



Fables de symbiose (1): Le calamar et la fourmi

Pr. Philippe J Sansonetti
Chaire de Microbiologie et Maladies Infectieuses

Leçon #2

13 décembre 2017

Paul Klee, Symbiose, 1934. Collection privée

Cours

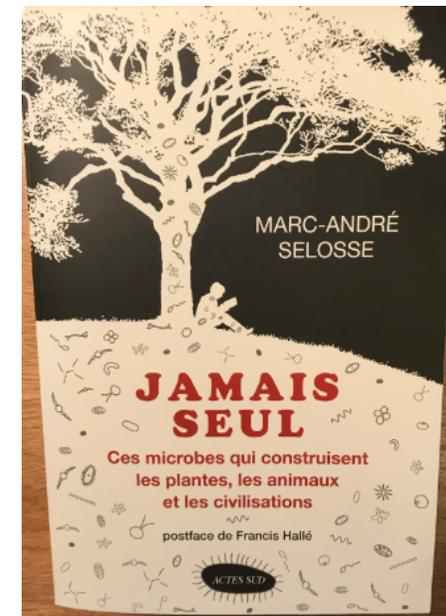
Fables de symbiose (1): le calamar et la fourmi

Séminaire

Marc-André Sélosse
Professeur, Muséum d'Histoire Naturelle

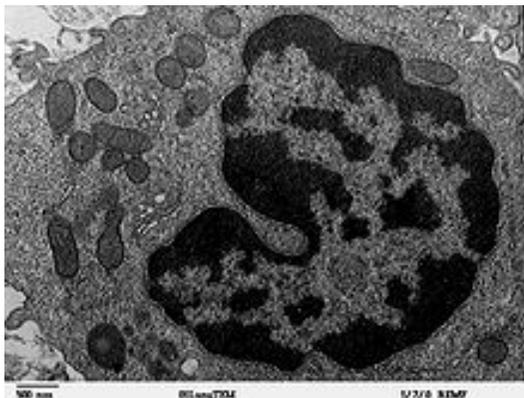
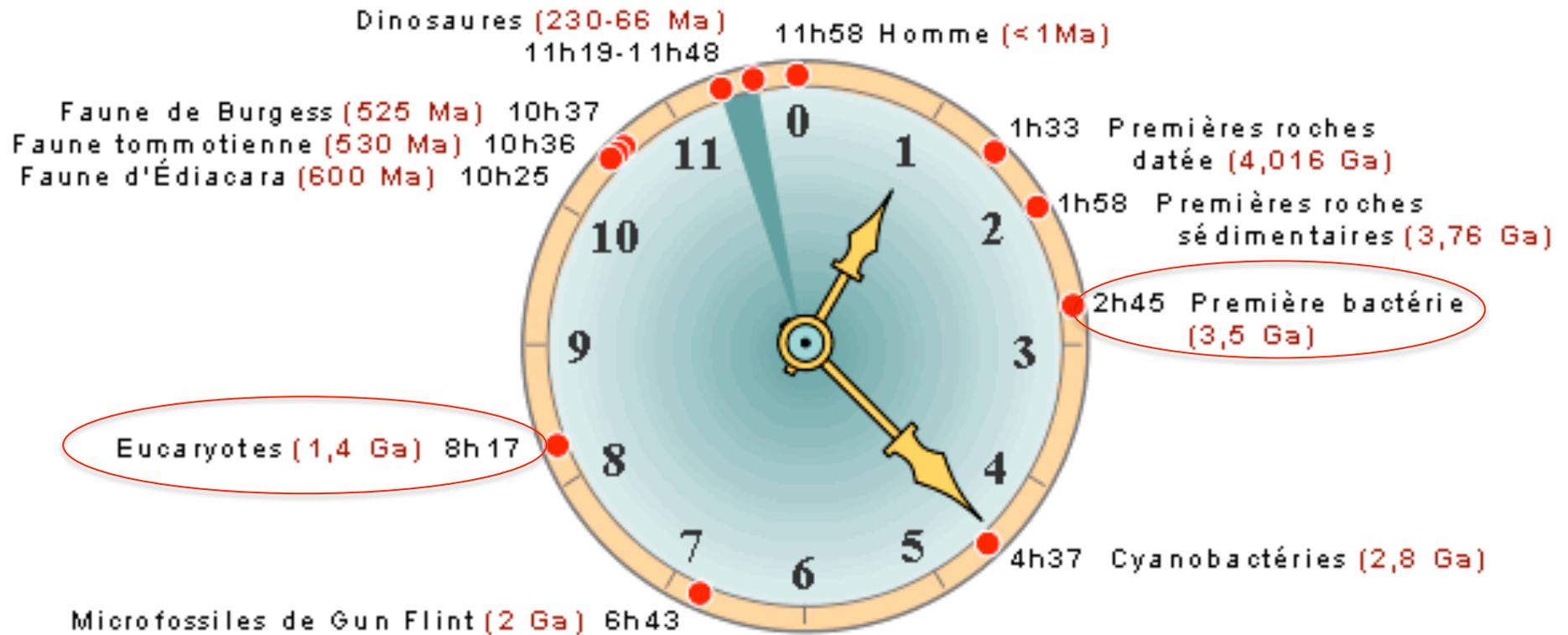


Muséum
national
d'Histoire
naturelle



"La plante, entre holobionte et réseaux d'interactions"

Grandes étapes de l'histoire du vivant: l'horloge "éco-évo-dévo"



Mitochondrie:
LA symbiose primordiale

Symbiose

Terme de **symbiose** introduit par **Anton de Bary** au 19^{ème} siècle =
règle de vie commune de plusieurs espèces
"association vivante d'espèces différentes"
"Die Erscheinung der Symbiose", Strasbourg, 1879.



Heinrich Anton de Bary
1831 (Francfort) -1888 (Strasbourg)
Médecin, biologiste, botaniste
Pionnier de la mycologie

Association symbiotique souvent
construite autour d'un grand partenaire,
l'**hôte** et de plus petits partenaires,
les **symbiotes**

Vue subjective car pour 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 des deux n'est pas celui qu'on pense...

Symbiose hôte-microbes: un peu de sémantique

- **Symbiose**: organismes vivant ensemble

Autres qualificatifs = qualification conséquences de la symbiose:

- **Mutualisme**: aptitude (fitness) des deux organismes partenaires augmentée (en particulier leur capacité de contribuer au succès de la prochaine génération)

- **Commensalisme**: un organisme partenaire bénéficiaire, l'autre pas affecté

- **Parasitisme**: un organisme partenaire bénéficiaire, l'autre négativement affecté

Lorsque effet interaction sur les deux partenaires difficile à définir (systèmes complexes), faute d'accès aux conséquences, on reste sur le terme symbiose

Peut aboutir à **endosymbiose** prolongée, vitale pour les deux espèces

Exemple extrême: **mitochondrie** chez animaux et chloroplaste chez plantes

Caractéristiques du monde microbiologique et macrobiologique facilitant leur partenariat

Monde microbiologique

Petite taille

Temps de réplication court

Populations de grande taille

Capacité de transfert génétique horizontal
(pangénome quasi illimité)

Versatilité métabolique élevée

Monde macrobiologique

Grande taille

Temps de réplication long

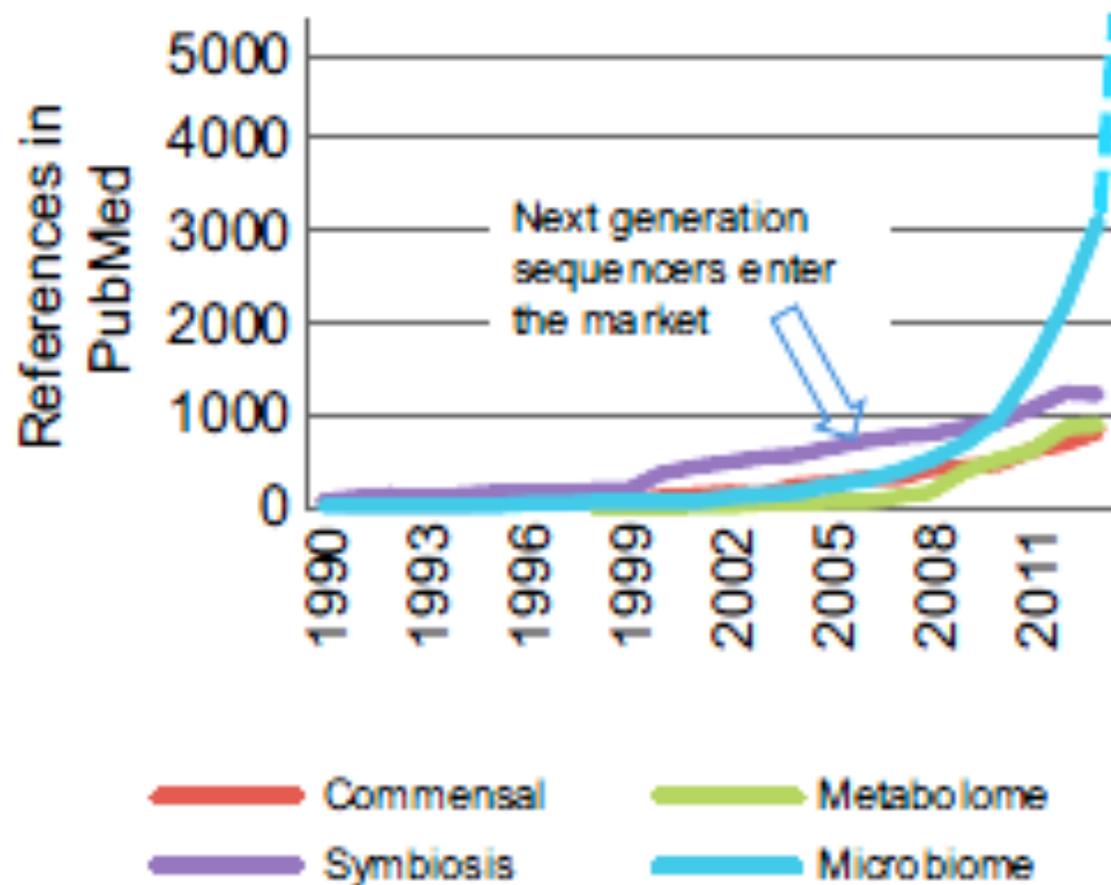
Populations de petite taille

Capacité limitée de transfert génétique
horizontal (pangénome limité)

Versatilité métabolique limitée

Croissance du domaine du microbiome reflétée par le nombre de références NCBI/PubMed

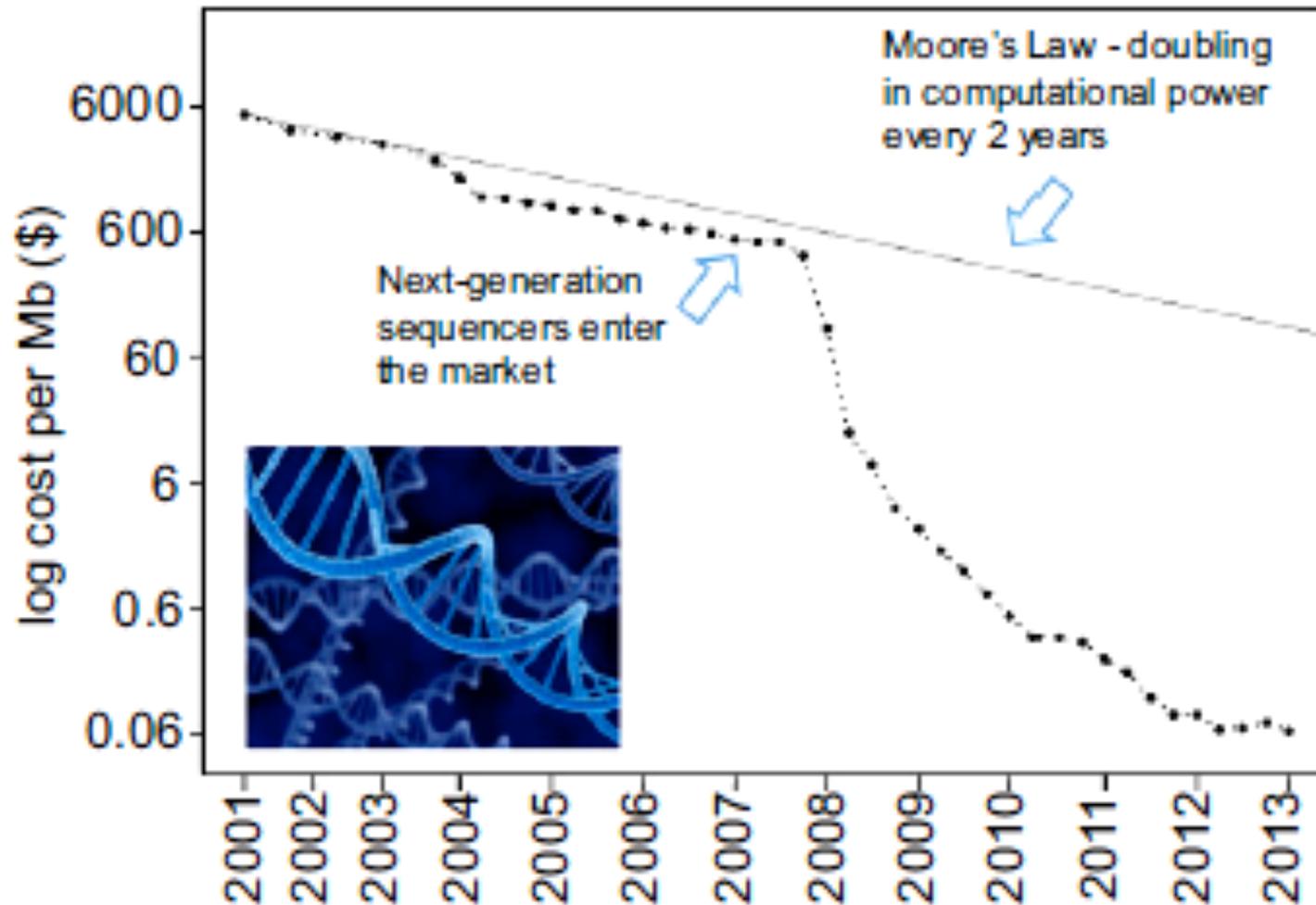
Mots clés: *commensal, symbiosis, metabolome, microbiome*



Enable
New s
Myths

Fig. 7.
19th a

Baisse du coût de séquençage des acides nucléiques depuis 2000



D'après Boyle & Gyle. 2012

Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences

Margaret McFall-Ngai^{a,1}, Michael G. Hadfield^{b,1}, Thomas C. G. Bosch^c, Hannah V. Carey^d, Tomislav Domazet-Lošo^e, Angela E. Douglas^f, Nicole Dubilier^g, Gerard Eberl^h, Tadashi Fukamiⁱ, Scott F. Gilbert^j, Ute Hentschel^k, Nicole King^l, Staffan Kjelleberg^m, Andrew H. Knollⁿ, Natacha Kremer^o, Sarkis K. Mazmanian^p, Jessica L. Metcalf^q, Kenneth Neelson^r, Naomi E. Pierce^s, John F. Rawls^t, Ann Reid^u, Edward G. Ruby^v, Mary Rumpho^w, Jon G. Sanders^x, Diethard Tautz^y, and Jennifer J. Wernegreen^w

© 2015. Published by The Company of Biologists Ltd | The Journal of Experimental Biology (2015) 218, 1968–1973 doi:10.1242/jeb.115121



REVIEW

Giving microbes their due – animal life in a microbially dominant world

Margaret J. McFall-Ngai*



Margareth J McFall-Ngai

Questions fondamentales:

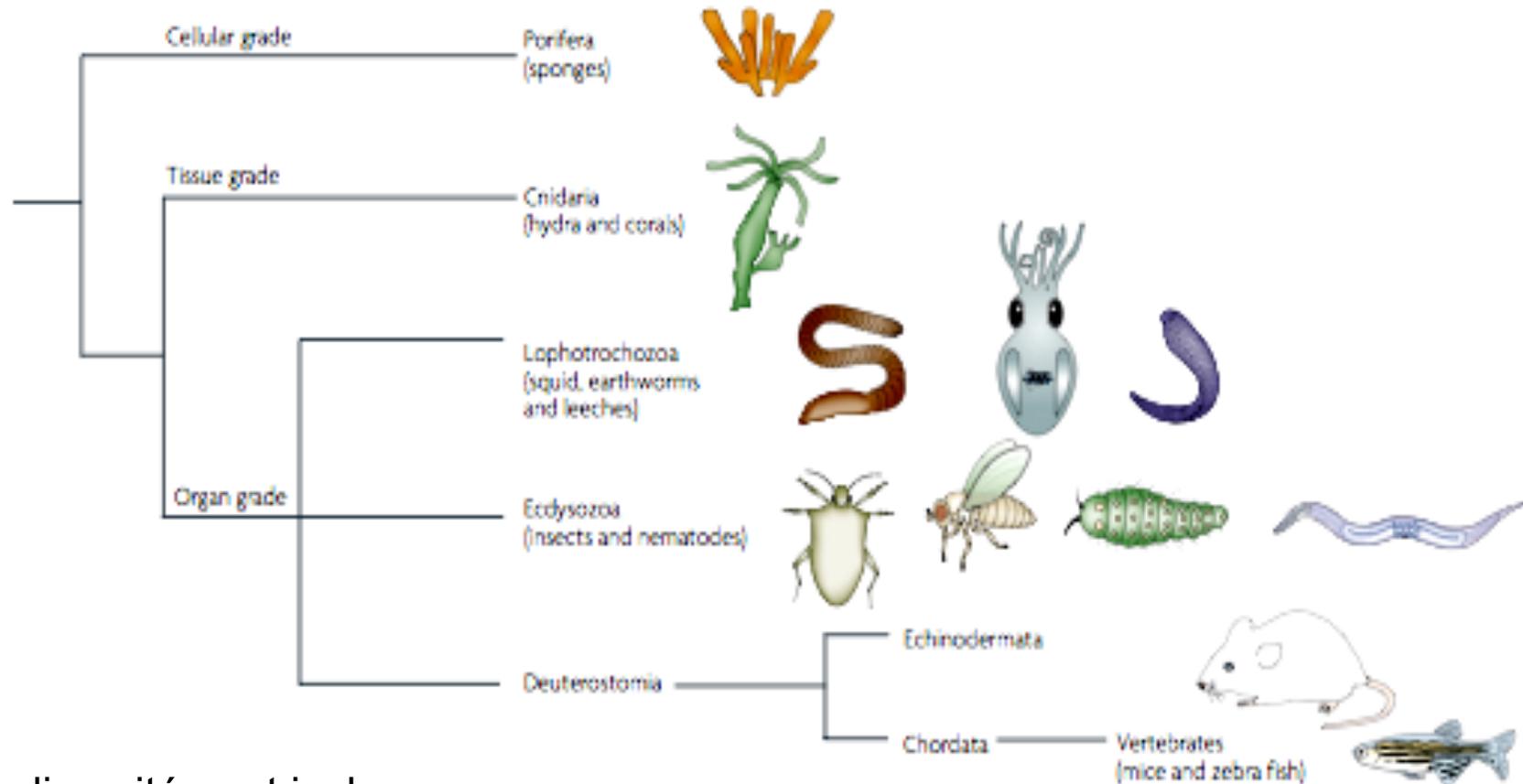
Comment les bactéries ont-elles influencé les origines et l'évolution des animaux ?

Comment bactéries et animaux influencent mutuellement leurs génomes ?

Jusqu'à quel point et comment le développement normal de l'animal dépend de ses partenaires bactériens ?

Comment se maintient l'homéostasie entre hôte et partenaires bactériens ?

Diversité associations symbiotiques touche ensemble des phyla du monde vivant



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)

(Ruby EG. 2008. Nat.Rev.Microbiol., 6:752-762).

Catégories de symbioses

Deux paramètres importants:

Ancienneté apparente de la co-dépendance hôte-symbiote
Intensité et l'étendue de cette co-dépendance

Deux pôles:

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

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 même hôte

Questions clés

Quelles sont les bases génétiques, moléculaires et cellulaires du dialogue symbiotique ? = frontière de la (micro)biologie

Jusqu'à quel point la symbiose a-t-elle affecté l'évolution, le développement, la niche écologique du couple symbiotique

Que nous disent et que ne nous disent pas (encore) les modèles ?

Mode de transmission des symbiotes

Biologie du développement système symbiotique tente de définir comment "**l'holobio**te" (les deux partenaires en co-évolution) persiste comme unité de sélection à travers les générations

Mode de transmission microorganismes impliqués dans la symbiose:

- **vertical**: transmission par la mère dans ou à la surface de l'oeuf = symbiotes des bactériocytes (adipocytes) des insectes = endosymbioses (Baumann P et coll. 2016). Aphides, Tsé-Tsé, blattes, etc..

Animaux à ration déséquilibrée: un composant dominant et nombreuses carences compensées par partenaire

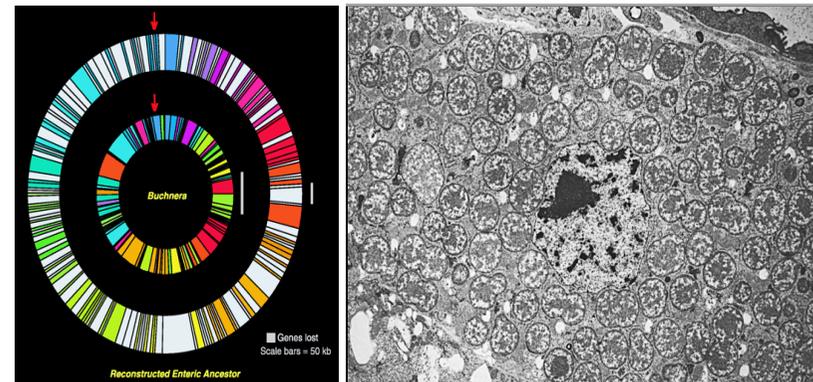
Buchnera aphidicola

Gamma-protéobactérie/entérobactérie

Relation symbiotique 200 millions années avec *Acyrtosiphon pisum* (puceron du pois)

Réduction génomique: pas de gènes LPS, perte respiration anaérobie, gènes sucres aminés, acides gras, phospholipides, glucides

- **horizontal**: microbiote nouvellement acquis à chaque génération à partir environnement (microbiote intestinal) (Bright M & Bulgheresi S. 2010. Nat Rev Microbiol)



Le calamar et la fourmi...

Symbioses mutualistes affectant le développement d'un des partenaires sous forme d'un organe dédié: calamar et *V. fischeri*, **gènèse d'un organe lumineux**



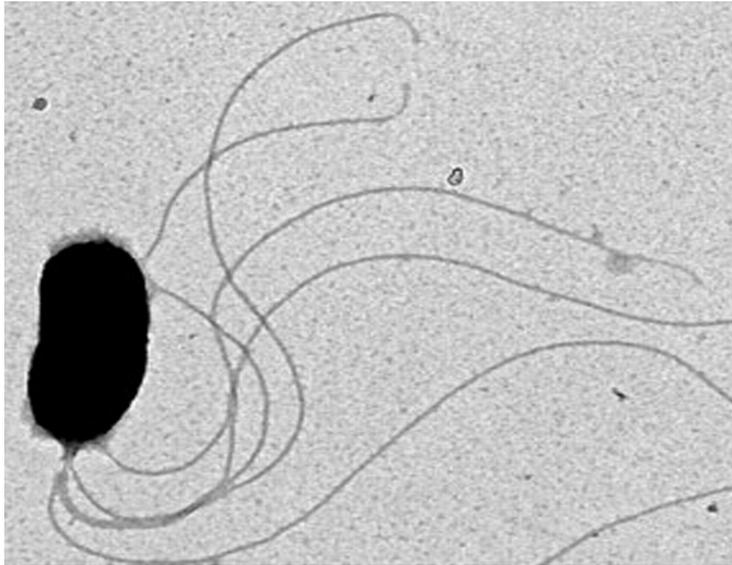
Euprymna scolopes
(Calamar sépiolide, Hawaï)

Symbioses mutualistes affectant nutrition et survie des deux organismes: fourmis coupe-feuilles, champignonnistes et mycétome, holobiotte multidimensionnel

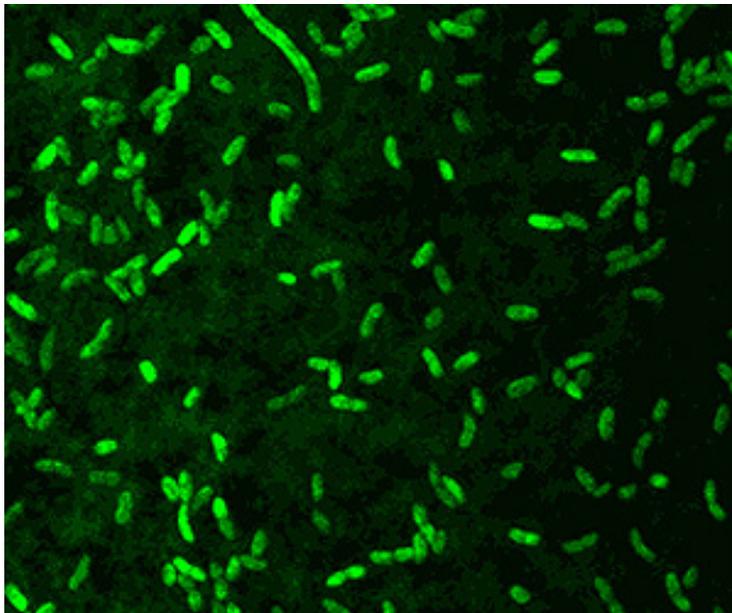


Fourmis Attine,
genre *Atta* & *Acromyrmex*

Vibrio fischeri et *Euprymna scolopes* (Calamar sépiolide)



Vibrio fischeri



Euprymna scolopes



Le calamar et le vibrion

Symbiose entre calamar *Euprymna scolopes* et bactérie luminescente *Vibrio fischeri* obligatoire pour animal hôte pour survivre dans la nature mais pas pour partenaire bactérien

E. scolopes = aposymbiote, nait sans symbiote associé

V. fischeri acquis tôt depuis environnement

Animaux examinés dans population sauvage = tous porteurs de

V. fischeri dans organe lumineux (McFall MJ. 2014. Anun Rev Microbiol)

V. fischeri = vie planctonique marine hors *E. scolopes*

Lumière produite par *V. fischeri* dans organe lumineux = **probable** camouflage contre prédateurs habituels du calamar (contre-illumination) (Jones BW & Nichigushi. 2004. Mar Biol)

Viabilité des animaux axéniques jointe à possibilité cultiver *V. fischeri* et y développer une approche génétique (génomé séquencé, mutagénèse possible) = modèle de choix étude des symbioses

(Stable EB & Ruby EG. 2002. Meth.Enzymol; Ruby et coll. 2005. PNAS;

Mandel et coll. 2008. BMC Genomics

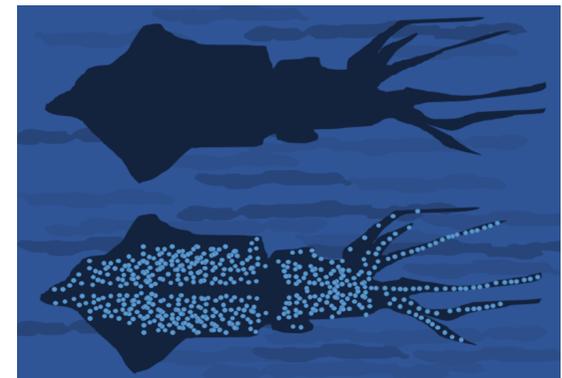
Stratégies de camouflage chez animaux marins

Animaux marins mésopélagiques (vivant entre deux eaux) tendent à apparaître comme des silhouettes sombres contre surface claire (soleil ou lune) vus du fond par prédateurs

Contre-mesure = production de lumière (bioluminescence) = **contre-illumination** (différente de contre-ombrage jouant sur concentration de mélanine dans téguments)

Mode de camouflage principal chez animaux marins avec transparence et coloration argentée

Rôle de projecteur ?



Vibrio fischeri et *Euprymna scolopes*

(Calamar sépiolide des eaux hawaïennes)

Nombreuses espèces animales bioluminescentes

La moitié génèrent lumière grâce à activité symbiotique avec bactéries lumineuses du genre *Vibrio* ou *Photobacterium*

Euprymna scolopes utilise luminescence émise grâce à **enzyme luciférase** produite par *Vibrio fischeri* pour processus de contre-illumination (Jones BW et coll. 1998. Mar.Biol)

$\text{FMNH}_2 + \text{RCHO} \rightarrow \text{FMN} + \text{RCOOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{hn}$ (490 nm)

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

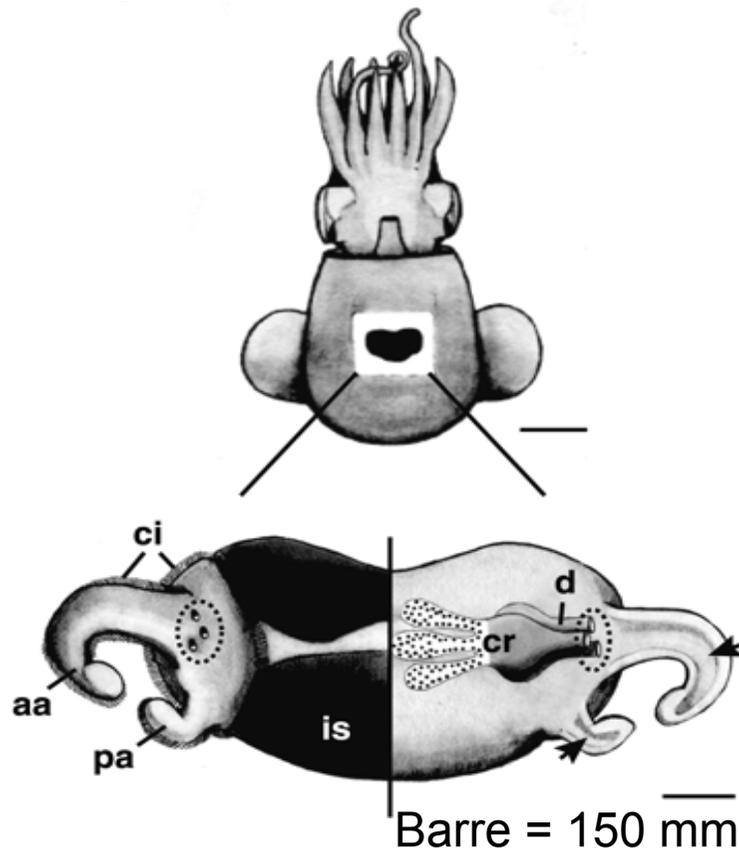


Trois éléments caractéristiques de la symbiose

Spécificité colonisation de *E. scolopes*

Morphogénèse organe lumineux induite par *V. fischeri*

Régulation émission de luminescence par quorum sensing



Détails 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 cryptes (cr) contenant bactéries qui vont coloniser les diverticules (d). Relation entre cryptes et conduits vers pores (cercle). Section montre aussi (flèches) sinus dans excroissances

Spécificité de la colonisation de *E. scolopes* par *V. fischeri*

Période de développement embryonnaire prépare *E. scolopes* à interagir avec *V. fischeri* acquis de l'environnement

Fin période embryonnaire: lignages cellulaires différenciés apparaissent, participent à "récolte" de *V. fischeri*:

- **épithélium cilié** = récessus antérieur et postérieur couvrant "sinus sanguin"
- **cellules entourant pores** (Koropatnick T et coll. 2014. Biol Bull)

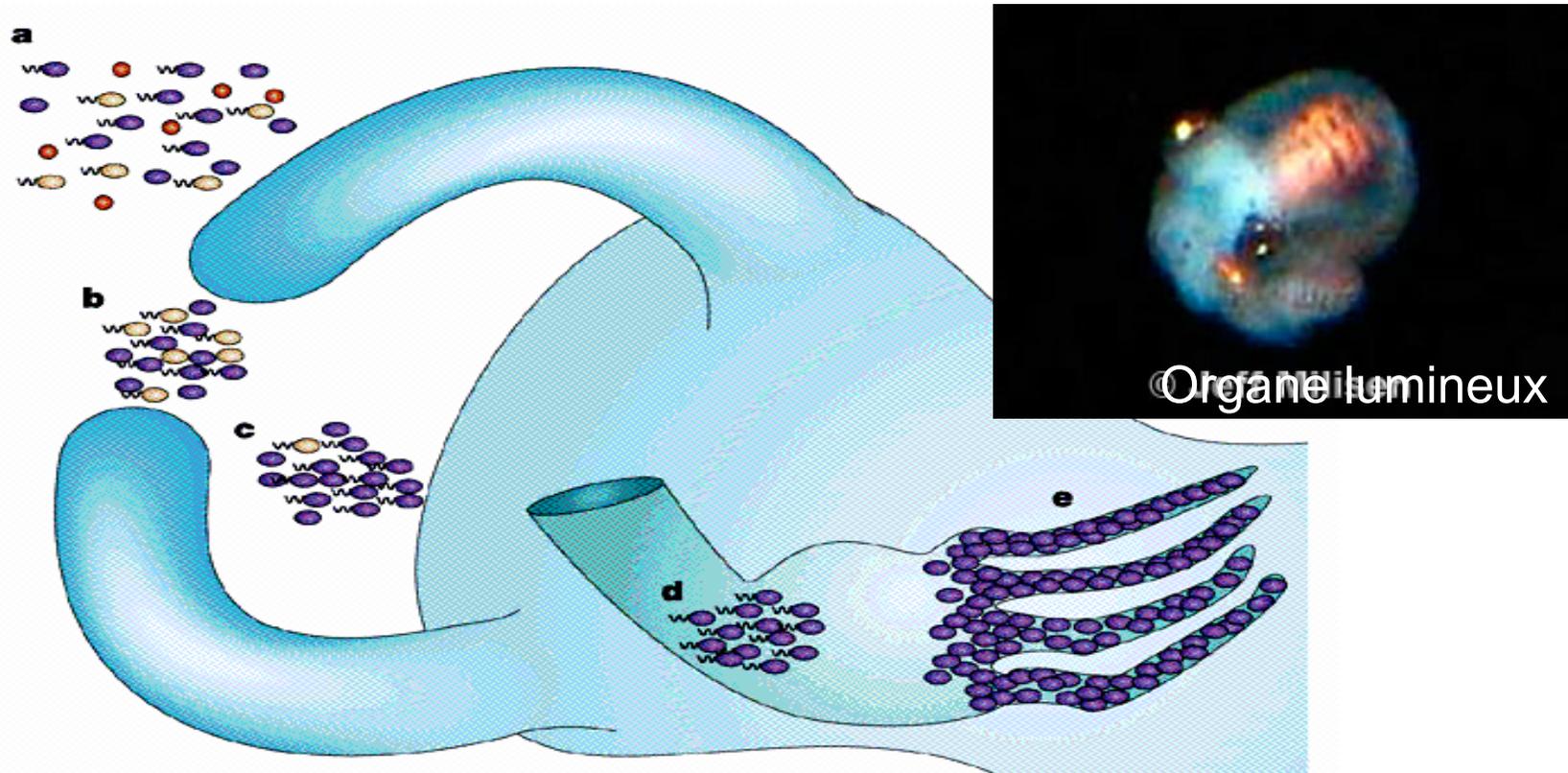
Invagination "sac d'encre" devient structure complexe avec cryptes aveugles:

- **Crypte principale** = pore menant à corridor ouvrant sur large antichambre
- A mi-profondeur, **constriction** (bottleneck) ouvre sur **labyrinthe de cryptes**

V. fischeri doit s'adapter à succession d'environnements (Sycuro et coll. 2006. J Morphol)

Organe lumineux fonctionnel quelques heures après éclosion (Ruby EG & Asato LM. 1993. Arch Microbiol). Aspire eau de mer qui passe par les compartiments successifs et accumule *V. fischeri* tout en rejetant autres microorganismes

Spécificité de la colonisation de *E. scolopes* par *V. fischeri*



Sélectivité extraordinairement efficace car dans eaux hawaïennes où vit *E. scolopes*, *V. fischeri* est minoritaire (10^2 - 10^3 /ml comparé aux 10^6 /ml autres bactéries (Jones et coll. 2004. Nat Rev Microbiol; Lee K & Ruby EG. 1995. Appl Environm Microbiol))

Progression de la colonisation de l'organe lumineux par *V. fischeri* = série d'étapes aboutissant à la sélection de *V. fischeri* colonisateur unique des cryptes
En absence de *V. fischeri*, colonisation entamée par autres bactéries avorte (Nyholm SV et coll. 2000. PNAS)

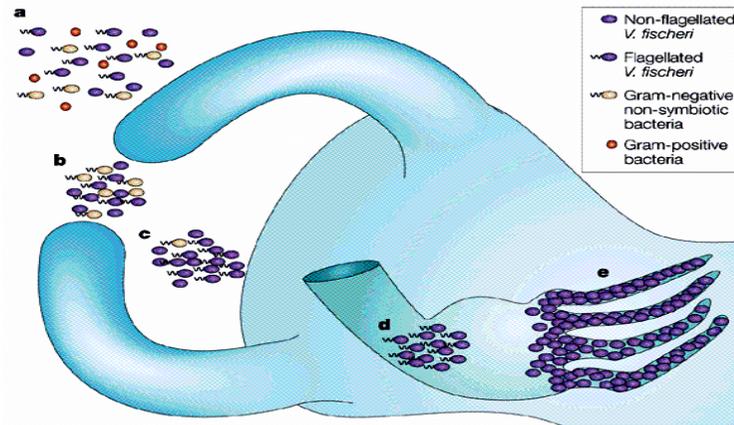
Spécificité de la colonisation de *E. scolopes* par *V. fischeri*: des pistes ?

Spécificité 1: souches de *V. fischeri* adaptées à *E. scolopes* possèdent gène, *rcsS*, codant pour système à deux composants RcsS (kinase) absent du génome des souches de *V. fischeri* adaptées à poissons vivant dans des environnements marins similaires

Ce système contrôle expression du gène *sypG* présent dans toutes les souches de *V. fischeri* - mais peu ou pas exprimé en absence RcsS – codant pour expression polysoside complexe sécrété (exopolyoside) qui participe à formation des agrégats et à adhérence spécifique à orifice des pores (équivalent biofilm) (Yip et coll. 2005. Mol Microbiol; Husa et coll. 2007. J. Bacteriol; Husa et coll. 2008. J.Bacteriol; Mandel et coll. 2009. Nature)

Spécificité 2: contrairement aux autres espèces bactériennes, *V. fischeri* sensibilisé par première vague de NO associé au mucus sécrété par signaux PGN-induits au stade d'agrégats bactériens à l'orifice du pore Entraîne résistance exceptionnelle de *V. fischeri* aux vagues successives de NO acquise (Wang Y & Ruby EG. 2011. Cell Microbiol)

Spécificité de la colonisation de *E. scolopes* par *V. fischeri*

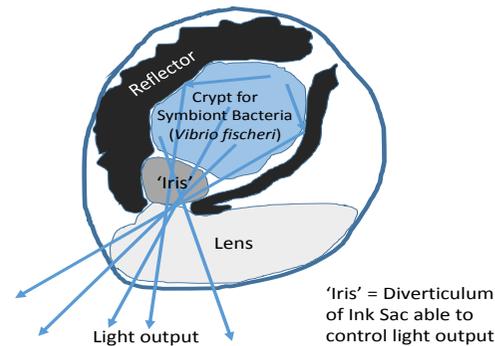


Suite à adhésion aux cils cellules épithéliales, formation agrégats bactériens, survie: nécessité combinaison flagelles - chimioattraction pour colonisation initiale vers les cryptes

Suivant réussite trajet, symbiotes perdent expression flagelles, deviennent Immobiles, modification longueur des chaînes latérales du LPS et acylation du lipide A. Seuls *V. fischeri* luminescents maintiennent colonisation et symbiose sur long terme

Quotidiennement, bactéries, hémocytes et matrice riche en protéines expulsés en bloc (Graf J & Ruby EG. 1998. PNAS; Nyholm SV & McFall-Ngai MJ. 1998. Biol Bull; Schleicher TR & Nyholm SV. 2011. PLoS One; Sage PT & Carman CV. 2009. Front Biosci)

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



Organe lumineux présente forte convergence structurelle avec oeil

Au lieu de présenter tissu photorécepteur = rétine, couche épithéliale interne est photogénique par population symbiotique extracellulaire résidant dans cryptes

Pour modifier lumière incidente, organe lumineux possède système réflecteur:

- Couche réfléchissante (tapetum) = imbrication de couches formées de la protéine Réflectine (Crookes MK. 1992. Science)
- Couche pigmentée type iris/choroïde contrôlant direction et quantité de lumière émise (McFall-Ngai MJ & Montgomery MK. 1990. Biol Bull)
- Lentille d'origine musculaire transparente par forte concentration de l'enzyme aldéhyde déshydrogénase, un des deux enzymes-cristallin de l'oeil du calamar (Montgomery MK & McFall-Ngai MJ. 1992. J. Biol. Chem.)
- Entre lentille et tissu photogène, à l'intérieur pore unique de chaque lobe, est situé un filtre jaune dont fonction est très probablement de faire glisser lumière émise vers longueurs d'onde correspondant à illumination surface de la mer par la lune...

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

V. fischeri déclenche la morphogénèse de l'organe lumineux

Toutes les régions de organe lumineux "visités" par *V. fischeri* durant phase de colonisation subissent changements développementaux induits par bactérie

Traitement antibiotique ne restaure que très partiellement aspect morphologique initial de l'organe
(Doino JA & McFall-Ngai MJ. 1995. Biol Bull)

Changement le plus spectaculaire = disparition de l'épithélium cilié superficiel résultant apoptose des cellules épithéliales qui prend 4-5 jours mais est irréversiblement programmé dès 12^{ème} heure.

Tissus internes organe lumineux subissent modifications plus subtiles en présence de *V. fischeri*, mais plus subtiles et réversibles

Effecteurs et signaux ?

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

Même si signalisation menant à "saut développemental" encore mal connue, clair que MAMPs, LPS (endotoxine) et PGN (fragments du peptidoglycane) sont inducteurs essentiels = morphogènes (Koropatnick TA et al. 2013. Science)

Outre changements tissulaires (apoptose épithéliale), induisent aussi trafic des hémocytes dans organe lumineux

Agissent en synergie pour atténuer activité de NOS et production de NO

Shéma activité sensiblement différent des mammifères où MAMPs activent nitrosylation (Altura MA et al. 2011. Cell Microbiol)

Bioluminescence produite dans organe lumineux synergise avec endotoxine et peptidoglycane pour conduire programme développemental

Bases moléculaires perception lumière mal connues (McFall-Ngai MJ et coll. 2012. Semin Immunol)

Deux possibilités...

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

Cryptochromes = photorécepteurs fonctionnant dans le bleu pouvant répondre à bande bleue du spectre de bioluminescence de *V. fischeri*. Cryptochromes identifiés chez plantes, peuvent médier changements développementaux en présence lumière (Liu CX et coll. 2012. Nat Chem Biol)

Rhodopsine ? = organe lumineux très proche de l'oeil et montre sensibilité à lumière et cascades de signaux associés (Tong D et coll.2009. PNAS)
Mutants de *V. fischeri* déficients dans production bioluminescence n'induisent pas la transcription de gènes candidats à la production des récepteurs des MAMPS

Lumière semble impliquée dans mise en place de la signalisation par les MAMPS. En son absence, ensemble du système amenant au saut développemental ne fonctionne pas (Peyer SM et coll. 2012. Mech dev)

Toutes les pièces du puzzle doivent maintenant être assemblées (McFall-Ngai MJ. 2014. Ann Rev Microbiol)

L'organe lumineux de *E. scolopes* répond à un cycle nyctéméral pour niveau bioluminescence

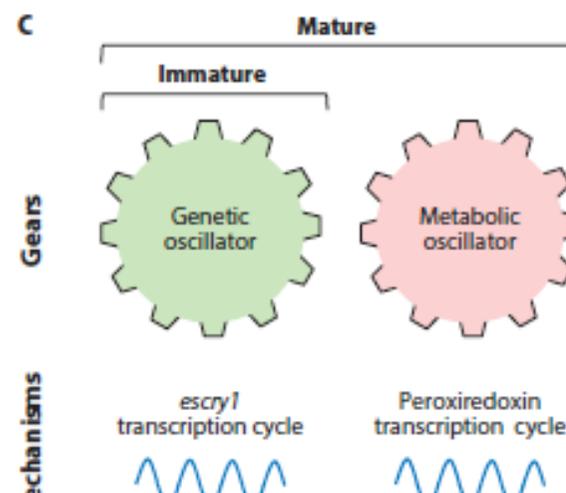
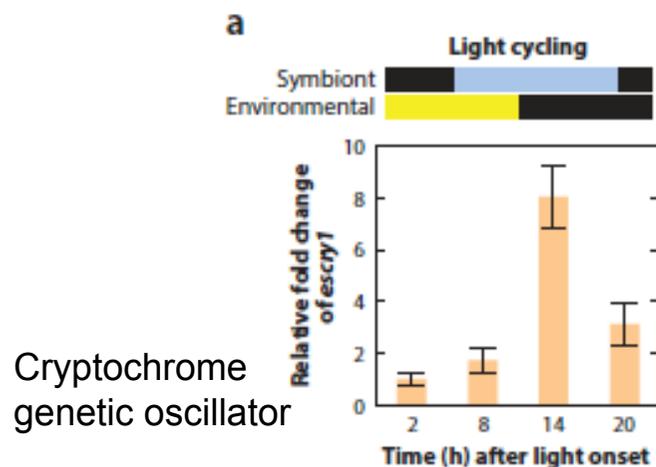
Système symbiotique calamar-*V. fischeri* le plus étudié pour sa capacité de variation nyctémérale

Intensité fluorescence oscille sur base cycle jour-nuit (Boettcher KJ et coll. 1996. J Comp Physiol)

- Niveau maximum de fluorescence = soirée, quand animal quitte fonds sableux pour chercher nourriture

- Niveau minimum de fluorescence = heures précédant l'aube, suivi du phénomène d'expulsion (Graf J & Ruby EG. 1998. PNAS)

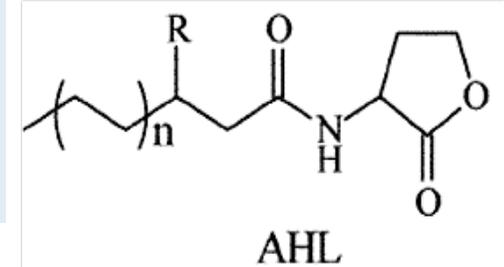
Gènes impliqués dans rythme circadien commencent à être identifiés: *escry* 1 & 2 (cryptochromes) *escry2* très exprimé dans oeil et cycle directement en fonction lumière (Heath-Heckman EA. 2013. mBio)



Heath-Heckman EA. 2013. mBio

Candidate mechanisms underlying molecular and biochemical control of host-symbiont rhythms. (a) *escry1*

Régulation de l'émission de luminescence par quorum sensing



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

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

Mutations dans ces deux systèmes annulent la symbiose:

- 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 précocement, à faible densité, agit sur les étapes initiales de la colonisation
- 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 ?



© Can Stock Photo

Carver-Rogniat



La fourmi, le champignon et les microbes

Fourmis attines (Atta) et myrmecines (Acromyrmex), "champignonnistes", et "coupe-feuilles" = petites fourmis rouges américaines Incapables de dégrader la cellulose

Sont devenues agricultrices champignonnistes, cultivant le basidiomycète *Leucoagaricus gongylophorus* en mycétomes souterrains en "rayons"

Fourmis nourrissent le champignon avec fragments feuilles qu'ils digèrent et restituent aux fourmis sous forme de nutriments simplifiés assimilables

Reine, couvée = source exclusive de nutriments

Ouvrières = source partielle en plus de sève plantes

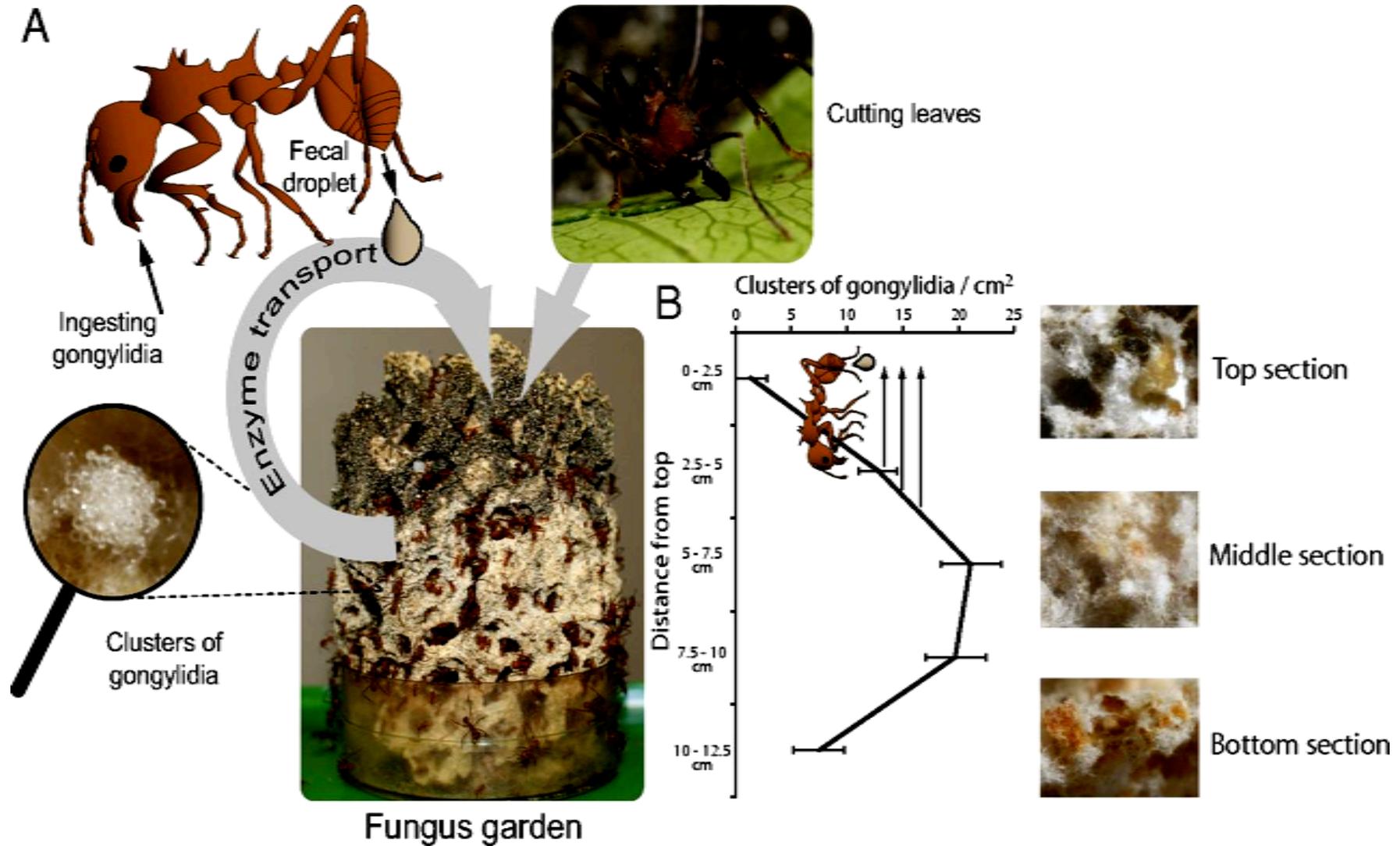
Symbiose unissant fourmis champignonnistes et mycètes connue depuis 1874

Couple = "ménage à trois" avec autre partenaire: les bactéries

Fonction bactéries dans cette symbiose complexe est cependant un sujet de débat

Ces bactéries participent-elles à la bonne santé du partenaire fongique, bénéficiant indirectement à la colonie de fourmis, ou apportent-elles à la fourmi qui les héberge une protection directe ?

La fourmi, le champignon et les microbes



La fourmi, le champignon et les microbes

Association fourmis attines et champignonnières = paradigme de symbioses herbivores - communautés microbiennes

Fourmis attines probablement apparues il y a 50 millions d'années dans le bassin amazonien

Symbiose entre fourmis attines et champignons symbiotiques a permis diversification en > 230 espèces couvrant les deux Amériques (Hölldobler et coll. 1990. The ants. Harvard University Press)

La plupart des espèces de fourmis constituent petites colonies (quelques douzaines de travailleuses)

Fourmis coupe-feuilles devenues prédominantes parmi les herbivores, capables d'ingérer jusqu'à 17 % biomasse foliaire dans certains écosystèmes (Costa et coll. 2009. J Veg Sci)

Certaines colonies peuvent représenter > 8 millions d'individus

Magnifique modèle pour étudier l'impact des symbioses sur l'écologie et l'évolution des espèces.

La fourmi, le champignon et les microbes

Couple symbiotique très "fidèle" entre "hautes attines" et *Leucoagaricus gongylophorus*

"Basses attines" montrent une diversité plus large de symbiotes

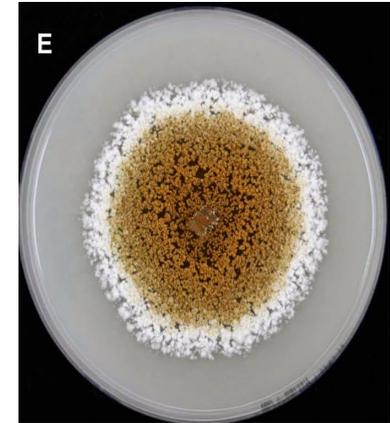
Mycétome pas restreint à *Leucoagaricus gongylophorus*

Contient d'autres espèces fongiques et bactériennes:

- Champignon filamenteux = **Escovopsis** (+ autres) en compétition avec *L. gongylophorus*

- Actinobactérie = *Pseudonocardia*, produisant un antibiotique contrôlant croissance d'*Escovopsis* et autres "mauvaises herbes"

de défendre le mycétome contre la croissance de *Escovopsis* et autres "mauvaises herbes" (Caldera et coll. 2009. Environ Entomol; Currie CR. 2001. Annu Rev Microbiol)



Escovopsis

Présence de levures discutée en terme d'impact positif ou négatif sur mycétome

Etudes métataxonomiques récentes dans les champigninières montrent autres genres bactériens dominés par gamma-protéobactéries (*Klebsiella* et *Pantoea*, cultivables et capables de fixer l'azote (Aylward FO et coll. 2011. ISME J; Pinto-Tomas AA et coll. 2009. Science)

Dégradation de la biomasse végétale



Biomasse végétale sous forme de fragments de feuilles vivantes = cellulose, hémicelluloses, lignine, sucres simples et protéines

Molécules de la biomasse végétale transformées en gongylidia (nectar) stocké dans poches hyphales des mycétomes contenant essentiellement lipides et sucres simples = sources énergie essentielle insectes (Chapela et coll. 1994. Science; Mueller et coll. 2010. PLoS One; Mueller et coll. 2001. Rev Biol; Costa AN et coll. 2009. J Veg Sci)

Leucoagaricus gongylophorus = activité lignocellulolytique dominante permettant production et croissance sur amidon et xylane (Silva et coll. 2006. Microbiol Res)

Identification pectinases et xylanases (Erthal et coll. 2009. Comp Biochem Physiol)

Activité biochimique très large du mycétome: xylane, pectine, amidon, laminarine, cellulose, lichenane, chitine (De Fine Licht et coll. 2010. Evolution)

Cellulose = polysaccharide le plus ciblé par *Leucoagaricus gongylophorus* ? (Martin et coll. 1969. Ann Entomol Soc Am)

Modèle de l'intestin annexe

Champignonnière considérée comme organe / intestin annexe de la colonie de fourmis cultivatrices assurant conversion / assimilation nutriments

Colonie de fourmis + mycétome = holobionte ou superorganisme

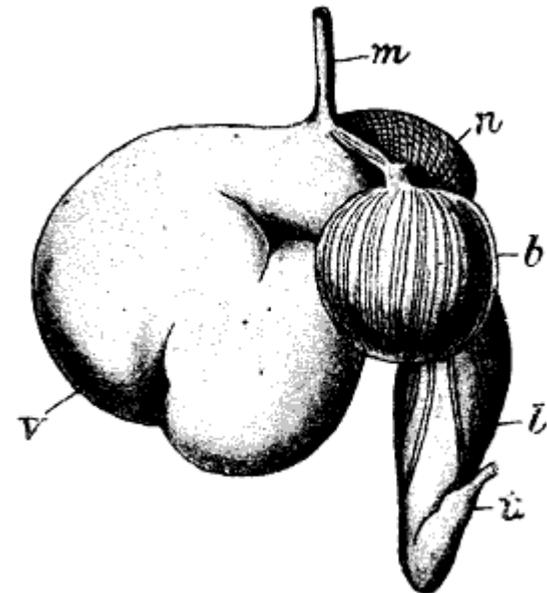
Equivalent de la panse/rumen des herbivores ruminants polygastriques

Populations bactériennes dans intestin fourmi et dans mycétomes participent à production nutriments, y compris capacité fixation azote



?

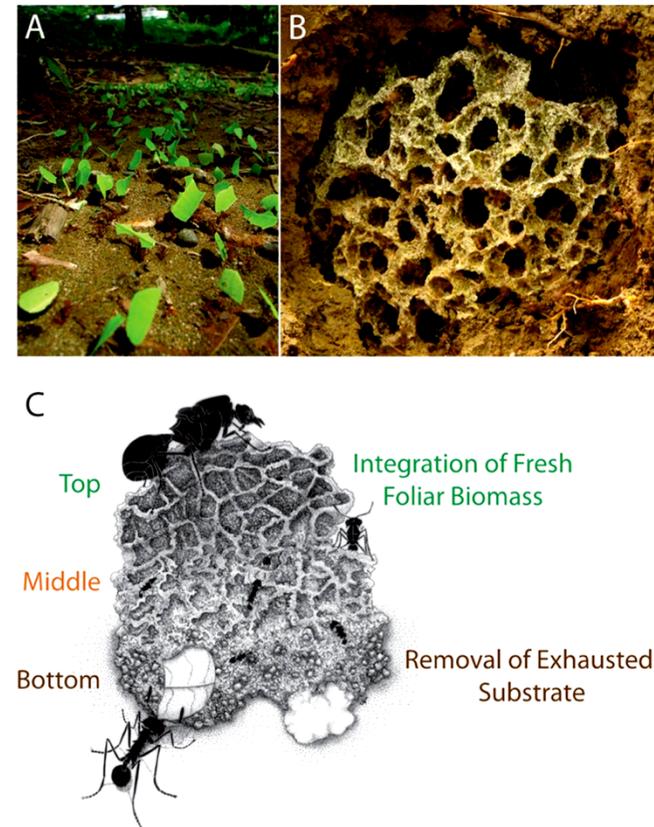
=



Maintien composition et équilibre populationnel dans la champignonnière: hygiène chez les fourmis attines

L'apport de feuilles possiblement vectrices d'autres microorganismes et leur capacité nutritive pour d'autres espèces microbiennes est un risque permanent de déstabilisation de l'équilibre microbiologique de la champignonnière

Nature des pressions sélectives pour la stabilité ?



Maintien composition et équilibre populationnel dans la champignonnière: hygiène chez les fourmis attines

Désherbage par ouvrières: élimination fragments morts des mycétomes, "mauvaises herbes" comme filaments d'*Escovopsis*. Etablissement de "déchetteries" séparées (Currie CR & Stuart AE.2001. Proc Royal Soc)

Toilettage mycétomes: léchage mycétome par ouvrières et filtrage spores fongiques étrangères dans cavités intra-buccales. Essentiel élimination spores allogènes entrant en compétition avec *Leucoagaricus*
Ajout expérimental spores étrangères augmente immédiatement activité toilettage, suggérant capacité de reconnaissance spores étrangères accédant à écosystème (Currie & Stuart; 2001)

Epandage: dépôt / application gouttelettes fécales sur matrices mycétomes
Gouttelettes = concentré chitinases et lignocellulases contribuant à biodégradation fragments feuilles et à hygiène mycétomes (Martin et coll. 1970. J. Insect Physiol; Rodrigues et coll. 2008. B J Microbiol)

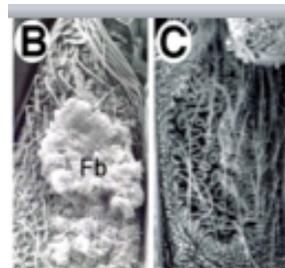
Activités montrent comment exigences de la symbiose ont influencé évolution et développement des espèces symbiotiques

Glandes métapleurales, un organe de protection de la fourmi (et plus ?)

Sécrétions des glandes métapleurales: processus présent dans d'autres espèces de fourmis fournissant un fluide bactéricide antiinfectieux (Veal et coll. 1992. J Appl Bacteriol)

Contenu des sécrétions des glandes métapleurales: phénylacétate et acides gras à chaînes courtes possédant activités antibactériennes et antifongiques larges (Bot A et coll. 2002. Insectes Soc)

Pseudonocardia associé glandes métapleurales fourmi attine, particulièrement niveau de la fovéa de glande mésopleurale
Est aussi portée par femelles reproductrices (gynes = jeunes reines vierges) au niveau organes de copulation, permettant transmission ultérieure de *Pseudonocardia* à la descendance (Currie CR et coll. 2006. Science)



Plaques métapleurales
avec (B), sans (C)
colonie de *Pseudonocardia*

Comment éviter les activités fongicides sur le mycétome symbiotique ?

Leucoagaricus produit lui même gamme de composés antimicrobiens de même que des bactéries symbiotiques comme Pseudonocardia (famille des Actinomycetes produisant des substances antibiotiques variées) actives sur Escovopsis (Sen R et coll. 2009. PNAS)

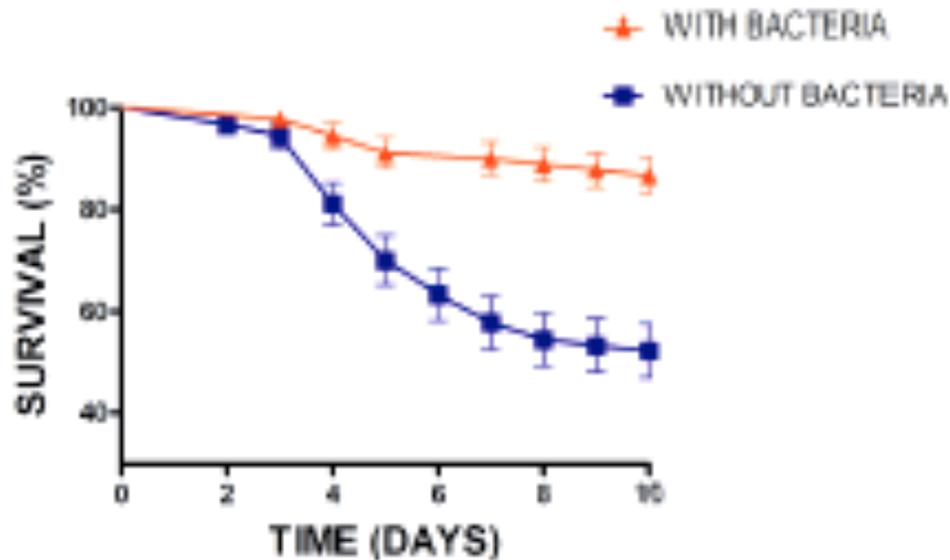
Fourmis champignonnistes maintiennent Actinobactéries, en particulier Pseudonocardia, dans le mycétome

Elles ajoutent leurs sécrétions glandulaires métapleurales pour compléter les mesures d'hygiène du mycétome

Ouvrières frottent régulièrement leurs pattes sur région métapleurale pendant qu'elles procèdent à activités de "désherbage-toilettage" du mycétome (Fernandez-Marin et coll. 2006. Proc Biol Sci)

Si des spores étrangères sont expérimentalement introduites dans la champignonnière, cette activité augmente (Fernandez-Martin et coll. 2009. Proc Biol Sci)

Pseudonocardia, biofilm protecteur



Survie d'ouvrières
Acromyrmex subterraneus

Rouge = contrôle serum physio
Bleu = élimination du biofilm de
Pseudonocardia par traitement antibiotique

(Samuels et coll. 2013. Com & Integr Biol)

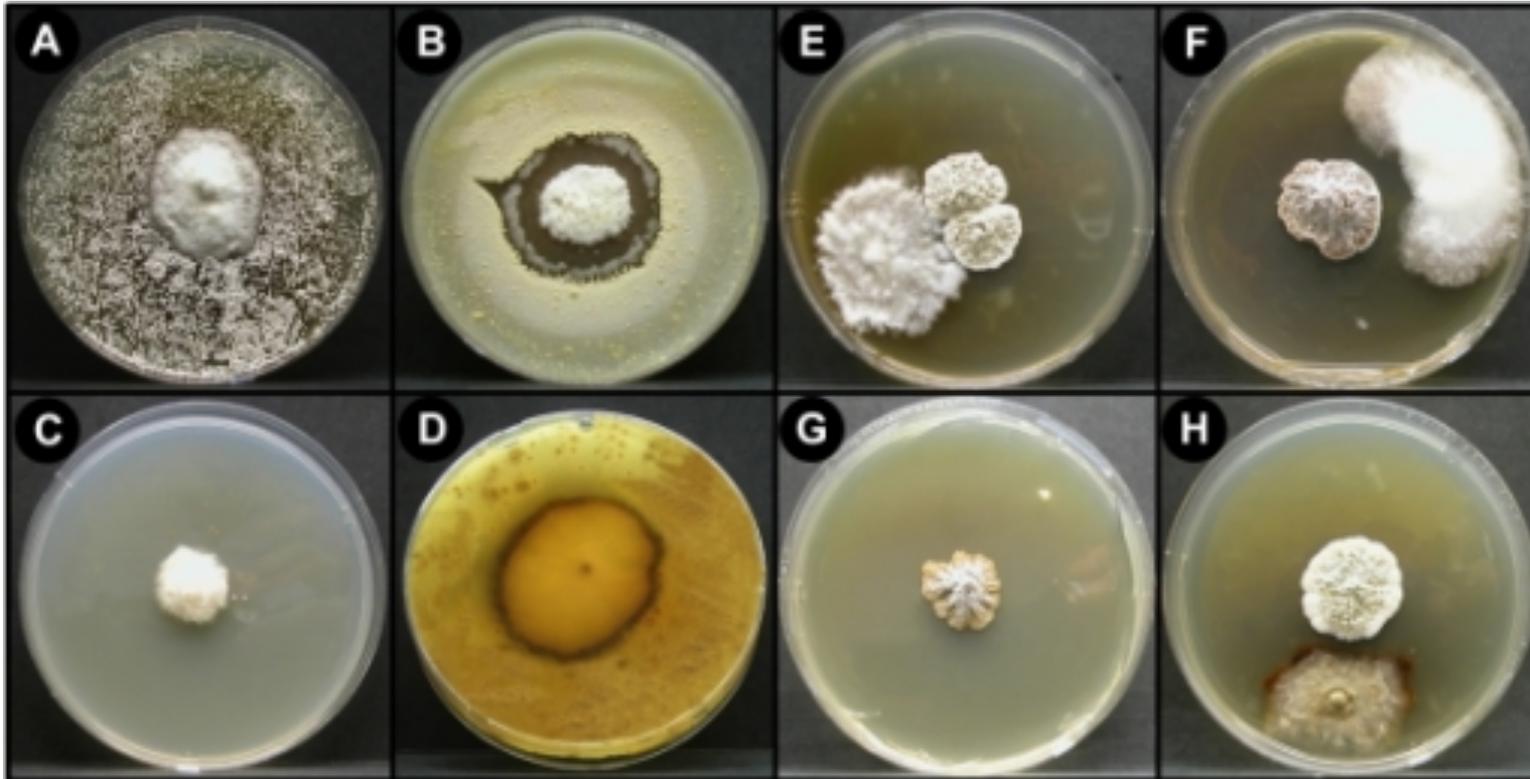


Biofilm de Pseudonocardia
Haut = jeune ouvrière
Bas = ouvrière plus âgée

Antagonisme mutuel: les risques du ménage à trois

Antagonismes mycétome
sur Pseudonocardia

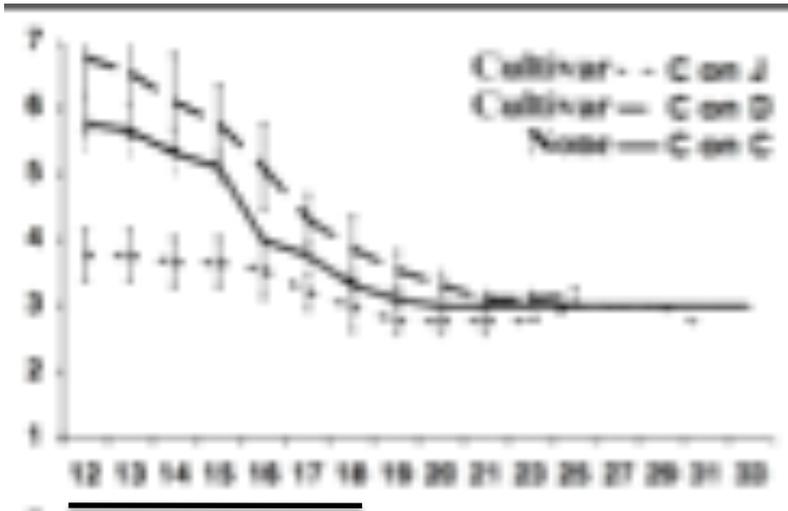
Antagonismes Pseudonocardia
sur mycétome



Antagonisme mutuel Actinobacteries – Basidiomycète
garant de la stabilité du mutualisme ?

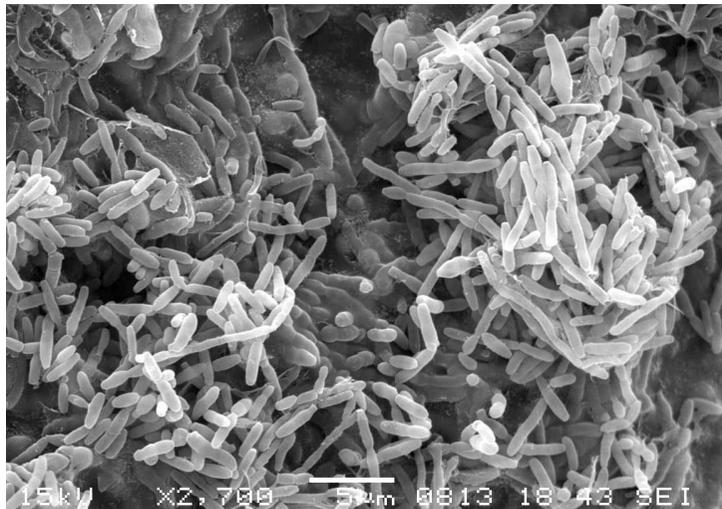
Et si c'était encore plus compliqué...

Quantité Pseudonocardia
cuticule ouvrières



Cultivatrices

Fourragères



Pseudonocardia



Biofilm de Pseudonocardia
Haut = Ouvrière jardinière
Bas = ouvrière fourragère

Adaptation réciproque du génome des fourmis attines *Atta cephalotes* et *Acromyrmex echinator*

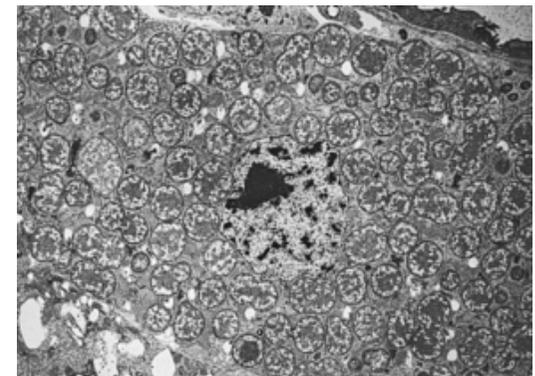
Deux génomes séquencés / annotés

Informations pour mieux déchiffrer symbiose fourmis attines - symbiote fongique (Nygaard et coll. 2011. Genome Res; Suen et coll. 2011. PLoS Genet)

Hypothèse: dépendance obligatoire fourmis attines vis à vis basidiomycète a amené réduction génomique, contrairement à espèces non dépendantes
telle symbiose

Observé dans autres modèles: **puceron du haricot** et endosymbiote *Buchnera aphidicola* (Consortium Sequencing Pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. 2010. PloS Biol; Shigenobu et coll. 2000. Nature)

**Absence gènes voie biosynthèse
plusieurs acides aminés produits
par endosymbiote**



Adaptation réciproque du génome des fourmis attines *Atta cephalotes* et *Acromyrmex echinator*

Génomes séquencés de fourmis attines montrent:

- **Déficit voie biosynthèse arginine**

Pas dans génome espèces de fourmis non champignonnistes

Arginine abondamment présente dans mycétome fourmis attines (Martin et coll. 1969. Ann Entom Soc Am)

- **Perte gène codant pour hexamérine** responsable séquestration des acides aminés durant développement larve (Suen et coll. 2011. PLoS Gen).

Nécessité réduite de stockage des acides aminés lorsque disponibles au "supermarché de proximité" (mycétome) ?

- **Nombre gènes codant sérine protéases** très réduit dans génome *A. cephalotes* vs autres insectes (Suen et coll. 2011. PLoS Gen)

Moins de nécessité hydrolyse des protéines car disponibilité courts peptides dans mycétome ou capacité fourmi attine concentrer dans intestin sérines protéases recueillies sur mycétome ?

Adaptation réciproque du génome des fourmis attines *Atta cephalotes* et *Acromyrmex echinator*

Données cohérentes avec hypothèse fourmis champignonnistes ont perdu capacités acquisition certains nutriments clés au cours co-évolution 50 millions d'années de symbiote fongique

Possible que co-évolution ait causé profondes modifications physiologiques: concentration enzymes cellulolytiques ou activités antimicrobiennes du champignon symbiote concentrées dans intestin fourmi puis restituées par l'application gouttelettes fécales

Au total: coévolution dans le cadre d'une symbiose stable induit glissement évolutif progressif vers association obligatoire