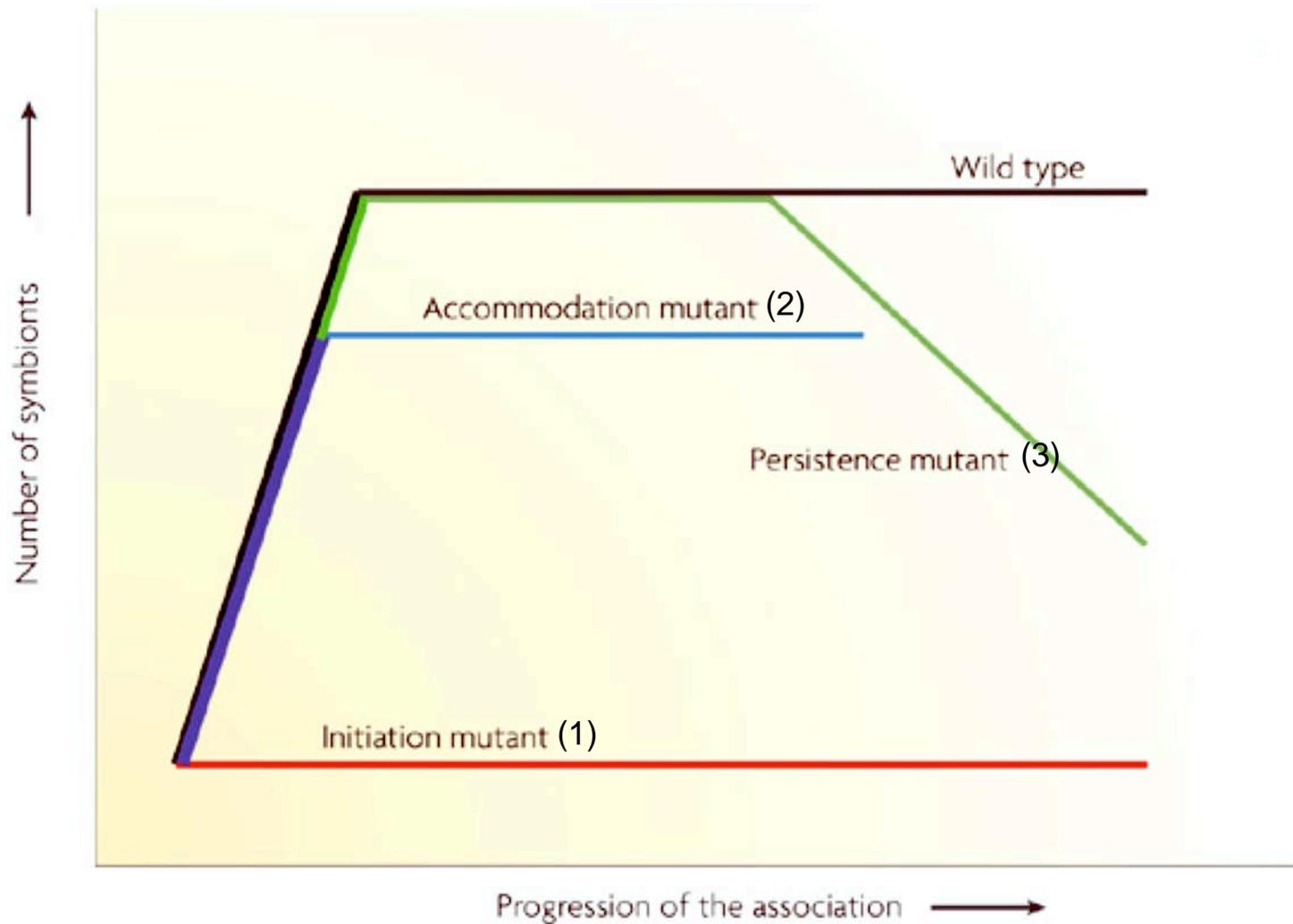
Technique:

développement de méthodes permettant de disséquer les mécanismes par lesquels les organismes échangent des signaux « dialogue moléculaire ».

Conceptuelle:

reconnaissance que les organismes supérieurs créent un véritable espace de vie partagée avec des groupes bien caractérisés de microorganismes.

L'étude des bases génétiques, moléculaires et cellulaires de ce dialogue est devenue une nouvelle frontière de la biologie.



Les symbiontes bactériens transmis horizontalement doivent « négocier » plusieurs étapes du processus de colonisation. L'analyse génétique qui a pu être réalisée chez plusieurs d'entre eux a permis de définir un certain nombre de classes de mutants, donc d'étapes dans le processus.

Dans la courbe ci-dessus, un microorganisme transmis horizontalement à un hôte va croître jusqu'à donner lieu à une population de symbiontes de taille stable avec le temps. Trois classes principales de défauts peuvent être décrits: (1) initiation de la symbiose, (2) accommodation de la symbiose, (3) persistance de la symbiose.