

STRUCTURE, CLASSIFICATION & IDENTIFICATION

PARTIE 2

✦ QUELS SONT LES ÉLÉMENTS DE LA STRUCTURE DE LA PAROI DES BACTÉRIES À GRAM- ET GRAM+ ?

☀ PAROI D'UNE BACTÉRIE GRAM + :

(allez voir les schémas sur mon diapo et refaites-les si vous voulez pour vous repérer!!)

On observe la périphérie du cytoplasme, la membrane plasmique avec ses **phospholipides** et ses **protéines intrinsèques**, et plus à l'extérieur le **peptidoglycane** qui constitue la paroi. Il faut savoir que ce peptidoglycane est amarré à la membrane plasmique par des **acides lipotéichoïques**.

On observe également au sein de cette paroi des **acides téichoïques** (≠ lipotéichoïques). Ce sont des molécules qui ne sont **présentes que chez les bactéries à GRAM+** et qui correspondent au deuxième composant majeur de leur paroi (50% du poids). Ces acides téichoïques présentent un **pouvoir antigénique**, ce qui fait qu'ils peuvent jouer un rôle important dans les **infections**.

☀ PAROI D'UNE BACTÉRIE GRAM - :

La paroi d'une bactérie GRAM- est plus complexe. On peut ici voir, de l'intérieur vers l'extérieur, la membrane plasmique avec des **phospholipides** et des **protéines**, le **peptidoglycane** (dont le volume est réduit), et une membrane externe qui possède des **porines**, des **lipopolysaccharides** et des **protéines intrinsèques**. Le peptidoglycane est cette fois-ci amarré à la membrane externe (et pas la membrane plasmique), et ce par des **lipoprotéines de Braun** dont la partie protéique est **associée au peptidoglycane**, et la partie lipidique à la **membrane externe**. Ces lipoprotéines de Braun ont un rôle essentiel dans la **cohésion et la stabilisation** de la paroi.

Concernant les **lipopolysaccharides**, il faut retenir qu'ils ne sont **présents que chez les bactéries à GRAM-** et qu'ils représentent le constituant essentiel de leur membrane externe.

Il comporte deux parties :

- ♦ le **LIPIDE A** qui correspond au **support de la toxicité** de la molécule entière
- ♦ le **CORE** (un polysaccharide) dont la composition varie d'une espèce à une autre. Aussi appelés "**endotoxines**", ils sont impliqués dans le **choc septique** et peuvent entraîner une réaction inflammatoire démesurée. Leurs **chaînes latérales** sont plus ou moins longues et constituent l'**antigène somatique** qui a un rôle prépondérant dans ce choc.

✦ QUELLE EST LA STRUCTURE DU PEPTIDOGLYCANE ?

Le **peptidoglycane**, aussi nommé muréine ou mucopeptide, est un **polymère de chaînes linéaires** de **N-acétylglucosamine** et d'**acide N-acétylmuramique**, qui correspond en fait à un réseau de

sucres et d'acides aminés. Ces chaînes sont **liées** entre elles par de courtes **chaînes peptidiques** qui sont des **tétrapeptides** (typiquement la D et L-alanine, le D-glutamate et la L-lysine), au niveau de l'**acide N-acétylmuramique**. Les **tétrapeptides** sont eux-mêmes **reliés entre eux** par **transpeptidation** entre une **D-Alanine d'une chaîne** et la **L-lysine d'une autre chaîne**.

Il est important de connaître cette structure car c'est elle qui sera **ciblée par les antibiotiques**.

La **synthèse** du peptidoglycane **commence dans le cytoplasme** avec des **précurseurs** qui génèrent des sucres avec des acides aminés. Il y a ensuite **maturation** des précurseurs dans la **membrane plasmique**, puis **insertion dans la paroi**. On remarque qu'il existe **plusieurs enzymes impliquées** dans cette synthèse (transglycosylases, transpeptidases, etc...). C'est là que vont agir les **antibiotiques** : ils **inhibent la synthèse** des peptidoglycanes en **bloquant les enzymes**, ce qui a une **conséquence sur la forme** des bactéries puisque celle-ci dépend des peptidoglycanes. Ainsi, avec des **peptidoglycanes absents ou altérés, la bactérie gonfle et meurt**.

Voici quelques exemples d'antibiotiques à connaître :

- ♦ la **FOSFOMYCINE** agit sur les précurseurs en **inhibant la pyruvyl transférase**
- ♦ les **GLYCOPEPTIDES** bloquent l'**élongation des peptidoglycanes**
- ♦ et surtout les **β-LACTAMINES** inhibent les **transglycosylases**, les **transpeptidases** et les **carboxypeptidases**.

✦ QUELLE EST LA COMPOSITION DE L'ARN RIBOSOMIQUE ET QUEL EST L'INTÉRÊT DE SON ÉTUDE ?

++ RAPPELS ++

Dans les bactéries (tout comme dans les cellules eucaryotes), ce sont les **ribosomes** qui s'occupent de la **synthèse des protéines**.

On considère typiquement **trois ARN ribosomiques** (ARNr) : le **23S**, le **5S** et le **16S** (ici S ça veut dire Svedberg, c'est l'unité de mesure du coefficient de sédimentation). Ces ARNr vont ensuite se **lier à des protéines ribosomiques** pour former des **sous-unités**. Ainsi, le **23S** et le **5S** forment avec certaines de ces protéines la **sous-unité 50S**, tandis que le **16S** forme avec d'autres protéines la **sous-unité 30S** (là le S des sous-unités veut dire "small"). C'est l'association de ces **deux sous-unités** qui forme le **ribosome** avec un taux de sédimentation de **70S** chez les bactéries.

La **découverte de ces ribosomes** s'est en revanche faite **dans l'autre sens**, puisqu'en chauffant les ribosomes on a découvert les sous-unités, puis en chauffant ces derniers on a finalement trouvé des protéines et des ARNr.

La **petite sous-unité** des bactéries comprend donc un ARNr avec une constante de sédimentation de **16S**. Cet ARNr correspond à une molécule de choix pour **retrouver les liens de parenté** entre les espèces car elle est **universelle chez les procaryotes** (chez les eucaryotes, c'est l'ARNr 18S qui joue ce rôle).

Une particularité de cet ARNr 16S est qu'il est fait d'une succession de **séquences à vitesse**

d'évolution variable, avec des séquences conservées, des séquences variables et des séquences hypervariables. C'est intéressant car ça permet, en comparant les séquences conservées, de voir à quelle famille, à quel genre voire à quelle espèce appartient la bactérie étudiée. Le fait d'avoir ces séquences conservées tout au long de l'ARNr permet d'hybrider des amorces et d'amplifier le gène qui code pour l'ARNr de n'importe quelle bactérie. Ainsi, l'amplification et le séquençage de ce gène sont universels.

La quantité de ribosomes disponible dans chaque bactérie est très importante, ce qui permet de faire une hybridation in situ afin de visualiser les bactéries. La banque de l'ARNr 16S correspond à la plus grande banque de séquences communes (plus de 200 000 séquences).

L'identification moléculaire des bactéries fonctionne ainsi : à partir d'un prélèvement, on extrait l'ADN correspondant à l'ARNr 16S et on l'amplifie par PCR avec des amorces universelles. Puis on fait un séquençage et on fait une lecture afin de pouvoir par la suite comparer la séquence obtenue à une banque de données et ainsi identifier la bactérie.

Néanmoins, il s'agit d'une stratégie qui ne sera utilisée que dans quelques cas:

- ♦ Soit à partir d'une colonie isolée, pour identifier une bactérie non reconnue par spectrométrie de masse et qui présente d'autres caractérisations phénotypiques.
- ♦ Soit à partir d'un prélèvement, si :
 - On visualise des bactéries au microscope mais qu'elles ne sont pas cultivables sur les milieux de culture habituels
 - La culture est négative, le plus souvent après un traitement antibiotique, afin de vérifier l'absence d'une bactérie donnée
 - Le prélèvement est considéré comme stérile, c'est-à-dire ne contenant pas de microbiote et à priori monobactérien (LCR, liquide articulaire, valve cardiaque...).

Sinon, on préférera la spectrométrie de masse qui est plus efficace et moins coûteuse.

✦ QU'EST-CE QUI CARACTÉRISE LA PLASTICITÉ DU GÉNOME BACTÉRIEN ?

Cela concerne des structures comme l'ADN chromosomique et l'ADN extra-chromosomique.

Le génome évolue par des mutations aléatoires non corrigées lors de la réplication de l'ADN chromosomique ou plasmidique, à une fréquence 1 sur 10^6 à 10^7 nucléotides, qui vont se fixer dans la population par pression de sélection. En effet, si la mutation touche la cible des antibiotiques, celle-ci ne sera plus reconnue et conférera aux bactéries une résistance aux antibiotiques. Le génome peut aussi évoluer par acquisition d'un nouveau matériel génétique puisque les bactéries sont capables de récupérer de l'ADN externe par le biais de plusieurs réactions (transformation, transduction et/ou conjugaison notamment).

++ Petit Rappel ++

Un PLASMIDE correspond à de l'ADN circulaire, superenroulé et extra-chromosomique, dont la réplication est indépendante de l'ADN chromosomique. Il est situé dans le cytoplasme.

En général, un plasmide a une petite taille (un centième de celle du chromosome bactérien) et

porte pourtant une **grande diversité de gènes**. Il contient ainsi des gènes nécessaires à sa **réplication**, des gènes **structuraux** (impliqués dans la formation des fimbriae), des gènes **métaboliques et cataboliques** qui confèrent des **caractères absents chez les souches** de l'espèce (ce qui peut parfois être source d'erreur pour l'identification), des gènes de **production de toxines** mais aussi et surtout des gènes de **résistance aux antibiotiques**.

Voici quelques mécanismes qu'utilisent les bactéries pour acquérir du nouveau matériel génétique.

☀ **LA TRANSFORMATION :**

Elle a été découverte en **1928** avec l'**expérience de Griffith** (soit bien avant la découverte de l'ADN). Dans cette expérience, des colonies de *Streptococcus pneumoniae* d'abord rugueuses non virulentes ont été injectées chez des souris en intra-péritonéal. Après injection, la souris reste vivante. Cependant, en injectant une **souche lisse virulente**, la souris meurt après l'injection. On a ainsi pu distinguer les **souches virulentes létales** des **souches non virulentes et non létales**. Ensuite, on a injecté des souches virulentes qui ont été chauffées pour être tuées ; la souris reste vivante. Pour finir, on a injecté à la fois une souche virulente morte et une souche non virulente vivante ; après injection, la souris meurt. Au terme de cette expérience, Griffith a conclu qu'il existe quelque chose dans les bactéries virulentes qui passe vers les bactéries non virulentes (qui deviennent de ce fait virulentes), et ce **même si elles sont mortes**.

Ce qu'il ne savait pas c'est que c'étaient plus précisément des fragments d'ADN qui transitaient d'une bactérie à une autre.

☀ **LA TRANSDUCTION :**

Elle se fait via un **virus** qui n'infecte que des bactéries, c'est-à-dire un **bactériophage**, qui va se fixer sur une bactérie et lui injecter son ADN. Une fois la bactérie infectée, il peut suivre un cycle lytique ou un cycle lysogénique.

♦ Dans un **cycle lytique**, le bactériophage va **se reproduire et détruire la bactérie** pour libérer ses clones. Chaque clone peut **recupérer des morceaux d'ADN** de la bactérie.

♦ Dans un **cycle lysogénique**, le bactériophage va plutôt **s'intégrer dans le chromosome** et rester "en dormant". À ce moment-là, il apporte à la bactérie **de l'ADN issu d'autres bactéries précédemment infectées**, et qui peut coder pour de nouveaux caractères.

☀ **LA CONJUGAISON :**

La conjugaison se fait entre une **bactérie mâle** et une **bactérie femelle** par l'intermédiaire d'un **pilus sexuel**. Et c'est au sein de ce pilus que seront échangés des fragments d'ADN **chromosomique ou plasmidique**, le transfert **dépendant du temps de contact** entre les deux bactéries.

✚ QUELLES SONT LES BASES ET LES RÈGLES DE CLASSIFICATION DES BACTÉRIES ?

L'**espèce** correspond à l'**unité fondamentale** de la classification, et la **souche** à une **sous-division** de l'espèce. Un **clone** désigne la population descendant d'une même souche.

Pour que **deux souches appartiennent à la même espèce**, elles doivent respecter deux critères :

- ◆ un critère **phénotypique**, avec un ou des caractère(s) distinctif(s) des autres espèces
- ◆ un critère **génotypique**, qui correspond à une hybridation ADN/ADN supérieure ou égale à **70%**, à température optimale.

En réalité, ces deux critères commencent à devenir **abandonnés de nos jours** car on compare des bactéries avec **95%** de séquences complètes génomiques **identiques**. Ainsi, la **classification des bactéries** est devenue phylogénétique et se base sur **l'amplification et le séquençage de l'ARNr 16S** et plus simplement de l'ADN correspondant, voire désormais sur un **séquençage haut débit** de tout le génome bactérien.

Pour terminer, la **nomenclature des bactéries** correspond à l'ensemble des règles qui régissent l'attribution d'un nom à chaque taxon distinct ; elle est **universelle** et **hiérarchique**. Comme vu précédemment, le nom d'une bactérie comprend un nom de **genre** (qui commence toujours par une majuscule) et un nom d'**espèce** (tout en minuscule).

finnn de cette dernière fiche TTR, j'espère qu'elles vous plaisent et que mes vidéos aussi!! si vous avez la moindre question sur les cours ou sur la P1 en général, comment aborder le S2 avec la reprise etc.... je reste dispo sur le forum/discord ou en mp <33

dédi au CRL de Valrose où je finis mes fiches (dont celle-ci) au lieu de bosser l'anglais mdr (trql j'ai le C2+ même la dame de l'accueil elle était choquée de mon niveau stratosphérique #modestie)
dédi à ma mère, aka mon coach personnel sans qui j'aurais JAMAIS réussi <3
dédi à mon père qui a supporté mon stress + celui de ma mère pendant la P1 mdr <3
dédi à ma soeur qui s'en bat totalement les steaks de cette dédicace et quand j'lui dirai "regarde je t'ai fait une dédicace dans ma fiche!!" elle va dire "ah ok" supplément side eyes (en vrai elle fait genre mais ça lui fait plaisir) (jtm)
dédi à ma fillote Jad qui est littéralement venue gratter une dédicace en m'envoyant un vocal jpp, et dédicace aussi à Thibo mon autre fillot, lâchez rien les bg je veux vous voir à Pasteur l'année prochaine!!
dédi à mes copinesss Charlotte mvv trop une star, Marine avec qui on a trop de cours en commun jpp, Marina la toute première personne que j'ai rencontré au tut, Iris & Iris les plus belles
dédi à Philo, Flore, Mathilde, Marie et Alice, à notre soirée raclette x potins

dédi à vous, dédicace à ceux qui n'ont jamais de dédicace (je compatissais c'était moi l'an dernier mmdr)
bon courage, ça va le faire <3