

UTILISATION DES ANALYSES DE LA COMPOSITION DE CERTAINES EAUX NATURELLES POUR EVALUER LES CHANCES DE SURVIE D'UNE CYANOBACTERIE ENTOMOPATHOGENE

N. MONTENY - L.I.N - BONDY

1. INTRODUCTION

Les agents bactériens de lutte biologique utilisés contre les larves de moustiques et de simules sont représentés par deux espèces, *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus sphaericus*.

Ces bactéries possèdent une protéine toxique présente sous forme cristalline dans la spore. Cette toxine agit sur les cellules du tube digestif des larves et provoquent leur mort par dégradation des tissus de l'intestin. Le spectre d'action de ces deux espèces est légèrement différent au regard des espèces visées. Cependant, les limites à leur utilisation sont sensiblement les mêmes : à un bon niveau de toxicité pour leurs cibles respectives s'oppose l'inconvénient de leur disparition plus ou moins rapide de la zone de nutrition des larves, essentiellement par sédimentation.

Le recyclage naturel qui a été décrit pour *B. sphaericus* n'est pas suffisamment efficace pour pallier cette disparition et pour *B. thuringiensis* il n'a pas été observé. Les techniques biochimiques récemment développées et les transformations génétiques offrent la perspective d'améliorer l'efficacité de ces larvicides et de développer des méthodes nouvelles pour augmenter leur rémanence dans un milieu naturel.

Les travaux entrepris ces dernières années par plusieurs équipes concernant la biologie moléculaire de ces protéines toxiques ont pour but de déterminer quels sont les gènes responsables de leur synthèse, de

trouver les conditions de transformation de différents organismes hôtes susceptibles d'exprimer ces protéines et de subsister dans le milieu.

L'attitude des chercheurs est mitigée vis-à-vis de l'utilisation en terrain ouvert d'organismes ayant subi des transformations génétiques. On conçoit qu'après les quelques accidents écologiques survenus suite à l'introduction par l'homme d'espèces nouvelles dans un biotope, la prudence en ce domaine soit de mise. Le congrès d'Asilomar (Californie - 1975) fut la première étape dans la prise de conscience du monde scientifique devant ce nouvel outil qu'est le clonage des gènes.

L'Organisation Mondiale de la Santé pour sa part, impliquée dans plusieurs programmes de recherche visant à l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés émet un ensemble de recommandations et attire l'attention des équipes impliquées dans ces essais sur la probabilité de transfert spontané des transposons. Ce risque bien que théorique n'est pas négligeable.

Le transfert d'un gène d'un organisme à un autre peut être réalisé par transformation génétique : le fragment d'ADN peut rester intracytoplasmique s'il est porté sur un plasmide ou encore être inséré dans le génome de l'organisme receveur. Ainsi des cellules de la cyanobactérie *A. nidulans* R₂ ont été transformées pour exprimer les gènes de la toxine de *B. sphaericus* par une équipe mixte CNRS-Institut PASTEUR. Grâce à la collaboration établie entre le Laboratoire de Lutte contre les Insectes nuisibles (L.I.N. - ORSTOM-Bondy) et le Laboratoire d'Enzymologie (CNRS - Gif-sur-Yvette), nous avons pu faire une étude-type de cet organisme transformé

Les cyanobactéries sont des procaryotes longtemps considérés comme des algues "bleues" en raison de la présence d'un système photosynthétique analogue à celui des chloroplastes des plantes supérieures. Des études récentes de leur ultrastructure les ont fait classer parmi les bactéries. Certaines souches acceptent la transformation génétique par les méthodes classiquement en vigueur.

La souche *Anacystis nidulans* R₂, est la souche de choix pour ces essais de transformation génétique.

Nous avons pu disposer de différents échantillons :

- souche témoin non transformée : *A. nidulans* R₂
- souches transformées portant le plasmide :

pGsp 12 : insert = déterminant génétique de 3,5 kb portant les deux gènes codant pour la toxine de *B. sphaericus* souche 1593

pGsp 73 : insert = déterminant génétique (différent du précédent) portant en plus des deux gènes codant pour la toxine, un gène codant pour la protéine enveloppe d'une vésicule gazeuse présente dans certaines souches de cyanobactéries.

Trois points essentiels ont été étudiés :

- activité sur petit mammifère
- niveau de toxicité sur larves de moustiques
- comportement en mare semi-naturelle

Le présent exposé s'attachera à développer essentiellement ce troisième point.

Une évaluation préliminaire de la toxicité de deux souches transformées a été conduite en laboratoire sur des larves de *Culex pipiens* d'élevage.

Les droites de régression "pourcentage de mortalité en fonction de la concentration en protéines" construites avec les résultats des titrages sur *Culex* des deux souches d'*A. nidulans* pGsp 12 et pGsp 73 présentent des pentes très significativement différentes (2,89 et 0,42 respectivement). Ceci indique une différence dans le niveau de toxicité des deux souches vis-à-vis des moustiques. Deux hypothèses peuvent être émises :

- la toxicité de la souche est liée au niveau d'expression et de maturation de la protéine par la machinerie génomique; les deux souches ayant été transformées par des inserts différents nous n'avons pas la preuve que l'expression de la toxine soit du même ordre dans les deux ;

- une différence de comportement alimentaire des larves vis-à-vis de ces deux produits dont la dispersion dans le milieu n'est pas identique compte tenu de leur densité différente. Il est courant d'observer que les larves de *Culex* se maintiennent en surface. Ceci correspond à des larves au repos. En réalité lorsque la profondeur de l'eau le permet, et c'est le cas au moins en élevage et dans le cas des tests en laboratoire, les larves se déplacent sur le fond des récipients, en position verticale, et filtrent les corpuscules qui ont sédimenté.

ESSAIS EN MARES SEMI-NATURELLES

Dans le but de suivre la croissance de la cyanobactérie dans un milieu aussi complexe que l'eau d'un milieu naturel, le spectre d'absorption d'une suspension de la souche étudiée a été comparé à celui de l'eau de la mare expérimentale. Trois pics d'absorption correspondant spécifiquement à *A. nidulans* peuvent être retenus ; ils se présentent aux longueurs d'onde de 440, 630 et 680 nm.

Il est possible d'avoir une bonne évaluation de la présence de la cyanobactérie dans le milieu grâce à une simple mesure de densité optique. Nous avons choisi 630 nm. Ces valeurs ont été mises en relation avec les conditions climatiques dans le but de déterminer quelles grandeurs peuvent influencer le maintien ou provoquer la disparition du micro-organisme en milieu naturel.

Deux études ont été conduites en mares semi-naturelles situées à Bondy. Afin d'éviter toute dispersion incontrôlée des souches, les mares ont été entourées d'un grillage et recouvertes d'un filet à mailles de 2 cm.

* **Le premier essai** a porté sur la dose et n'a concerné que le pGsp 12 : les deux mares retenues pour cette étude ont plusieurs années d'existence. Elles sont colonisées par une faune et une flore aquatiques spontanées (salamandres, grenouilles entre autres). La surface a été débarrassée des lentilles d'eau (*Lemna minor*) avant l'expérimentation. Une mare témoin permet de suivre l'évolution de la population naturelle de *Culex*. La densité larvaire dans chacune d'elles a été suivie par prélèvements aléatoires trois fois par semaine. Les données climatiques,

durée journalière de l'insolation, températures maximales et minimales au cours de la période, ont été fournies par la Météorologie Nationale.

La quantité d'inoculum d'*A. nidulans* pGsp 12 à appliquer a été déterminée par dosages préliminaires en laboratoire. La suspension de cyanobactéries a été épanchée de manière homogène à la surface de chaque mare. La première mare a été traitée à 1,2 mg de protéines par litre, la seconde à 6 mg/l.

Les résultats montrent qu'il y a effectivement eu une limitation de la population de moustiques dans les mares traitées (tableau I).

TABLEAU I. : Densité de population naturelle de larves de *C. pipiens* (valeur moyenne de trois prélèvements de 200 ml).

Temps (jours)	Mare témoin	Mare I traitée à 1,2 mg/litre	Mare II traitée à 6 mg/ litre
0	51 ± 10	12 ± 12	35 ± 5
2	241 ± 20	10 ± 3	0
6	157 ± 31	24 ± 4	0
9	207 ± 23	17 ± 5	0
12	368 ± 58	17 ± 3	0
14	344 ± 69	101 ± 15	0
16	503 ± 60	39 ± 10	0

Des prélèvements réguliers d'eau permettent d'évaluer la densité de cyanobactérie par mesure de l'absorption à 630 nm, sur le fond (D.O. au fond) et à 10 cm sous la surface (D.O. en surface)

En dépit d'une insolation et d'une température nocturne élevées, la **concentration en cyanobactéries décroît au cours du temps**, plus rapidement en surface mais également sur le fond, après un premier enrichissement dû très vraisemblablement à une sédimentation.

L'introduction d'un plasmide et l'expression d'une protéine nouvelle dans les cellules d'*A. nidulans* leur confèrent une densité telle que la bactérie ne se maintient pas en surface.

Quoiqu'il en soit le transfert des gènes de *B. sphaericus* dans un organisme susceptible de se maintenir proche de la surface n'ayant pas été probant, une autre approche a été mise en place : l'adjonction dans le plasmide vecteur d'un gène d'une autre souche de cyanobactérie codant pour la protéine enveloppe de vésicules gazeuses. Ce travail réalisé en 1988-89 par une équipe mixte CNRS-Institut Pasteur a abouti à la souche *A. nidulans* pGsp 73 dont nous avons étudié la flottabilité et le comportement en milieu naturel au cours de l'été 1989.

Les vésicules gazeuses n'ayant pu être visualisées par microscopie par l'équipe qui a réalisé la transformation, nous avons monté un dispositif expérimental destiné à observer l'effet de la transformation sur la flottabilité de la souche *A. nidulans* pGsp 73 : 100 ml d'une culture dense sont déposés au fond d'un récipient cylindrique en verre contenant deux litres d'eau de mare filtrée. La densité du milieu de culture est telle que l'échantillon se répartit sur le fond du récipient. Au cours des heures qui suivent, une différence de diffusion manifeste entraîne une répartition homogène de l'échantillon pGsp 73 ainsi que de la suspension *A. nidulans* témoin alors que l'échantillon pGsp 12 montre une tendance très nette à l'accumulation dans le bas de la colonne d'eau apportant la preuve s'il en était encore besoin de l'augmentation de sa densité consécutive à la transformation.

Dans le deuxième essai en mare semi-naturelle la comparaison a porté sur l'efficacité des transformants pGsp12 et pGsp 73 présentant une différence de flottabilité.

Trois mares identiques en surface (3 m²) et remplies trois mois auparavant d'eau de ville ont reçu un premier inoculum le 4 juillet de 2,4 mg/litre de chacune des trois souches : *A. nidulans* R₂ témoin, *A. nidulans* transformée pGsp 12 et *A. nidulans* transformée pGsp 73. Elles ont été traitées une seconde fois, respectivement avec les mêmes souches, le 2 août à 2,1 mg/l pour renouveler les observations.

Dans les mares expérimentales les valeurs de D.O. à 630 nm indiquent une disparition de la cyanobactérie en 4 à 5 jours. Néanmoins il apparaît une baisse sensible de la densité larvaire dans les mares traitées. En général, les pontes de *Culex* étaient très abondantes dans la

mare témoin et assez rares, si ce n'est inexistantes, dans les mares traitées. Il y a d'ailleurs tout lieu de croire que la faible densité larvaire tenait plus de l'absence de repopulation que de la toxicité de l'eau.

L'attractivité relative des trois souches est mise en évidence par un essai en laboratoire : dans une cage de *Culex pipiens* d'élevage sont placés trois pondoires contenant l'eau des trois mares expérimentales chargées de *A. nidulans* pGsp 12 (I), *A. nidulans* pGsp 73 (II) et *A. nidulans* R₂ (III).

CONCLUSION

L'ensemble des observations faites jusqu'alors ne permettait donc pas de justifier la disparition de la cyanobactérie de la mare semi-naturelle.

La croissance d'*A. nidulans* est tributaire de plusieurs facteurs. Des conditions optimales d'éclairement et de température ont été définies pour le maintien de cet organisme en conditions artificielles de même que la composition en éléments minéraux (RIPPKA *et al.*, 1979).

La concentration d'*A. nidulans*, surtout en surface, n'est influencée ni favorablement par le rayonnement solaire global (R_g) ni défavorablement par les températures minimales et la diminution est continue.

Il fallait donc chercher dans la composition minérale du milieu des mares expérimentales une explication à cette dégénérescence. La comparaison de la composition des deux milieux révèle un très large déficit en nitrates et en ion sodium auquel est imputable la disparition de la cyanobactérie dans le milieu étudié (tableau II).

TABLEAU II : Analyse des éléments chimiques majeurs des divers milieux impliqués dans l'expérimentation (concentrations en milliéquivalents par litre).

ion	Mare témoin	Mare traitée	Milieu optimal de culture
Ca ⁺⁺	3,97	2,67	0,39
Mg ⁺⁺	1,24	1,20	0,40
K ⁺	1,13	0,24	0,17
Na ⁺	0,92	1,00	18,35
HCO ₃ ⁻	4,12	2,12	0,75
Cl ⁻	1,63	1,55	0,39
PO ₄ ⁻	0,02	0,01	0,17
NO ₃ ⁻	0,01	0,03	17,60
SO ₄ ⁻⁻	1,71	1,54	0,40
pH	7,5	7,5	7,4

L'importance des nitrates pour un organisme autotrophe est bien connue. Si les normes de sécurité pour l'eau potable (< 50 mg NO₃⁻/l) imposent une limitation à l'épandage des "engrais azotés", l'agriculture intensive est à l'origine d'un enrichissement permanent en nitrates des eaux de ruissellement. Il serait donc intéressant de vérifier la viabilité d'*A. nidulans* dans des eaux chargées en nitrates.

Le mauvais maintien d'*A. nidulans* dans nos mares expérimentales au cours d'une période climatiquement favorable n'est pas la preuve de la non applicabilité du produit dans d'autres conditions.