

# LICHENS ET BACTÉRIES

par Jean-Bernard QUIOT

64, rue Jacques Tati -34070 MONTPELLIER - jblfr@aol.com

---

## Résumé :

Des techniques mises au point en biologie moléculaire (métagénomique, FISH) permettent de détecter, de classer phylogénétiquement et de localiser *in situ* des bactéries cultivables ou non cultivables sur milieux de culture. Ces techniques montrent la présence régulière et sous différents climats de protéobactéries associées à de nombreuses espèces de lichens. Un nouveau lignage de bactéries rhizobiales (LAR1) paraît propre aux lichens.

## Summary :

Recent methods in molecular biology (metagenomic, FISH) allow to detect, to classify phylogenetically and to *in situ* locate bacteria species ever cultivable or no cultivable. Those methods show that numerous proteobacteria species can be found in different lichens species under different climates. A new lineage of rhizobiales (LAR1) seems associated with lichens.

---

Des progrès importants dans les techniques d'identification, de classement et de localisation des acides nucléiques améliorent les connaissances sur les relations qui existent entre lichens et bactéries.

## **1. Le vivant est divisé en trois règnes**

La classification phylogénétique actuelle des êtres vivants est de type cladistique. Elle est basée sur les principes définis par HENNIG en 1950 qui recherche et hiérarchise les taxons monophylétiques (tous les descendants issus d'une même origine). Grâce aux progrès de la biologie moléculaire, cette classification est de plus en plus basée sur les données de séquençage de gènes des organismes vivants.

On reconnaît actuellement trois règnes (REVIER, 2002, LECOINTRE et LEGUYADIER, 2006) :

- Les **Eucaryotes** qui regroupent les animaux, les plantes et les champignons, tous constitués de cellules avec un noyau entouré d'une membrane et renfermant des chromosomes en nombres plus ou moins spécifiques.
- Les **Eubactéries** qui regroupent la plupart des bactéries classiquement connues. Ce sont des procaryotes sans noyaux délimités mais avec des ADN (Acides désoxyribonucléiques, porteurs des gènes) généralement circulaires et non regroupés
- Les **Archea** découverts depuis une trentaine d'année. Ce sont aussi des bactéries procaryotes mais qui colonisent plutôt les milieux difficiles (très acides, salés, source chaudes émergées ou sous marines etc...)

## **2. Depuis une dizaine d'années, les connaissances sur le monde bactérien sont bouleversées**

Le nombre d'espèces bactériennes repérées est devenu gigantesque !

Classiquement on identifiait et on caractérisait les bactéries en les isolant en conditions stériles, en les faisant croître sur une gamme de milieux de culture discriminants et en y associant quelques tests (coloration de Gram, observation des flagelles, test de pouvoir pathogène...). On en connaissait à peu près 11 000 espèces (LECOINTRE et LE GUYADER, 2006).

Les progrès de plusieurs techniques de biologie moléculaire ont permis d'affiner la caractérisation d'un isolat bactérien (MADIGAN et MARTINKO, 2012) :

- *Le **séquençage** du génome bactérien c'est à dire l'identification de la suite de nucléotides qui constituent les brins d'ADN a été rendu possible par la méthode de SANGER (1977). Il permet la caractérisation fine d'un isolat bactérien.*

- *La mise au point de la **PCR** (Polymerase chain réaction) publiée par Mullis en 1986 à révolutionné l'étude des acides nucléiques en permettant d'obtenir une très grande quantité de copies d'un acide nucléique recherché. Pour cela, on associe d'une part un piégeage sélectif de l'ADN à amplifier par des amorces spécifiques (courtes séquences d'ADN complémentaires de l'ADN cible) qui se fixent sur la cible et, d'autre part, une enzyme polymérase thermorésistante qui va copier le brin d'ADN à partir du point de fixation de l'amorce.*

*La thermorésistance de l'enzyme permet de réaliser sans la détruire des cycles répétés incluant par exemple, fixation des amorces à 60°C, copie du gène par la polymérase à son optimum d'activité 72°C, séparation à 95°C des doubles brins d'ADN obtenus puis retour à 60°C pour un nouveau cycle. On réalise dans un automate (thermocycleur) plus de 30 cycles successifs et on obtient ainsi plus d'un milliard de copies de l'ADN cible. Cet ADN peut être soumis à des analyses classiques : électrophorèse, séquençage, clonage...*

*Si l'on s'intéresse aux ARN, avant de lancer la PCR, on peut faire intervenir une transcriptase reverse, c'est à dire une enzyme qui va transformer en ADN les ARN de l'échantillon à analyser ; on parle de RT-PCR.*

Plus récemment, l'utilisation de la **métagénomique** a permis de s'apercevoir qu'il existe, dans la nature, 1000 à 5000 fois plus d'espèces de bactéries que l'on ne croyait. Ces bactéries se multiplient dans la nature mais ne sont pas capables de pousser sur nos milieux de culture artificiels. Elles forment l'élément majeur de la biodiversité sur terre et pourraient avoir un rôle essentiel dans l'adaptation car elles sont capables d'échanger très facilement des gènes entre elles et peut-être aussi avec des eucaryotes.

### ***Qu'est-ce que la métagénomique ?***

*C'est une approche qui permet de détecter et de caractériser des organismes vivants par le séquençage de certains de leurs gènes **sans avoir à isoler physiquement et à cultiver ou à élever ces organismes** (MADIGAN et MARTINKO, 2012).*

*En pratique, la métagénomique consiste à amplifier par PCR une séquence d'ADN donnée, directement à partir d'un échantillon de terrain, en utilisant des amorces judicieusement*

définies au niveau de leur spécificité. Pour les bactéries on amplifie généralement la séquence 16S-rARN (séquence d'ARN ribosomal bactérien ayant un coefficient de sédimentation théorique de 16 Svedberg). Cette séquence de rARN est différente des séquences ribosomales 18s des eucaryotes. Elle est distinguée aussi des 16S rARN des chloroplastes par un choix d'amorces judicieux (les chloroplastes sont d'anciennes bactéries intégrées dans les eucaryotes et ils disposent donc de ribosomes de type bactérien).

On obtient ainsi des copies amplifiées de la séquence recherchée telle qu'elle existe dans tous les types de bactéries présentes dans l'échantillon de terrain, qu'il s'agisse de bactéries cultivables ou non cultivables sur milieux artificiels. Suite à des mutations et des remaniements anciens, ces copies amplifiées ou « amplifiats » présentent des différences de forme et de séquence qui les distinguent, et elles sont représentatives des différents types de bactéries présents dans l'échantillon.

On caractérise ensuite ces amplifiats, en utilisant différentes techniques selon leurs coûts et leurs disponibilités au laboratoire, depuis la SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) et le séquençage selon SANGER jusqu'aux techniques de séquençage de nouvelle génération telle que le pyrosequencing 454, (une technique extrêmement puissante diffusée par le laboratoire Roche) et analogues.

Dans une seconde étape associée, en utilisant des programmes informatiques, on compare les diverses séquences obtenues expérimentalement pour évaluer par exemple le nombre de types bactériens présents dans l'échantillon de terrain. On utilise des programmes informatiques qui peuvent permettre de bâtir un premier arbre phylogénétique. On vérifie la robustesse des différences trouvées entre les phylotypes en utilisant le plus souvent un test, **le bootstrap**, qui tire parti des facilités de calculs en série offertes par l'informatique et remplace les analyses statistiques classiques.

Toujours en utilisant des programmes informatiques, on peut choisir de consulter sur le web les banques de gènes où sont conservées en accès libre les dizaines de millions de séquences précédemment réalisées par d'autres chercheurs. On en extrait toutes les séquences disponibles concernant la zone amplifiée qui nous intéresse et on les compare pour bâtir un nouvel arbre phylogénétique, sécurisé par bootstrap. Cet arbre peut être utilisé pour positionner les séquences trouvées dans les prélèvements de terrain par rapport aux séquences caractéristiques des genres ou espèces bactériennes de référence.

La métagénomique a donc permis de reconnaître l'existence des types bactériens communs ou originaux qui étaient présents dans l'échantillon provenant du terrain et de les placer avec plus ou moins de précision dans la classification connue des bactéries. On s'est affranchi de la nécessité de faire des isolements et des mises en culture et on a pu reconnaître la présence d'espèces bactériennes non cultivables et même d'espèces nouvelles.

### **3. Mise en évidence *in situ* de la présence de bactéries dans les lichens**

Depuis moins de 10 ans les connaissances sur la présence de bactéries dans les lichens ont progressé grâce à deux techniques : la métagénomique qui a permis

d'identifier les espèces présentes mais aussi le **FISH** qui a permis de localiser ces bactéries sur le lichen.

### **Qu'est-ce que le FISH ? (Fluorescence In Situ Hybridation)**

*Le FISH est une technique moléculaire qui permet de repérer très finement la localisation d'un ADN donné présent à la surface d'un organisme vivant.*

*Avec un mode opératoire assez simple, on va hybrider une sonde ADN spécifique sur l'ADN in situ de l'organisme étudié. Une sonde moléculaire est constituée par un petit ADN de 10 à 20 nucléotides dont la séquence a été synthétisée pour correspondre à une séquence cible complémentaire présente sur l'organisme à étudier. A l'extrémité de ce petit ADN, on a fixé un pigment qui a la propriété de fluorescer lorsqu'il est éclairé par un rayonnement UV. On étale la sonde sur la préparation et, après incubation et un rinçage soigneux pour éliminer l'excès de sonde non hybridée, on va observer la préparation sous un microscope à fluorescence équipé d'une lampe à ultra-violet ou mieux avec un **microscope confocal** disposant d'une source laser capable de faire fluorescer le pigment utilisé. L'avantage du microscope confocal, beaucoup plus coûteux, est de permettre une reconstruction informatique tridimensionnelle de l'image, ce qui améliore la précision de l'observation. Il est possible d'utiliser, sur la même préparation, des sondes spécifiques de différents ADN et porteuses de pigments de différentes couleurs.*

Appliquée à un lichen, cette technique permet de reconnaître la présence et de localiser les éventuelles colonies bactériennes.

Un grand nombre de travaux sur les bactéries des lichens ont été réalisés par l'équipe de GRUBE et CARDINALE de Graz en Autriche. Ces études ont été corroborées par les articles de l'équipe de LUTZONI de la Duke University en Caroline du Nord et par celle de BATES et FIERER à Boulder, Colorado.

Les résultats actuels sont les suivants :

- L'approche métagénomique a permis de détecter de nombreuses colonies bactériennes sur des espèces différentes de lichens à chlorophycées mais aussi dans un cyanolichen.
- Ces lichens proviennent de différentes parties du monde : Autriche, Alpes, Antarctique, Amérique de l'Est et de l'Ouest et même deux *Roccella* collectés à Saint-Malo (*probablement sur la Tour Solidor !*). La présence de bactéries apparaît comme un phénomène général répandu chez des lichens vivants sous différents climats et sur différents continents.
- Les bactéries repérées ont été situées dans la classification générale des bactéries. La plupart appartient au groupe des **protéobactéries** (*eubactéries*), mais des **archea** existent occasionnellement. Selon HODKINSON et LUTZONI (2009), BATES et al, (2011), un grand nombre de bactéries non cultivables détectées dans des lichens à chlorobiontes forment un clade (LAR1) particulier au sein des **rhizobiales**. D'autres espèces se rapprochent de bactéries déjà connues pour avoir des capacités à former des symbioses racinaires avec des plantes (*Acetobacteraceae, Brucelleceae, Methylobacterium*).

- BATES *et al* (2011) ont utilisé le pyrosequencing 454 pour réaliser une étude à grande échelle permettant d'isoler 657 phylotypes bactériens différents à partir de 16 échantillons de lichens ce qui illustre la diversité des espèces bactériennes en jeu. Ils ont comparé ensuite ces séquences à celles de 7230 séquences de bactéries et archaéa provenant d'échantillons de sols collectés au voisinage des lichens prélevés. Ils constatent de façon significative que les deux groupes ne se recoupent pas, ce qui démontre la nature particulière de la plupart des types bactériens inféodés aux lichens par rapport aux bactéries saprophytes du sol.
- Les études in situ par FISH ont été réalisées sur plusieurs espèces de lichens. Il est établi que ces bactéries peuvent être trouvées souvent sur la face inférieure du lichen mais aussi parfois au sein des feutrages d'hyphes et même à l'intérieur des branches dans le cas de *Cladonia arbuscula*. De très belles photos en FISH et microscopie confocale montrent que les colonies bactériennes de différentes espèces qui se sont développées à la surface de *Cladonia arbuscula* peuvent faire penser à de véritables biofilms bactériens, parfois recouverts par une protection de polysaccharides.

*Les biofilms sont des structures tridimensionnelles de bactéries pouvant réunir des espèces différentes qui se sont reconnues en échangeant des signaux biochimiques (quorum sensing).*

#### **4. À quoi servent ces bactéries ?**

Est-on en présence de saprophytes ou ces bactéries ont-elles un rôle actif dans la symbiose ? Des indices font pencher pour la seconde hypothèse.

- Ces bactéries sont adaptées à se multiplier dans ou sur le lichen.
- Certaines de ces bactéries appartiennent à un clade spécifique inféodé aux lichens ce qui fait penser à une coévolution ou co-adaptation bactérie-lichen.
- Un premier rôle pourrait être de métaboliser l'azote de l'air et donc d'alimenter en azote les lichens à chlorophycées. Des éléments vont dans cette direction, en particulier, les séquences disponibles rapprochent certaines de ces bactéries des bactéries symbiotiques des racines de plantes. Le gène "nif" (pour nitrogen fixation) bien connu a été trouvé dans une bactérie détectée sur *Umbilicaria mammulata*. Inversement, un lichen qui trouve l'azote dans sa cyanobactérie associée ne semble pas porter les mêmes espèces bactériennes que les lichens à chlorophycées.
- De la même façon, ces bactéries pourraient jouer un rôle dans le métabolisme du phosphore.

## **Conclusion**

À partir de maintenant, il devient de plus en plus difficile de considérer un lichen comme une stricte association symbiotique entre une chlorophycée ou une cyanobactérie et un champignon.

Le « lichen » est un micro-écosystème par lui-même qui n'a pas fini de nous étonner. On peut s'attendre à ce que se confirment plusieurs nouveautés :

- L'approche métagénomique est aussi appliquée à la partie mycélienne des lichens. Elle a permis de reconnaître la présence de nombreuses espèces de champignons dont les hyphes indistingables macroscopiquement sont présents en mélange avec le mycobionte. Certaines de ces espèces correspondent aux mycobiontes de lichens du voisinage dont les spores de dissémination ont été accueillies (MUGGIA et GRUBE, 2010). L'analyse phylogénétique d'autres espèces de ces champignons dits « endolichéniques » les positionnent comme ancestraux par rapport à de nombreuses espèces nouvellement décrites qui vivent au voisinage des tissus palissadiques dans le feuillage des végétaux supérieurs (ARNOLD et al, 2009).
- Les études de génétique moléculaire mettent de plus en plus souvent en évidence des cas de **transferts latéraux de gènes** entre espèces parfois très différentes. Ces échanges sont bien connus chez les bactéries. Récemment, chez les champignons, les phytopathologistes mycologues ont répertorié plusieurs cas probables et confirmé au moins un transfert de gène entre deux champignons (OLIVER et SOLOMON 2007). La croissance de mycelia en contacts étroits pourrait être un facteur facilitant ces transferts (ibidem).

Le lichen avec sa surpopulation de champignons, bactéries, algues (en attendant des données sur les virus) devient un candidat possible pour être reconnu comme l'un des lieux où se crée de la biodiversité.

Pourquoi des champignons ou des bactéries modifiées par des transferts génétiques latéraux au sein d'un lichen ne pourraient-ils pas sortir de ce lichen et tenter de se confronter, seuls, aux opportunités d'un environnement en constante modification ?

Ce rôle (hypothétique) pourrait aussi justifier l'incroyable longévité des lichens au cours de l'évolution des terres émergées : plus de 400 millions d'années prouvées, (TAYLOR et al, 1995) et peut-être plus de 600 millions d'années selon des observations encore en discussion.

## **Remerciements :**

L'auteur remercie Jean-Pierre GAVÉRIAUX, Robert ENGLER et Laurence QUIOT pour leurs incitations, encouragements et aides dans la préparation de ce manuscrit. Les hypothèses avancées n'engagent que l'auteur.

## Bibliographie :

- Arnold A.E., Mialikowska J., Higgins K.L., Sarvate S.D., Gugger P., Way A., (2009). *A phylogenetic estimation of trophic transition network for ascomycetous fungi : are lichens cradles of symbiotrophic fungal diversification ? Syst. Biol.* 58 : 283-297.
- Bates S.T., Garrett W.C., Cropsey J., Caporaso G., Knight R., Fierer N., (2011). *Bacterial communities associated with the lichen symbiosis. Applied and environmental Microbiology* 77 : 4, 1309-1314
- Cardinale M., Puglia A.M., Grube M., (2008). *In situ analysis of the bacterial community associated with the reindeer lichen Cladonia arbuscula reveals predominance of alphaproteobacteria. FEMS Microbiol. Ecology* 66 : 63-71
- Hodkinson B.P., Lutzoni F., (2009). *A microbiotic Survey of lichen associated bacteria reveals a new lineage from the rhizobiales. Symbiosis* 49 : 163-180
- Hodkinson B.P., Lutzoni F., (2010). *Do lichens harbor their own rhizobia ? A large scale phylogenetic Survey of lichen associated from the order rhizobiales. Inoculum* 61 : 55-56
- Hodkinson B.P., Gottel N.R., Schadt L.W., Lutzoni F., (2011). *Phototrophic symbiont and geography are major factors affecting highly structured and diverse bacterial communities in the lichen microbiome. Environmental microbiology* : 1-15 . Society for Applied Microbiology & Blackwell ed.
- Lecointre G., Le Guyader H., (2006). *Classification phylogénétique du vivant*, 3<sup>o</sup> édition, Belin ed.
- Madigan M., Martinko J., (2012). *BROCK, Biologie des micro-organismes*. 11<sup>o</sup> édition, Pearson ed.
- Muggia L., Grube M., (2010). *Fungal composition of lichen thalli assessed by single strand conformation polymorphism. The Lichenologist*, 42 : 461-473 (abstract)
- Oliver R.P., Solomon P.S., (2007). *Recent fungal diseases of crop plants : is latéral gene transfert a common theme ? MPMI* 21 : 3, 287-293
- Reviers B. de, (2002). *Biologie et phylogénie des algues*, Tome 1, Belin ed.
- Taylor T.N., Hass H., Remy W., Kerp H., 1995, *The oldest fossil lichen. Nature*, 378 : 244.