

Molécules en action

Caractérisation des espèces chimiques réactives
d'après leur mécanisme d'action primaire

9



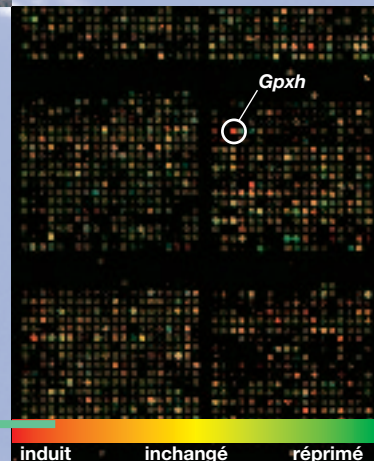
Des biosenseurs bactériens
pour la détection de l'arsenic
dans l'eau potable

12



Les gènes de défense utilisés
comme indicateurs de pollution

15



Nouvelle perspective pour l'analyse
de la qualité de l'eau potable

18



Molécules en action

2 Editorial

Article thématique

- 3 Les stratégies biomoléculaires dans le domaine de l'environnement – 135 ans d'une recherche captivante

Recherches actuelles

- 6 Ilots génomiques et transfert horizontal de gènes entre bactéries
9 Caractérisation des espèces chimiques réactives d'après leur mécanisme d'action primaire
12 Des biosenseurs bactériens pour la détection de l'arsenic dans l'eau potable
15 Les gènes de défense utilisés comme indicateurs de pollution
18 Une nouvelle perspective pour l'analyse de la qualité de l'eau potable
20 Le procédé Anammox pour l'élimination de l'azote dans les stations d'épuration
22 La diversité génétique des daphnies dans les lacs alpins

Notes

- 24 Publications (3193–3311)
27 Livres
28 Divers

Editeur Distribution et ©:
EAWAG, Case postale 611, CH-8600 Dübendorf
Tél. +41-1-823 55 11
Fax +41-1-823 53 75
<http://www.eawag.ch>

Rédaction Martina Bauchrowitz, EAWAG

Traductions Laurence Frauenlob-Puech, D-Waldkirch

Conseiller linguistique Fabrice Combes, F-Marseille

Copyright Reproduction possible après accord avec la rédaction.

Parution 3x par an en français, allemand et anglais.
Production chinoise en coopération avec INFOTERRA
China National Focal Point.

Crédit photographique EAWAG

Maquette inform, 8005 Zurich

Graphisme Peter Nadler, 8700 Küsnacht

Impression sur papier recyclé

Abonnements et changements d'adresse Les nouveaux abonné(e)s sont les bienvenu(e)s!
Le bulletin d'inscription se trouve au milieu de ce numéro.

De l'écosystème à l'écosystème par la molécule



Rik Eggen, chef de la division «Microbiologie de l'environnement et écotoxicologie moléculaire»

A l'heure actuelle, plus personne ne peut imaginer la recherche scientifique sans la biologie moléculaire. Ainsi, dans le domaine médical, c'est au niveau moléculaire que les processus responsables de l'apparition de maladies sont étudiés. Une fois les mécanismes identifiés, il devient possible de développer des médicaments spécifiques qui seront alors appliqués en traitement préventif comme le sont p. ex. les vaccins ou bien, quand la maladie est déjà déclarée, en traitement curatif ciblé et si possible sans effets secondaires. Le rôle croissant de la biologie moléculaire dans la recherche environnementale reste par contre un aspect moins connu du plus grand nombre. L'EAWAG s'engage pour une exploitation des écosystèmes aquatiques, cours d'eau, lacs et eaux souterraines, dans une optique de durabilité. Les écosystèmes aquatiques sont très complexes et constituent l'habitat d'une multitude d'êtres vivants des plus divers, de la bactérie unicellulaire aux plantes et animaux supérieurs en passant par les algues pluricellulaires. Les organismes évoluent en échanges permanents entre eux et avec le milieu environnant qui, lui-même très dynamique, est en évolution constante. Pour en avoir une idée, il suffit de penser aux changements naturels telles que les variations journalières et saisonnières. A celles-ci s'ajoutent les nuisances d'origine anthropique dont l'importance augmente constamment sous l'effet de la croissance incessante de la population mondiale. Des problèmes tels que le rejet de polluants dans les milieux naturels, l'amenuisement des ressources en eau potable ou le développement des pathogènes dans les eaux superficielles des pays en voie de développement ne peuvent plus être ignorés. Dans un tel contexte, il est besoin d'approches

qui permettent d'une part de protéger pour l'avenir l'environnement aquatique complexe de manière préventive et d'autre part de traiter les problèmes d'urgence de manière ciblée et «sans effets secondaires». L'EAWAG tente ainsi d'analyser au niveau moléculaire les processus qui se déroulent au sein des écosystèmes pour mieux comprendre, prévoir et empêcher les effets négatifs des actions anthropiques. Nous avons cependant parfaitement conscience du fait que nous ne progresserons réellement dans ce sens que si nous ne perdons pas les ensembles de vue dans leur globalité à force de considérer les détails.

Domaine essentiel s'il en est, la recherche fondamentale en biologie moléculaire est abordée par l'EAWAG sous ses thèmes les plus divers comme p. ex. la diversité génétique des daphnies dans les lacs alpins ou bien les mécanismes d'action des polluants au niveau moléculaire. Mais la recherche appliquée occupe également une place de choix dans les activités de l'EAWAG. Là aussi, les méthodes de biologie moléculaire sont de plus en plus employées. Citons à titre d'exemple le développement d'un biosenseur permettant la mise en évidence de polluants, l'identification d'une bactérie utilisée depuis peu pour l'élimination de l'azote dans les stations d'épuration et l'élaboration d'une méthode biomoléculaire pour la détection d'agents pathogènes dans l'eau potable.

Plongez dans le monde des molécules et laissez-vous convaincre de la contribution précieuse que peut apporter la biologie moléculaire à une gestion durable des écosystèmes aquatiques.



Les stratégies biomoléculaires dans le domaine de l'environnement

135 ans d'une recherche captivante

La biologie moléculaire est devenue une discipline à part entière au milieu du siècle dernier. C'est dans le domaine de la microbiologie qu'il faut chercher ses racines, cette dernière s'attachant à ses débuts à décrypter les processus vitaux élémentaires et donc aussi à étudier le fonctionnement des écosystèmes. Alors qu'à l'heure actuelle l'implication de la biologie moléculaire dans les domaines des biotechnologies ou de la médecine va de soi pour le plus grand nombre, son rôle dans celui de la recherche environnementale appliquée reste méconnu. Ce n'est pas lui rendre justice car elle peut apporter une contribution précieuse à la résolution de problèmes d'actualité dans ce domaine qui nous concerne tous.

Des chercheurs se sont intéressés dès le milieu du XIX^e siècle à la transformation par voie biologique de certains composés par le biais des microorganismes. La plupart des études de l'époque étaient basées sur la théorie de la génération spontanée selon laquelle la vie pouvait indéfiniment apparaître à partir du monde inerte. Dans le même temps et presque par inadvertance, ces travaux fournirent les premières connaissances d'ordre biomoléculaire sur le métabolisme des microorganismes. Le chercheur français Béchamp [1], un contemporain de Louis Pasteur, était lui aussi adepte de la théorie de la génération spontanée. Il étudia la capacité de transformation de substances définies dans divers échantillons prélevés dans le milieu naturel et fit entre autres état d'une formation de méthane à partir d'éthanol. Les agents responsables de cette réaction étaient d'après lui des microorganismes qui étaient apparus de toute pièce au laboratoire dans les solutions étudiées et il leur donna le nom de *Microzyma cretea*. C'est grâce aux expérimentations remarquables de Pasteur qu'il a été permis de réfuter la théorie de la génération spontanée, qui s'avéra en réalité d'une multiplication de microorganismes déjà présents dans les échantillons.

Au cours de la deuxième moitié du XIX^e siècle, le scientifique allemand Felix Hoppe-Seyler poursuivit assidûment la voie biomoléculaire dans la recherche environnementale. En tant que premier professeur de Chimie physiologique de l'Université de

Strasbourg, il fit le lien entre les aspects biomoléculaires et énergétiques des processus biologiques. Il s'aperçut en effet que chaque transformation biochimique s'accompagnait d'une libération d'énergie, elle-même utilisée par les microorganismes pour assurer leur croissance et leur métabolisme cellulaire. Ceci est particulièrement remarquable étant donné que la thermodynamique classique, telle qu'elle est unanimement reconnue aujourd'hui, n'en était qu'à ses balbutiements (ce n'est qu'en 1878 que Josiah Gibbs introduisit la notion d'énergie libre) [2]. L'approche scientifique de Hoppe-Seyler devait être encore affinée au cours des années qui suivirent.

Des isotopes radioactifs pour marquer les métabolites

La découverte dans les années trente et quarante du siècle dernier des isotopes ¹¹C et ¹⁴C par le chimiste Samuel Ruben et le physicien Martin Kamen [3] constitua un autre tournant décisif dans l'histoire de la biologie moléculaire. Les deux chercheurs ont tout de suite compris quel était l'intérêt de tels isotopes pour la recherche. L'emploi expérimental du ¹¹C s'avéra cependant délicat et problématique, étant donné que la demi-vie de cet isotope n'est que de 21 minutes. C'est le recours au ¹⁴C, dont la demi-vie est d'environ 5700 ans, qui permit de suivre les produits transitoires des transformations biochimiques même dans les systèmes complexes ainsi que d'identifier les organismes responsables de la synthèse

de certains produits d'assimilation dans un écosystème. La micro-autoradiographie permet de visualiser directement les organismes qui catalysent une certaine transformation biochimique dans un écosystème (Fig. 1). C'est au couple de chercheurs Luise et Thomas Brock que l'on doit d'avoir ouvert la voie de cette méthode [4].

La mise en évidence de microorganismes spécifiques

Dans les années 70 et 80, les biologistes, et en particulier les écologues microbiologistes, se consacrent en priorité au développement de méthodes permettant d'identifier directement les microorganismes dans les échantillons complexes prélevés dans le milieu naturel.

Des composés spécifiques: Certaines substances ne sont présentes que chez des groupes de microorganismes bien précis. C'est le cas du coenzyme transporteur d'électrons F_{420} que l'on ne trouve à une exception près que chez les bactéries méthanogènes. Cette substance est particulièrement intéressante car elle possède des propriétés fluorescentes qui peuvent être mises à profit pour mettre en évidence les bactéries qui la renferment (Fig. 2).

Procédés immunologiques: La mise en évidence d'espèces données de bactéries par voie immunocytochimique qui était déjà largement pratiquée dans le domaine de la

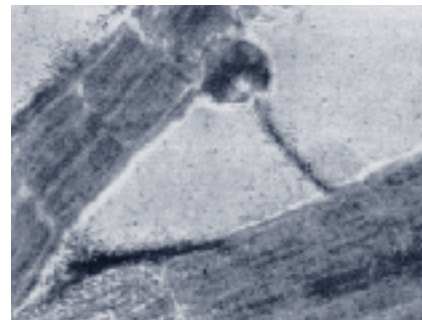
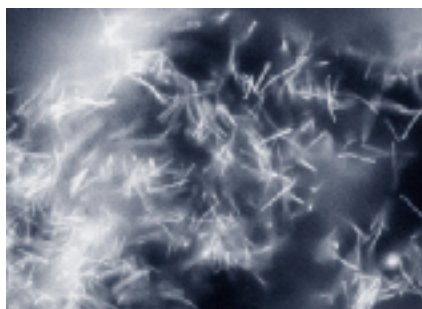


Fig. 1: Autoradiogramme de bactéries épiphytes (visibles en bas à gauche sous la forme de colonies noires) vivant sur des rhodophycées marines. Les bactéries ont été alimentées avec du glutamate au ¹⁴C comme source de carbone [tiré de 4].



A. Zehnder, EAWAG

Fig. 2: F_{420} , un coenzyme transporteur d'électrons que l'on rencontre presque exclusivement chez les bactéries méthanogènes. Cette substance devient fluorescente après excitation par de la lumière ultraviolette. Cette propriété permet une identification directe des bactéries méthanogènes dans les populations naturelles, comme ici des cellules de *Methanobacterium formicicum*.

microbiologie médicale voit son champ d'application s'étendre aux systèmes naturels vers la fin des années 70. Il existait alors déjà de multiples possibilités de marquage permettant de visualiser des anticorps précis dans un organisme cible (Fig. 3). Ces techniques allaient du marquage radioactif à l'emploi de métaux lourds spécifiques et de colorants fluorescents en passant par celui d'enzymes catalysant des réactions particulières (méthode ELISA). Le recours aux anticorps permet même de mettre en évidence des protéines isolées, en général des enzymes, dans une cellule donnée au sein d'un système complexe. L'inconvénient des techniques immunocytochimiques, c'est que les organismes ou les protéines qui doivent être reconnus par les anticorps doivent tout d'abord être isolés. Ils sont en effet indispensables à la production des anticorps.

Sondes à ARN et à ADN: La recherche a effectué un véritable bond en avant avec le développement dans la première moitié des années 80 des sondes à ARN et à ADN. Deux conditions étaient nécessaires à ce progrès. Il fallait tout d'abord que l'on réalise que l'ARN était une molécule universelle permettant d'établir des liens de parenté entre organismes et que l'on approfondisse les recherches à ce sujet. Carl Woese [5] et Norman Pace [6] furent les pionniers dans ce domaine. Il fallait ensuite que l'ADN puisse être multiplié *in vitro*, c'est-à-dire en dehors de la cellule. En découvrant la réaction en chaîne de la polymérase ou PCR («polymerase chain reaction»), Kary Mullis permit en 1985 de s'engager dans cette voie [7] (Fig. 4). Les sondes sont construites de manière à reconnaître des séquences spécifiques d'ARN ou d'ADN. Selon qu'il s'agit de régions variables ou conservées, cette technique permet une identification au niveau des espèces ou de groupes entiers d'organismes. Si, de plus, les sondes sont

combinées à des colorants fluorescents, les microorganismes marqués peuvent être directement visualisés au microscope à fluorescence. A l'aide de la PCR, il est d'autre part possible d'isoler des séquences de gènes inconnues issues d'un écosystème quelconque pour les comparer par la suite avec des séquences d'ADN connues et cataloguées. Etant donné l'immensité des banques de données déjà établie, il y a de grandes chances que les séquences inconnues puissent être rattachées à des fonctions spécifiques ou bien des groupes d'organismes définis.

Identifier les facteurs et éléments défavorables aux organismes

Au-delà de la question de comprendre les processus – qui fait quoi, où et comment – se pose depuis quelques décennies celle d'évaluer les causes et les conséquences de dommages causés à l'environnement. Au sein de cette thématique complexe, un domaine de recherche porte sur l'étude des produits chimiques toxiques susceptibles de se retrouver dans le milieu naturel et de porter atteinte aux organismes qui le peuplent. L'urgence avec laquelle il convenait d'aborder ces questions a d'un côté généré des progrès considérables au niveau de la chimie analytique – on est aujourd'hui en mesure de doser une multitude de polluants à des concentrations même infimes dans une matrice complexe. D'un autre côté, nos connaissances sur la régulation des processus biomoléculaires constituent une base précieuse pour la construction de ce que l'on appelle des biosenseurs. Ceux-ci per-

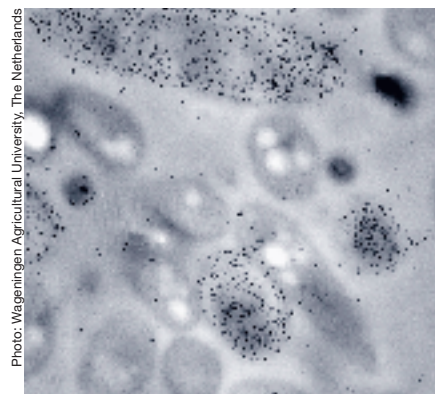


Fig. 3: Des anticorps marqués avec des particules d'or colloïdal (points noirs) permettent d'effectuer au microscope électronique à transmission une identification immunocytochimique de bactéries préparées en coupes ultra-fines. La photo ci-dessus illustre le marquage de *Methanosaeta concillii*, une bactérie consommatrice d'acide acétique, sur un biofilm obtenu sur acide propionique.

mettent de mettre en évidence des concentrations infimes de polluants par l'expression d'enzymes spécifiques ou de protéines fluorescentes. En outre, le séquençage de génomes entiers donne la possibilité de rassembler des groupes de gènes spécifiques pour les reporter sur ce que l'on appelle des puces à ADN. A l'aide de ces puces, il est alors possible d'étudier les réactions des gènes face aux produits chimiques et autres nuisances écologiques.

Au cours des 150 dernières années, nous avons parcouru un long chemin sur la voie de la compréhension des aspects moléculaires de la vie dans un environnement en évolution permanente. Les dernières 20 années en particulier ont été marquées par une véritable explosion des connaissances dans le domaine de la recherche appliquée.

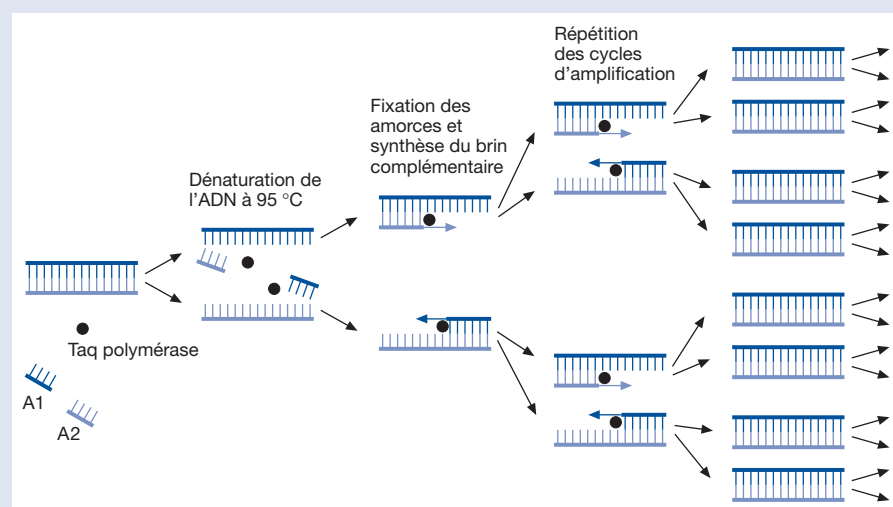


Fig. 4: Multiplication de fragments donnés d'ADN par la technique de la PCR. Le morceau d'ADN à amplifier est mis en solution avec deux amorces (A1 + A2) et une enzyme, la Taq polymérase. Le brassage est effectué de manière automatisée pendant 30 cycles de température dans un thermocycleur. Un cycle de température dure environ 4 minutes et se compose de trois étapes. 1^{ère} étape: L'ADN est dénaturé à 95 °C; 2^{ème} étape: La température est baissée jusqu'à 37 °C maximale pour que les amorces puissent se fixer à l'ADN; 3^{ème} étape: A une température de 75 °C, la Taq polymérase synthétise le brin complémentaire d'ADN.

L'EAWAG a été largement impliqué dans ce phénomène comme l'illustrent les exemples de travaux présentés dans ce numéro.

Effets et mise en évidence des toxiques

L'arsenic constitue une nuisance ressentie dans le monde entier. Il s'agit en effet de l'un des polluants les plus importants de l'eau potable. Au Bangladesh et au Vietnam, des millions de personnes souffrent des suites de contaminations par l'arsenic. Le dosage de cet élément par des méthodes classiques de chimie analytique est cependant loin d'être évident et pratiquement impossible sans un bon équipement de laboratoire. J.R. van der Meer et J. Stocker (voir p.12) ont mis au point un biosenseur bactérien facile à utiliser et sensible à des concentrations même très faibles d'arsenic (un millionième de gramme par litre). Les bactéries génétiquement modifiées sont porteuses de ce que l'on appelle un gène rapporteur dont l'activation en présence d'arsenic est suivie de la synthèse d'une protéine rapporteur. Cette enzyme catalyse une réaction associée à la libération d'une coloration bleue. Selon la concentration en arsenic, la quantité d'enzyme produite sera plus ou moins grande et donc la quantité de colorant bleu plus ou moins importante. Toute personne même profane est donc en mesure à l'aide de papier indicateur de constater si un puits donné est contaminé ou non par de l'arsenic.

Pendant de nombreuses années, l'écotoxicologie était dominée par une approche plutôt phénoménologique. Les nouvelles méthodes de biologie moléculaire permettent aujourd'hui d'étudier l'expression de gènes spécifiques et la synthèse des protéines correspondantes en réponse à des stimuli précis. Quand un organisme entre en contact avec un produit toxique, différents gènes se trouvent activés. Les produits de ces gènes sont impliqués dans les systèmes de défense des cellules contre le toxique. Dans leur article de la page 15, B. Fischer et R. Eggen montrent que l'activité des gènes de défense peut être mise à profit pour mettre en évidence certains polluants. La réaction d'une cellule à un toxique ne constitue cependant qu'une partie de la réponse au problème. Il importe également de comprendre de quelle manière les produits toxiques provoquent des dommages, ce qui signifie qu'il est également impératif de disposer d'informations sur les réactions des polluants avec les structures biologiques. B. Escher (voir p. 9) et ses collaborateurs ont étudié toute une série de réactions induites par les polluants

et décrivent les mécanismes d'action primaires de tels réactifs.

Elimination de l'azote et pureté de l'eau potable

Un groupe d'ingénieurs et de microbiologistes (voir l'article de C. Fux et collaborateurs p. 20) ont étudié de concert de nouvelles voies d'élimination de l'azote dans les eaux usées. Le processus Anammox découvert aux Pays-Bas dans lequel l'ammonium est directement transformé en azote atmosphérique en présence de nitrites mais sans apport d'oxygène se prête particulièrement bien au traitement des eaux polluées à forte teneur en ammonium. Mais pour pouvoir l'employer, il fallait tout d'abord identifier les microorganismes responsables de cette transformation. C'est à l'aide de sondes génétiques spécifiques que l'on y est parvenu. La bonne applicabilité pratique du procédé Anammox a ensuite été testée dans un réacteur pilote, ce qui fait que plus rien ne s'oppose à sa mise en œuvre à grande échelle dans les stations d'épuration.

La qualité sanitaire de l'eau potable est encore actuellement contrôlée à l'aide de la méthode de culture en boîte de gélose en grande partie élaborée au XIX^e siècle. Le problème, c'est que cette méthode de culture est très demandeuse en temps. Elle ne livre généralement de résultats qu'au bout de 72 heures, 24 heures dans le meilleur des cas. Les contaminations aiguës ne peuvent donc pas être détectées à temps pour être endiguées comme il se doit. Une méthode basée sur la PCR permettrait d'effectuer un grand pas en avant. Les contaminations pourraient être identifiées au bout d'environ quatre heures, les mesures nécessaires pouvant être engagées de manière précoce. Dans leur article de la page 18, A. Rust et W. Köster montrent comment cette méthode de contrôle de la qualité sanitaire des eaux potables peut être appliquée.

Transfert de gènes et diversité génétique

Deux autres articles sont consacrés à des aspects évolutifs. L'équipe de J.R. van der Meer (voir p. 6) a été la première à montrer comment de gros morceaux d'ADN étaient échangés entre bactéries. Ces morceaux d'ADN sont appelés îlots génomiques; ils peuvent représenter plus de 10% du patrimoine génétique total et doter les bactéries réceptrices de propriétés supplémentaires, comme p. ex. celle de dégrader certains polluants. Le transfert de gènes alors qualifié d'horizontal permet aux bactéries de franchir des étapes importantes de l'évolution en l'espace de quelques généra-

tions avec de grandes chances de succès. M. Winder et P. Spaak (voir p. 22) ont étudié la diversité génétique des puces d'eau dans des lacs alpins situés à différentes altitudes. Ce faisant, ils cherchaient à savoir si l'idée communément admise selon laquelle plus les lacs sont élevés, plus la diversité spécifique des communautés planctoniques est faible, était également valable au niveau de la diversité génétique des populations. Les auteurs concluent de leurs travaux que la diversité génétique ne diminue pas avec l'altitude, mais qu'elle peut encore être considérable dans des lacs très élevés.

«More is different»

Les progrès très rapides réalisés au niveau des méthodes de biologie moléculaire comportent le risque de nous faire perdre la vision d'ensemble, nous incitant par exemple à essayer d'expliquer le fonctionnement de tout un écosystème à partir d'une poignée d'informations détaillées. L'important, c'est d'adopter les stratégies de biologie moléculaire pour décrypter les phénomènes du vivant au niveau des processus et de reporter ensuite cette perception à la globalité du système. Dès 1972, Philip W. Anderson constate dans son article intitulé «More is different» que la décomposition d'un système en ses différents éléments ne suffit pas à comprendre le fonctionnement de l'ensemble [8]. Les deux approches sont nécessaires et, à l'EAWAG, nous en sommes bien conscients.



Alexander Zehnder, microbiologiste, directeur de l'EAWAG et professeur de protection des eaux et de technologie de l'eau à l'EPF de Zurich. Ses intérêts scientifiques se portent sur la microbiologie de l'environnement, sur l'application des processus microbiens aux biotechnologies de l'environnement et sur des questions de développement durable.

- [1] Béchamp A. (1868): Lettre de M. Béchamp à M. Du-mas. *Annales de Chimie et de Physique* 13, 103-111.
- [2] Hoppe-Seyler F. (1887): Die Methangährung der Essigsäure. Hoppe-Seyler's Zeitschrift der Physiologischen Chemie 11, 561-568.
- [3] Kamen M.D. (1963): Early history of carbon-14. *Science* 140, 584-590.
- [4] Brock T.D., Brock M.L. (1966): Autoradiography as a tool in microbial ecology. *Nature* 209, 734-736.
- [5] Woese C.R., Fox G.E. (1977): Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74, 5088-5090.
- [6] Pace N.R., Stahl D.H., Lane D.J., Olson G.J. (1985): Analyzing of natural populations by RNA sequences. *ASM News* 51, 4-12.
- [7] Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Ehrlich H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-Polymerase. *Science* 239, 487-491.
- [8] Anderson P.W. (1972): More is different. *Science* 177, 393-396.

Ilots génomiques et transfert horizontal de gènes entre bactéries

Les chromosomes sont en général considérés comme des molécules stables devant être soigneusement copiées pour chaque cellule fille nouvellement formée. A part quelques rares erreurs de copiage («mutations»), il ne peut pas arriver grand chose à l'ADN chromosomique. Mais en est-il vraiment ainsi? On sait maintenant que les chromosomes bactériens comportent des «îlots génomiques», c'est-à-dire des régions de l'ADN capables de se séparer elles-mêmes de leur chromosome, d'atteindre d'autres bactéries et de s'insérer dans le chromosome récepteur. Leur fonction? Ils dotent bien souvent les bactéries réceptrices de nouvelles propriétés leur permettant par exemple d'infecter certains hôtes eucaryotes ou de dégrader certains polluants.

Il y a près de dix ans que nous avons commencé d'étudier le processus de transfert horizontal de gènes entre bactéries (voir glossaire). Notre objectif était de déterminer la fréquence avec laquelle certains gènes étaient transférés entre différentes bactéries dans un environnement naturel. Pour notre étude, nous avons choisi comme système modèle la souche B13 de la bactérie *Pseudomonas* sp. isolée à partir de boues d'épuration. Cette souche se sert exclusivement de 3-chlorobenzoate comme source de carbone et d'énergie (Fig. 1). Lors de sa découverte en 1974, elle faisait partie des rares souches bactériennes capables de dégrader les composés chlorés. Cet aspect était particulièrement intéressant puisque de nombreux polluants appartiennent à la famille des composés aromatiques chlorés. Mais la souche B13 se distingue encore par une autre propriété des plus spectaculaires: ces bactéries sont en effet capables de transférer ceux de leurs gènes impliqués dans le métabolisme du 3-chlorobenzoate vers d'autres espèces de bactéries et ce, même au sein du microcosme d'un digesteur d'eaux usées [1]. On constata d'autre part un fait tout à fait curieux: le taux de transfert de gène horizontal semblait augmenter en présence de 3-chlorobenzoate. Nous avons alors supposé que ce phénomène était dû au fait que le 3-chlorobenzoate favorisait la croissance des bactéries recevant les gènes responsables de la dégradation de ce composé. D'un autre côté,

nous ne savions pas encore trop comment ces gènes pouvaient passer du B13 aux autres bactéries.

Les gènes responsables de la dégradation du 3-chlorobenzoate localisés sur un îlot génomique

Nous nous sommes donc penchés avec une attention particulière sur le mécanisme de transfert de gène. Roald Ravatn, qui a effectué une thèse sur ce thème, constata que la bactérie «receveuse» avait en fait reçu un fragment d'ADN de B13 contenant au moins 100 000 paires de bases. Ce fragment contenant les gènes responsables de la dégradation du 3-chlorobenzoate fut appelé l'élément *c/c* [2] (Fig. 2A) et l'on constata qu'il était inséré dans un ou deux sites très spécifiques du chromosome récepteur. Le chromosome de la souche B13 est lui-même doté de deux copies de l'élément *c/c* qui ne semblent pas disparaître après transfert vers une nouvelle bactérie (Fig. 2B). Roald Ravatn identifia également le facteur responsable de l'excision de l'élément *c/c* du chromosome de B13 et de sa réinsertion dans le chromosome récepteur. Il s'agit d'une enzyme appelée «intégrase». En comparant la composition biochimique de l'intégrase de la souche B13 avec d'autres protéines, on constata qu'il existait une parenté avec les intégrases des bactériophages qui intègrent leur génome aux chromosomes des cellules infectées, et avec les

intégrases de ce que l'on appelle les îlots génomiques (voir glossaire) [3]. Le gène de l'intégrase de la souche B13 est situé à l'extrémité 5' de l'élément *c/c* (Fig. 2A).

Depuis quelques années, la découverte de nouveaux îlots génomiques se fait à un rythme grandissant. Ces progrès sont principalement dus à la multiplication des projets de séquençage des génomes. De grands laboratoires sont parvenus à déterminer la séquence de nucléotides complète de près de 100 génomes bactériens. L'étude des séquences complètes de nucléotides a révélé que de nombreuses bactéries portaient des îlots génomiques et disposaient même d'une multitude de copies différentes. Les îlots génomiques se caractérisent par la présence d'un gène codant pour une intégrase ainsi que par la présence d'un site spécifique d'insertion sur le chromosome récepteur (Fig. 2B). Toutes les informations dont nous disposons sur l'élément *c/c* indiquent qu'il s'agit bien d'un îlot génomique.

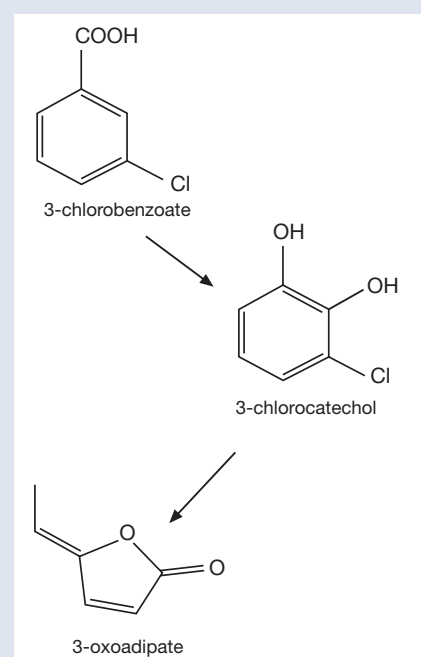


Fig. 1: Dégradation spécifique d'un composé aromatique chloré, le 3-chlorobenzoate. Le produit 3-oxoadipate entrera ensuite dans le métabolisme général.

Glossaire

Ilots génomiques

Régions instables des chromosomes bactériens qui se transfèrent parfois elles-mêmes du génome d'une bactérie à celui d'une autre. Elles produisent un accroissement de la vitalité des bactéries et peuvent être classées en différentes catégories ou sous-types: par exemple, les «ilots écologiques» des bactéries de l'environnement et les «ilots de pathogénicité» des bactéries pathogènes qui comportent des fonctions auxiliaires intervenant au niveau de l'infection, de la synthèse de toxines et de l'adhésion [4].

Green Fluorescent Protein ou GFP

Protéine rapporteur; les cellules dans lesquelles la GFP est synthétisée deviennent fluorescentes et peuvent être observées au microscope à épifluorescence.

Transfert de gène horizontal

Echange d'ADN entre bactéries; par opposition au transfert de gène vertical qui correspond à la transmission d'un gène d'un ancêtre commun à ses descendants. La reproduction des bactéries est généralement qualifiée d'asexuée car les bactéries ne pratiquent pas l'équivalent de la fusion génétique de deux cellules différentes qui est la caractéristique de la reproduction sexuée des eucaryotes. Les bactéries sont néanmoins capables d'échanger des segments d'ADN. Etant donné que ces segments peuvent se fixer dans un génome et conférer de nouvelles propriétés à la bactérie receveuse, l'échange de gènes entre bactéries peut être considéré comme une forme de sexualité bactérienne.

Promoteur

Région régulatrice d'un gène situé en tête de la région codante. L'activation du promoteur induit la transcription de la région codante qui provoque la synthèse de la protéine correspondante.

Comment les îlots génomiques se déplacent-ils?

Maintenant que nous savions que les gènes responsables de la dégradation du 3-chlorobenzoate se situaient sur un îlot génomique, il nous restait à nous pencher sur le fait constaté antérieurement que le transfert de l'élément *c/c* était favorisé par la présence de 3-chlorobenzoate. C'est à ce stade que Vladimir Sentschilo a entamé en 1999 une thèse de doctorat visant à déterminer quels facteurs environnementaux ou cellulaires influencent sur le transfert de l'élément *c/c*. Etant donné que le transfert de l'élément *c/c* est toujours précédé d'une activa-

tion du gène codant pour l'intégrase, il nous a semblé judicieux d'utiliser cette activation comme indicateur de l'excision et du transfert dont elle est toujours suivie. Dans ce but, Vladimir Sentschilo a donc concentré

ses efforts sur le gène codant pour l'intégrase et construit des bactéries rapporteurs spécifiques (à la manière du biosenseur pour la détection de l'arsenic, p. 12). Ces bactéries rapporteurs portent une construc-

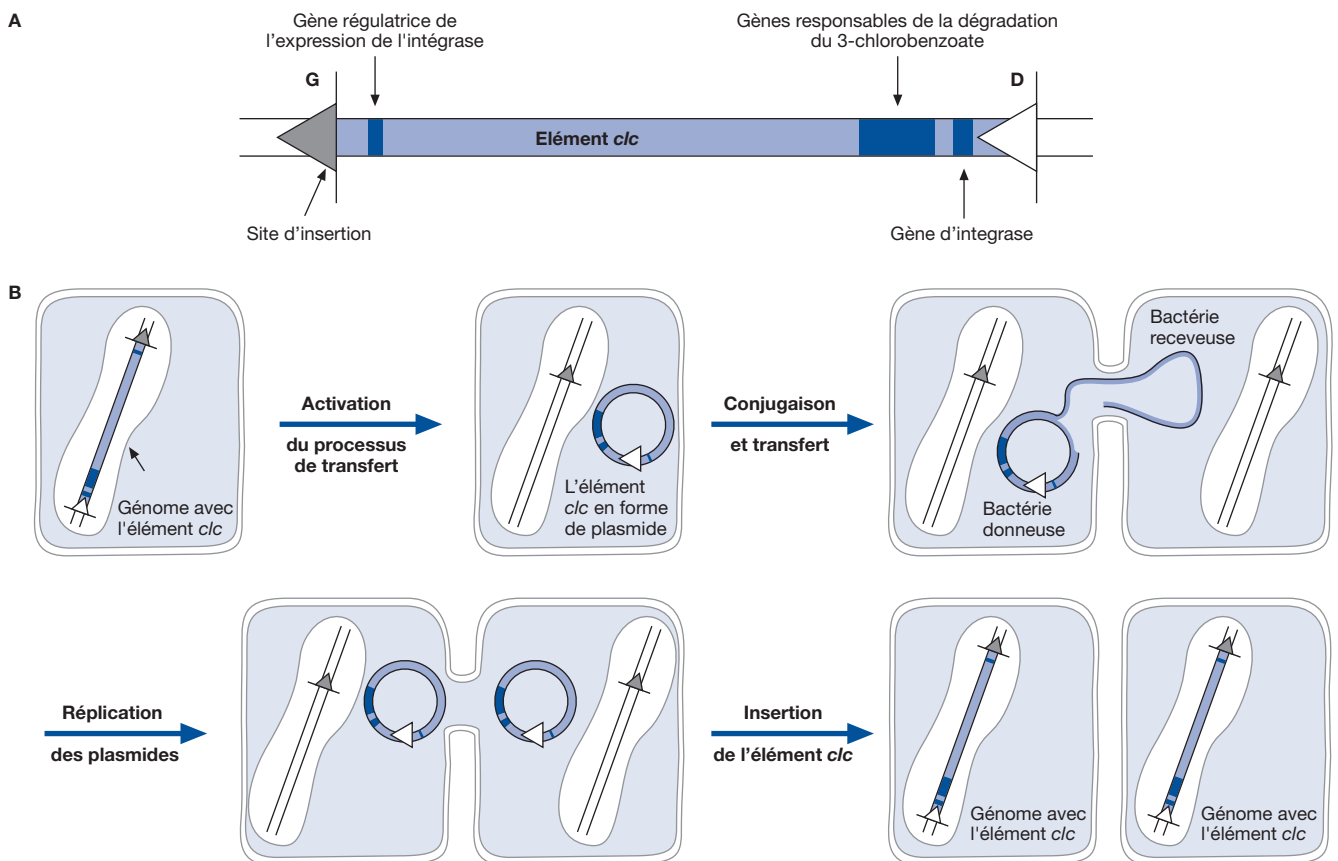


Fig. 2: L'élément *c/c* (A) et sa propre vie hypothétique (B). Une fois activé, le élément *c/c* est découpé du chromosome par l'intégrase et se trouve alors dans la cellule bactérienne comme molécule d'ADN circulaire (= plasmide). Quand cette bactérie rencontre une deuxième bactérie sans l'élément *c/c*, l'élément *c/c* est transféré sous forme d'ADN simple brin. Après réplication l'élément *c/c* s'est réintégré également grâce à l'intégrase au site d'insertion dans les génomes des deux bactéries.

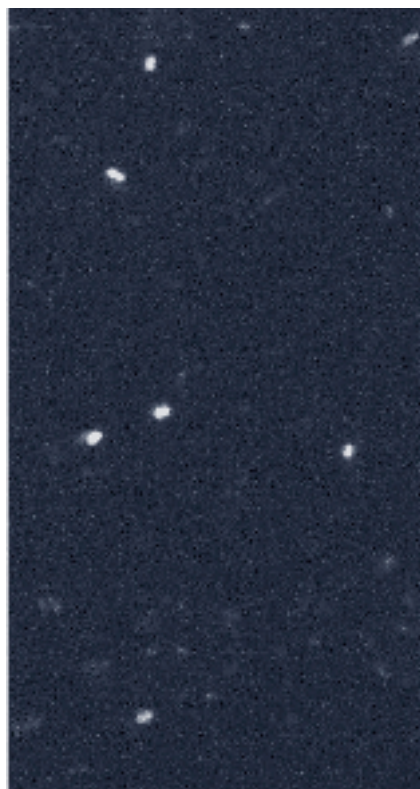
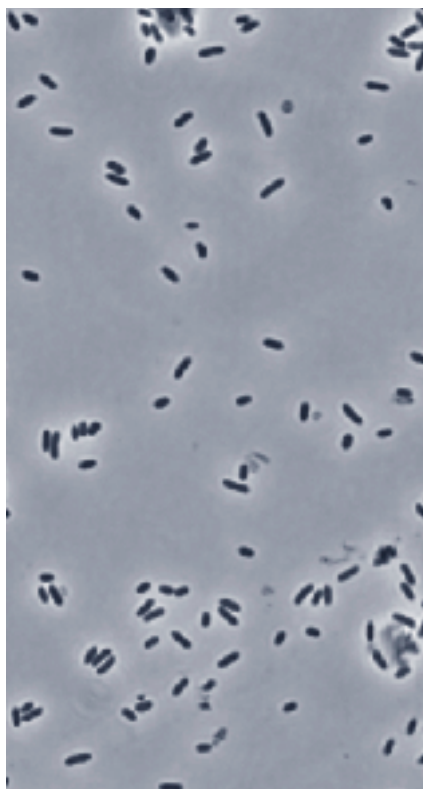


Fig. 3: Le processus du transfert de l'élément *c/c* est seulement activé dans très peu de bactéries d'une culture de *Pseudomonas* sp. souche B 13. Veuillez comparer l'image microscopique en contraste de phase (gauche, noir sur gris) avec le même détail (droit) montrant les bactéries activées comme cellules claires sur fond noir.

tion moléculaire constituée du promoteur (voir glossaire) du gène de l'intégrase couplé au gène rapporteur de la «Green Fluorescent Protein» (GFP, voir glossaire). La présence de GFP dans la cellule révélerait donc une activation du promoteur du gène de l'intégrase et donc la mise en route du processus de transfert de l'élément *c/c*.

A notre grande surprise, seule une petite partie des cellules d'une culture de la souche B13 développa un signal fluorescent (Fig. 3), ce qui indique que le mécanisme de transfert n'a été activé que dans une petite partie de la population. Dans la plupart des cas, cependant, les cellules qui deviennent fluorescentes ne se trouvent plus dans une phase de croissance active (c.-à-d. dans des conditions de jeûne). Autre observation surprenante, quand les cellules avaient été cultivées en présence de 3-chlorobenzoate, le nombre de cellules fluorescentes en conditions de jeûne était plus élevé que chez les cellules cultivées avec d'autres sources de carbone. Ce résultat confirme notre observation initiale et montre de plus que le 3-chlorobenzoate stimule le transfert de l'élément *c/c* à un stade particulièrement précoce, c.-à-d. au niveau de l'activation de l'expression du gène de l'intégrase. On ignore cependant encore pourquoi le gène de l'intégrase est activé dans certaines bactéries et pas dans d'autres.

Vladimir Sentchilo a d'autre part réussi à identifier deux protéines qui semblent influencer l'expression du gène de l'intégrase et peuvent être en rapport avec des signaux cellulaires ou environnementaux. Curieusement, ces deux protéines sont codées par l'îlot génomique lui-même (Fig. 2A) et en consultant les bases de données, on s'aperçoit que de nombreuses autres bactéries synthétisent des protéines similaires. Pour mieux comprendre la fonction de l'îlot génomique de la souche B13 ainsi que ses rapports avec d'autres îlots génomiques sur le plan de l'évolution, nous avons maintenant décidé de déterminer la séquence complète de l'ADN de ces bactéries. Ce travail est réalisé en collaboration avec l'Institut Pasteur de Paris et l'Institut de Recherche sur le Génome (IfG) de l'Université de Bielefeld en Allemagne. Nous espérons que ces connaissances nous permettront de comprendre les mécanismes de régulation du transfert de l'élément de la souche B13 ainsi que d'autres îlots génomiques.

Implications plus ou moins désirables

S'il s'avère que certains polluants tels que le 3-chlorobenzoate stimulent réellement le transfert de gène, il faut s'attendre à observer des effets sur les taux de dissémination de certaines fonctions génétiques au sein des communautés bactériennes. Du point

de vue de la dégradation des polluants, il serait plutôt bénéfique de voir les gènes responsables de leur dégradation plus largement répandus, leur biodégradation s'en trouvant accélérée. Par contre, une dissémination plus rapide de propriétés pathogènes permettant aux bactéries d'infecter des hôtes eucaryotes ne constitue pas une perspective très réjouissante. Il semble que même les génomes des organismes considérés comme étant les plus petits du monde vivant comportent des entités encore plus petites, les îlots génomiques, qui semblent avoir leur propre mode de vie.



Jan Roelof van der Meer est microbiologiste et dirige le groupe «Microbiologie moléculaire» à la division «Microbiologie de l'environnement et écototoxicologie moléculaire» de l'EAWAG. Domaines de recherche: Evolution, dégradation des polluants, développement de biosenseurs et écologie microbienne.

Coauteurs: Vladimir Sentchilo, Muriel Gaillard

- [1] Ravatn R., Zehnder A.J.B., van der Meer J.R. (1998): Low-frequency horizontal transfer of an element containing the chlorocatechol degradation genes from *Pseudomonas* sp. strain B13 to *Pseudomonas putida* F1 and to indigenous bacteria in laboratory-scale activated-sludge microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2126–2132.
- [2] Ravatn R., Studer S., Springael D., Zehnder A.J.B., van der Meer J.R. (1998): Chromosomal integration, tandem amplification, and deamplification in *Pseudomonas putida* F1 of a 105-kilobase genetic element containing the chlorocatechol degradative genes from *Pseudomonas* sp. strain B13. *Journal of Bacteriology* 180, 4360–4369.
- [3] van der Meer J.R., Ravatn R., Sentchilo V. (2001): The *c/c* element of *Pseudomonas* sp. strain B13 and other mobile degradative elements employing phage-like integrases. *Archives of Microbiology* 175, 79–85.
- [4] Hacker J., Carniel E. (2001): Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity: A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Reports* 2, 376–381.

Caractérisation des espèces chimiques réactives d'après leur mécanisme d'action primaire

Chacun de nous a été un jour ou l'autre confronté aux images désolantes de poissons morts flottant le ventre en l'air vers le rivage. Ces images nous font réaliser de façon brutale combien les accidents majeurs dus aux produits chimiques peuvent être dévastateurs pour les êtres vivants qui peuplent nos milieux aquatiques. Mais notre environnement est également soumis en permanence à de faibles doses de polluants dont les effets passent bien souvent inaperçus. Il est donc primordial d'apprendre la manière exacte dont les polluants chimiques se comportent au sein des êtres vivants qu'ils contaminent. Le but de notre travail est d'identifier les mécanismes d'action primaires des molécules réactives à l'aide de tests bactériologiques afin de pouvoir procéder à une classification des risques dus aux produits chimiques.

Le risque écotoxicologique lié aux espèces chimiques réactives ne peut être évalué de manière satisfaisante à l'aide des tests classiques. Cela est dû au fait que les molécules réactives sont souvent rapidement hydrolysées et que les méthodes classiques ne testent en fin de compte qu'une petite partie du grand spectre d'action de ces composés. Il est cependant particulièrement important de déterminer le mécanisme d'action des polluants chimiques étant donné que c'est lui qui conditionne la toxicité potentielle du produit. C'est pour cette raison que nous nous attachons actuellement à développer une batterie de tests bactériens permettant de couvrir l'ensemble des mécanismes d'action des espèces chimiques réactives.

Les polluants attaquent les biomolécules

Tous les effets toxiques résultent en fin de compte d'interactions primaires entre les polluants et trois types de biomolécules : les lipides membranaires, les protéines et l'ADN [1]. Ces interactions vont des faibles affinités régies par les forces de van der Waals à la formation de liaisons chimiques en passant par des interrelations spécifiques dues p. ex. aux liaisons hydrogène ou aux forces d'attraction entre charges opposées (Fig. 1). Les relations de faible intensité induisent en général des effets non spécifiques et réversibles et n'interviennent que dans le cas de polluants hydrophobes. Les interrelations spécifiques jouent p. ex. un rôle dans les réactions d'inhibition enzy-

matiques dans lesquelles le polluant vient s'imbriquer à la manière d'une clé dans une serrure dans le site de fixation de l'enzyme qui n'est plus en mesure de réagir avec son substrat spécifique. Mais notre intérêt se porte plus particulièrement sur les espèces chimiques réactives qui établissent avec les biomolécules cibles des liaisons chimiques covalentes, en général irréversibles. Ces espèces chimiques comptent un grand nombre de substances présentant différents groupes fonctionnels réactifs. On trouve notamment dans cette famille de composés les espèces réactives de l'oxygène (voir l'article de B. Fischer, p. 15) et ce que l'on appelle les réactifs électrophiles sur lesquels se concentre plus particulièrement notre article.

La cellule se prémunit contre les réactifs électrophiles

Les réactifs électrophiles sont des substances qui de par leur configuration électronique sont pauvres en électrons et réagissent de préférence avec les groupes nucléophiles (= riches en électrons) des peptides, des protéines et de l'ADN. Leurs cibles de prédilection sont les groupements thiols des peptides et des protéines ainsi que certains groupements oxygénés et azotés de l'ADN (Fig. 2). Dans le pire des cas, les protéines peuvent être endommagées par les réactifs électrophiles au point de ne

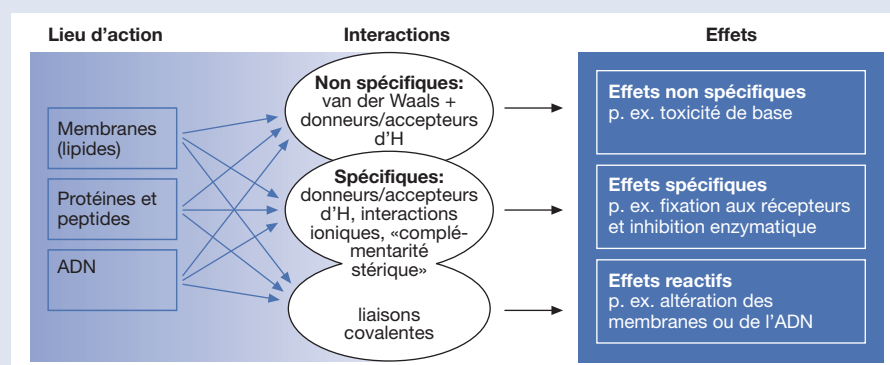


Fig. 1: Classification des effets toxiques en fonction de la nature des interactions entre polluants et biomolécules sur le lieu d'action.

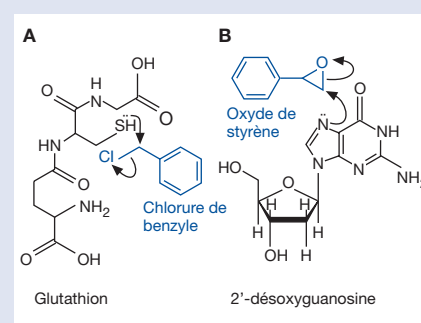


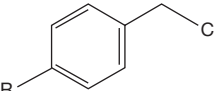
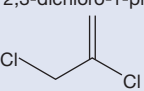
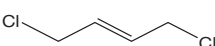
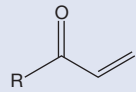
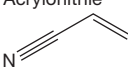
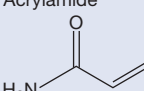
Fig. 2: Deux exemples de modes d'action primaires d'espèces chimiques réactives. Les réactions chimiques avec les protéines (A) ou l'ADN (B) induisent des effets toxiques.

plus pouvoir assurer leurs fonctions et les réactions entre électrophiles et ADN peuvent déstabiliser cette macromolécule et induire des mutations pouvant entraîner des cancers. Les réactions avec les deux cibles peuvent finalement mener à la mort.

Mais les cellules se prémunissent contre de telles attaques. Le glutathion, un tripeptide intracellulaire (Fig. 2), bloque les polluants électrophiles, qui sont ensuite rejetés de la cellule. Il existe aussi de nombreux systèmes chargés de réparer les dommages causés à l'ADN, comme p. ex. des protéines qui reconnaissent et réparent les erreurs qui se trouvent dans les séquences d'ADN. Pour des concentrations de polluant élevées et/ou des temps d'exposition prolongés, ces systèmes de défense sont cependant vite dépassés et des effets toxiques se produisent.

Evaluation de différents mutants d'*E. coli* et de divers types d'effets

Les méthodes qui détectent une activation de ces systèmes de défense sont donc toutes désignées pour être intégrées à des tests visant une identification des mécanismes d'action primaires des réactifs électrophiles. Il faut cependant tenir compte d'un élément important: la toxicité d'une substance électrophile ne dépend pas uniquement de sa réactivité chimique mais aussi de sa concentration sur le lieu de la réaction à l'intérieur de la cellule. Cette concentration intracellulaire dépend à son tour de la quantité de molécules électrophiles qui sont absorbées par l'organisme, de la manière dont le polluant se répand dans celui-ci et de la capacité de l'organisme à le neutraliser en le transformant rapidement en un composé moins nocif. Ces processus ont donc une influence décisive sur la biodisponibilité du polluant considéré. Dans le cas des organismes unicellulaires, on peut supposer que la concentration en polluant hydrophile sur le lieu de la réaction est aussi élevée que la concentration extracellulaire. C'est la raison

Structure	Biomolécule altérée
Epoxide	
 Oxyde de styrène R = phényle Epoxy 2,3-propylbenzène R = benzyle 2-(4-nitrophényle)-oxirane R = p-nitrophényle 1,2-époxybutane R = C ₂ H ₅ Epichlorohydrine R = CH ₂ Cl	ADN ADN ADN et protéines ADN ADN et protéines
2-méthyl 2-vinylloxirane 	ADN et protéines
Réactifs organochlorés	
 Chlorure de benzyle R = H Chlorure de 3-méthylbenzyle R = m-CH ₃ Chlorure de 4-nitrobenzyle R = p-NO ₂	ADN et protéines ADN et protéines ADN et protéines
2,3-dichloro-1-propylène 	ADN et protéines
trans-1,4-dichloro-2-butène 	ADN et protéines
Substances avec doubles liaisons réactives	
 Acroléine R = H Acrylate d'éthyle R = O-C ₂ H ₅ Acrylate de 2-hydroxyéthyle R = O-C ₂ H ₄ -OH Acrylate d'isobutyle R = HO-sec-C ₄ H ₉	Protéines Protéines Protéines Protéines
Acrylonitrile 	Protéines
Acrylamide 	Protéines

Tab. 1: Les 17 polluants de notre étude et leur mode d'action primaire.

pour laquelle nous avons choisi de travailler avec la bactérie *Escherichia coli*. Ce micro-organisme présente également l'avantage d'être disponible sous la forme de nombreux mutants en plus de la souche d'origine. Nous avons évalué tout un éventail de souches d'*E. coli* des plus diverses. Pour nos tests, les bactéries ont été exposées à 17 réactifs électrophiles différents (Tab. 1) et nous avons mesuré les paramètres et types d'effets suivants: inhibition de la croissance, concentration intracellulaire de glutathion, interruption des brins d'ADN et activation

de différents mécanismes de réparation de l'ADN [2].

Deux paires de souches d'*E. coli* utilisées comme biosenseurs

Nous avons obtenu des résultats particulièrement probants avec deux paires de souches d'*E. coli*. Les souches MJF276 (glutathion⁺) et MJF335 (glutathion⁻) ne se distinguent que par rapport à leur capacité de synthétiser du glutathion, sinon elles sont génétiquement semblables. De même les deux souches MV4108 (ADN⁻) et

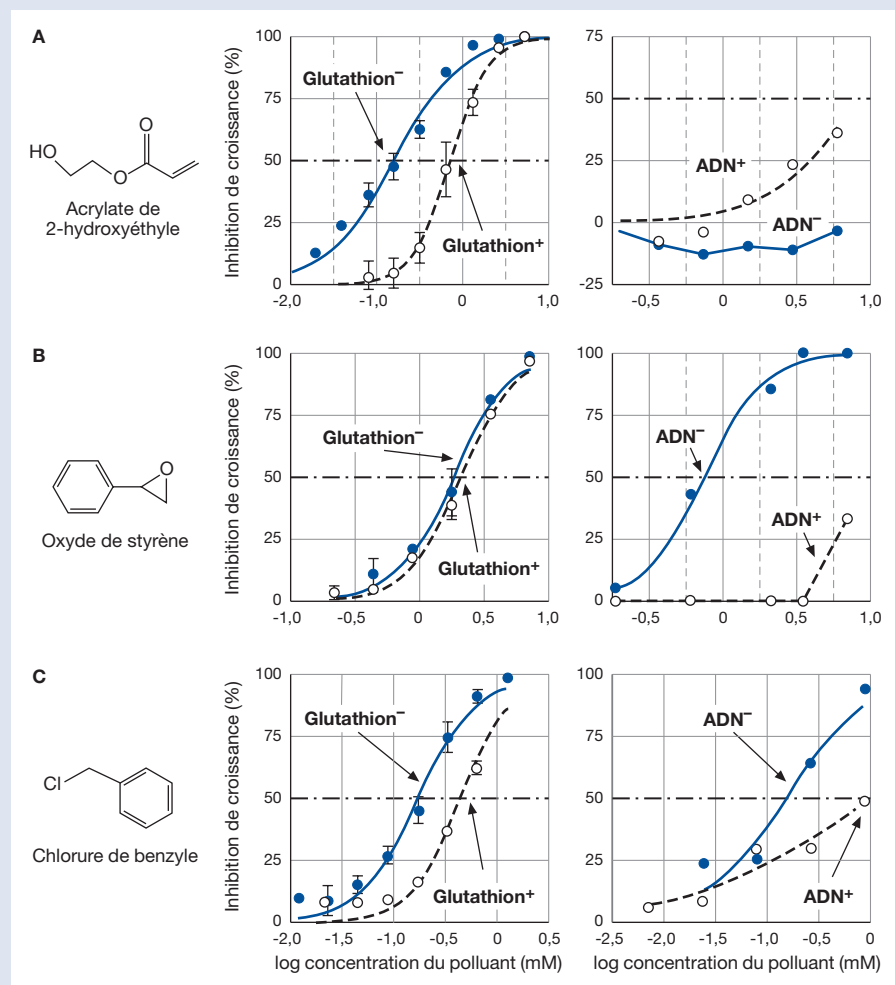


Fig. 3: Courbes de croissance des deux paires de souches d'*E. coli* glutathion⁺/glutathion⁻ et ADN⁺/ADN⁻ exposées à différentes concentrations de polluants.
 A: Exemple de l'acrylate de 2-hydroxyéthyle, un polluant altérant les protéines.
 B: Exemple de l'oxyde de styrène, un polluant altérant l'ADN.
 C: Exemple du chlorure de benzyle, un polluant non spécifique qui réagit aussi bien avec les protéines qu'avec l'ADN.

MV1161 (ADN⁺) sont génétiquement identiques mis à part leur capacité de réparation de l'ADN: dans la première, plusieurs gènes codant pour des enzymes de réparation ont subi une mutation annihilant leur fonction alors qu'ils sont intacts dans la dernière. Les paires de souches de bactéries ont été cultivées en suspension dans un milieu liquide contenant différentes concentrations des réactifs électrophiles à étudier. L'inhibition de la croissance a ensuite été mesurée. Ces analyses ont montré que les espèces chimiques réactives connues pour leur action dommageable au niveau des protéines induisaient de nettes différences de croissance chez les souches glutathion⁺ et glutathion⁻ alors qu'elles n'influaient pas sur la croissance des souches ADN⁺ et ADN⁻ (Fig. 3A). Les six substances à doubles liaisons activées que nous avons étudiées (Tab. 1) font partie de ce groupe de composés chimiques. A l'inverse, les réactifs connus pour leurs effets au niveau de l'ADN induisent de fortes différences

de croissance chez la paire de souches ADN⁺/ADN⁻, la croissance de la souche ADN⁻ étant nettement inhibée contrairement à celle de la souche ADN⁺ (Fig. 3B). Ce groupe de substances auquel appartiennent les trois époxydes étudiés (Tab. 1) ne provoque pas de différence de croissance entre les souches glutathion⁺ et glutathion⁻. Nous avons d'autre part identifié un troisième groupe de composés à la réactivité non spécifique, puisqu'elles attaquent aussi bien les protéines que l'ADN (Tab. 1) et induisent des différences de croissance au sein des deux paires de souches (Fig. 3C).

Validation et perfectionnement des tests

Les résultats de cette étude peuvent non seulement servir à une classification des modes d'action mais également à une description des effets sur les organismes aquatiques. C'est particulièrement évident quand on compare les CE₅₀ des substances appliquées à *E. coli* avec celles obtenues dans

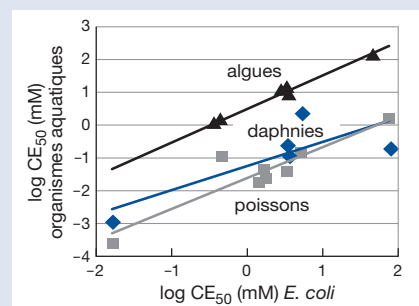


Fig. 4: Toxicité (CE₅₀) des polluants étudiés. Comparaison des CE₅₀ pour *E. coli* avec les CE₅₀ pour les algues, les daphnies et les poissons.

des essais réalisés sur des organismes aquatiques. On constate qu'il existe une corrélation linéaire entre les différentes CE₅₀ (Fig. 4). On appelle CE₅₀ la concentration d'un polluant pour laquelle on observe 50% d'un certain effet toxique, dans notre cas l'inhibition de la croissance chez *E. coli* et algues ainsi que la mortalité chez *Daphnia* et des poissons.

L'étude décrite ici n'est qu'un début dans le domaine de l'évaluation des espèces chimiques réactives d'après leur mode d'action primaire. D'un côté, il est prévu d'intégrer les paires de souches présentées dans des batteries de tests écotoxicologiques; d'un autre côté, les concepts doivent encore être perfectionnés et étendus à d'autres modes d'action. Il n'est cependant possible de réaliser une évaluation du risque écotoxicologique différenciée qu'à partir du moment où l'on a déterminé la chaîne de causalité entre les interactions primaires au niveau moléculaire et les effets observables au niveau des populations ou des écosystèmes.



Beate Escher est chimiste et dirige l'équipe «Evaluation des composés chimiques d'après les modes d'action» au sein de la division «Microbiologie de l'environnement et écotoxicologie moléculaire» de l'EAWAG. Elle enseigne la chimie de l'environnement et l'écotoxicologie à l'EPF de Zurich. Thèmes de recherche: Absorption et distribution des composés chimiques dans les organismes, modes d'action toxiques, méthodes d'évaluation des composés chimiques.

Coauteurs: Angela Harder, Paolo Landini, Christian Niederer, Nicole Tobler

- [1] Escher B.I., Hermens J.L.M. (2002): Modes of action in ecotoxicology: their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects. *Environmental Science & Technology* 36, 4201–4217.
- [2] Harder A. (2002): Assessment of the risk potential of reactive chemicals with multiple modes of toxic action. Dissertation ETH Zurich, 78 p.

Des biosenseurs bactériens pour la détection de l'arsenic dans l'eau potable

L'arsenic est l'un des polluants inorganiques de l'eau potable les plus préoccupants de par le monde. La situation est particulièrement alarmante au Bangladesh où plus d'un million de personnes présentent déjà des signes d'empoisonnement. Pour être en mesure d'analyser l'eau des quelque 9 millions de puits privés du pays, il est besoin d'une méthode de terrain qui soit à la fois peu onéreuse, fiable et suffisamment sensible. Pour répondre à ces besoins, une équipe de l'EAWAG a mis au point une méthode de dosage de l'arsenic reposant sur un biosenseur spécifique. Ce test à bandes de papier indicateur fait appel à des bactéries génétiquement modifiées qui produisent une coloration bleue en présence de faibles concentrations d'arsenic. L'EAWAG a déposé une demande de brevet pour cette innovation.

L'arsenic inorganique est un polluant commun de l'eau potable fort répandue dans le monde entier [1–3]. Etant généralement d'origine géochimique, les arsénates et arsénites peuvent se trouver dans les eaux souterraines à des concentrations allant jusqu'à 1 à 2 mg par litre. La plupart des pays admettent pour l'arsenic un seuil de toxicité dans l'eau potable situé entre 10 et 50 μg par litre. Même à des concentrations de l'ordre de 50 μg par litre, une exposition chronique à l'arsenic provoque ou augmente le risque de contracter des arsnoses et des cancers induits par l'arsenic. Il est donc primordial que les eaux contenant de l'arsenic ne soient pas utilisées pour la consommation. Malheureusement, cer-

taines régions du monde connues pour leur très forte exposition à l'arsenic dans l'eau potable, comme le Bangladesh et le Vietnam, font partie de celles qui disposent de l'infrastructure scientifique la plus faible [1, 2]. D'autre part, la distribution d'eau potable de ces deux pays est gérée de manière locale, la plupart des ménages disposant de leur propre captage. Etant donné que l'on sait maintenant qu'il est très difficile d'estimer précisément le degré de contamination des différents captages parce que les concentrations d'arsénites présentent de fortes variations stationnelles et saisonnières, l'analyse détaillée de la qualité de l'eau potable est un élément capital de la stratégie de lutte contre la contamination

par l'arsenic, du moins tant qu'il n'existe pas de méthode efficace d'élimination de ce polluant.

Dosage de l'arsenic

L'arsenic est traditionnellement dosé par colorimétrie, p. ex. par la méthode au bromure mercurique. Cette méthode à la base de nombreux kits de mesure sur le terrain s'est cependant avérée inefficace pour des concentrations inférieures à 70 μg par litre et s'accompagne en outre d'une libération d'arsine gazeuse et de métaux lourds (Zn, Hg, Sn). Par contre, le dosage de l'arsenic par spectrophotométrie d'absorption atomique ou par spectroscopie de fluorescence atomique est très précis et absolument fiable, mais nécessite des moyens financiers considérables. C'est pour pallier cette situation que l'EAWAG a mis au point un test simple, précis et bon marché faisant appel à des bactéries génétiquement modifiées servant de biosenseurs pour la détection de l'arsenic. Comment cela a-t-il été possible?

L'idée d'exploiter les mécanismes naturels de défense des bactéries contre l'arsenic

L'arsenic n'est pas uniquement toxique pour les êtres humains et les animaux. Sa toxicité a également été constatée chez des organismes primitifs tels que les bacté-



Photos: J.P. van der Meer, EAWAG

Les cellules bactériennes du biosenseur luminescent doivent être impérativement conservées au frais.



Les cellules sont transférées dans une plaque de microtitration renfermant différents échantillons d'eau.



Le luminomètre permet de mesurer l'importance de la contamination des échantillons d'eau par de l'arsenic.

ries. Celles-ci disposent de quelques mécanismes biochimiques relativement efficaces pour neutraliser les ions arsénites et arsénates qui pénètrent dans la cellule (Fig. 1). Deux protéines bactériennes bien connues se chargent de ces deux formes d'arsenic. La première est une pompe intégrée dans la paroi cellulaire bactérienne qui expulse tout arsénite rencontré dans la cellule vers l'extérieur où il ne peut plus causer de dommages. La seconde protéine est appelée «arséniate réductase» et réduit les arsénates en arsénites.

Une autre protéine est nécessaire pour que la réaction de défense se déclenche dès que de l'arsenic est présent au sein de la cellule. Cette protéine appelée ArsR est une sorte de détecteur d'arsenic. Elle peut se fixer de deux manières différentes: en l'absence d'arsenic, elle est fixée sur un élément spécifique de l'ADN et empêche la transcription des gènes de défense contre l'arsenic par l'appareil de transcription (Fig. 1). Cette répression n'est cependant pas totale et de petites quantités d'ArsR, d'arséniate réductase et de pompe à arsénites sont toujours présentes. Quand de l'arsénite pénètre dans la cellule, l'ArsR change de comportement; elle vient immédiatement se fixer sur le composé arsénié et perd son affinité pour le site de l'ADN dont elle se détache. Le mécanisme de défense

n'est donc plus inhibé par l'ArsR et la cellule produit une quantité accrue de pompes à arsénites et d'arséniate réductases.

Pour mettre au point le biosenseur à arsenic, nous avons tiré profit des propriétés biochimiques de l'ArsR. A la seule différence que notre but n'était pas de déclencher le mécanisme de défense mais plutôt la production d'autres protéines ou enzymes faciles à détecter quand la cellule entre en contact avec les arsénites. C'est là que le génie génétique entre en jeu. Des manipulations génétiques permettent de transformer les bactéries de manière à ce qu'elles produisent une réaction lumineuse ou un signal fluorescent ou encore une réaction colorimétrique quand elles se trouvent en présence d'arsénites [4]. Nous avons donc relié entre eux le gène codant pour l'ArsR, le site fixateur de l'ArsR sur l'ADN et un gène rapporteur codant pour une enzyme lumineuse, la luciférase (Fig. 1). Après avoir introduit cette construction génétique dans des cellules d'*Escherichia coli*, le biosenseur était en principe prêt [5].

Un biosenseur luminescent très sensible en suspension liquide

Comment utiliser le nouveau biosenseur bactérien? Sous leur forme la plus simple, les cellules de biosenseur sont cultivées dans un milieu nutritif liquide jusqu'à ce que

la culture atteigne une densité d'environ 2×10^8 cellules par ml. Les bactéries sont alors collectées et remises en suspension dans une solution saline de glycérol puis réparties en aliquotes et congelées à -80°C . De telles aliquotes restent viables pendant plus de 5 ans. Pour effectuer un test, les aliquotes sont décongelées, diluées avec du milieu de culture frais pour ranimer les cellules et mélangées avec l'échantillon d'eau à analyser. On procède parallèlement à un étalonnage du système à l'aide de solutions standards de concentrations connues en arsénites allant de 0 à $0,5\ \mu\text{M}$ (entre 0 et $40\ \mu\text{g}$ d'arsenic par litre). Il est possible d'analyser des volumes d'eau très faibles puisque le volume minimal du mélange ne doit être que de $200\ \mu\text{l}$. D'autre part, de nombreux échantillons peuvent être analysés simultanément. Pour l'analyse, les cellules sont mises en incubation à 30°C pendant au moins 30 minutes, le temps nécessaire à la production de luciférase bactérienne. Après incubation, une goutte de substrat spécifique de la luciférase (n-décanyl) est ajoutée à la solution et l'émission lumineuse est mesurée dans un luminomètre. La courbe d'étalonnage obtenue avec ces cellules de biosenseur est en général linéaire dans le domaine de concentration en arsénites compris entre 0 et $0,5\ \mu\text{M}$ (Fig. 2). Pour des concentrations plus élevées ou

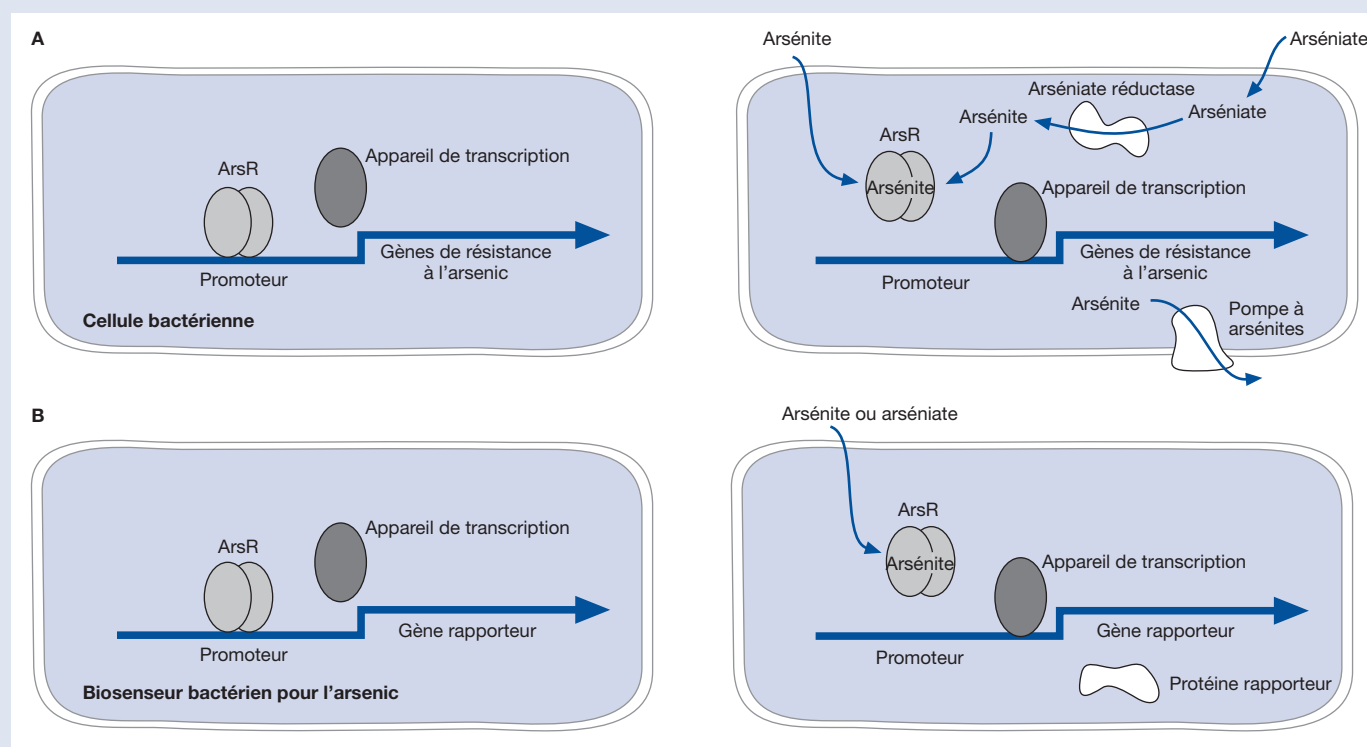


Fig.1: Principe de la défense contre l'arsenic chez les bactéries (A) et des biosenseurs à arsenic (B). La protéine de régulation ArsR se fixe sur une zone spécifique de l'ADN et inhibe l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans les mécanismes de défense contre l'arsenic. Quand les arsénites pénètrent ou sont formées dans les cellules, ils se fixent aux ArsR qui se détachent de l'ADN alors à nouveau accessible à l'appareil de transcription. Les gènes de résistance à l'arsenic (codant pour l'ArsR elle-même, pour la pompe à arsénites et pour l'arséniate réductase) ou le gène rapporteur (codant pour la luciférase, la «Green Fluorescent Protein» ou la β -galactosidase) sont alors exprimés.

pour des solutions inconnues, il est nécessaire de procéder à des dilutions permettant de se placer dans le domaine de linéarité pour obtenir des résultats précis.

Un biosenseur plus simple à bandes de papier indicateur

La méthode décrite plus haut n'est pas assez simple pour le terrain et limite son utilisation au laboratoire. Il y a pour cela deux raisons principales: d'une part, elle nécessite l'utilisation d'un luminomètre qui est un appareil relativement onéreux, et d'autre part, la manipulation des cultures bactériennes en milieu liquide est trop délicate pour le terrain. C'est pourquoi nous avons tenté de mettre au point un autre système de biosenseur dans lequel les cellules bactériennes génétiquement modifiées seraient immobilisées sur une bande de papier indicateur. A la place du gène rapporteur de la luciférase, ce second système comprend un gène codant pour la β -galactosidase, une enzyme qui produit une réaction colorée, ici en présence d'arsenic. Ces cellules de biosenseur sont comme précédemment tout d'abord cultivées en milieu liquide, mais sont placées après collecte dans une solution contenant divers sucres et acides aminés ainsi que de la gélatine. De petites quantités de ce mélange sont alors déposées sur des bandes de papier (Fig. 3) qui sont ensuite précautionneusement séchées à température contrôlée et sous vide partiel. Les cellules fixées sur les bandes de papier restent actives pendant environ 1 mois si elles sont stockées entre -20 et 30 °C. Pour réaliser un test colorimétrique, il suffit de placer une bande de papier indicateur dans un flacon contenant 1 ml d'échantillon à analyser et de la laisser incuber pendant 30 minutes à 30 °C avant de la retirer. On dépose alors sur le papier une goutte de substrat spécifique de la β -galactosidase et on obtient une coloration bleue dont l'intensité dépend de la quantité de β -galactosi-

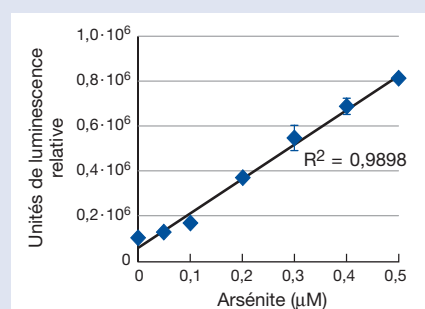


Fig. 2: Exemple de courbe d'étalonnage pour le biosenseur à luciférase. Des concentrations croissantes d'arsénites (allant de $0,05$ à $0,5$ μM) induisent une augmentation linéaire de la luminescence produite par les cellules de biosenseur.

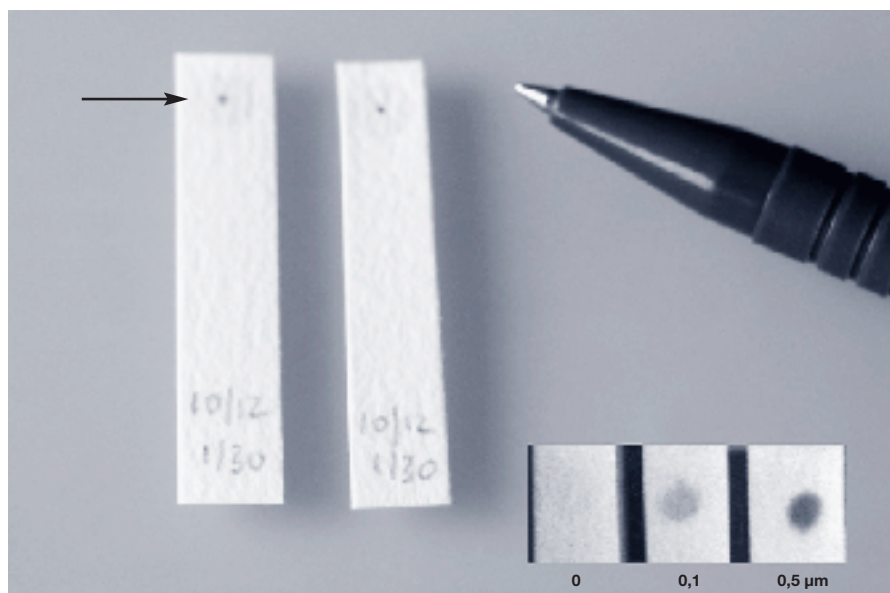


Fig. 3: Le test de détection de l'arsenic par papier indicateur: bandes de papier ($4 \times 0,5$ cm) portant des taches de cellules bactériennes desséchées (flèche). Après incubation dans des échantillons d'eau arsénifiée, les cellules produisent de la β -galactosidase. L'activité de cette enzyme est rendue visible par la conversion de son substrat en une molécule de couleur bleue (encart). L'intensité de la coloration dépend de la concentration en arsénites.

dase. L'intensité de la coloration donne une mesure qualitative de la quantité d'arsenic à laquelle ont été exposées les cellules. Si l'on compare cette indication à celle donnée par une solution standard contenant 10 ou 50 μg d'arsenic par litre, on peut estimer si la concentration de l'échantillon se situe au-dessus ou en dessous du seuil fixé pour l'eau potable (Fig. 3). Le papier indicateur au biosenseur donne donc un résultat moins précis que le biosenseur liquide dont il ne possède pas non plus la longue durée de conservation, mais il semble mieux adapté à une utilisation sur le terrain.

Questions en suspens

Voilà pour les aspects techniques. Des questions et problèmes importants restent à régler avant que le biosenseur puisse être utilisé pour des analyses de routine sur le terrain. Par exemple, comment garantir la qualité des cellules de biosenseur (c'est-à-dire leur potentiel d'activation immédiate)? Quelle est la qualité des résultats du biosenseur par rapport aux analyses chimiques? La composition chimique des échantillons d'eau a-t-elle une influence sur les résultats du test? Les autorités locales des pays en voie de développement sont-elles assez bien formées pour manier correctement le biosenseur? Qu'advient-il des bactéries génétiquement modifiées après le test? C'est en procédant pas à pas que l'on pourra apporter des réponses aux questions encore en suspens. L'EAWAG a déposé une demande de brevet auprès de l'Office européen des brevets. De plus, l'EAWAG est à la recherche de partenaires industriels poten-

tiels qui seraient disposés à acquérir une licence à la technologie du biosenseur à arsenic et à financer les développements futurs. Les nouvelles améliorations et tests effectués sur les biosenseurs permettront, espérons-le, d'obtenir une comparaison réaliste des résultats des tests à biosenseurs et des méthodes d'analyse chimique ainsi que de leurs champs d'application.

Jan Roelof van der Meer, voir portrait page 8.

Coauteur: Judith Stocker

- [1] Hug S., Wegelin M., Gechter D., Canonica L. (2001): Eaux souterraines arsenicales: une catastrophe pour le Bangladesh. EAWAG news 49, 18–20.
- [2] Berg M. (2002): De l'arsenic dans l'eau potable – le Vietnam nouveau point de mire. EAWAG news 53, 12–14.
- [3] Pfeifer H.-R., Zobrist J. (2002): De l'arsenic dans l'eau potable – la Suisse également concernée? EAWAG news 53, 15–17.
- [4] Jaspers M.C.M., Totevova S., Demnerova K., Harms H., van der Meer J.R. (1999): The use of whole-cell living biosensors to determine the bioavailability of pollutants to microorganisms. In: Bavaye P., Block J.C., Goncharuk V.V. (eds.) Bioavailability of organic xenobiotics in the environment. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 153–158.
- [5] Stocker J., Balluch D., Gsell M., Harms H., Feliciano J., Daunert S., Malik K.A., van der Meer J.R. (2003): Development of a set of simple bacterial biosensors for quantitative and rapid field measurements of arsenite and arsenate in potable water. Environmental Science & Technology 37, 4743–4750.

Les gènes de défense utilisés comme indicateurs de pollution

De la recherche fondamentale à l'application pratique

Quand les cellules animales ou végétales sont exposées à certains polluants, divers composés oxygénés toxiques se forment en leur sein, notamment l'oxygène singulet. Les cellules disposent fort heureusement de mécanismes moléculaires de défense contre ces produits hautement réactifs. Une équipe de l'EAWAG étudie actuellement le comportement de l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* en présence d'oxygène singulet. Ces travaux doivent à long terme permettre de développer un bio-senseur pour la détection de l'oxygène singulet qui servirait donc en même temps d'indicateur indirect de la présence de polluants.

La molécule d'oxygène est une base indispensable de la vie des organismes supérieurs puisque c'est la respiration qui permet aux plantes et aux animaux de développer l'énergie nécessaire à la croissance et au métabolisme cellulaire. Mais l'oxygène peut également constituer un danger de mort quand des espèces réactives de l'oxygène (voir encadré et Fig. 1) se forment au sein des cellules où leur action oxydatrice peut occasionner de sérieux dommages [1]. Si les cellules ne parviennent pas à neutraliser ce stress oxydatif, elles peuvent subir au niveau de certains de leurs composants intrinsèques comme les lipides, les protéines et l'ADN des dommages tels qu'ils peuvent même entraîner leur mort. La formation des espèces réactives de l'oxygène peut être accélérée sous l'effet de certains facteurs, notamment une exposition des organismes à des métaux lourds ou à certains polluants organiques comme les herbicides et les composés halogénés. Cet effet des

polluants peut de plus être accentué par un fort rayonnement solaire. Cependant, très souvent les cellules ont développé des mécanismes spécifiques de détoxification de ces espèces réactives de l'oxygène [2].

Différents scénarios de défense moléculaire

En simplifiant un peu, on peut décrire une réaction de défense au niveau moléculaire de la façon suivante [3]: la cellule dispose de détecteurs qui l'avertissent dès qu'une situation de stress apparaît, comme p. ex. la formation intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène. Dès que l'alarme est déclenchée, il se produit une activation des gènes de stress suivie de leur transcription, le nombre de copies des gènes de stress (ARN messagers) dépendant de l'intensité du signal d'alarme et de l'activation. Cette réaction conduit enfin à la synthèse des protéines de stress correspondantes. Leur fonction est soit d'éliminer directement la

cause du stress, p. ex. de transformer les espèces réactives de l'oxygène en formes inoffensives, soit de réparer les dommages occasionnés à la cellule. Celle-ci synthétise deux types de protéines de stress: des protéines de stress généralistes et des protéines de stress très spécialisées capables de contrer de manière ciblée, rapide et efficace des facteurs de stress bien particuliers [4]. Le mode d'activation génétique donne donc souvent une indication sur la nature et l'intensité d'un stress subi par la cellule. On se sert aujourd'hui de l'expression (l'intensité d'activation) de gènes spécifiques pour développer des biosenseurs biologiques

Espèces réactives de l'oxygène

L'oxygène moléculaire, tel qu'il est présent dans la nature, est de par sa configuration électronique un composé peu réactif et donc inoffensif pour les êtres vivants. Il peut cependant être activé de manière physique par transfert d'énergie ou de manière chimique par transfert d'électrons. On désigne par espèces réactives de l'oxygène ces molécules d'oxygène excitées, car elles sont particulièrement réactives. Dans les organismes aérobies, elles peuvent déjà se former dans des conditions physiologiques normales. L'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle se forment par transfert d'électrons provenant p. ex. de la chaîne respiratoire des mitochondries (Fig. 1) [1]. Si par contre de l'énergie provenant p. ex. du rayonnement solaire est transférée à la molécule d'oxygène c'est ce que l'on appelle de l'oxygène singulet qui se forme (Fig. 1). L'oxygène singulet ne se distingue pas de la molécule d'oxygène par sa composition chimique mais par sa configuration électronique; il réagit très rapidement avec les composants de la cellule et donne naissance à des hydroperoxydes organiques. Les acides gras insaturés dans les membranes réagissent particulièrement vite avec l'oxygène singulet, ce qui peut entraîner la formation de peroxydes lipidiques et donc une altération des membranes. Il est ainsi vital pour tous les organismes de disposer de mécanismes de défense efficaces contre l'oxygène singulet et les dommages qu'il peut occasionner.

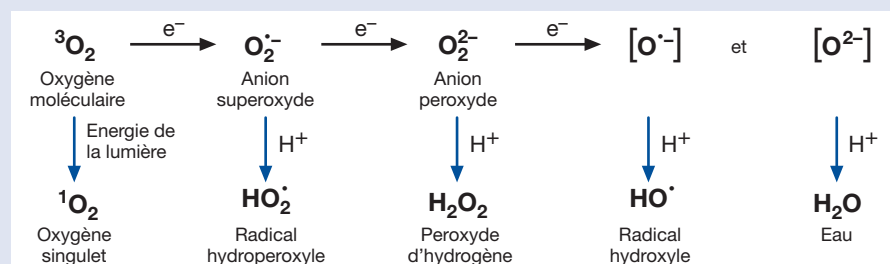


Fig. 1: Formation d'espèces réactives de l'oxygène à partir d'oxygène moléculaire par réduction incomplète ou par transfert d'énergie de la lumière. Les espèces de l'oxygène indiquées entre parenthèses sont instables et donnent immédiatement leur forme protonée.

Stress cellulaire	Polluant	Facteur d'induction
Peroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂ (2 mM)	2,8
Anion superoxyde	Ménadione (5 µM)	6,4
Hydroperoxydes organiques	Tert-butyl-hydroperoxyde (0,1 mM)	4,7
Oxygène singulet	Rose Bengal à la lumière (5 µM)	78,9
Rose Bengal (témoin)	Rose Bengal à l'obscurité (5 µM)	3,1
Inhibition de la photosynthèse	DBMIB (herbicide) (1 µM)	9,5
Choc thermique	Passage de 25 °C → 40 °C	1,3
Sel/stress osmotique	NaCl (200 mM)	1,5

Tab. 1: Activation du gène du *Gpxh* dans des cellules de *Chlamydomonas* soumises à différents types de stress. Des cultures de *Chlamydomonas* ont été exposées pendant 60 minutes aux différents facteurs de stress. Facteur d'induction = quotient de l'expression du gène du *Gpxh* dans la culture stressée sur l'expression du gène du *Gpxh* dans la culture témoin. L'expression du gène du *Gpxh* est représentée par la quantité d'ARN messager synthétisée par l'appareil de transcription.

pour la détection et le dosage de polluants, comme p. ex. celui mis au point par l'EAWAG pour le dosage de l'arsenic (voir l'article de J.R. van der Meer, p. 12). Le projet présenté ici a pour but de développer un biosenseur pour la détection dans l'eau de polluants provoquant dans les cellules la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Etant donné que les connaissances sur les mécanismes de défense contre l'oxygène singulet (voir encadré et Fig. 1) sont encore assez minces, nous portons tous nos efforts sur ce réactif-là.

Des puces à ADN livrent les premiers éléments d'information

Les organismes capables de photosynthèse sont particulièrement sensibles au stress oxydatif [2] étant donné que l'appareil photosynthétique est une source importante de composés oxygénés réactifs. C'est pour cette raison que nous avons choisi comme modèle pour notre étude un organisme photosynthétique, la chlorophycée flagellée unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Cette chlorophycée présente la

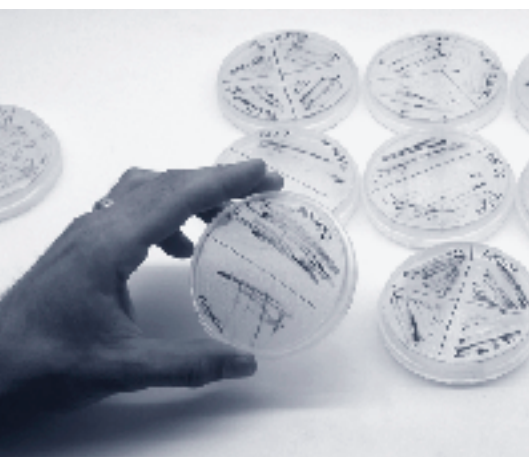
même structure cellulaire que les algues et les plantes supérieures, est facile à cultiver et se prête bien à l'emploi de techniques de biologie moléculaire [5]. Autre avantage décisif, on dispose depuis peu de puces à ADN renfermant l'information génétique de *C. reinhardtii*. Les puces à ADN permettent d'étudier l'expression de la majorité des gènes d'un organisme [3, 6] et donc, comme dans notre cas, de mettre en évidence des gènes de défense spécifiques encore inconnus.

Un total de 2792 gènes de *C. reinhardtii* se trouvent fixés sur les puces à ADN que nous avons utilisées. Pour faire la distinction entre les gènes de défense spécifiquement axés sur l'oxygène singulet et les gènes non spécifiques impliqués dans un stress oxydatif, nous avons réalisé les expériences avec des puces à ADN en utilisant soit l'oxygène singulet soit le H₂O₂, un réactif oxygéné fort répandu. Une étude comparative de l'expression des gènes dans les deux cas révèle de nettes différences: certains gènes sont activés par l'oxygène singulet mais pas par H₂O₂ (voir la photographie d'une puce à ADN en page de couverture: chaque point

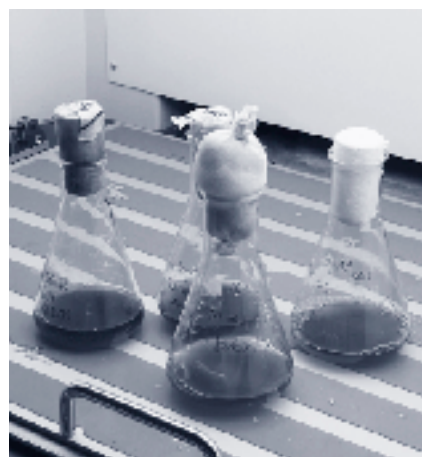
correspond à un gène de *Chlamydomonas*; les gènes induits sont en rouge, ceux qui sont réprimés en vert et les gènes dont l'expression reste inchangée en jaune).

Une induction spécifique due à l'oxygène singulet

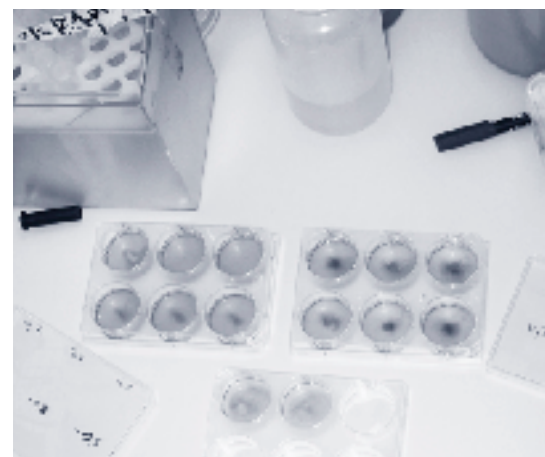
Les gènes dont l'induction par l'oxygène singulet était la plus forte et la plus spécifique ont été étudiés plus avant pour caractériser leur expression et leur fonction dans le cas d'autres types de stress. Dans le cadre de ces tests, un gène s'est avéré particulièrement intéressant. Il s'agit d'un gène homologue de la glutathion peroxydase (*Gpxh*) qui appartient à une famille de gènes impliqués dans d'autres organismes dans la dégradation des hydroperoxydes organiques [7]. Bien que le gène *Gpxh* soit également induit par d'autres espèces réactives de l'oxygène, son expression est maximale en présence de l'oxygène singulet (Tab. 1) [8]. Cette observation semble indiquer que dans *Chlamydomonas* un récepteur spécifique détecte la présence de l'oxygène singulet et que cette réaction est suivie d'une activation ciblée de gènes de



Culture de *Chlamydomonas* sur milieu gélifié en boîte de Pétri ...



... ou en milieu liquide à température et éclairciment constants.



Pour les essais d'induction, les cellules d'algues sont transférées sur des plaques de culture de cellules.

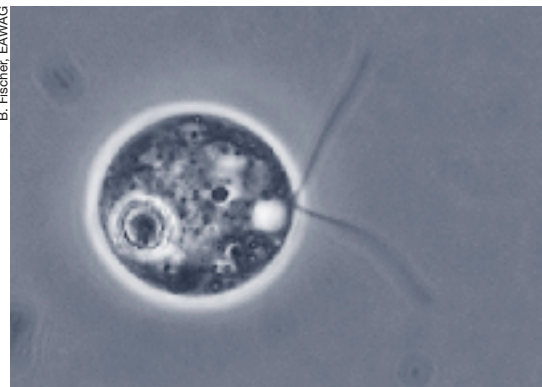
défense spécifiques de cette forme de l'oxygène.

Le promoteur du *Gpxh* examiné de plus près

Pour nous faire une idée plus exacte du mécanisme d'induction du gène *Gpxh*, nous nous consacrons en ce moment à une étude détaillée du promoteur de ce gène. Le promoteur est la région d'ADN située avant la séquence codante qui contrôle l'expression du gène. Il comprend des éléments régulateurs auxquels peuvent se fixer ce que l'on appelle des facteurs de transcription entraînant alors une activation du gène. Ces éléments régulateurs présentent une séquence de nucléotides bien précise qui ne peut être reconnue que par le facteur de transcription qui lui correspond (Fig. 2). Une comparaison avec la séquence d'autres gènes a permis de détecter un tel élément régulateur dans le promoteur du *Gpxh*. En réalisant une expérience dans laquelle l'élé-

ment régulateur était coupé du promoteur, nous avons pu montrer que cet élément jouait un rôle important pour l'induction du gène par l'oxygène singulet. Le gène de *Gpxh* ainsi modifié n'était en effet plus activable par l'oxygène singulet [8]. Dans une deuxième étape, nous avons cherché à savoir ce qui se passerait si cet élément régulateur du *Gpxh* était intégré dans la région du promoteur d'un autre gène qui n'est normalement pas activé par l'oxygène singulet. Pour cette expérience, nous avons choisi de travailler sur le gène de la β -tubuline de *Chlamydomonas*. Ce gène code pour la tubuline qui est une protéine structurale que l'on trouve dans le flagelle de nombreuses microalgues dont *Chlamydomonas*. Nous avons effectivement observé une légère activation du gène modifié de la β -tubuline par l'oxygène singulet. Ces deux expériences montrent que l'élément régulateur du *Gpxh* joue un rôle important dans le mécanisme d'activation du gène par l'oxygène singulet. Bien que l'élément présente une grande homologie avec deux éléments régulateurs de mammifères connus et bien caractérisés, il n'a pas été possible de l'identifier formellement comme l'un des deux. Il se peut que les éléments de la séquence n'aient pas été entièrement conservés entre algues et mammifères. Il est également concevable que l'élément régulateur du *Gpxh* soit un élément régulateur nouveau et jusqu'à présent inconnu. Nous ne pourrions répondre à ces questions que lorsque le facteur de transcription qui lui correspond sera isolé et caractérisé. Des efforts de recherche sont encore nécessaires pour déterminer plus précisément

B. Fischer, EAWAG



L'algue unicellulaire biflagellée *Chlamydomonas* vue au microscope (Grossissement: 100x).

ment s'il existe un mécanisme spécifique d'induction du *Gpxh* par l'oxygène singulet dans *Chlamydomonas*. Si c'était le cas, l'élément régulateur du *Gpxh* pourrait servir au développement d'un indicateur moléculaire de pollution. Un tel biosenseur permettrait de détecter et de doser les polluants à l'origine de la formation d'oxygène singulet dans les cellules.



Beat Fischer, biologiste moléculaire, effectue une thèse de doctorat à la division «Microbiologie de l'environnement et écotoxicologie moléculaire» de l'EAWAG.

Coauteur: Rik Eggen

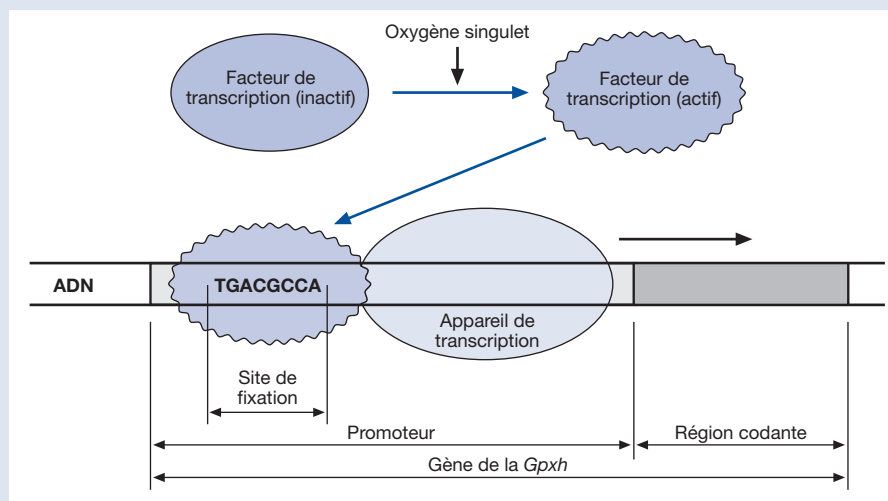


Fig. 2: Mécanisme possible d'activation du gène *Gpxh* par l'oxygène singulet. En présence d'oxygène singulet, le facteur de transcription du *Gpxh* passe de sa forme inactive à sa forme active et se fixe sur l'élément régulateur du *Gpxh*. C'est seulement à partir de ce moment-là que l'appareil de transcription peut venir se fixer sur le gène pour le lire.

- [1] Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1999): Free radicals in biology and medicine. Oxford science publications, 3rd edition. Clarendon Press, Oxford, New York, 968 p.
- [2] Mendez-Alvarez S., Leisinger U., Eggen R.I.L. (1999): Adaptive responses in *Chlamydomonas reinhardtii*. International Microbiology 2, 15–22.
- [3] Eggen R.I.L. (2002): L'emploi de traceurs biologiques en écotoxicologie. EAWG news 52, 8–9.
- [3] Gille G., Sigler K. (1995): Oxidative stress and living cells. Folia Microbiologica 40, 131–52.
- [5] Rochaix J.-D., Michel G.-C., Sabeeha M. (1998): The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in *Chlamydomonas*. Advances in photosynthesis, Vol. 7. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 760 p.
- [6] Rockett J.C., Dix D.J. (2000): DNA arrays: technology, options and toxicological applications. Xenobiotica 30, 155–177.
- [7] Leisinger U., Rüfenacht K., Zehnder A.J.B., Eggen R.I.L. (1999): Structure of a glutathione peroxidase homologous gene involved in the oxidative stress response in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Science 149, 139–149.
- [8] Leisinger U., Rüfenacht K., Fischer B., Pesaro M., Spengler A., Zehnder A.J.B., Eggen R.I.L. (2001): The glutathione peroxidase homologous gene from *Chlamydomonas reinhardtii* is transcriptionally up-regulated by singlet oxygen. Plant Molecular Biology 46, 395–408.

Une nouvelle perspective pour l'analyse de la qualité de l'eau potable

A la recherche d'une méthode alternative, plus rapide

Les analyses de routine permettant de juger de la qualité des eaux de consommation font appel à la méthode de culture sur substrat nutritif solide destinée à dénombrer des bactéries. Cette méthode est cependant très demandeuse en temps. Les résultats sont au plus tôt disponibles au bout de 24 heures. Pour pallier cet inconvénient, des chercheurs de l'EAWAG tâchent de mettre au point une méthode d'analyse plus rapide. Le recours à de nouvelles techniques de biologie moléculaire semble bien prometteur, mais la mise au point finale de la méthode est loin d'être évidente.

Il y a déjà plusieurs décennies que la mesure de paramètres bactériologiques fait partie des analyses de routine effectuées pour s'assurer de la qualité de l'eau de consommation. Les méthodes employées sont basées sur la mise en évidence d'organismes indicateurs comme p. ex. l'entérobactérie *Escherichia coli* [1]. On part du principe que ces bactéries inoffensives sont libérées en même temps que d'éventuels germes pathogènes et qu'elles peuvent tout comme eux se retrouver dans l'eau de consommation. Pour mettre en évidence *E. coli*, la méthode de culture sur milieu solide, à la fois simple et peu onéreuse, est employée depuis des décennies avec succès. Elle présente cependant l'inconvénient d'être très demandeuse en temps: Il faut au mieux compter 24 heures avant d'obtenir un

résultat. Dans certaines situations, il serait pourtant fort souhaitable de savoir plus rapidement si l'eau potable distribuée répond réellement aux normes d'hygiène. Ainsi par exemple, après plusieurs jours de fortes pluies, il se pourrait que certaines eaux servant à l'approvisionnement en eau potable se trouvent mal filtrées ou contaminées par des substances fécales et se retrouvent malencontreusement dans l'eau de consommation. Dans une telle situation, il serait impératif que le fournisseur d'eau potable prenne immédiatement les mesures qui s'imposent pour décontaminer le système de distribution des eaux (désinfection, nettoyage) et qu'il informe sans délai la population sur la nécessité de faire bouillir l'eau avant de la consommer. Si le résultat des analyses n'est connu qu'au bout de

24 heures, il peut être déjà trop tard. C'est pour répondre à ce besoin de détection précoce des contaminations que des chercheurs de l'EAWAG tentent actuellement de mettre au point une méthode d'analyse plus rapide basée sur des techniques de biologie moléculaire.

La méthode de référence à *E. coli*

L'eau potable fait partie des denrées alimentaires et doit donc répondre aux critères définis par l'Ordonnance suisse sur l'hygiène [2]. Celle-ci stipule que l'analyse de qualité doit reposer sur des méthodes de référence extraites du Manuel suisse des denrées alimentaires [3]. D'autres méthodes peuvent être employées «à condition que les résultats qu'elles fournissent, comparés à ceux des méthodes de référence, conduisent de manière probante à une appréciation identique» [2]. La méthode de référence utilisée pour la mise en évidence d'*E. coli* dans l'eau potable est la méthode de culture en boîte de gélose (Fig. 1). L'Ordonnance sur l'hygiène impose pour *E. coli* la valeur de tolérance «non détectable dans 100 ml d'eau analysée». Le protocole expérimental de la méthode de référence prévoit donc de filtrer 100 ml d'eau à analyser à l'aide d'une membrane retenant *E. coli* et d'autres bac-

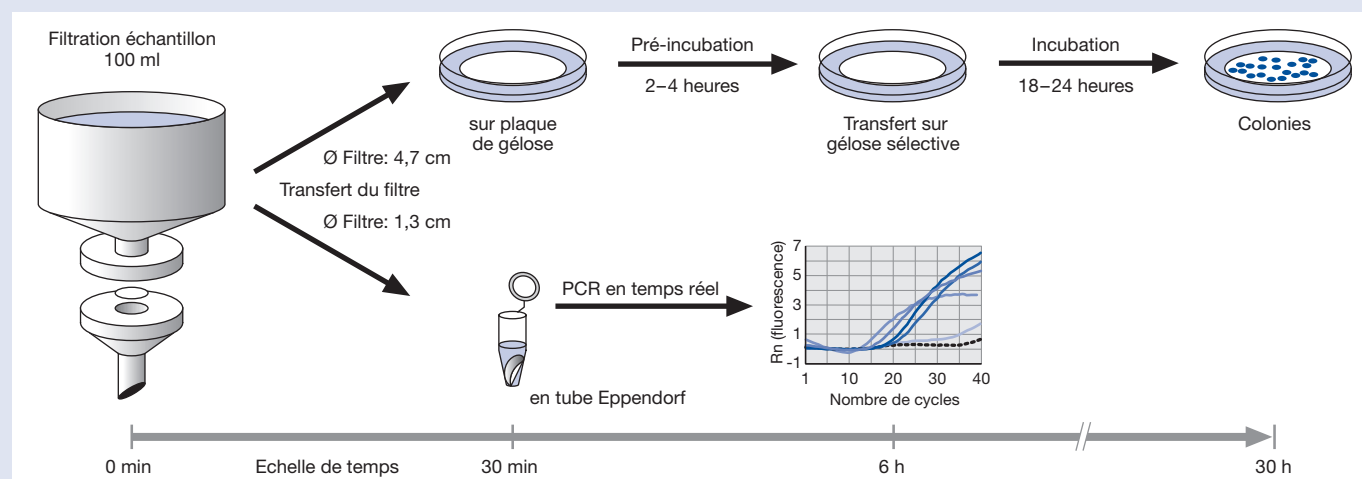


Fig. 1: Etapes et temps nécessaires pour l'analyse de la qualité microbiologique de l'eau par la méthode de culture en boîte de gélose (en haut) et la nouvelle méthode PCR alternative (en bas).

téries. Ce filtre est ensuite placé sur une boîte de Pétri emplies de milieu de culture gélatinisé sur lequel les cellules bactériennes se multiplient pour former des colonies pouvant être dénombrées. Les colonies d'*E. coli* sont identifiées à l'aide d'une réaction enzymatique qui produit une coloration bleue en leur présence (Fig. 1, en haut).

La méthode d'analyse alternative

Les techniques de biologie moléculaire offrent de nouvelles possibilités pour la mise au point de méthodes d'analyse plus rapides. Il nous a semblé prometteur de recourir à la réaction en chaîne de la polymérase (PCR, Polymerase Chain Reaction, Fig. 1 en bas). Dans cette technique, de petits fragments portant l'information génétique d'*E. coli* (ADN) sont multipliés en cycles d'amplification répétés. Les fragments synthétisés peuvent ensuite être détectés à l'aide d'un colorant fluorescent qui se fixe au sein de l'ADN bicaténaire. Dans la méthode que nous utilisons, la PCR en temps réel, la fluorescence est mesurée directement et entrée sur ordinateur. Le résultat correspond au nombre de cycles d'amplification nécessaires pour que la fluorescence atteigne le seuil de détection. En ce qui concerne l'eau à analyser, cela signifie: plus il y a de cellules d'*E. coli* (et donc d'ADN) dans l'échantillon, moins il faut de cycles d'amplification pour pouvoir détecter les fragments d'ADN synthétisés. Une étape

importante de notre protocole de PCR est le prétraitement enzymatique des échantillons avec une DNase pour éliminer tout résidu éventuel d'ADN libre provenant de cellules bactériennes mortes. Cette démarche permet d'éviter les résultats faussement positifs.

Une nette différence

Pour vérifier que les résultats de la méthode PCR développée correspondent bien à ceux obtenus avec la méthode classique de culture en boîte de gélose, de l'eau potable a été contaminée au laboratoire avec des cellules d'*E. coli* et conservée à 4 °C. Pendant un mois, des échantillons ont été régulièrement prélevés dans cette réserve et analysés par les deux méthodes. Au début de l'expérience (temps 0), les deux méthodes ont permis de mettre les bactéries en évidence (Fig. 2A + B). Avec le temps, cependant, le nombre de bactéries détectées avec la méthode classique a rapidement chuté. Nous nous attendions donc à ce que la fluorescence après PCR soit détectable au bout d'un nombre de cycles croissant avec la durée de l'expérience. Ce ne fut pas le cas. Même au bout d'un mois, la PCR permettait encore de mettre en évidence des cellules d'*E. coli* qui, apparemment, ne furent plus aptes à se développer sur milieu de culture. De telles cellules bactériennes, qui ne se développent plus en culture mais qui peuvent tout de même être détectées avec d'autres méthodes, sont qualifiées de viables mais non cultivables (VBNC, «viable but not culturable»). Dans le milieu de la microbiologie, la question est controversée de savoir s'il est important ou non de détecter les stades VBNC chez les indicateurs comme *E. coli* ou chez les bactéries pathogènes. Certaines expériences indiquent que de telles bactéries peuvent «se réveiller» ou redevenir infectieuses [4], d'autres confirment le contraire [5, 6]. Concernant nos expériences, l'explication la plus plausible est que les cellules meurent peu à peu, et ce, avec une vitesse qui varie en fonction de leur «passé».

Les méthodes établies sont difficiles à remplacer

Cette expérience simple montre bien que les deux méthodes ne livrent pas les mêmes conclusions et donc que la méthode PCR ne constitue pas une alternative acceptable pour la méthode de culture sur milieu solide. Les principes sur lesquels les deux méthodes sont basées, la capacité de multiplication d'une part et la mise en évidence de fragments d'ADN spécifiques d'autre part, sont probablement trop différents pour livrer

des résultats similaires. On voit combien la définition des valeurs de tolérance bactériologiques dépend de la méthode d'analyse employée.

Dans la littérature, certains auteurs proposent de faire précéder la PCR d'une courte période de culture de quelques heures. Ceci permet d'obtenir une meilleure concordance avec les résultats de la méthode de référence [7]. On se trouve actuellement dans un climat de discussion accompagné d'efforts de normalisation visant l'établissement de standards pour la validation de méthodes d'analyse alternatives [8]. Considérée isolément, la méthode de PCR décrite ici pourrait s'établir comme une méthode «nouvelle». Mais il faudrait pour cela définir exactement dans quel stade physiologique les cellules d'*E. coli* doivent être détectées. Il nous semble tout de même que le champ d'application de notre méthode se trouve plutôt au niveau de la recherche qu'à celui des analyses de routine de la qualité de l'eau de consommation.

Remerciements

Nous tenons à remercier l'Institut Bachema de Schlieren pour avoir initié et financé ce projet de recherche!



Annette Rust a mis au point la méthode présentée dans le cadre d'une thèse de doctorat effectuée à la division «Microbiologie de l'environnement et ecotoxicologie moléculaire» de l'EAWAG.

Coauteur: Wolfgang Köster

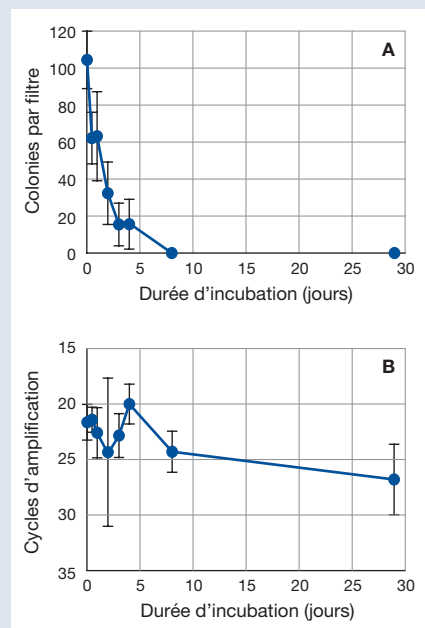


Fig. 2: Résultats de la mise en évidence d'*E. coli* par la méthode de culture en boîte de gélose (A) et par la méthode PCR (B) dans une eau sciemment contaminée. Contrôles effectués sur des échantillons témoins d'eau non contaminée; Méthode de culture: = 0 colonies, méthode PCR: seuil de détection non atteint au bout de 40 cycles d'amplification.

- [1] Köster W., Egli T., Rust A. (2002) Des agents pathogènes dans l'eau (potable)? EAWAG news 53, 26–28.
- [2] Ordonnance du DFI du 26 juin 1995 sur les exigences d'ordre hygiénique et microbiologique concernant les denrées alimentaires, les objets usuels, les locaux, les installations et le personnel (Ordonnance sur l'hygiène, OHyg), numéro RS 817.051, p. 1–16.
- [3] Ettel W. (ed.) (2000): Chapitre 54, Microbiologie. Dans: Le Manuel suisse des denrées alimentaires, L'Office fédéral de la santé publique, Berne.
- [4] Colwell R.R. (2000): Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. Journal of Infection and Chemotherapy 6, 121–125.
- [5] Smith R.J., Newton A.T., Harwood C.R., Barer M.R. (2002): Active but nonculturable cells of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium do not infect or colonize mice. Microbiology 148, 2727–2726.
- [6] Bogosian G., Bourneuf E.V. (2001): A matter of bacterial life and death. EMBO reports 2, 770–774.
- [7] Frahm E., Obst U. (2003): Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. Journal of Microbiological Methods 52, 123–131.
- [8] Hübner P., Gautschi S., Jemmi T. (2002): In house-Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren. Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene 93, 118–139.

Le procédé Anammox pour l'élimination de l'azote dans les stations d'épuration

La collaboration fructueuse entre microbiologistes et ingénieurs des procédés

En tant qu'état riverain du Rhin, la Suisse s'est engagée à réduire ses rejets d'azote dans la Mer du Nord. A l'heure actuelle, l'élimination de l'azote dans les stations d'épuration se fait généralement en ajoutant à grands frais une étape supplémentaire au traitement biologique des eaux usées. Dans les années 90, de nouvelles études ont cependant révélé qu'une élimination pouvait aussi se produire dans des conditions de fonctionnement imprévues. Ce phénomène est attribuable à un genre bactérien identifié depuis peu et également détecté dans les stations d'épuration suisses. Tirant profit de cette constatation, des ingénieurs des procédés ont mis au point une nouvelle technique d'élimination durable de l'azote.

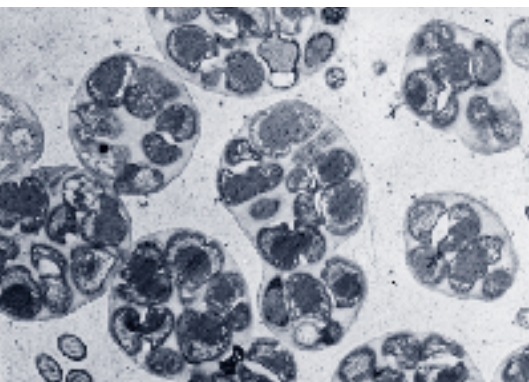
On entend par élimination de l'azote la transformation de composés azotés bio-disponibles comme l'ammonium (NH_4^+), les nitrites (NO_2^-) et les nitrates (NO_3^-) en azote moléculaire gazeux (N_2) inoffensif et pouvant être libéré dans l'atmosphère. Les procédés d'épuration des eaux font aujourd'hui le plus souvent appel à la technique de nitrification-dénitrification biologique pour éliminer l'azote (voir encadré). Les stations de traitement des eaux polluées suisses font souvent l'économie de l'étape de dénitrification, ce qui fait qu'une assez grande partie de l'azote est encore rejetée dans les cours d'eau sous forme de nitrates. En tant qu'état riverain du Rhin, la Suisse s'est cependant engagée dans le cadre de l'Ordonnance sur la protection des eaux de 1998 à réduire ses rejets d'azote dans le Rhin de

2000 tonnes jusqu'en 2005, ce qui l'oblige à prendre très bientôt des mesures efficaces dans ce sens. Il serait fort onéreux d'équiper toutes les stations d'épuration suisses d'une étape supplémentaire de nitrification-dénitrification, procédé nécessitant par ailleurs une grande quantité d'énergie et de ressources [1]. Il est donc nécessaire de développer des procédés innovateurs et plus économiques.

A la poursuite du micro-organisme inconnu

Dans les années 80 et 90, certaines observations donnaient à penser que la technique de nitrification-dénitrification n'était pas le seul moyen d'éliminer l'ammonium, mais qu'il existait probablement des microorganismes capables d'oxyder l'azote ammoniacal en azote gazeux en présence de nitrites et sans apport d'oxygène. Des chercheurs hollandais et allemands ont été les premiers à identifier ces microorganismes. Il s'agit de bactéries de l'ordre des planctomycètes: *Brocadia anammoxidans* et *Kuenenia stuttgartiensis* [2, 3]. Le phénomène d'oxydation anaérobie de l'ammonium a également pu être observé dans la station d'épuration de Kolliken en Suisse qui ne dispose pas de zone de dénitrification. Les études que nous avons menées dans cette station ont montré qu'un système de biofilm à plusieurs couches s'y était formé. Les biofilms de ce genre présentent de forts gradients d'oxygène, la couche supérieure pouvant p. ex.

être bien oxygénée alors que la couche inférieure fixée au support fonctionne en anaérobiose [4]. Nous avons donc supposé que les microorganismes que nous cherchions se trouvaient dans la couche la plus profonde du biofilm. Grâce à des sondes génétiques spécifiques et à la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) [5], nous avons effectivement pu démontrer que cette zone abritait une grande quantité de bactéries planctomycètes (Fig. 1). Cependant, jusqu'à présent personne au monde n'est encore parvenu à obtenir des cultures pures de ces nouvelles bactéries à l'aide des méthodes traditionnelles de microbiologie. Nous avons toutefois réussi à concentrer un échantillon de biofilm jusqu'à obtenir un taux de 90 % de planctomycètes parmi les bactéries isolées [6]. Les bactéries de la station de Kolliken sont également de l'espèce *Kuenenia stuttgartiensis*. Des essais de biologie moléculaire et de physiologie ont démontré que *K. stuttgartiensis* était capable d'oxyder l'ammonium en conditions anaérobies pour former de l'azote gazeux (voir encadré) [3, 6]; ce processus est appelé Anammox («anaerobic



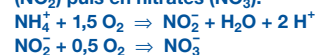
Franziska Bosshard, EAWAG

Fig. 1: Agrégats de bactéries Anammox rendus visible à l'aide d'un microscope électronique.

Nitrification

= oxydation aérobie de l'ammonium par des bactéries nitrifiantes.

En présence d'oxygène (O_2), l'azote ammoniacal (NH_4^+) est transformé en nitrites (NO_2^-) puis en nitrates (NO_3^-):



Dénitrification

= réduction des nitrates par des bactéries dénitrifiantes.

En présence de carbone organique (p. ex. méthanol) et en conditions anaérobies, les nitrates sont réduits en azote gazeux moléculaire (N_2):



Anammox

= Oxydation anaérobie de l'ammonium par des bactéries Anammox.

En présence de nitrites et en conditions anaérobies, l'ammonium est oxydé en azote moléculaire gazeux:



ammonium oxidation» = oxydation anaérobie de l'ammonium).

L'oxydation anaérobie de l'ammonium – un procédé durable d'élimination de l'azote

Ces éléments constituaient une base scientifique solide sur laquelle les ingénieurs des procédés pouvaient s'appuyer. Les stations d'épuration pratiquant une fermentation des boues produisent un surnageant particulièrement riche en ammonium; en effet, cet effluent renferme encore de 15 à 20% de la charge en azote des eaux polluées arrivant à la station. A l'heure actuelle, ce surnageant est renvoyé en tête de station où, mélangé avec les eaux usées provenant du réseau d'assainissement, il est traité dans le bassin à boues activées. Au lieu de faire «recirculer» ce surnageant, on pourrait le traiter à part avec le nouveau procédé Anammox, ce qui économiserait énergie et ressources. Cette dernière solution nécessite un apport extérieur de nitrites, non contenus dans le surnageant lui-même mais par ailleurs synthétisés lors de la nitrification (voir encadré). Un procédé en deux étapes semble donc tout indiqué (Fig. 2). Dans un premier réacteur aéré, l'azote ammoniacal est partiellement oxydé en nitrites (*nitrification partielle*). Les nitrites formés et l'ammonium restant sont ensuite conduits dans un deuxième réacteur dans lequel ils

subissent en anaérobiose une réduction aboutissant à la production de N_2 moléculaire (*Anammox*). L'ensemble du procédé est nommé «nitrification partielle/Anammox» ou plus brièvement procédé Anammox. Jusqu'à présent, ce procédé n'est employé que pour le traitement des eaux usées riches en ammonium. Grâce aux méthodes de génie génétique, les bactéries Anammox peuvent être mises en évidence à tout moment, ce qui peut être très utile pendant la phase de lancement du procédé ou en cas de panne.

Comparé à la méthode classique de nitrification-dénitrification, le procédé Anammox présente les avantages suivants (Fig. 3):

- L'apport d'oxygène peut être réduit de 60%. L'énergie nécessaire à l'aération du bassin est ainsi économisée.

- Les bactéries Anammox n'ont pas besoin de carbone organique pour leur croissance. Dans la technique de nitrification-dénitrification, au contraire, il est nécessaire d'apporter du carbone organique, p.ex. sous forme de méthanol.

- Les bactéries Anammox produisent moins de biomasse, ce qui permet de réduire la masse de boues d'épuration à éliminer.

Ainsi, non seulement le procédé Anammox demande moins d'énergie et de ressources mais il est en plus moins coûteux que la méthode traditionnelle de nitrification-dénitrification.

Le procédé Anammox au banc d'essai

Pour estimer la faisabilité de ce procédé à deux étapes, l'EAWAG s'est associé à la station d'épuration de Werdhölzli (Zurich) et à d'autres partenaires pour construire et faire fonctionner une installation pilote de 4 m³ [7]. Les essais réalisés sur ce modèle ont permis de mieux appréhender le processus et de confirmer sa bonne faisabilité. Ils ont de plus apporté les données nécessaires au dimensionnement et à la bonne exploitation d'une installation à l'échelle industrielle.

On observe malheureusement encore une certaine réserve vis-à-vis de ce nouveau procédé. Elle s'explique principalement par la faible vitesse de croissance des bactéries Anammox ainsi que par le manque d'expérience pratique avec le procédé. Mais étant donné les nombreux avantages qu'il présente, on peut s'attendre à voir les premiers réacteurs Anammox apparaître dans les stations d'épuration dans les années qui viennent.



Christian Fux, ingénieur des procédés, a terminé début 2003 sa thèse sur le procédé Anammox à la division «Génie de l'environnement» de l'EAWAG. Il effectue depuis un stage post-doctoral à l'«Advanced Wastewater Management Centre» de l'Université Queensland en Australie.

Coauteurs: Konrad Egli, Jan Roelof van der Meer, Hansruedi Siegrist

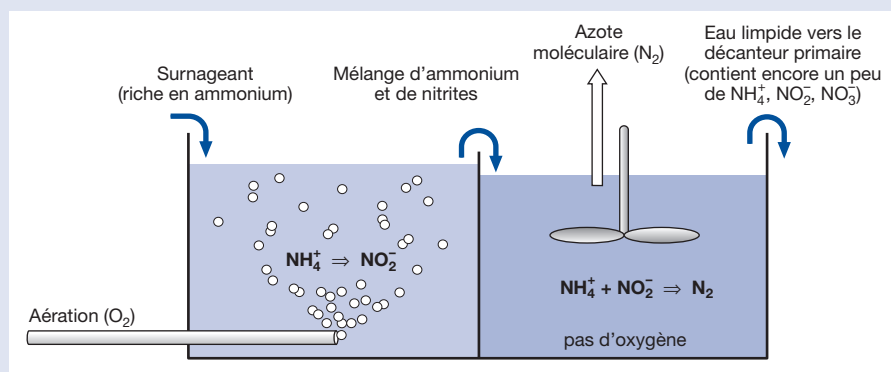


Fig. 2: Le procédé Anammox.

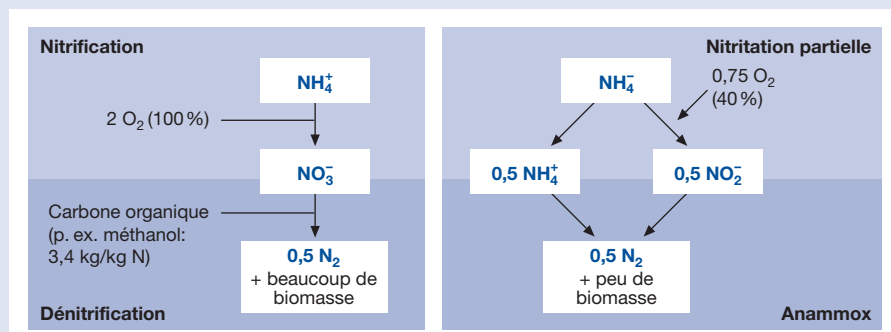


Fig. 3: Comparaison du procédé Anammox avec la méthode classique d'élimination de l'azote par nitrification-dénitrification.

- [1] BUWAL (1996): Stickstofffrachten aus Abwasserreinigungsanlagen. Schriftenreihe Umwelt Nr. 276, 67 S.
- [2] Strous M., Fuerst J.A., Kramer E.H.M., Logemann S., Muyzer G., van de Pas-Schoonen K.T., Webb R., Kuenen J.G., Jetten M.S.M. (1999): Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 400, 446–449.
- [3] Schmid M., Twachtman U., Klein M., Strous M., Juretschko S., Jetten M., Metzger J.W., Schleifer K.-H., Wagner M. (2000): Molecular evidence for genus-level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Systematic & Applied Microbiology* 23, 93–106.
- [4] Koch G., Egli K., van der Meer J.R., Siegrist H. (2000): Mathematical modeling of autotrophic denitrification in a nitrifying biofilm of a rotating biological contactor. *Water Science and Technology* 41, 191–198.
- [5] Zepp K. (2002): L'ARN: Un traceur pour identifier des microorganismes. *EAWAG news* 52, 12–13.
- [6] Egli K., Fanger U., Alvarez P., Siegrist H., van der Meer J.R., Zehnder A.J.B. (2001): Enrichment and characterization of a new anammox bacterium from a rotating biological contactor treating an ammonium-rich leachate. *Archives of Microbiology* 175, 198–207.
- [7] Fux C., Böhler M., Huber P., Brunner I., Siegrist H. (2002): Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitritation and subsequent anaerobic ammonium oxidation (anammox) in a pilot plant. *Journal of Biotechnology* 99, 295–306.

La diversité génétique des daphnies dans les lacs alpins

Il y a déjà plus de 100 ans que la recherche scientifique s'intéresse de près à la diversité du zooplancton et du phytoplancton des lacs alpins. Il est aujourd'hui unanimement admis que la richesse spécifique des communautés planctoniques diminue avec l'altitude. Nous avons voulu savoir si ce phénomène se manifestait également au niveau des populations et nous avons pour cela mené une étude sur un organisme zooplanctonique bien typique, la daphnie ou puce d'eau. Nous avons étudié la diversité génétique de 11 populations de daphnies évoluant dans des lacs de montagne de différentes altitudes. La diversité génétique s'est avérée fort disparate.

Les conditions environnementales extrêmes qui règnent dans les régions alpines font que rares sont les espèces végétales et animales qui ont pu s'adapter pour y vivre. C'est la raison pour laquelle la biodiversité, ou plus exactement la richesse spécifique, diminue avec l'altitude. Ce que l'on ne sait pas exactement par contre, c'est si la diversité génétique, qui est une partie de la biodiversité, est également concernée par ce phénomène. Nous avons cherché à répondre à cette question en étudiant les populations de daphnies de différents lacs des montagnes suisses. Ces organismes planctoniques sont particulièrement intéressants pour une telle étude car ils ont la particularité de pouvoir se reproduire aussi bien de manière sexuée qu'asexuée (parthénogenèse) [1].

Reproduction asexuée et œufs de résistance

Si les conditions environnementales sont clémentes, la parthénogenèse est la forme de reproduction habituelle des daphnies. Dans cette forme de reproduction, les femelles parthénogénétiques donnent naissance à des organismes-filles génétiquement identiques (des clones). Les daphnies sont ainsi en mesure de se reproduire de manière exponentielle en un rien de temps. Cette propriété leur permet de profiter au mieux de la période de croissance relativement courte qui caractérise les lacs alpins. Quand les conditions environnementales se détériorent, s'il se produit p. ex. une chute de température ou une pénurie alimentaire,

les daphnies produisent des mâles et forment des femelles capables de reproduction sexuée. Dans la poche incubatrice de ces femelles, les œufs fécondés de manière sexuée sont entourés d'une coque protectrice très résistante, formant ce que l'on appelle un éphippium, et libérés lors de la prochaine mue. Les éphippias peuvent subsister pendant des années au sein des sédiments dans lesquels ils se sont déposés. Quand les conditions sont favorables, ces œufs donnent naissance à des femelles parthénogénétiques et le cycle vital reprend. Si les conditions restent favorables tout au long de l'année, il n'y a pas production d'œufs de résistance et les générations parthénogénétiques se succèdent les unes aux autres.

Environnement, reproduction et diversité génétique

Dans notre projet, nous avons cherché à savoir comment les conditions environnementales, la forme de reproduction et la diversité génétique dépendaient les unes des autres dans les lacs alpins. Pour ce faire, nous avons étudié 11 lacs situés à différentes altitudes dans les montagnes suisses et présentant des conditions environnementales de plus en plus rudes avec l'altitude. Des prélèvements ont été effectués pendant quatre années de suite (de 1997 à 2000) en fin d'été ou en début d'automne dans les populations de daphnies de ces lacs.

Nos essais étaient basés sur les hypothèses suivantes:

- Les lacs alpins doivent présenter une forte proportion d'individus sexués (issus de reproduction sexuée) étant donné que les daphnies ne peuvent survivre aux hivers froids et pauvres en nourriture que sous la forme d'œufs de résistance.
- Chez les daphnies, la diversité génétique dépend principalement de l'échange sexué de matériel génétique. Nous sommes donc partis du principe que les populations de lacs dans lesquels les daphnies se reproduisent majoritairement de façon sexuée présentaient une diversité génétique plus élevée que les autres.
- Étant donné que les conditions environnementales deviennent de plus en plus rudes avec l'altitude, il nous semble donc que la diversité génétique des populations de daphnies doit augmenter avec l'altitude et non pas diminuer comme le fait la richesse spécifique. Il faut s'attendre à ce que la diversité génétique des lacs de haute montagne soit plus élevée que celle des lacs de basse altitude.

Des populations généralement dominées par les individus sexués

La part relative des daphnies sexuées et asexuées dans les lacs alpins étudiés s'est avérée être très variable, allant de 2 à 90 % (Fig. 1 en bas). Dans 8 des 11 lacs de montagne étudiés se trouvaient davantage d'individus sexués qu'asexués. Dans les deux lacs alpins de plus basse altitude, le lac inférieur et le lac supérieur d'Arosa, nous n'avons pu mettre en évidence que des femelles asexuées. À l'inverse, les prélèvements effectués dans le Riffelsee II, le lac le plus élevé de l'étude, ne comprenaient pratiquement que des individus sexués. Entre ces deux extrêmes, la distribution des daphnies sexuées et asexuées était cependant très hétérogène, ce qui fait qu'il est impossible de dégager une tendance particulière. Nous avons d'autre part constaté avec surprise que contrairement aux lacs de basse altitude dans lesquels les mâles représentent souvent moins d'1 % des populations, les lacs de montagne que nous avons étudiés présentaient jusqu'à 30 à 40 % de mâles. La part des mâles sexués y était de plus toujours supérieure à celle des femelles sexuées.

La diversité génétique

Pour déterminer la diversité génétique des différentes populations de daphnies, nous avons étudié jusqu'à 80 daphnies par lac à l'aide de la méthode des allozymes (voir encadré). La diversité clonale livre un premier indice. Elle correspond au nombre de

La méthode d'étude génétique

L'analyse des allozymes par électrophorèse est une méthode qui a fait ses preuves pour déterminer la diversité génétique au niveau des populations [2]. Elle est basée sur le principe suivant: L'information génétique d'une enzyme peut se trouver une seule fois ou plusieurs fois dans le génome d'un organisme. Si plusieurs gènes codent pour cette enzyme, ces différents gènes peuvent avoir été modifiés au cours de l'évolution, en général suite à des mutations. La conséquence en est que les cellules synthétisent plusieurs enzymes, dites des allozymes, différant légèrement par leurs séquences d'acides aminés mais assumant la même fonction que l'enzyme d'origine. Dans le cas le plus simple, il n'existe que deux allozymes qui ne se distinguent que par un seul acide aminé. Si le nouvel acide aminé a une charge électrique différente de celui d'origine, les deux allozymes présentent des vitesses de migration différentes dans un champ électrique et peuvent donc être séparés par électrophorèse puis mises en évidence à l'aide d'une réaction spécifique avec un substrat adéquat. Si l'on couple cette dernière réaction avec une réaction colorée, l'enzyme peut être directement mise en évidence sur le gel d'électrophorèse sous la forme d'une bande. Cette méthode indique le nombre de variantes d'une enzyme qui existe dans une population et permet donc de mesurer sa diversité génétique.

clones différents contenus dans une population. Nous avons trouvé entre 2 et 42 clones différents dans les 11 lacs de montagne étudiés (Fig. 1 en haut). C'est dans le Melchsee et le Lago Cadagno que la diversité clonale était la plus élevée.

Il est possible de décrire la diversité génétique de manière plus détaillée si l'on considère la fréquence de chacun des clones en plus de la diversité clonale. En effet, une population comprenant 10 clones de même fréquence est plus diversifiée qu'une population dans laquelle un des 10 clones est dominant et représente 99% des individus. Nous avons donc calculé pour chacune des 11 populations étudiées l'indice de diversité de Simpson ($D_{Sim} = 1 - \sum p_i^2$, p_i = proportion d'un clone i dans la population) (Fig. 1 en haut). Cet indice donne la probabilité que deux individus choisis au hasard ont une structure génétique distincte. Des valeurs élevées du D_{Sim} (près de 1) indiquent que la

population est composée de nombreux clones présentant à peu près la même fréquence et présente donc une grande diversité. Une valeur faible du D_{Sim} (près de 0) indique qu'un clone est dominant dans la population et traduit donc une faible diversité. Nos résultats montrent que la diversité des populations de daphnies était élevée dans nombreux lacs et assez basse dans le lac de Arosa supérieur ainsi que dans le Leisee et le Riffelsee II.

La structure génétique spatiale des daphnies est complexe

La forte proportion d'individus sexués constatée dans les lacs alpins constitue un élément étonnant et indique que les daphnies ne sont à même de résister aux conditions hivernales difficiles de nombre d'entre eux que sous la forme d'œufs de résistance. Il faut cependant noter que la part d'individus sexués n'était pas en relation avec la

diversité génétique qu'elle soit exprimée sous la forme de diversité clonale ou d'indice de diversité de Simpson. Nous n'avons d'autre part pas pu mettre en évidence de corrélation entre la diversité génétique des daphnies et l'altitude des lacs alpins étudiés. Nous avons comparé nos résultats avec la diversité génétique de populations de daphnies de deux lacs de plaine, le Greifensee ($D_{Sim} = 0,96$) et le Lac des Quatre-Cantons ($D_{Sim} = 0,48$). Il s'est avéré que la diversité génétique de certains lacs de montagne peut être tout aussi faible que celle du Lac des Quatre-Cantons ou bien tout aussi élevée que celle du Greifensee. Nos travaux [3] constituent une première contribution à l'étude de la diversité génétique d'une espèce zooplanctonique particulièrement importante dans les lacs alpins ainsi qu'à la détermination des facteurs susceptibles de l'influencer. Il semble cependant que la reproduction sexuée des daphnies ne s'accompagne pas nécessairement d'une augmentation de la diversité génétique. Force est donc de supposer que d'autres facteurs tels que la présence de certaines espèces ou de certains hybrides de daphnies jouent un rôle plus important que la forme de reproduction ou bien que seul un nombre limité de clones est adapté aux conditions extrêmes des lacs d'altitude. Il semble d'autre part qu'une grande diversité génétique ne soit pas nécessairement garante de survie pour les daphnies dans les lacs alpins. Celle-ci est plus probablement assurée par d'autres stratégies comme une grande plasticité au niveau du comportement ou du cycle vital.



Monika Winder a récemment soutenu une thèse de doctorat à la division «Limnologie» de l'EAWAG sur le thème de «L'écologie du zooplancton dans les lacs alpins». Elle effectue depuis un stage post-doctoral à l'Université de Washington, Seattle, USA.



Piet Spaak, biologiste et chef du groupe «Ecologie du développement» à la division «Limnologie». Il enseigne l'écologie du développement à l'EPF Zurich. Domaines de recherche principales: Diversité génétique chez les daphnies, lacs alpins et relations prédateur-proie.

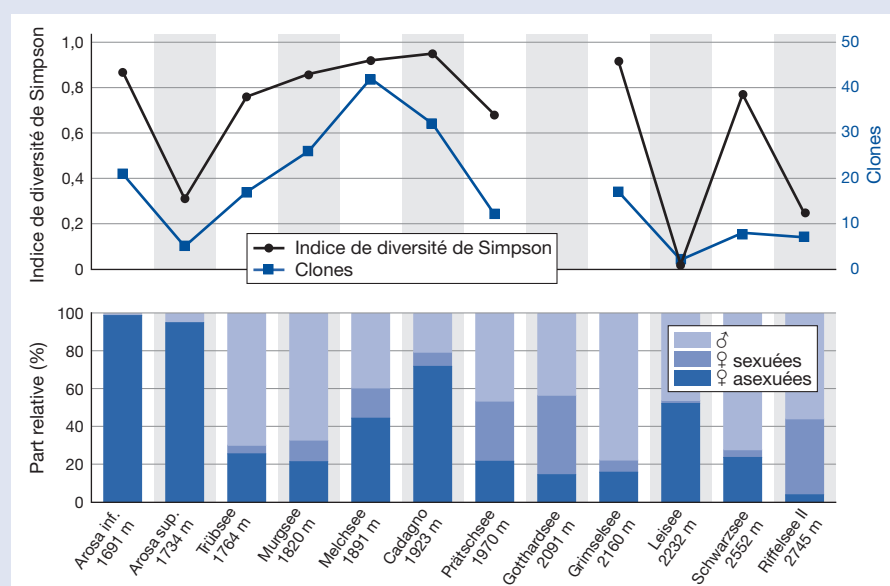


Fig. 1: Étude des populations de daphnies de 11 lacs des montagnes suisses situés à différentes altitudes. En bas: Part relative des individus sexués et asexués; En haut: Diversité génétique exprimée par le nombre de clones ou par l'indice de diversité de Simpson.

- [1] De Meester L. (1996): Local genetic differentiation and adaptation in freshwater zooplankton populations: patterns and processes. *Ecoscience* 3, 385–399.
- [2] Monaghan M. (2003): Fragmentation des habitats et diversité génétique. *EAWAG news* 54, 28–30.
- [3] Winder M., Monaghan M.T., Spaak P. (2001): Have human impacts changed alpine zooplankton diversity over the past 100 years? *Arctic Antarctic and Alpine Research* 33, 467–475.

Pour vos commandes, veuillez utiliser le bulletin encarté au milieu du présent numéro.

- [3193] **Andrade A.P., Witholt B., Hany R., Egli T., Li Z.** (2002): Preparation and Characterization of Enantiomerically Pure Telechelic Diols from mcl-Poly[(R)-3-hydroxyalkanoates]. *Macromolecules* 35, 684–689.
- [3194] **Andrade A.P., Neuenschwander P., Hany R., Egli T., Witholt B., Li Z.** (2002): Synthesis and Characterization of Novel Copoly(ester-urethane) Containing Blocks of Poly-[(R)-hydroxyoctanoate] and Poly-[(R)-3-hydroxybutyrate]. *Macromolecules* 35, 4946–4950.
- [3195] **Brun R.** (2002): Learning From Data: Parameter Identification in the Context of Large Environmental Simulation Models. Diss. ETHZ No. 14 575, Zurich.
- [3196] **Leisinger U.** (2002): Regulation of Gene Expression Upon Oxidative Stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. Diss. ETHZ No. 14 434, Zurich.
- [3197] **Monaghan M.T.** (2002): Habitat Fragmentation in Alpine Streams: Implications for Genetic Structure and Species Richness of Aquatic Insects. Diss. ETHZ No. 14 561, Zurich.
- [3198] **Behringer J.** (2002): Legitimität durch Verfahren? Bedingungen semi-konventioneller Partizipation. Dissertation Universität Stuttgart, S. Roderer Verlag, Regensburg.
- [3199] **Egli T.** (2002): Microbial Degradation of Pollutants at Low Concentrations and in the Presence of Alternative Carbon Substrates: Emerging Patterns. In: «Biotechnology for the Environment: Strategy and Fundamentals», S.N. Agathos, W. Reineke (Eds.). Kluwer Academic Publ., pp. 131–139.
- [3200] **Egli T., Witschel M.** (2002): Enzymology of the Breakdown of Synthetic Chelating Agents. In: «Biotechnology for the Environment: Strategy and Fundamentals», S.N. Agathos, W. Reineke, (Eds.). Kluwer Academic Publ., pp. 205–217.
- [3201] **Yang H., Zehnder A.J.B.** (2002): Water Scarcity and Food Import: A Case Study for Southern Mediterranean Countries. *World Development* 30 (8), 1413–1430.
- [3202] **van der Nat D., Tockner K., Edwards P.J., Ward J.V.** (2002): Quantification of Large Woody Debris in Large Floodplain Rivers: An Area-Based Approach Using Differential GPS and GIS. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 28, 332–335.
- [3203] **Robinson C.T., Uehlinger U., Guidon F., Schenkel P., Skvare R.** (2002): Limitation and Retention of Nutrients in Alpine Streams of Switzerland. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 28, 263–272.
- [3204] **Malard F., Hofmann A., Tockner K., Uehlinger U.** (2002): Iron Concentration in the Water of a Glacial River System. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 28, 134–139.
- [3205] **Hieber M., Robinson C.T., Uehlinger U., Ward J.V.** (2002): Are Alpine Lake Outlets Less Harsh Than Other Alpine Streams? *Arch. Hydrobiol.* 154 (2), 199–223.
- [3206] **Rechberger H., Graedel T.E.** (2002): The Contemporary European Copper Cycle: Statistical Entropy Analysis. *Ecol. Economics* 42, 59–72.
- [3207] **Gerecke A.C., Schärer M., Singer H.P., Müller S.R., Schwarzenbach R.P., Sägesser M., Ochsenbein U., Popow G.** (2002): Sources of Pesticides in Surface Waters in Switzerland: Pesticide Load Through Waste Water Treatment Plants – Current Situation and Reduction Potential. *Chemosphere* 48, 307–315.
- [3208] **Hug F., Baccini P.** (2002): Physiological Interactions Between Highland and Lowland Regions in the Context of Longterm Resource Management. *Mountain Res. & Develop.* 22 (2), 168–176.
- [3209] **Kovar K., Chaloupka V., Egli T.** (2002): A Threshold Substrate Concentration is Required to Initiate the Degradation of 3-Phenylpropionic Acid in *Escherichia coli*. *Acta Biotechnol.* 22 (3–4), 285–298.
- [3210] **Laj C., Kissel C., Mazaud A., Michel E., Muscheler R., Beer J.** (2002): Geomagnetic Field intensity, North Atlantic Deep Water Circulation and Atmospheric $\Delta^{14}\text{C}$ During the Last 50 kyr. *Earth and Planetary Sci. Lett.* 200, 177–190.
- [3211] **Mavrocordatos D., Fortin D.** (2002): Quantitative Characterization of Biotic Iron Oxides by Analytical Electron Microscopy. *American Mineralogist* 87, 940–946.
- [3212] **Nguyen H.M., Pham H.V., Giger W., Berg M.** (2002): Simultaneous Determination of Polar and Apolar Organophosphorus Pesticides and Triazine Herbicides by Solid-phase Microextraction (SPME) in Aqueous Samples. *Anal. Sci.* 17 (Suppl.), a375–a378.
- [3213] **Duong H.A., Pham H.V., Gallard H., Berg M.** (2001): Determination of the Breakpoint in Chlorine Dosage for Typical Groundwater Sources in Hanoi Area. *J. Anal. Sci. of the Vietnam Anal. Sci. Soc.* 6 (4), 63–66. (in Vietnamese)
- [3214] **Duong H.A., Hoang M.H., Pham H.V., Berg M., Giger W.** (2001): Evaluation of GC/MS/HS Method for Analysis of Volatile Organic in Water. *J. Anal. Sci. of the Vietnam Anal. Sci. Soc.* 6 (2), 31–36. (in Vietnamese)
- [3215] **Min N.H., Ha P.N., Viet P.H., Giger W., Berg M.** (2000): Determination of Polar and Non-polar Pesticides in Aqueous Solutions by Solid Phase Microextraction (SPME) and Gas Chromatography Mass Spectrometer (GC/MS). Workshop on Management, Use and Assessment of Environmental Pollution of Pesticides, CEC, Hanoi, Sept. 28–29.
- [3216] **Boller M., Wagner W.** (2001): Urban Water Management in Switzerland. Conference-Proceedings EurAqua, Sixth Scientific and Technical Review, Laboratorio Nacional de Engenharia Civil, LNEC, Lisbon, Portugal, Lisbon 20–21 October 1999.
- [3217] **Tockner K., Ward J.V., Edwards P.J., Kollmann J., Gurnell A.M., Petts G.E.** (2001): Der Tagliamento (Norditalien): Eine Wildflusssau als Modellökosystem für den Alpenraum. Bayer. Akad. für Naturschutz und Landschaftspflege, Laufen/Salzach. Laufener Seminarbeiträge 3 (01), S. 25–34.
- [3218] **Meyer A., Würsten M., Schmidt A., Kohler H.-P.E., Witholt B.** (2002): Hydroxylation of Indole by Laboratory-Evolved 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 277 (37), 34161–34167.
- [3219] **Friedrich J., Dinkel C., Friedl G., Pimenov N., Wijsman J., Gomoiu M.-T., Cociasu A., Popa L., Wehrli B.** (2002): Benthic Nutrient Cycling and Diagenetic Pathways in the Northwestern Black Sea. *Estuarine, Coastal & Shelf Sci.* 54, 369–383.
- [3220] **Hügel K., Larsen T., Gujer W.** (2002): Ökobilanzen als Massstab für die Ressourcen-Effizienz in der Abwasserentsorgung. *Schriftenreihe Wasserforschung* 7, 129–141.
- [3221] **Brun R., Kühni M., Siegrist H., Gujer W., Reichert P.** (2002): Practical Identifiability of ASM2d Parameters – Systematic Selection and Tuning of Parameter Subsets. *Water Res.* 36, 4113–4127.
- [3222] **Granina L., Müller B., Wehrli B., Martin P.** (2000): Oxygen, Iron, and Manganese at the Sediment-Water Interface in Lake Baikal. *Terra Nostra* 2000/9, Baikal, First Workshop and Symposium, pp. 87–93.
- [3223] **Hieber M.** (2002): Alpine Streams: Aspects of Biocomplexity. Diss. ETHZ No. 14 601, Zurich.
- [3224] **Tockner K., Paetzold A., Karaus U.** (2002): Leben in der Flussschiffahrt zwischen Trockenfall und Hochwasser. In: «Rundgespräche der Kommission für Ökologie». Bd. 24. Verlag F. Pfeil, München, S. 37–46.
- [3225] **Winder M., Spaak P.** (2002): Effects of Natural UV Radiation on the Life History of Alpine

- Daphnia*. Verh. Internat. Verein. Limnol. 28, 355–359.
- [3226] **Robinson C.T., Gessner M.O.** (2000): Leaf Breakdown in an Alpine Spring Brook. Verh. Internat. Verein. Limnol. 27, 744–747.
- [3227] **Ackermann G.E., Brombacher E., Fent K.** (2002): Development of a Fish Reporter Gene System for the Assessment of Estrogenic Compounds and Sewage Treatment Plant Effluents. Environ. Toxicol. Chem. 21 (9), 1864–1875.
- [3228] **Frutiger A., Meier Bürgisser G.M.** (2002): Life History Variability of a Grazing Stream Insect (*Liponeura cinerascens minor*; Diptera: Blephariceridae). Freshwater Biol. 47 (9), 1618–1632.
- [3229] **Golet E.M., Alder A.C., Giger W.** (2002): Environmental Exposure and Risk Assessment of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Wastewater and River Water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland. Environ. Sci. Technol. 36 (17), 3645–3651.
- [3230] **Gessner M.O., van Ryckegem G.** (2002): Water Fungi as Decomposers in Freshwater Ecosystems. In: «Encyclopedia of Environmental Microbiology», G. Bitton, (Ed.). John Wiley & Sons, pp. 3353–3363.
- [3231] **Escher B.I., Hermens J.L.M.** (2002): Modes of Action in Ecotoxicology: Their Role in Body Burdens, Species Sensitivity, QSARs, and Effects. Environ. Sci. Technol. 36 (20), 4201–4217.
- [3232] **Gessner M.O., Newell S.Y.** (2002): Biomass, Growth Rate, and Production of Filamentous Fungi in Plant Litter. In: «Manual of Environmental Microbiology», 2nd ed., C.J. Hurst et al., (Eds.). ASM Press, Washington, D.C., pp. 390–408.
- [3233] **Ruckstuhl S., Suter M.J.F., Kohler H.P.-E., Giger W.** (2002): Leaching and Primary Biodegradation of Sulfonated Naphthalenes and their Formaldehyde Condensates from Concrete Superplasticizers in Groundwater Affected by Tunnel Construction. Environ. Sci. Technol. 36 (15), 3284–3289.
- [3234] **Graça M.A.S., Cressa C., Gessner M.O., Feio M.J., Callies K.A., Barrios C.** (2001): Food Quality, Feeding Preferences, Survival and Growth of Shredders from Temperate and Tropical Streams. Freshwater Biol. 46, 947–957.
- [3235] **Gessner M.O., Chauvet E.** (2002): A Case for Using Litter Breakdown to Assess Functional Stream Integrity. Ecol. Appl. 12 (2), 498–510.
- [3236] **Hieber M., Gessner M.O.** (2002): Contribution of Stream Detritivores, Fungi, and Bacteria to Leaf Breakdown Based on Biomass Estimates. Ecology 83 (4), 1026–1038.
- [3237] **Baldy V., Chauvet E., Charcosset J.-Y., Gessner M.O.** (2002): Microbial Dynamics Associated with Leaves Decomposing in the Mainstem and Floodplain Pond of a Large River. Aquatic Microbial Ecology 28, 25–36.
- [3238] **Buesing N., Gessner M.O.** (2002): Comparison of Detachment Procedures for Direct Counts of Bacteria Associated with Sediment Particles, Plant Litter and Epiphytic Biofilms. Aquatic Microbial Ecology 27 (1), 29–36.
- [3239] **Gessner M.O.** (2001): Mass Loss, Fungal Colonisation and Nutrient Dynamics of *Phragmites australis* Leaves During Senescence and Early Aerial Decay. Aquat. Bot. 69, (2–4), 325–339.
- [3240] **Lotter A.F., Appleby P.G., Bindler R., Dearing J.A., Grytnes J.-A., Hofmann W., Kammerik A., Lami A., Livingstone D.M., Ohlendorf C., Rose N., Sturm M.** (2002): The Sediment Record of the Past 200 Years in a Swiss High-alpine Lake: Hagelseewli (2339 m a.s.l.). J. Paleolimnol. 28, 111–127.
- [3241] **Cameron N.G., Schnell A., Raution M.L., Lami A., Livingstone D.M., Appleby P.G., Dearing J.A., Rose N.** (2002): High-resolution Analyses of Recent Sediments from a Norwegian Mountain Lake and Comparison with Instrumental Records of Climate. J. Paleolimnol. 28, 79–93.
- [3242] **Catalan J., Ventura M., Brancelj A., Granados I., Thies H., Nickus U., Korhola A., Lotter A.F., Barbieri A., Stuchlik E., Lien L., Bitusik P., Buchaca T., Camarero L., Goudsmit G.H., Kopacek J., Lemcke G., Livingstone D.M., Müller B., Raution M.L., Sisko M., Sorvari S., Sporka F., Strunecky O., Toro M.** (2002): Seasonal Ecosystem Variability in Remote Mountain Lakes: Implications for Detecting Climatic Signals in Sediment Records. J. Paleolimnol. 28, 25–46.
- [3243] **Berg M., Hug S., Zobrist J.** (2002): Arsen, eine neue Herausforderung für Wasserfachleute. CHemie 10, 3–13.
- [3244] **Heller Hansraj C.** (2000): Trophic Cascading in Lake Lucerne, Switzerland the Influence of Top-Down Controls on the Pelagic Food Web. Christine Heller Hansraj. Diss. ETHZ Nr. 13 631, Zurich.
- [3245] **Spaak P., Eggenschwiler L. Bürgi H.** (2000): Genetic Variation and Clonal Differentiation in the *Daphnia* Population of the Greifensee, a Pre-Alpine Swiss Lake. Verh. Internat. Verein. Limnol. 27, 1919–1923.
- [3246] **Wick L.M., Weilenmann H., Egli T.** (2002): The Apparent Clock-Like Evolution of *Escherichia coli* in Glucose-Limited Chemostats Is Reproducible at Large but Not at Small Population Sizes and Can Be Explained with Monod Kinetics. Microbiology (UK) 148, 2889–2902.
- [3247] **Roth C.M., Goss K.U., Schwarzenbach R.P.** (2002): Adsorption of a Diverse Set of Organic Vapors on the Bulk Water Surface. J. Colloid Interface Sci. 252 (1), 21–30.
- [3248] **Zurbrugg C., Drescher S., Rytz I., Sinha M., Enayetullah I.** (2002): Decentralised Composting in Dhaka, Bangladesh – Production of Compost and its Marketing. In: «Appropriate Environmental and Solid Waste Management and Technologies for Developing Countries» 2nd Ed., G. Kocasoy et al., (Eds.). Proceedings International Solid Waste Association (ISWA), Istanbul, pp. 1285–1292.
- [3249] **Zurbrugg C., Drescher S., Sharatchandra H.C.** (2002): Decentralised Composting in India – Lessons Learned. Conf. Proc. 28th WEDC Internat. Conf. on Sustainable Environmental Sanitation and Water Services, November 18–22, 2002, Calcutta India.
- [3250] **Ahmed N., Zurbrugg C.** (2002): Organic Waste Management in Karachi, Pakistan. Conf. Proc. 28th WEDC Internat. Conf. on Sustainable Environmental Sanitation and Water Services, November 18–22, 2002, Calcutta India.
- [3251] **Drescher S., Zurbrugg C.** (2002): Dezentrale Kompostierung in Indien. Müllmagazin 3, 17–21.
- [3252] **Schweigert N., Eggen R.I.L., Escher B.I., Burkhardt-Holm P., Behra R.** (2002) Ecotoxicological Assessment of Surface Waters: A Modular Approach Integrating *in vitro* Methods. Altex Altern. Tierexp. 19, 30–37.
- [3253] **Ammann A.A.** (2002): Speciation of Heavy Metals in Environmental Water by Ion Chromatography Coupled to Icp-MS. Anal. Bioanal. Chem. 372 (3), 448–452.
- [3254] **Wahli T., Knuesel R., Bernet D., Segner H., Pugovkin D., Burkhardt-Holm P., Escher M., Schmidt-Posthaus H.** (2002): Proliferative Kidney Disease in Switzerland: Current State of Knowledge. J. Fish Dis. 25 (8), 491–500.
- [3255] **Kuehn K.A., Gessner M.O., Wetzel R.G. K.S.** (2000): Standing Litter Decomposition of the Emergent Macrophyte *Erianthus giganthus* (Plumegrass). Verh. Internat. Verein. Limnol. 27, 3846–3847.
- [3256] **Malard F., Ward J.V. Robinson C.T.** (2000): An Expanded Perspective of the Hyporheic Zone. Verh. Internat. Verein. Limnol. 27, 431–437.
- [3257] **Ackermann G.E., Schwaiger J., Negele R.D., Fent K.** (2002): Effects of Long-Term Nonylphenol Exposure on Gonadal Development and Biomarkers of Estrogenicity in Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 60 (3–4), 203–221.
- [3258] **Simankova M.V., Parshina S.N., Tourova T.P., Kolganova T.V., Zehnder A.J.B., Nozhevnikova A.N.** (2001): *Methanosarcina lacustris* Sp. Nov., a New Psychrotolerant Methanogenic Archaeon from Anoxic Lake Sediments. Syst. Appl. Microbiol. 24, (3), 362–367.
- [3259] **Bossard P. Roberts R.** (2001): Editorial. Aquat. Sci. 63, (3), 1–3.
- [3260] **Beardall J., Berman T., Heraud P., Kadiri M.O., Light B.R., Patterson G., Roberts S., Sulzberger B., Sahan E., Uehlinger U., Wood B.** (2001): A Comparison of Methods for Detection of Phosphate Limitation in Microalgae. Aquat. Sci. 63, (1), 107–121.
- [3261] **Bossard P., Gammeter S., Lehmann C., Schanz F., Bachofen R., Bürgi H.R., Steiner D., Zimmermann U.** (2001): Limnological Description of the Lakes Zurich, Lucerne, and Cadagno. Aquat. Sci. 63, (3), 225–249.
- [3262] **Callieri C., Morabito G., Huot Y., Neale P.J., Litchman E.** (2001): Photosynthetic Response of Pico- and Nanoplanktonic Algae to UVB, UVA and PAR in a High Mountain Lake. Aquat. Sci. 63, (3), 286–293.
- [3263] **Neale P.J., Bossard P., Huot Y.** (2001): Incident and *in situ* Irradiance in Lakes Cadagno and Lucerne: A Comparison of Methods and Models. Aquat. Sci. 63, (3), 250–264.
- [3264] **Neale P.J., Litchman E., Sobrino C., Callieri C., Morabito G., Montecino V., Huot Y., Bossard P., Lehmann, C. Steiner D.** (2001): Quantifying the Response of Phytoplankton Photosynthesis to Ultraviolet Radiation: Biological Weighting Functions Versus *in situ* Measurements in Two Swiss Lakes. Aquat. Sci. 63, (3), 265–285.

- [3265] **Kohler J., Schmitt M., Krumbeck H., Kapfer M., Litchman E., Neale P.J.** (2001): Effects of UV on Carbon Assimilation of Phytoplankton in a Mixed Water Column. *Aquat. Sci.* 63, (3), 294–309.
- [3266] **Käch A.** (2002): Microbial Degradation of Quaternary Ammonium Alcohols – Hydrolysis Products of Esterquat Surfactants Used as Fabric Softeners. Diss. ETHZ No. 14 575, Zurich.
- [3267] **Bott M.** (2002): Iron Sulfides in Baldeggersee During the Last 8000 Years: Formation Processes, Chemical Speciation and Mineralogical Constraints from EXAFS Spectroscopy. Diss. ETHZ No. 14 767, Zurich.
- [3268] **Füchslin H.P.** (2002): Microbial Competition and Mixed Substrate Utilisation in the Laboratory: Towards a Better Understanding of Microbial Behaviour in the Environment. Diss. ETHZ No. 14 641, Zurich.
- [3269] **Golet E.M.** (2002): Environmental Exposure Assessment of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Sewage, River Water and Soil. Diss. ETHZ Nr. 14 690, Zurich.
- [3270] **Jaspers M.C.M.** (2002): Using Reporter Bacteria to Study the Bioavailability of Pollutants in Aqueous Environments. Diss. ETHZ No. 14 620, Zurich.
- [3271] **Bloesch J.** (2001): The International Association for Danube Research (IAD): Its Role in Danube Research in the Perspective of the Future. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 27, 3939–3941.
- [3272] **Binder C., Bader H.-P., Scheidegger R., Baccini P.** (2001): Dynamic Models for Managing Durables Using a Stratified Approach: The Case of Tunja, Colombia. *Ecolog. Economics* 38 (2), 191–207.
- [3273] **Burkhardt-Holm P.** (2002): Proliferative Kidney Disease: Why is it of Interest for the Swiss Project «Fishnet»? *J. Fish Diseases* 25 (8), 441–442.
- [3274] **Burkhardt-Holm P.** (2002): Projekt «Fischnetz»: Die Spannung steigt. *Wasser, Boden, Luft, Umwelttechnik* 38 (3), 22–23.
- [3275] **Hartmann F., Bader H.-P., Scheidegger R., Baccini P.** (2001): Water Transport in a Bottom Ash Landfill from a Municipal Solid Waste («MSW») Incinerator. *J. Solid Waste Technol. & Management* 27 (2), 76–81.
- [3276] **Bader H.-P., Real M., Scheidegger R., Baccini P.** (2001): Grossmassstäbliche Einführung von Solarzellen: Dynamische Modellierung von Energie und Stoffflüssen. In: «Sustainability in the Information Society», Part 2: Methods/Workshop Papers, L.M. Hilty, P.W. Gilgen (Eds.), Metropolis Verlag, Marburg, pp. 797–802.
- [3277] **Real M., Bader H.-P., Scheidegger R.** (2001): Minimizing the Environmental Impact of Large-scale Rural PV. *Renewable ENERGY World* 4 (1), 41–54.
- [3278] **Reichert P., Schervish M., Small M.J.** (2002): An Efficient Sampling Technique for Bayesian Inference with Computationally Demanding Models. *Technometrics* 44 (4), 318–327.
- [3279] **Simoni S.F., Bosma T.N.P., Harms H., Zehnder A.J.B.** (2000): Bivalent Cations Increase Both the Subpopulation of Adhering Bacteria and their Adhesion Efficiency in Sand Columns. *Environ. Sci. Technol.* 34 (6), 1011–1017.
- [3280] **Lorke A., Umlauf L., Jonas T., Wüest A.** (2002): Dynamics of Turbulence in Low-speed Oscillating Bottom-boundary Layers of Stratified Basins. *Environ. Fluid Mechanics* 2, 291–313.
- [3281] **Holm P.** (2001): Das Projekt «Netzwerk Fischrückgang Schweiz»: Ziele, Chancen und Hindernisse. In: «Fortbildungskurs für Fischereiaufseher, 30. August bis 1. September 2000 in Jongny/Vevey (VD)». *Mitt. zur Fischerei Nr. 68*, BUWAL, Bern.
- [3282] **Kulbe T., Melles M., Verkulich S.R., Pushina Z.V.** (2001): East Antarctic Climate and Environmental Variability over the Last 9400 Years Inferred from Marine Sediments of the Bungee Oasis. *Arctic, Antarctic, & Alpine Res.* 33 (2), 223–230.
- [3283] **Müller B.** (2002): Biolandbau – eine Lösung für das Phosphorproblem der Mittellandseen? *Kommunalmagazin* 19 (10), 27–30.
- [3284] **Tockner K., Peter A.** (2002): Totholz spielt im Ökosystem der Gewässer eine wichtige Rolle. *Kommunalmagazin* 19 (10), 31.
- [3285] **Sarnthein M., Kennett J.P., Allen J.R.M., Beer J., Groote P., Laj C., McManus J., Ramesh R.** (2002): Decadal-to-millennial-scale Climate Variability – Chronology and Mechanisms: Summary and Recommendations. *Quaternary Sci. Reviews* 21, (10) 1121–1128.
- [3286] **Thompson L.G., Mosley-Thompson E., Davis M.E., Henderson K.A., Brecher H.H., Zagorodnov V.S., Mashiotto T.A., Lin P.-N., Mikhalenko V.N., Hardy D.R., Beer J.** (2002): Kilimanjaro Ice Core Records: Evidence of Holocene Climate Change in Tropical Africa. *Science* 298 (5593), 589–593.
- [3287] **Köster W., Egli T.** (2002): Molekulare Methoden in der mikrobiellen Trinkwasseranalytik. *BIOspektrum* 8 (4), 368–372.
- [3288] **Köster W.** (2002): Krankheitserreger im Trinkwasser. *Oekoskop Nr. 2*, 14–18.
- [3289] **Kipfer R., Peeters F.** (2002): Using Transient Conservative and Environmental Tracers to Study Water Exchange in Lake Issyk-Kul. In: «Lake Issyk-Kul: Its Natural Environment», J. Klerkx, B. Imanackunov (Eds.). NATO Science Series. IV. Earth and Environmental Sciences, Vol 13. Kluwer Academic Publ., Dordrecht NL, pp 89–100.
- [3290] **Beer J., Muscheler R., Wagner G., Kubik P.W.** (2001): Past Climate Changes Derived from Isotope Measurements in Polar Ice Cores. *Proc. IAEA Internat. Conf. on «Study of Environmental Change using Isotope Techniques»*, Vienna 23.–27.4.2001, C&S Papers Series 13/P, 265–273.
- [3291] **Uehlinger U., Naegeli M., Fisher S.G.** (2002): A Heterotrophic Desert Stream? The Role of Sediment Stability. *Western North Amer. Naturalist* 62 (4), 466–473.
- [3292] **Uehlinger U., Tockner K., Burgherr P.** (2002): Vielfalt im Gebirgsbach – Resultate aus dem Val-Roseg-Projekt. *Hotspot* 6, 9.
- [3293] **Holm P.** (2002): Fische in Not – Detektivarbeit im Projekt Fischnetz. *Hotspot* 6, 11.
- [3294] **Friedl G.** (2002): Staudämme stören den Nährstoffkreislauf. *Hotspot* 6, 12.
- [3295] **Uehlinger U., Robinson C.** (2002): Auswirkungen künstlicher Hochwasser auf die Ökologie des Spöl. *Cratschla H. 2*, 20–21.
- [3296] **Karagounis I., Bundi U.** (2002): Ein nachhaltiges Gemeindewerk – was nun? PUSCH – praktischer umweltschutz schweiz: Thema Umwelt H. 2, S. 4–6.
- [3297] **Bundi U.** (2002): Gewässer integral aufwerten. PUSCH – praktischer umweltschutz schweiz: Thema Umwelt H. 3, S. 2–3.
- [3298] **Bundi U., Karagounis I.** (2002): Ziel: Nachhaltige Gemeindewerke. PUSCH – praktischer umweltschutz schweiz: Thema Umwelt H. 2, S. 2–3.
- [3299] **van der Nat D., Schmidt A.P., Tockner K., Edwards P.J., Ward J.V.** (2002): Inundation Dynamics in Braided Floodplains: Tagliamento River, Northeast Italy. *Ecosystems* 5, 636–647.
- [3300] **Tockner K., Stanford J.A.** (2002): Riverine Flood Plains: Present State and Future Trends. *Environ. Conservation* 29 (3), 308–330.
- [3301] **Baur Keller I.** (2002): The Immobilisation of Heavy Metals and Metalloids in Cement-stabilised Waters: A Study Focusing on the Selenium Oxyanions SeO_3^{2-} and SeO_4^{2-} . Diss. ETHZ No. 14 840, Zurich.
- [3302] **Hoehn E.** (2002): Hydrogeological Issues of Riverbank Filtration – A Review. In: «Riverbank Filtration: Understanding Contaminant Biogeochemistry and Pathogen Removal», C. Ray (Ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht NL, pp. 17–41.
- [3303] **Golet E.M., Strehler A., Alder A.C., Giger W.** (2002): Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Sewage Sludge and Sludge-treated Soil Using Accelerated Solvent Extraction Followed by Solid-phase Extraction. *Anal. Chem.* 74 (21), 5455–5462.
- [3304] **Nesatyy V.J., Ross N.W.** (2002): Recovery of Intact Proteins from Silver Stained Gels. *Analyst* 127, (9) 1180–1187.
- [3305] **Aldrich A.P., Kistler D., Sigg L.** (2002): Speciation of Cu and Zn in Drainage Water from Agricultural Soils. *Environ. Sci. Technol.* 36 (22), 4824–4830.
- [3306] **Arscott D.B., Tockner K., Ward J.V.** (2001): Thermal Heterogeneity along a Braided Floodplain River (Tagliamento River, Northeastern Italy). *Canad. J. Fish. Aquat. Sci.* 58 (12), 2359–2373.
- [3307] **Tockner K., Ward J.V., Edwards P.J., Kollmann J.** (2002): Riverine Landscapes: an Introduction. *Freshwater Biol.* 47 (4), 497–500.
- [3308] **Ward J.V., Tockner K., Arscott D.B., Claret C.** (2002): Riverine Landscape Diversity. *Freshwater Biol.* 47 (4), 517–539.
- [3309] **Schertenleib R.** (2002): Globale Wasserproblematik. *Umwelt Focus Nr. 4*, 45–49.
- [3310] **Tockner K., Malard F., Uehlinger U., Ward J.V.** (2002): Nutrients and Organic Matter in a Glacial River-floodplain System (Val Roseg, Switzerland). *Limnol. Oceanogr.* 47 (1), 266–277.
- [3311] **Volkland H.-P.** (2001): From Biocorrosion to Bioprotection a New Approach in Corrosion Control. by Hans-Peter Volkland. Diss. ETHZ Nr. 14 293, Zurich.

Baumann P. (2002): Die Entwicklung des Fischnährtier-Bestandes in schweizerischen Fliessgewässern zwischen 1980 und 2000. Fischnetz-Publ., EAWAG, Dübendorf, 39 S. + Anhänge.

Baumgartner B., Belevi H. (2001): A systematic overview of urban agriculture in developing countries, Sandec Report, 34 p.

Bloesch J. (2001): «Auf zu neuen Ufern» – Forschungsaktivitäten der IAD. Jubiläumsschrift «25 Jahre Österreichisches Nationalkomitee der Internationalen Arbeitsgemeinschaft Donauforschung – Donauforschung neu». Schriftenreihe Bundesamt für Wasserwirtschaft, Bd. 12, Wien, S. 91–109. ISBN 3-901605-12-6.

Bohl E., Peter A., Kindler T., Haidvogel G. (2001): Fisch- und Krebsatlas Liechtensteins. Schriftenreihe Amt für Umweltschutz des Fürstentums Liechtenstein, Bd. 2, 83 S.

Bosma T.N.P., Harms H., Zehnder A.J.B. (2001): Biodegradation of xenobiotics in environment and technosphere. In: «The handbook of environmental chemistry, Vol. 2, Part K, Biodegradation and persistence», B. Beek (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, p. 163–202. ISBN 3-540-62576-3.

Bratrich C., Truffer B. (2001): Green electricity certification for hydropower plants – concept, procedure, criteria. Green Power Publ. Issue 7, EAWAG Kastanienbaum 124 p. ISBN 3-905484-06-4.

Bratrich C., Truffer B. (2001): Ökostrom-Zertifizierung von Wasserkraftanlagen – Konzepte, Verfahren, Kriterien. – EAWAG, Forschungszentrum für Limnologie, Kastanienbaum. Ökostrom Publ. Bd. 6, EAWAG Dübendorf, 113 S. ISBN 3-905484-05-6.

Bucher R. (2002): Feinsedimente in schweizerischen Fliessgewässern; Einfluss auf die Fischbestände. Fischnetz-Publ., EAWAG, Dübendorf, 87 S.

Detli R., Markard J. (2001): Kennzeichnung von Elektrizität. Mögliches Vorgehen gemäss Art. 12 EMG. Forschungsprogramm Energiewirtschaftliche Grundlagen, Bundesamt für Energie, Bern, Januar, 80 S.

Escher M. (2002): Zwischenbericht «Projekt Schwarze Forellen», Fischnetz-Publ., EAWAG, Dübendorf, 7 S.

Frutiger A., Müller R. (2002): Der Rote Sumpfkrebs im Schübelweiher (Gemeinde Küsnacht ZH) – Auswertung der Massnahmen 1998–2001 und Erkenntnisse. EAWAG, Dübendorf, 26 S.

Gehrels H., Peters N.E., Hoehn E., Jensen K., Leibundgut C., Griffioen J., Webb B., Zaadnoor-

dijk W.J. (Eds.) (2001): Impact of Human Activity on Groundwater Dynamics. IAHS-Publ. 269. Internat. Assoc. of Hydrological Sciences, Wallingford, UK, 369 p. ISBN 1-901502-56-2.

Gujer W. (2002): Siedlungswasserwirtschaft, 2. Auflage. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 421 S. ISBN 3-540-43404-6.

Klingel F. (2001): Nam Dinh Urban Development Project – Septage Management Study. Colenco Urban Development Internat., Nam Dinh City, Vietnam; EAWAG SANDEC, Dübendorf, 54 p.

Küttel S., Peter A., Wüest A. (2002): Temperaturpräferenzen und -limiten von Fischarten Schweizerischer Fliessgewässer. Rhone-Thur-Projekt, EAWAG, Kastanienbaum, Publ. Nr. 1, 36 S.

Markard J. (2001): Fokusgruppen-Erhebung zur Kennzeichnung von Elektrizität – Informationsbedürfnisse von Konsumentinnen und Konsumenten. Bundesamt für Energie BFE, Ittigen, 40 S.

Markard J., Peter A., Truffer B. (2001): Ökostrom aus den Alpen – Die Wasserkraft im liberalisierten Markt. Alpenreport, Band 2, CIPRA, Schaan, 317–323.

Montangero A., Strauss M. (2001): Faecal Sludge Treatment. Lecture Notes, IHE Delft, February 8, 24 p.

Montangero A., Strauss M. (2001): Gestion des boues de vidange. Atelier de planification, CREPA, Ouagadougou, Burkina Faso, 37 p.

Moosmann L., Jorde K., Schneider M., Meier W., Peter A., Wüest A. (2002): Restwasserbemessung für Ökostrom mit Beispiel Brenno (Bleniotal, TI). Ökostrom Publ. Bd. 9. EAWAG, Kastanienbaum, 121 S. ISBN 3-905484-08-0.

Pianta R., Boller M. (2001): Bericht über quantitative und qualitative Eigenschaften von Karstquellwasser und dessen Aufbereitung zu Trinkwasser mittels Membrantechnologie. EAWAG, Dübendorf.

Reichert P., Borchard D., Henze M., Rauch W., Shanahan P., Somlyódy L., Vanrolleghem P. (Eds.) (2001): River water quality model No 1. IWA Sci. & Technol. Report No. 12, London, 144 p. ISBN 1-900222-82-5.

Santiago S., Becker K., Chèvre N., Pardos M., Benninghoff C., Dumas M., Thybau E., Garrivier F. (2002): Guide pour l'utilisation des tests écotoxicologiques avec les daphnies, les bactéries luminescentes et les algues vertes, appliqués aux échantillons de l'environnement. S. Santiago (Ed.). Groupe de travail «Tests écotoxicologiques» de la Commission internat. pour la protection des eaux du Léman. SOLUVAL SANTIAGO, Couvet, 55 p.

Schager E., Peter A. (2002): Bachforellensömerlinge – Phase II. Fischnetz-Publ., EAWAG, Dübendorf, 218 S.

Schälchli U. (2002): Innere Kolmation; Methoden zur Erkennung und Bewertung. Fischnetz-Publ., EAWAG, Dübendorf, 24 S.

Schwarzenbach R.P., Gschwend P.M., Imboden D.M. (2002): Environmental Organic Chemistry, 2nd Edition. Wiley Interscience, Hoboken, USA, 1313 p. ISBN 0-471-35053-2.

Schweigert N., Eggen R.I.L., Escher B.I., Holm P., Behra R. (2001): Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fliessgewässer in der Schweiz – Vorschläge zur Vorgehensweise im Modul Ökotoxikologie. EAWAG Dübendorf, 29 S.

Spreng D., Truffer B., Wüstenhagen R. (2001): Perspektiven für die Wasserkraftwerke in der Schweiz: Die Chancen des Ökostrommarktes. Bundesamt für Energie, Bern, 66 S.

Strehler A. (2002): Immissionsstudie: Beschreibung der Immissionsdatenbank. Fischnetz-Publ. EAWAG, Dübendorf, 20 S.

Truffer B., Bloesch J., Bratrich C., Gonser T., Markard J., Hoehn E., Peter A., Wehrli B., Wüest A. (2002): Ökostrom aus Wasserkraft – ein transdisziplinäres Forschungsprojekt. Schlussbericht (1997–2001). EAWAG Kastanienbaum, Ökostrompublikationen, Bd. 10 EAWAG, Kastanienbaum. 80 S. ISBN 3-905484-09-9.

Truffer B., Bruppacher S., Behringer J. (2002): Nachfrage nach Ökostrom: Ergebnisse einer Fokusgruppenerhebung in den Städten Bern, Zürich und Stuttgart. Ökostrom Publ. Bd. 8 EAWAG, Kastanienbaum, 103 S. ISBN 3-9054884-07-02.

Truffer B., Seiler B. (2001): Umweltzertifizierung von Kleinwasserkraftanlagen. Grundlagen und Konzepte für ein vereinfachtes Verfahren für kleine Wasserkraftwerke. ENET Publikation Nr. 210057. Programm Kleinwasserkraftwerke, Bundesamt für Energie, Bern, 130 S.

Ward J.V., Kondratieff B.C., Zuelling R.E. (2002): An Illustrated Guide to the Mountain Stream Insects of Colorado, 2nd Ed. University Press of Colorado. 195 p. ISBN 0870816535.

Wegelin M., Meierhofer R., del Rosario Torres X., Gremion B., Mäusezahl D., Hobbins M., Indergand-Echeverria S., Grimm B., Aristanti C. (2002): Solar Water Disinfection – a Guide for the Application of SODIS. SANDEC Report No. 06/02, EAWAG, Dübendorf/Switzerland. 80 p. ISBN 3-906484-24-6.

Edition finale de la Table ronde consacrée à l'eau

Le projet pilote «Table ronde – Science et cité» consacré au thème de l'eau s'est achevé en janvier 2003 par une manifestation de clôture à l'EAWAG et par la publication d'un rapport final. Pendant les trois ans du projet, citoyens et chercheurs de l'EAWAG ont éprouvé le dialogue, trouvé des voies d'entente mutuelle et défini des principes élémentaires.



Lors du débat public sur la question «Le dialogue entre la science et la société est-il nécessaire?» les participants au projet ont pu s'entretenir avec Charles Kleiber, Secrétaire d'Etat à la science et à la recherche. En tant que président, il était là pour représenter la Fondation Science et Cité. Le directeur de l'EAWAG, Alexander Zehnder, qui avait participé à la Table ronde et Alfred Meier-Jucker, représentant de la Cité, ont fait état de leur expérience de dialogue. Christine Burgener, présidente communale de Thalwil ZH, a quant à elle expliqué en quoi de telles plates-formes étaient intéressantes pour les politiques. Le rapport final présenté lors de cette manifestation de clôture renferme un certain nombre de principes à partir desquels de telles plates-formes de discussion entre

science et société peuvent être conçues de manière constructive. Il importe avant tout de bien choisir les thèmes de discussion qui doivent être en relation étroite avec les travaux des institutions de recherche impliquées tout en ayant un rapport évident avec les préoccupations de la société. Il faut d'autre part bien savoir qu'il faut du temps pour que le dialogue s'installe dans un climat de tolérance et de compréhension mutuelles.

A l'EAWAG, nous avons déjà commencé à mettre le dialogue en application: les citoyens de la Table ronde ont participé à la planification de recherche de l'EAWAG pour la période budgétaire de 2004 à 2007.

Le rapport final peut être obtenu sur le site suivant: www.eawag.ch/news/science_et_cite/schlussbericht.pdf

Des étudiants dans la pratique: L'étude de cas de la Thur

La recherche environnementale moderne ne peut être appréhendée en cours théorique, comme un cours de natation qui se ferait hors de l'eau. Des étudiants en Sciences de l'environnement de l'EPF de Zurich ont donc dû traiter d'octobre 2002 à février 2003 un



problème environnemental concret, ce qui leur a donné l'occasion d'apprendre à travailler en équipe. Cette étude de cas était consacrée à la Thur, rivière engoncée dans un corset des plus serrés suite aux corrections successives qu'elle a subies depuis 140 ans et qui bénéficie depuis septembre 2001 d'un vaste programme de revitalisation. Les enseignements tirés de ce projet seront une véritable référence non seulement pour les grands projets du futur mais également pour les futurs spécialistes. Sous la tutelle de chercheurs de l'EPF de Zurich et de l'EAWAG, les étudiants répartis en six groupes de travail ont analysé les différents aspects de la revitalisation de la Thur et se sont penchés sur des questions comme celles de savoir comment on pouvait évaluer le succès de mesures de revita-

lisation, comment on pouvait convaincre les propriétaires riverains du bien-fondé de tels projets, comment on pouvait concilier écologie et protection contre les crues et si les changements climatiques avaient sur les crues de la Thur une influence plus importante que des modifications du mode d'occupation des sols.

Les résultats des groupes de travail ont été présentés au public au mois de février à l'occasion d'une visite sur le terrain. Ces résultats doivent être pris en compte dans le projet de revitalisation et c'est pourquoi l'étude de cas est actuellement examinée avec beaucoup d'attention par le Département de l'économie des eaux et de l'aménagement des cours d'eau du canton de Thurgovie.

Plus d'informations: www.eawag.ch/thur

Les premiers diplômés du cours PEAK d'écotoxicologie

Le but de l'écotoxicologie est de reconnaître les effets délétères des produits chi-



miques et de les juguler là où la possibilité se présente. Il revient à des spécialistes de l'industrie, de l'administration et du monde scientifique de veiller à une gestion et une manipulation consciencieuses de ces substances. Pour remplir cette mission, il leur faut disposer de bonnes bases d'écotoxicologie et être au fait des derniers développements techniques dans ce domaine. Le cours d'écotoxicologie «coetox» (collaboration en écotoxicologie) lancé en 1994 par l'EAWAG et l'EPF de Lausanne assure la formation de base et la formation continue

de ces spécialistes et souhaite favoriser les échanges d'expérience entre professionnels. Le 2 juin 2003, les premiers diplômés ont pu prendre possession de leur attestation de participation au cours. Par la présentation de leurs travaux d'étude, ils ont atteint le terme de leur formation continue. Le cours s'étend sur trois ans et comprend 5 modules présentés en langue allemande ou française. Un nouveau cours «coetox» démarrera en mars 2004.

Pour plus d'informations: www.eawag.ch/events/peak