

Diversité des Procaryotes-Interactions-Outils d'études

Question: Pourquoi a t'on besoin d'outils moléculaires?

- - La diversité morphologique est limitée
- - La diversité liée aux « habitats » est très grande
- - La diversité liée aux métabolismes est très grande
- - La diversité génétique est très grande
- - La diversité liée aux interactions est très grande

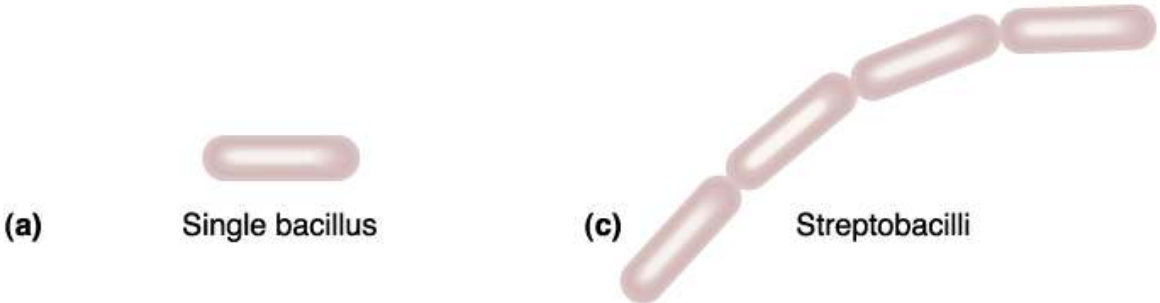
La majorité (entre 1 et 10 %) des microorganismes de l'environnement ne sont pas cultivables

(60 phylums bactériens (90 avec CPR), aucune souches cultivables pour au moins 20 d'entre-eux), 1500 phylum estimés.

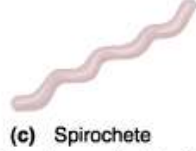
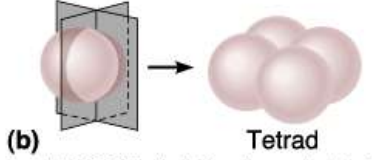
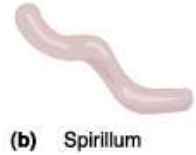
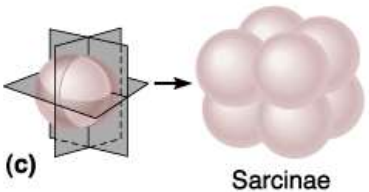
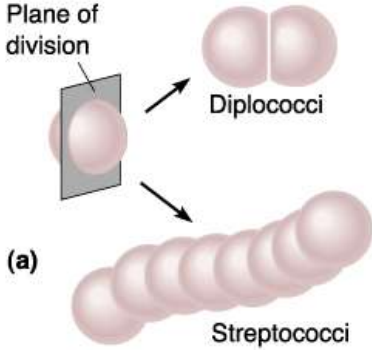
La diversité morphologique est « trop » limitée



Même si pas assez étudiée encore... Cf cours précédent

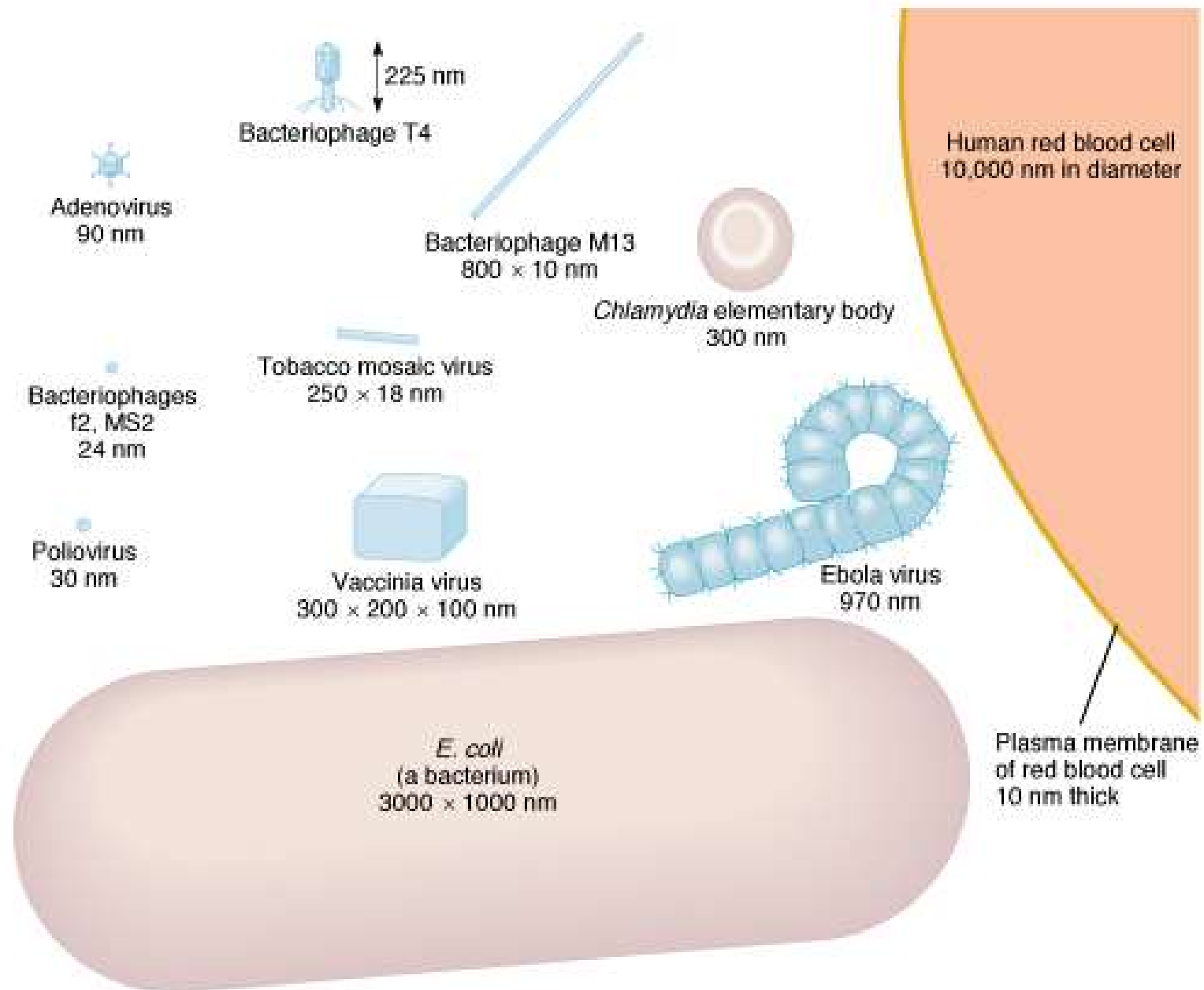


Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.



Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.





Small bacteria	
<i>Bacteroides spp</i>	0.1 x 0.15-0.13 μm
<i>Bordetella pertussis</i>	0.2-0.3 x 0.5-1.0 μm
<i>Mycoplasma spp (PPLO)</i>	0.1 - 0.25 μm dia
Medium bacteria	
<i>Bacillus spp</i>	0.7-0.8 x 2-3 μm
<i>E. coli</i>	0.4-0.7 x 1-3 μm
<i>S. aureus</i>	0.8-1.0 μm dia
Large Bacteria	
<i>Anabaena spp</i>	4-5 μm
<i>Achromatium spp</i>	5 x 100 μm

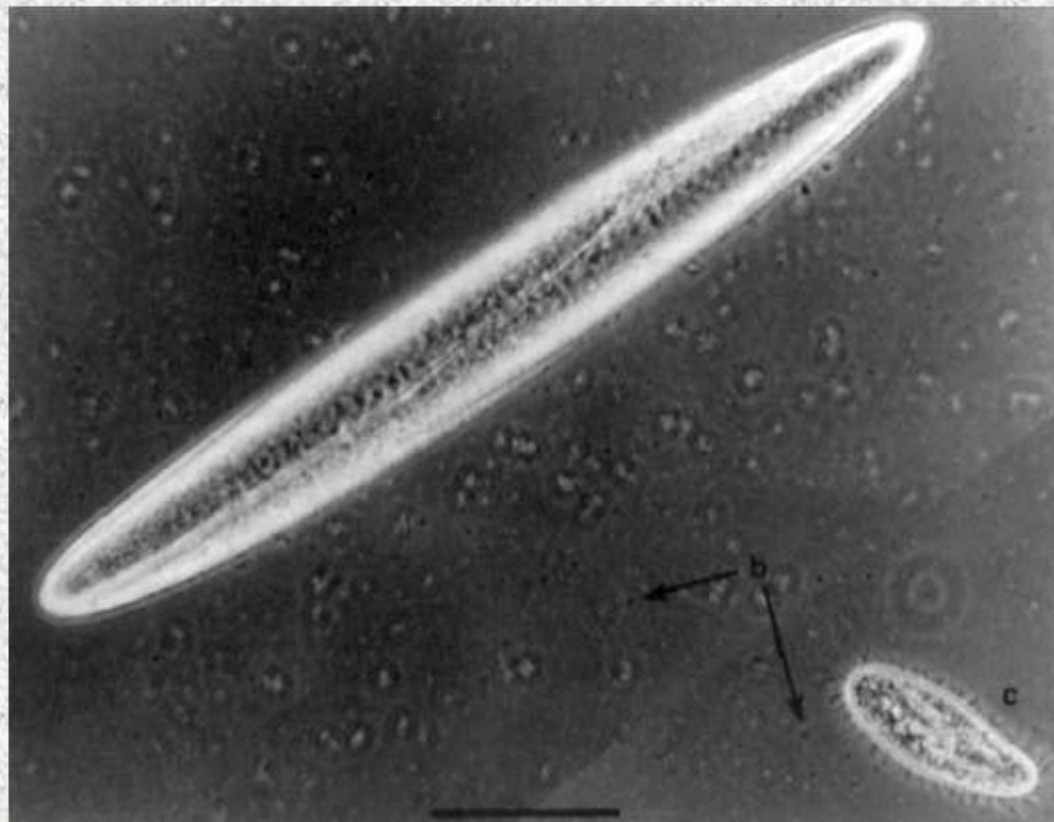


1. Bacteria can be enormous!!

Surgeonfish



Epulopiscium fishelsonii
Escherichia coli
Paramecium tetraurelia
Bar : 100 μ m





La plus large bactérie connue ?

Thiomargarita namibiensis

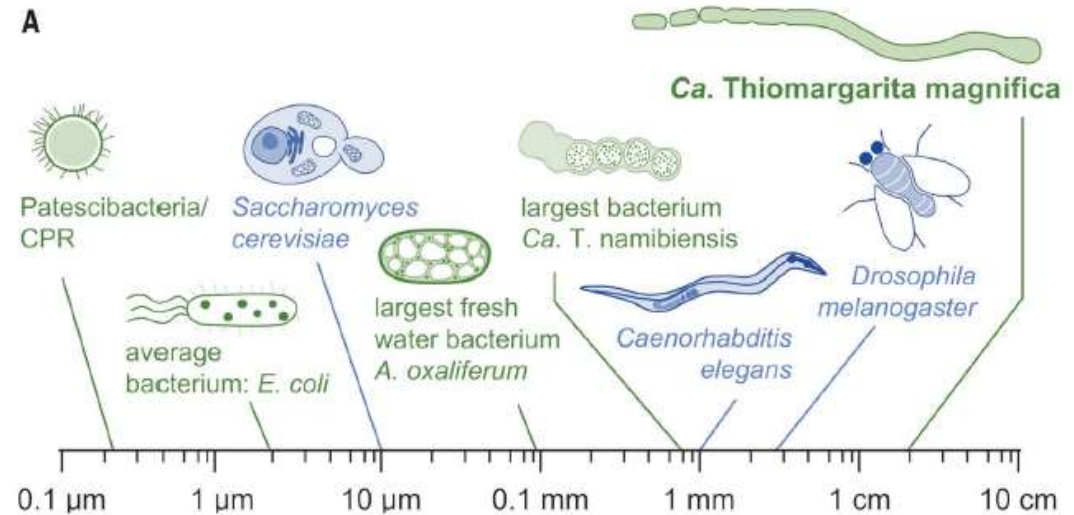
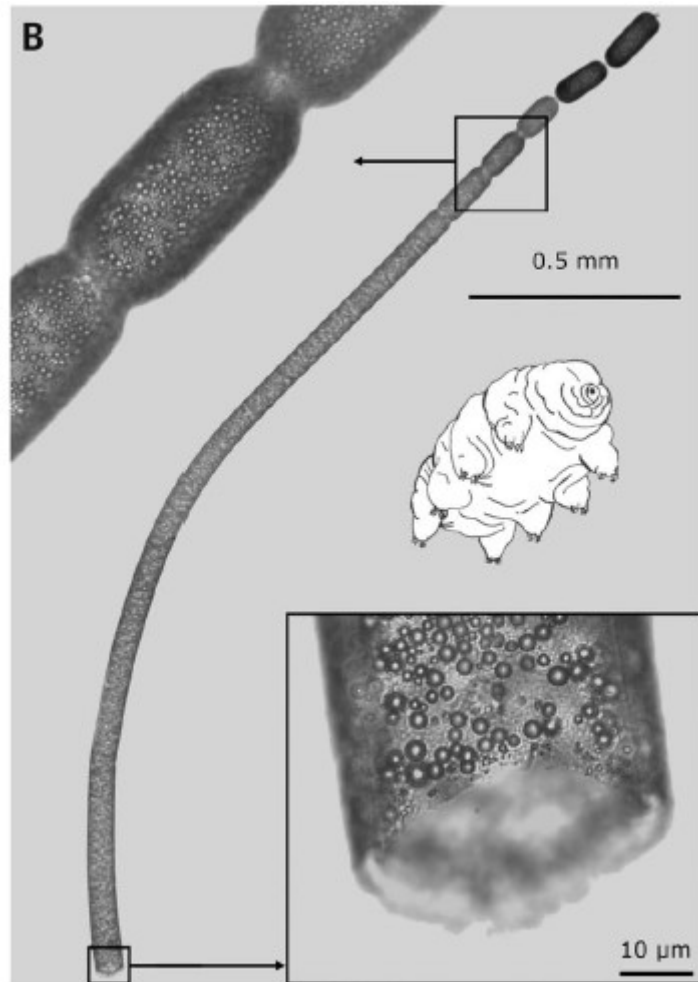


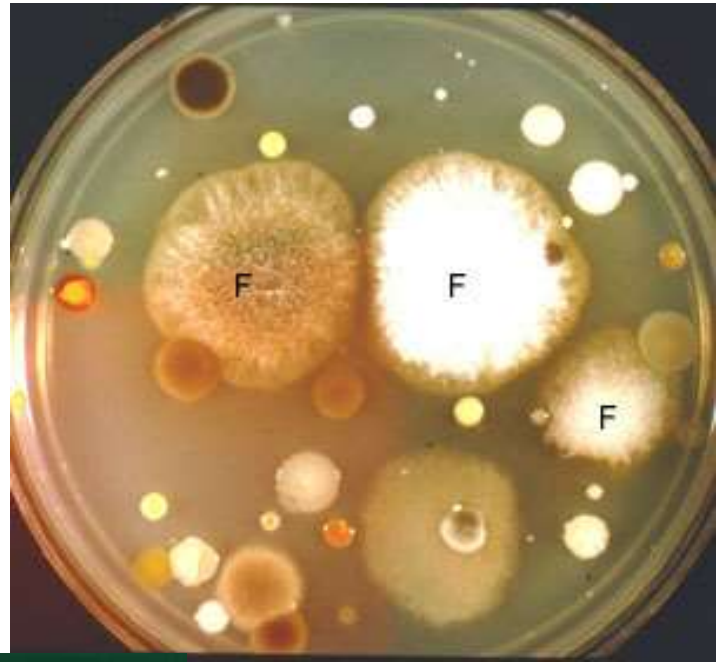
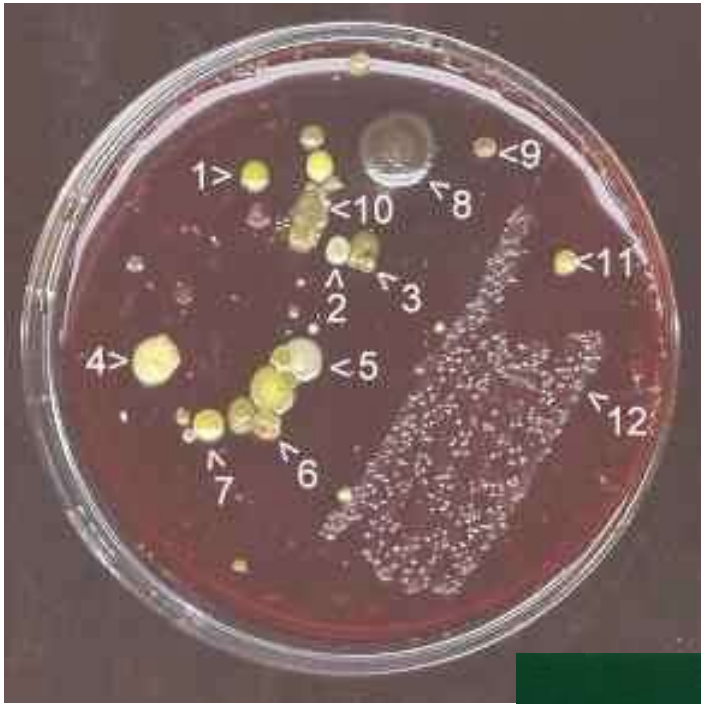
“The new bacterium steals the size record from *Epulopiscium fishelsoni*, which is found in surgeonfish guts. If an ordinary bacterium were mouse-size, *E. fishelsoni* would be the equivalent of a lion, and *T. namibiensis* might equal the world's largest animal, the blue whale”.

Schulz, H.N. A. Teske, *et al.* 1999. Dense populations of a giant sulfur bacterium in Namibian shelf sediments. *Science* 284(April 16):493.

MICROBIOLOGY

A centimeter-long bacterium with DNA contained in metabolically active, membrane-bound organelles

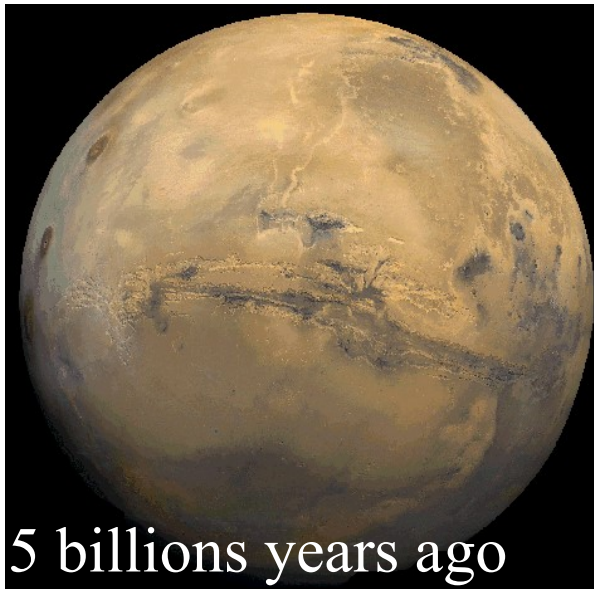




La diversité liée aux « habitats » est très grande



Les micro-organismes sont potentiellement présents partout sur Terre



Life begins around 4 billion years ago



Nous sommes tous des poussières d'étoiles



La diversité liée aux métabolismes est très grande



–Phototrophie

- Photosynthèse oxygénique (cyanobactéries) et photosynthèse anoxygénique (bactéries vertes et pourpres)

–Chimiotrophie

- Utilisation de composés chimiques comme source d'énergie.

Chimiolithotrophes (ex: *Thiobacillus ferrooxydens*), Chimioorganotrophes (la grande majorité)

Types énergétiques variés: aérobie stricte, aéro-anaérobie facultative, micro-aérophile, anaérobie stricte.

Types trophiques de température variés: hypertermophile, thermophile, mesophile, psychrophile, psychrotrophe.



Stromatolites



Lac envahi de Chromatiaceae

La diversité génétique est très grande



Différences héréditaires de composition en gènes entre organismes (Séquences ADN).

Si on considère:

- 1: diversité morphologique
- 2: diversité métabolique/physiologique
- 3: diversité génétique

1 et 2 sont le reflet de différences génotypiques, mais peuvent aussi être le résultat de différences de pattern d'expression génique = phénotype

A se rappeler: Les différences génotypiques ne traduisent pas forcément par des différences phénotypiques (ex: mutations muettes, différences non mesurables)

De même, les différences phénotypiques ne sont pas forcément dues à des différences génotypiques.



La diversité liée aux interactions est très grande

Quelques définitions:

Population: ensemble d'organismes possédant les mêmes caractéristiques et provenant d'une même origine.

Communauté: tous les organismes qui occupent un même site, les interactions entre ces organismes maintiennent le fonctionnement de la communauté.

Consortium: Association de plusieurs organismes ayant une fonction commune.

Les facteurs abiotiques (O_2 , pH, salinity, light, H_2O , temperature, nutrients, etc.) déterminent quelles populations peuvent coexister dans une communauté.

Les interactions biologiques déterminent la composition d'une communauté. Les communautés ont tendance à être stables et à résister à l'introduction de nouvelles espèces.



Le principe d'Allee– des interactions positives et négatives s'opèrent au sein d'une population et sont dépendantes de la densité.

- Coopération (interactions positives) généralement au sein d'une communauté de faible densité.
- Compétition (interactions négatives) généralement au sein d'une communauté de haute densité.

Compétition directe pour la nourriture

Compétition pour divers substrats

Accumulation de toxines

Avantages des populations denses:

- Partage des enzymes extracellulaires.
- Protection contre les facteurs environnementaux - inhibiteurs métaboliques, UV, etc..
- Échanges génétique favorisés.



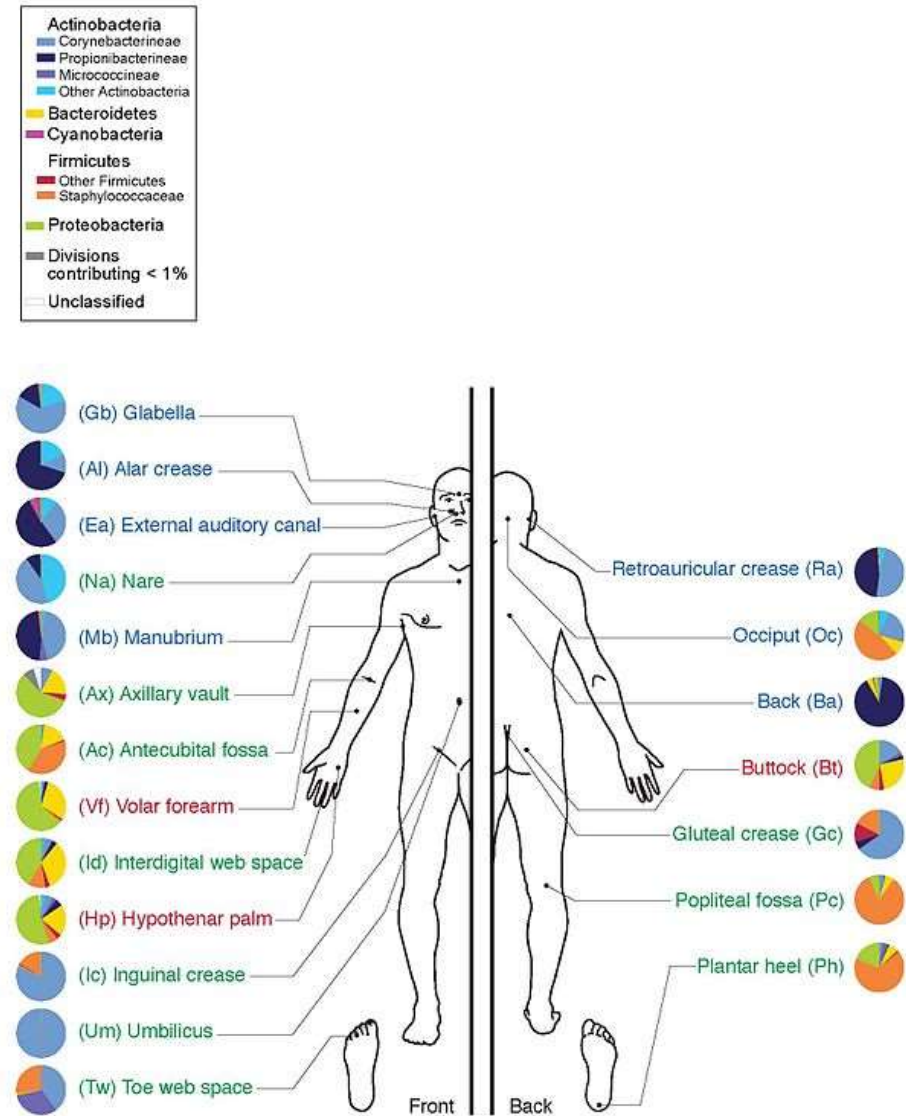
Différentes Classes d'Interactions

- Interactions :
 - Négatives - compétition, amensalisme
 - Positives - commensalisme, synergisme, mutualisme
 - Positives pour un organisme, Negatives pour un autre - parasitisme, prédation
- Coopération peut permettre l'exploitation d'un habitat non accessible à une espèce seule.



Neutralisme - Commensalisme

- Neutralisme - pas d'interactions, rare sans séparations physique ou temporelle
- Commensalisme - association entre des individus d'espèces différentes dans laquelle ils partagent de la nourriture et vivent ensemble, et où un des partenaires tire un bénéfice sans que cela nuise à l'autre.
- Ex: consommation d'oxygène peut être bénéfique aux organismes anaérobies. Sécrétion d'enzymes extracellulaires, de vitamines ou de facteur de croissance peuvent être bénéfiques à d'autres organismes.
- Microbiotes humains





Synergie – les deux espèces tirent un avantage, mais l'interaction n'est pas obligatoire.

- *Ex -Streptococcus faecalis* a besoin d'acide folique, mais produit de la phenylalanine.
- *Lactobacillus arabinosus* a besoin de phenylalanine, mais produit de l'acide folique.

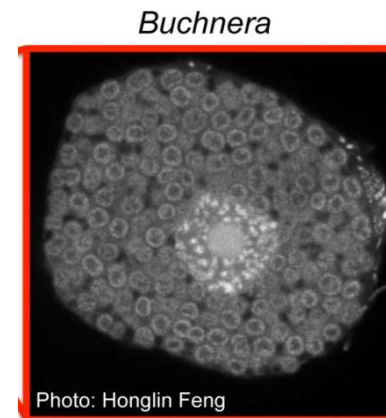
Syntrophie - interactions nécessaires entre 2 ou plusieurs populations pour des besoins nutritifs.

- Ex: Dans les sols humides, les methanogenes consomment acetate et H₂ produit par les bactéries fermentatives qui autrement atteindraient des concentrations inhibitrices.

Mutualisme ou Symbiose



- Interaction obligatoire entre deux populations bénéfique pour les deux populations dans un environnement donné.
- ex
 - Lichens - association d'algues ou de cyanobactéries & Champignons
 - Protozoaire/algue symbiose: *Chlorella* (algue) vit dans une *Paramecie*, qui assure une protection, une motilité, alors que l'algue fournit l'O₂ et le carbone organique.
 - γ *Proteobacteria* symbiont, δ *Proteobacteria* symbiont sur la peau du ver *Olavius*
 - *Buchnera aphidicola* chez le puceron





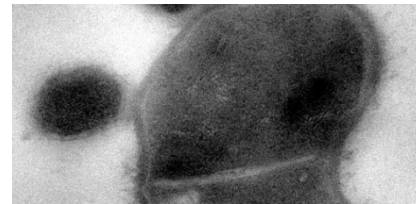
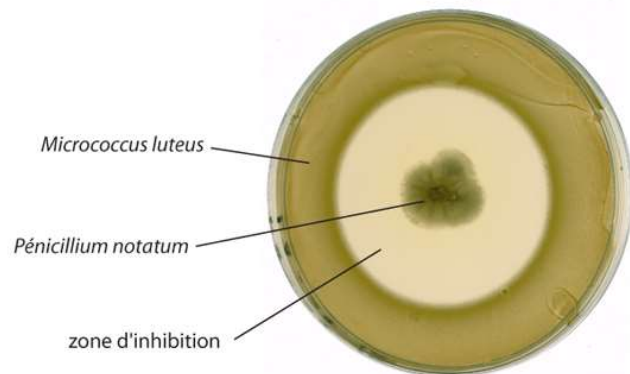
Amensalisme - Parasitisme - Prédation

Amensalisme – une population produit une substance inhibitrice pour les autres populations; production d'acides gras, l'oxydation du soufre qui produit de l'acide sulfurique, production d'ammoniaque, consommation d'oxygène, production d'alcool par des levures, production d'antibiotiques.

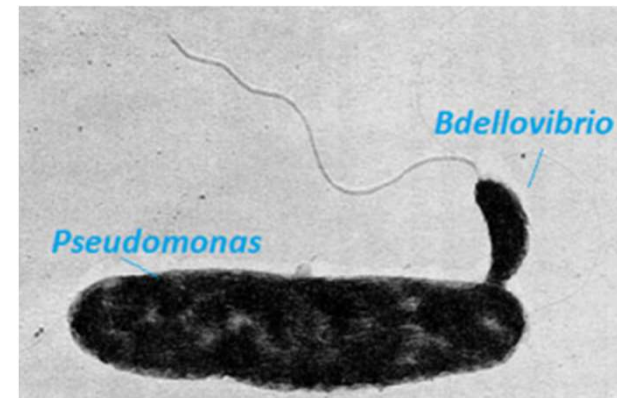
Parasitisme – une espèce a nécessairement besoin d'une autre pour se développer.

Predation -

Production de pénicilline



Une bactérie parasite de *Actinomyces odontolyticus* (flore bucale) découverte en 2016.



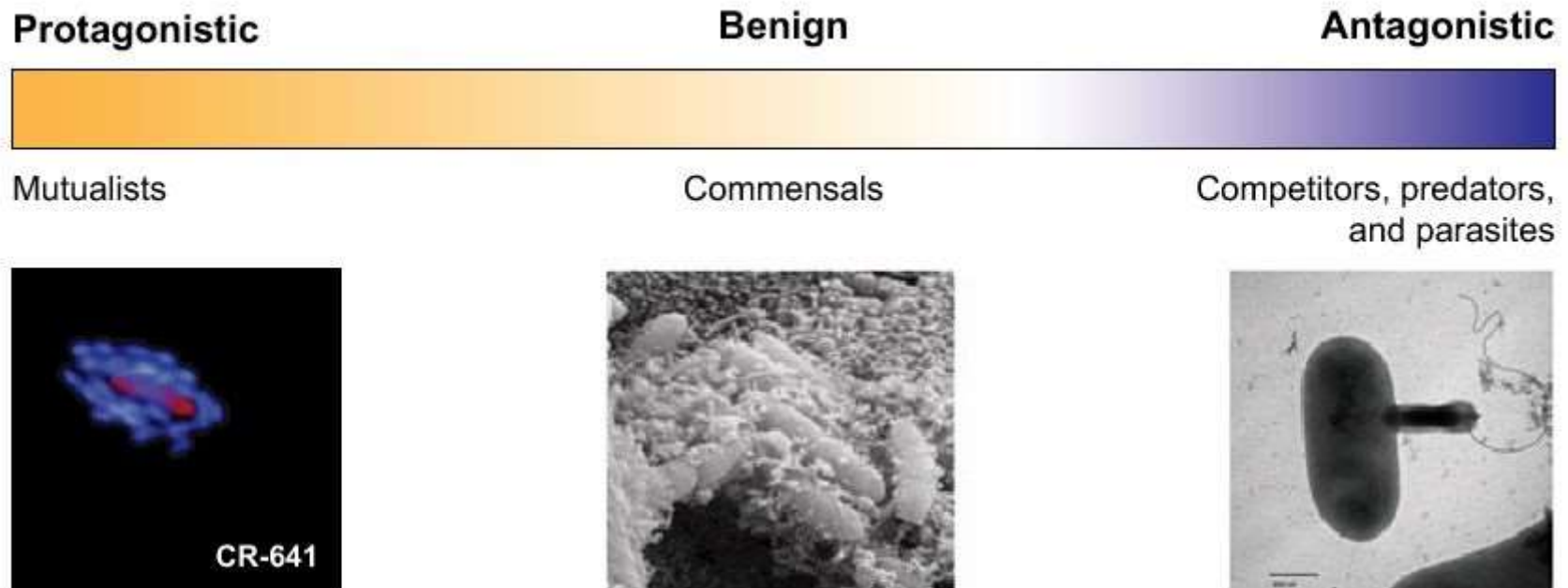


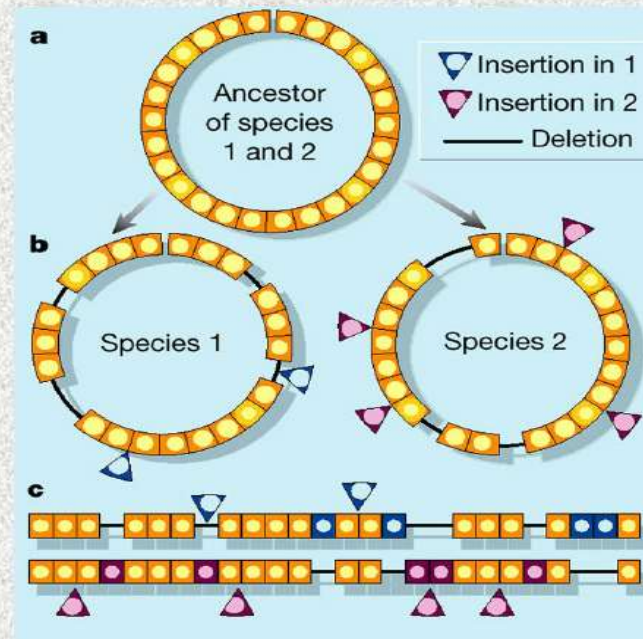
Figure 1

Continuum of interspecific interactions that occur in microbial communities. (*Left*) The beneficial relationships that occur between mutualists such as the phototrophic consortia (shown below) comprising central rod-shaped bacteria in the family *Comamonadaceae* (*red*) and green epibiotic sulfur bacteria (*blue*) (reprinted from Reference 95). Commensal, or benign, relationships are depicted in the middle of the continuum by an electron micrograph of the microbial community of the cabbage white butterfly. (*Right*) Antagonistic relationships are illustrated by an electron micrograph of *Bdellovibrio* attacking *Shewanella oneidensis* (photo credit: Robert Chamberlain, Wayne Rickoll, and Mark Martin).





Evolution des chromosomes bactériens par acquisition - perte de gènes



Les génomes bactériens naturellement présent dans l'environnement contiennent 1 à 10 prophages, de nombreux plasmides (libres, intégrés, cryptiques), des transposons.

Rappelez-vous: (Cf cours précédent) 22% des gènes impliqués dans la formation des FB chez *M. xanthus* ont été acquis par HGT.

Les transferts Horizontaux de gènes:



Three common mechanisms of lateral gene exchange :

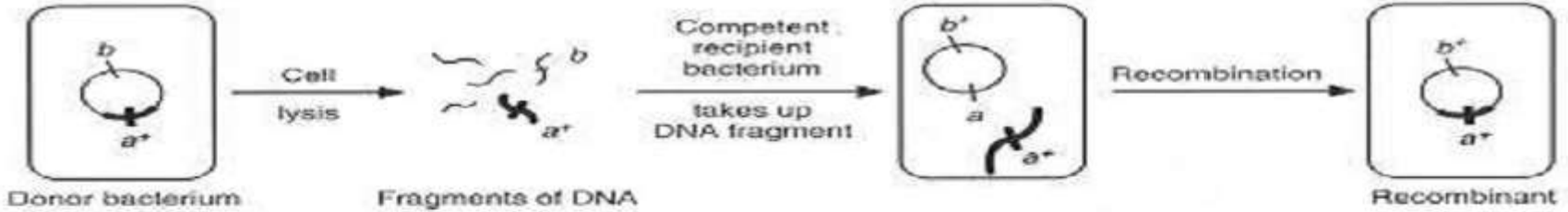
- Transformation (extracellular DNA uptake)
- Conjugation (bacterial mating systems)
- Transduction (viral mediated gene exchange)

Définitions

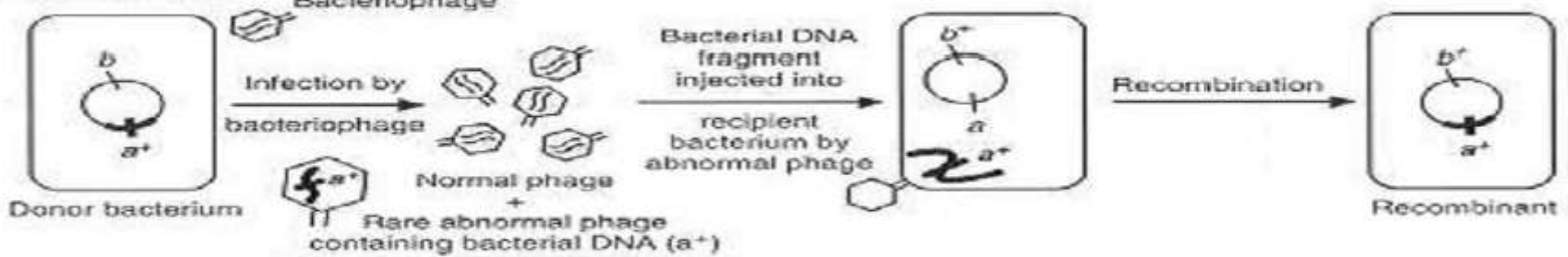
- Transfert vertical :
 - Transmission de l'information génétique de la génération parentale à la progéniture.
- Transfert horizontal (ou latéral) :
 - Passage de séquences d'un génome à un autre.
 - Mise en jeu de mécanismes comme la transformation, la transduction et la conjugaison.
 - Intégration par recombinaison.

Les transferts Horizontaux de gènes:

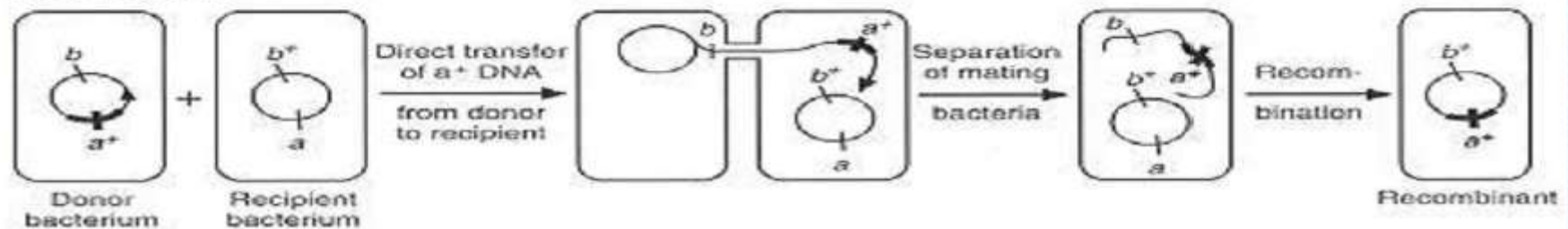
A. Transformation



B. Transduction



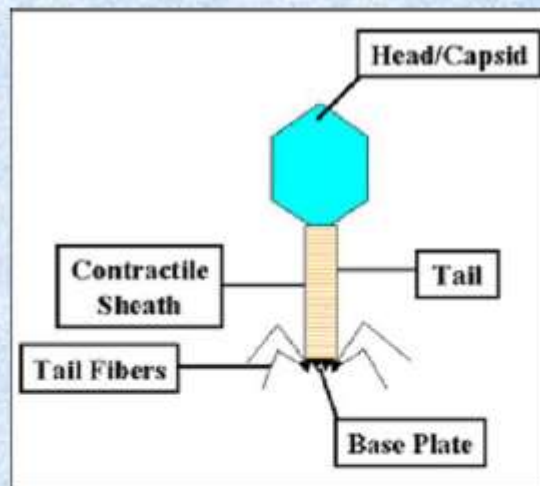
C. Conjugation



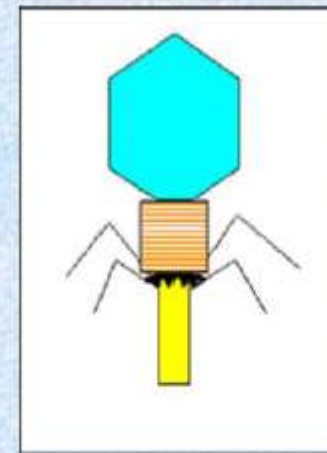
La transduction:



- Genetic recombination in which a DNA fragment is transferred from one bacterium to another by a bacteriophage



Structure of T4 bacteriophage



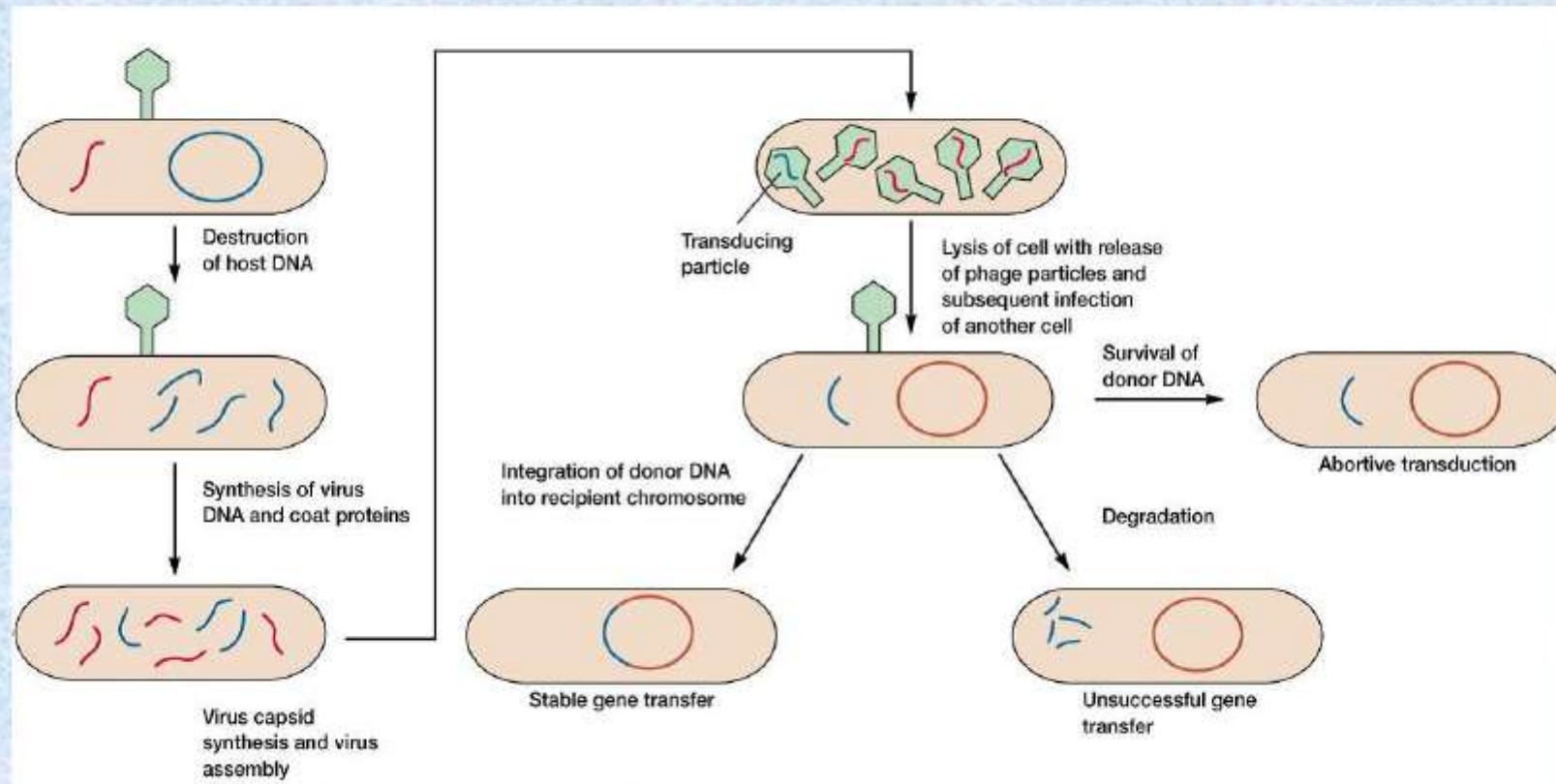
Contraction of the tail sheath of T4



- There are two types of transduction:
 - **generalized transduction:** A DNA fragment is transferred from one bacterium to another by a lytic bacteriophage that is now carrying donor bacterial DNA due to an error in maturation during the lytic life cycle.
 - **specialized transduction:** A DNA fragment is transferred from one bacterium to another by a temperate bacteriophage that is now carrying donor bacterial DNA due to an error in spontaneous induction during the lysogenic life cycle.

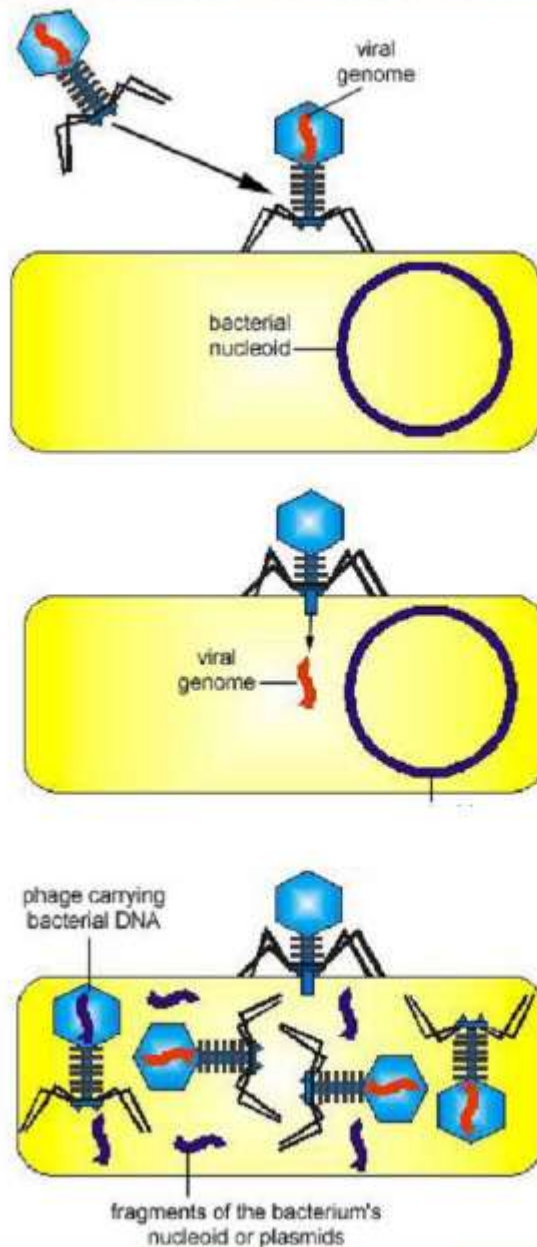


Generalized transduction





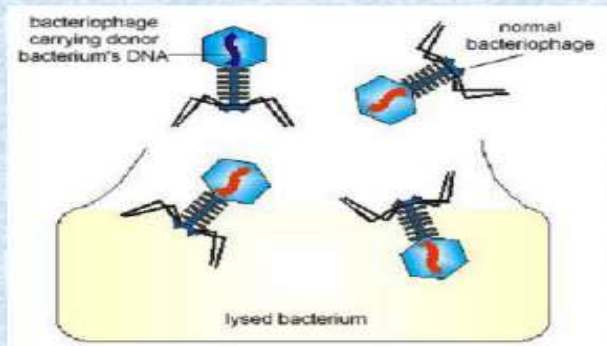
Seven steps in Generalised Transduction



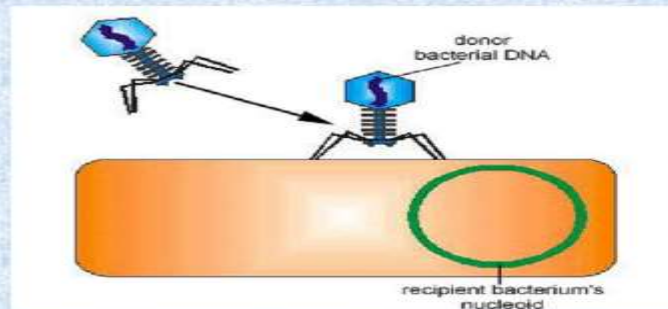
1. A bacteriophage adsorbs to a susceptible bacterium.

2. The bacteriophage genome enters the bacterium. The genome directs the bacterium's metabolic machinery to manufacture bacteriophage components and enzymes

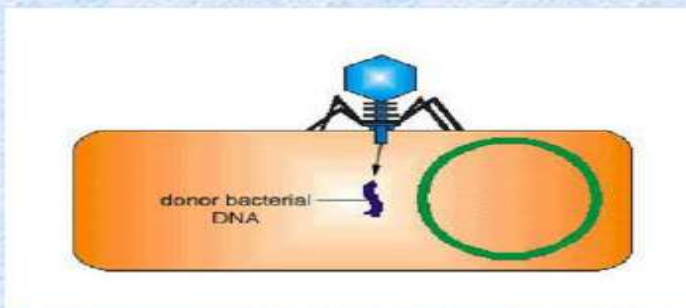
3. Occasionally, a bacteriophage head or capsid assembles around a fragment of donor bacterium's nucleoid or around a plasmid instead of a phage genome by mistake.



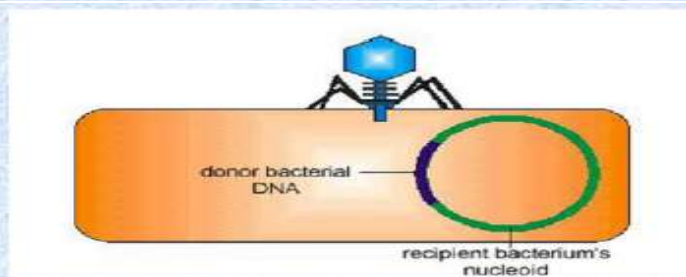
4. The bacteriophages are released.



5. The bacteriophage carrying the donor bacterium's DNA adsorbs to a recipient bacterium



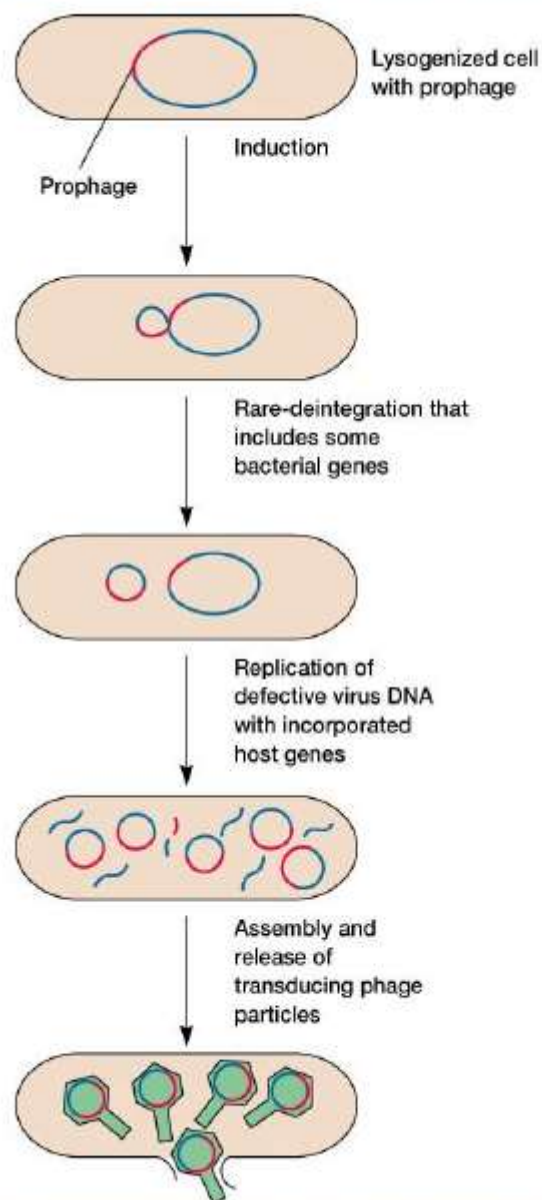
6. The bacteriophage inserts the donor bacterium's DNA it is carrying into the recipient bacterium .

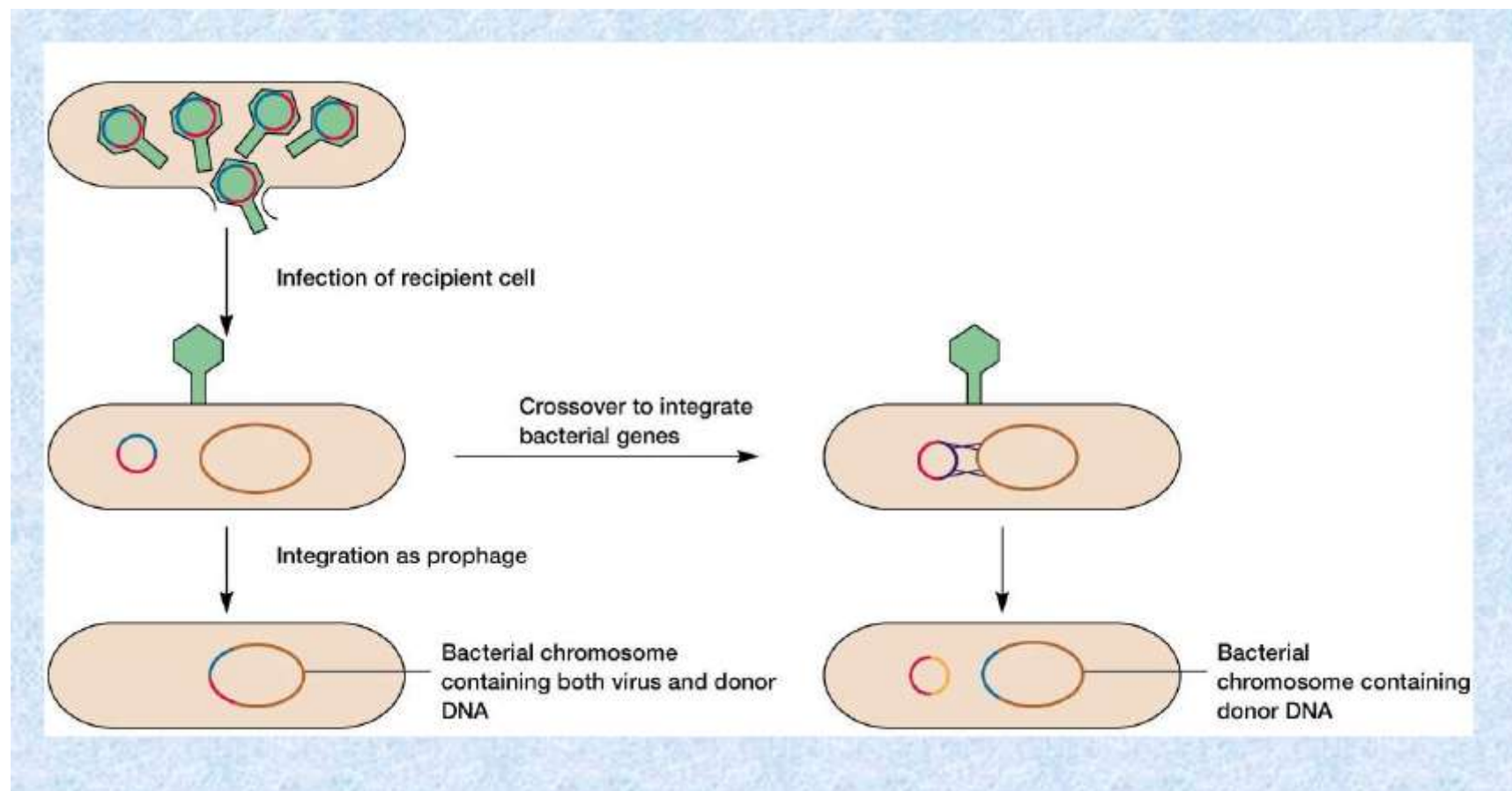


7. The donor bacterium's DNA is exchanged for some of the recipient's DNA.



Specialized transduction







La transformation

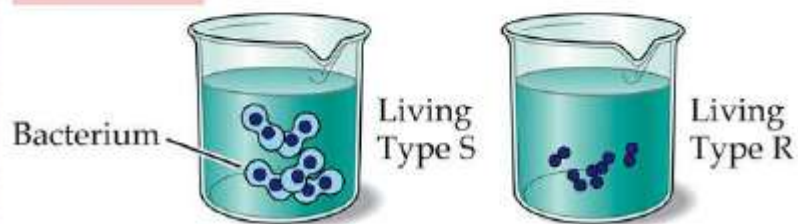
- Genetic recombination in which a DNA fragment from a (dead, degraded) bacterium enters a competent recipient bacterium and is exchanged for a piece of the recipient's DNA.



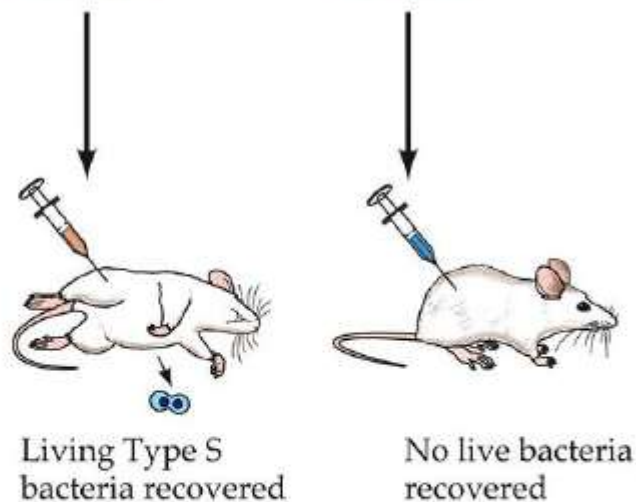
Demonstration of transformation

(A)

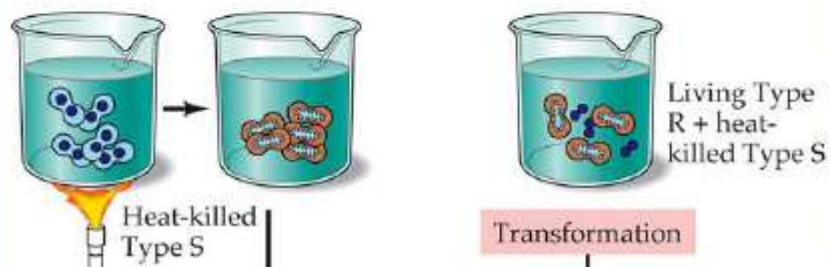
Treatments



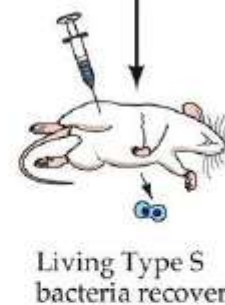
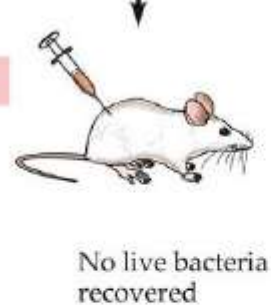
Results



Treatments



Results



Type R has been transformed to Type S.

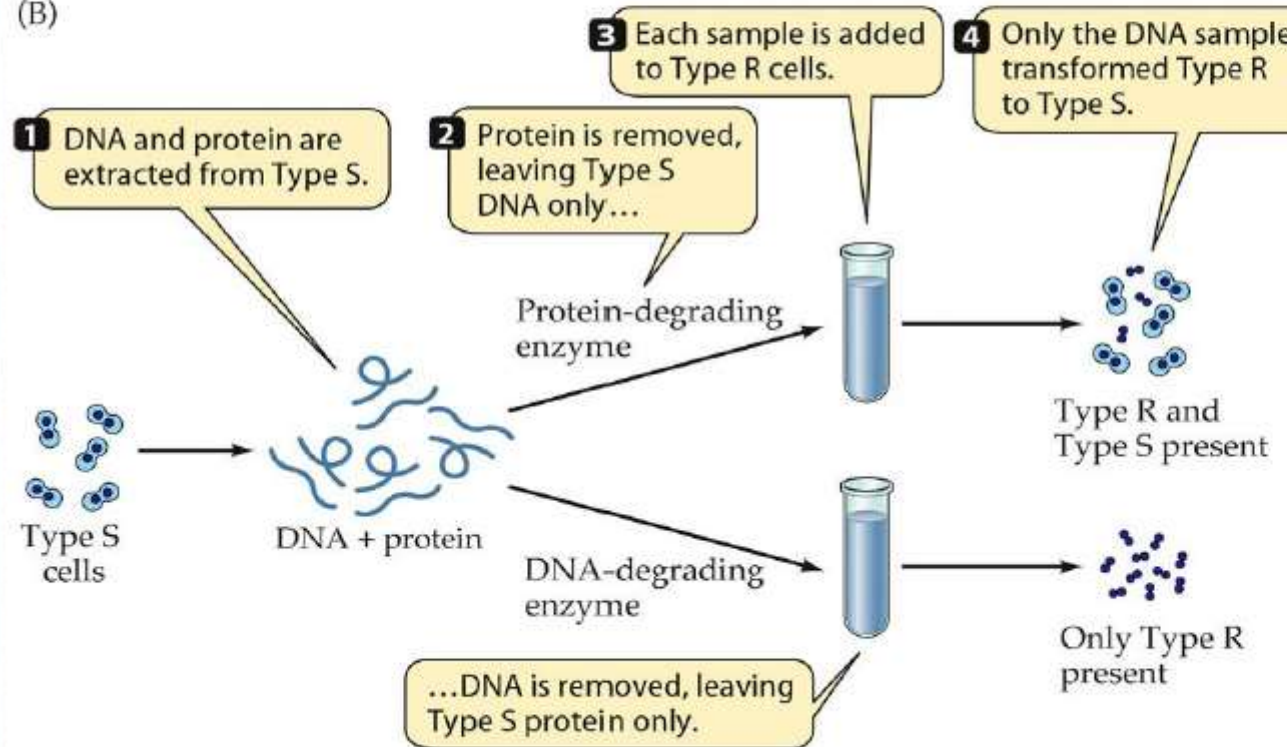


Demonstration of transformation

Transformation of avirulent *Streptococcus pneumoniae* to a virulent type.

Avery, MacLeod and McCarty 1944

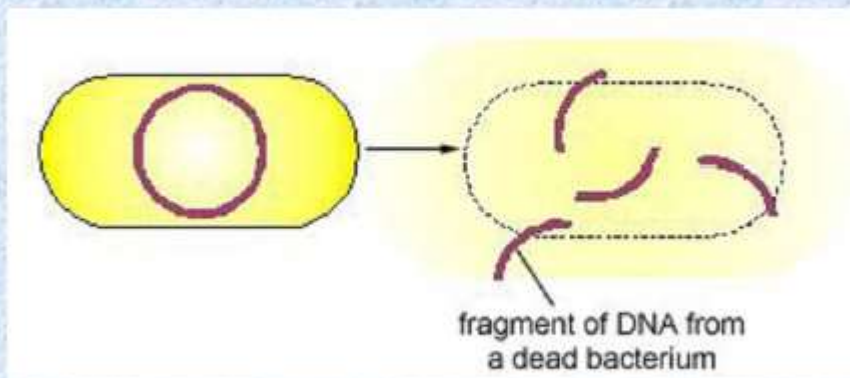
(B)



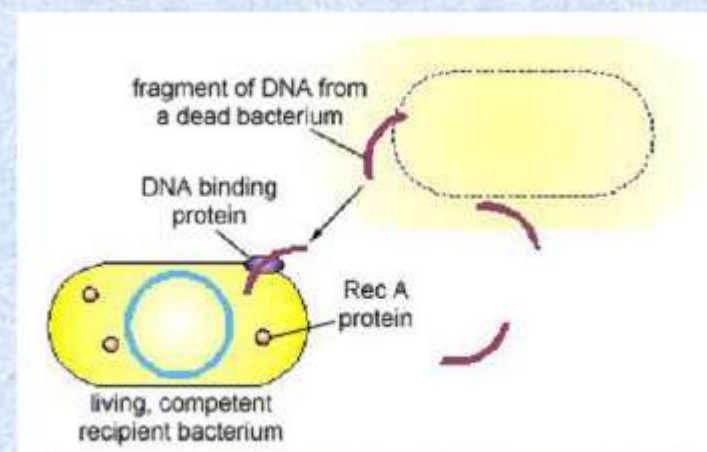
Demonstration that the transforming factor is DNA.



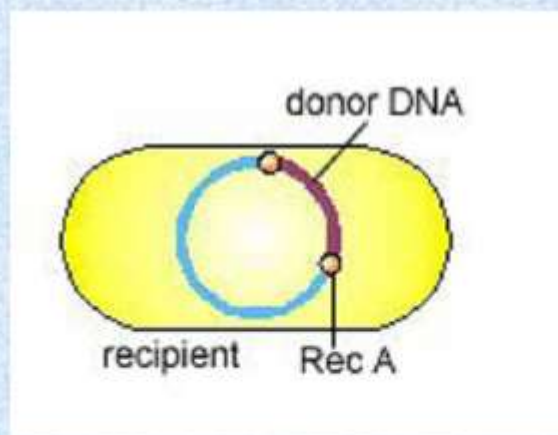
The 4 steps in Transformation



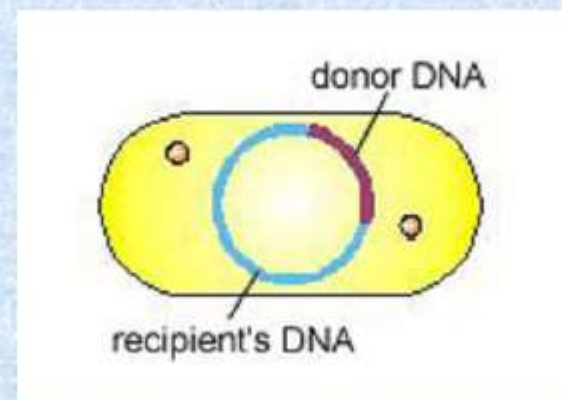
1. A donor bacterium dies and is degraded



2. A fragment of DNA from the dead donor bacterium binds to DNA binding proteins on the cell wall of a competent, living recipient bacterium



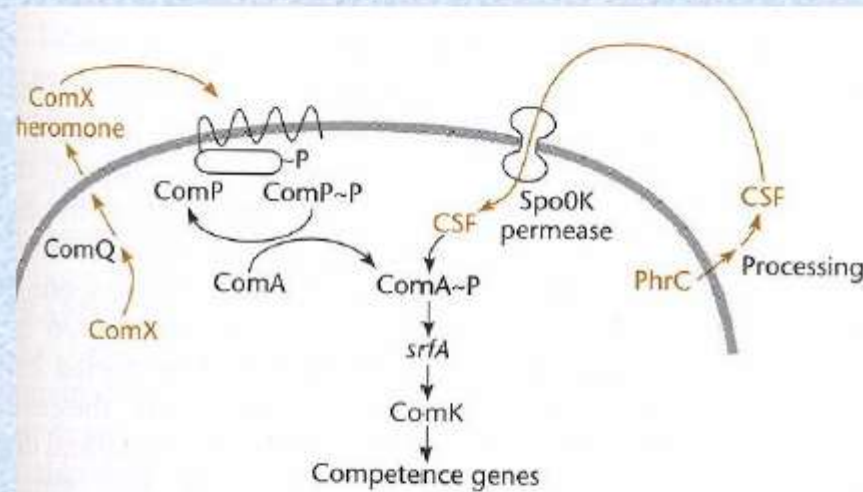
3. The Rec A protein promotes genetic exchange between a fragment of the donor's DNA and the recipient's DNA



4. Exchange is complete

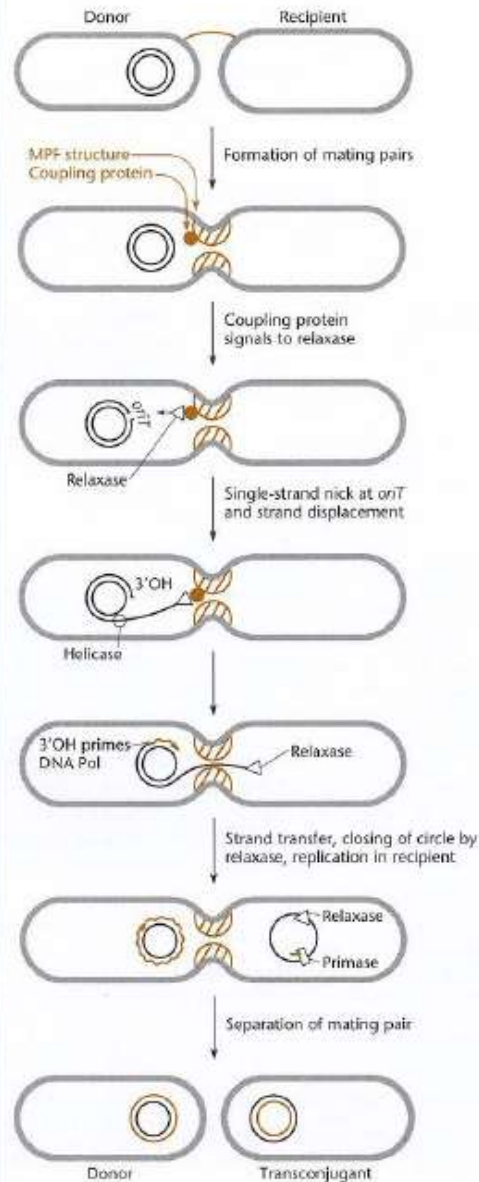


Transformation



Regulation of competence development in *Bacillus subtilis*. The ComP protein in the membrane senses high cell density and is phosphorylated. The phosphate is then transferred to ComA, which allows transcription of competence genes. The ComA protein phosphorylation involves two competence pheromone peptides (shown in gold), one of which is imported by an oligopeptide permease, the product of the *spo0K* gene. CSF, competence-stimulating factor.

La conjugaison

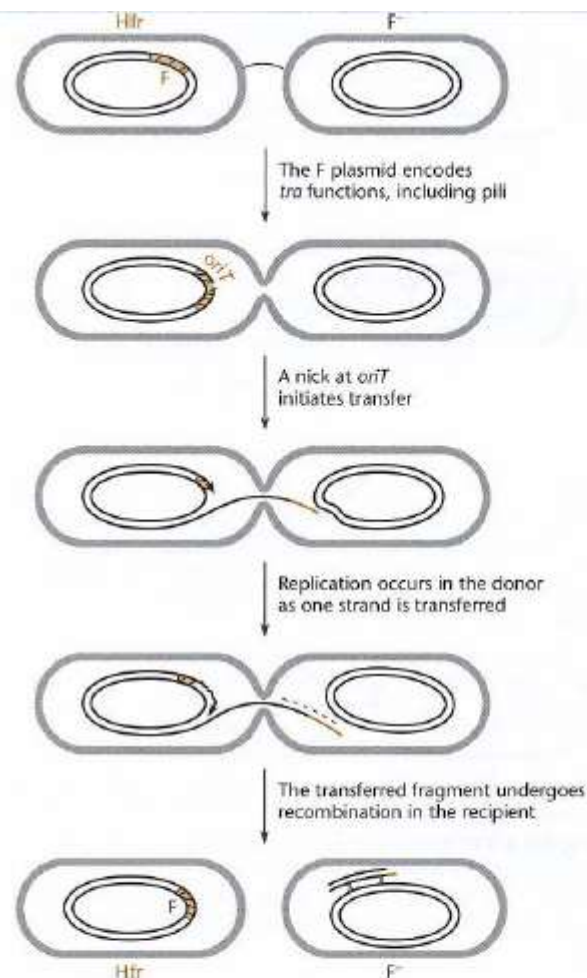


Conjugation

Mechanism of DNA transfer during conjugation showing the mating-pair formation (Mpf functions) in gold. The donor cell produces a pilus which forms on the cell surface and which may contact a potential recipient cell and bring it into close contact or may help hold the cells in close proximity after contact has been made, depending on the type of pilus. A pore then forms in the adjoining cell membranes. Upon receiving a signal from the coupling protein that contact with a recipient has been made, the relaxase protein makes a single-stranded cut at the *oriT* site in the plasmid. A plasmid-encoded helicase then separates the strands of the plasmid DNA. The relaxase protein, which has remained attached to the 5' end of the single-stranded DNA, is then transported out of the donor cell through the channel directly into the recipient cell, dragging the single-stranded attached DNA along with it. Once in the recipient, the relaxase protein helps recycle the single-stranded DNA. A primase, either that of the host or plasmid encoded and injected with the DNA, then primes replication of the complementary strand to make the double-stranded circular plasmid DNA in the recipient. The 3' end at the nick made by the relaxase in the donor can also serve as a primer, making a complementary copy of the single-stranded plasmid DNA remaining in the donor. Therefore, after transfer, both the donor and the recipient bacterium end up with a double-stranded circular copy of the plasmid.



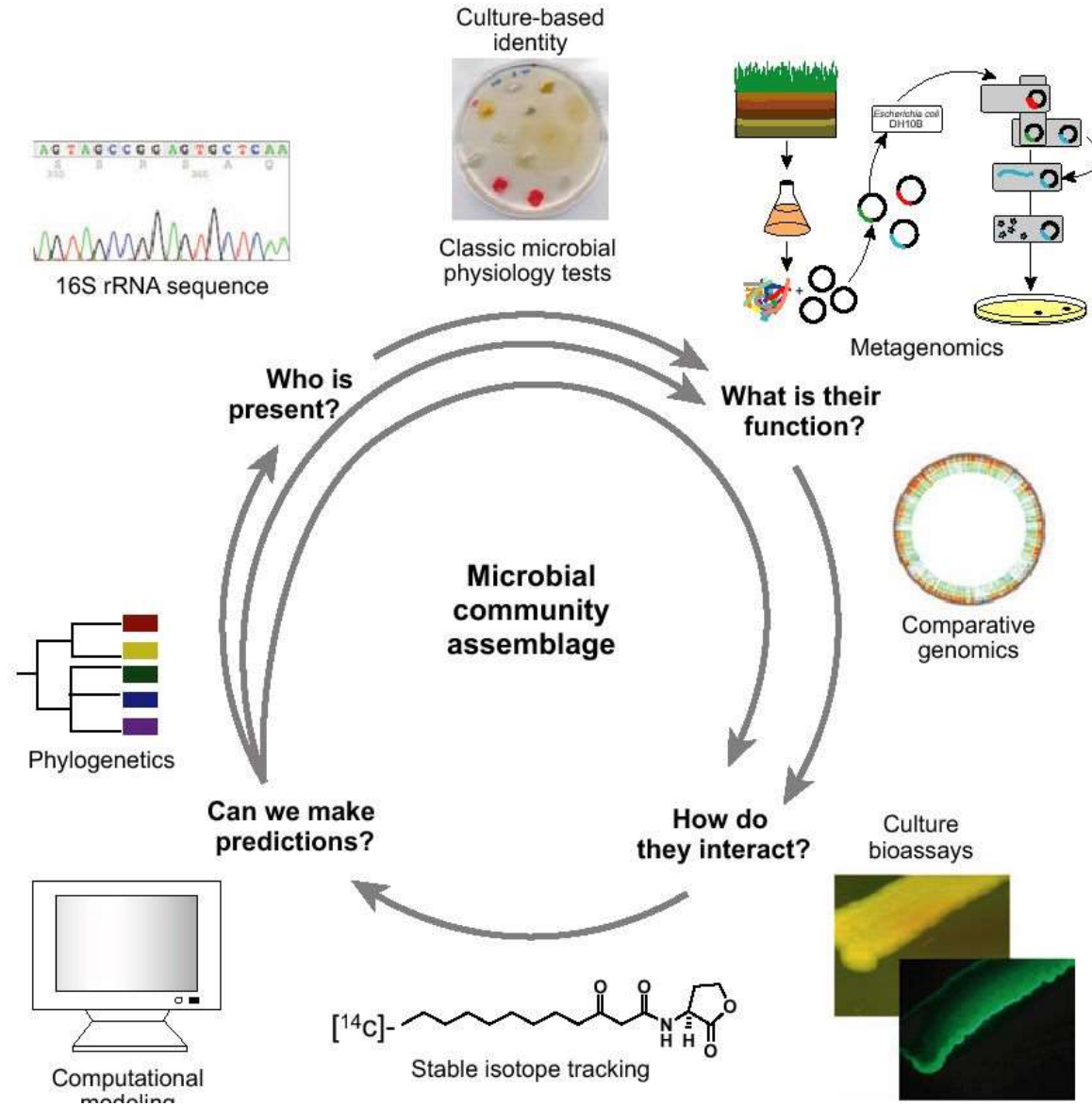
Conjugation



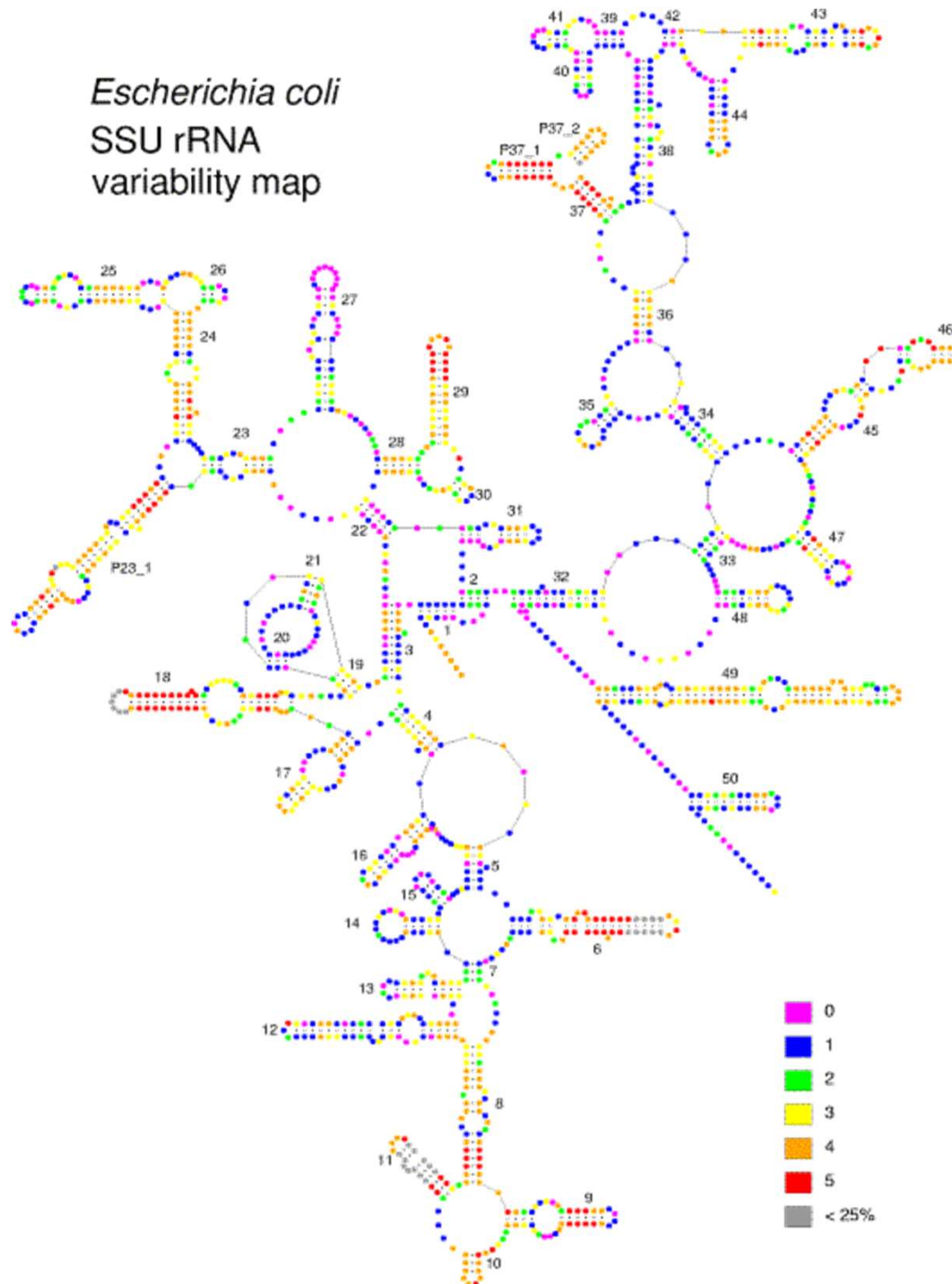
Transfer of chromosomal DNA by an integrated plasmid. Formation of mating pairs, nicking of the F *oriT* sequence, and transfer of the 5' end of a single strand of F DNA proceed as in transfer of the F plasmid. Transfer of the covalently linked chromosomal DNA will also occur as long as the mating pair is stable. Complete chromosome transfer rarely occurs, and so the recipient cell remains F⁻, even after mating. Replication in the donor usually accompanies DNA transfer. Some replication of the transferred single strand may also occur. Once in the recipient cell, the transferred DNA may recombine with homologous sequences in the recipient chromosome.



Les outils d'études



Escherichia coli
SSU rRNA
variability map





Les outils d'études

Pourquoi l'ADNr 16S est si utile et si utilisé?

1. Trouvé dans la plupart des microorganismes, même certains eukaryotes (mitochondries et chloroplastes possèdent un ARNr 16S similaire à celui des alpha-proteobacteries et des cyanobacteries.)
2. Certaines régions sont variables entre organismes, d'autres sont conservées.

Certaines régions sont spécifiques à certains niveaux phylogénétiques.



A à J: Régions conservées; V1 à V9: régions variables. Données issues du gène de l'ARN 16S de *E.coli*.

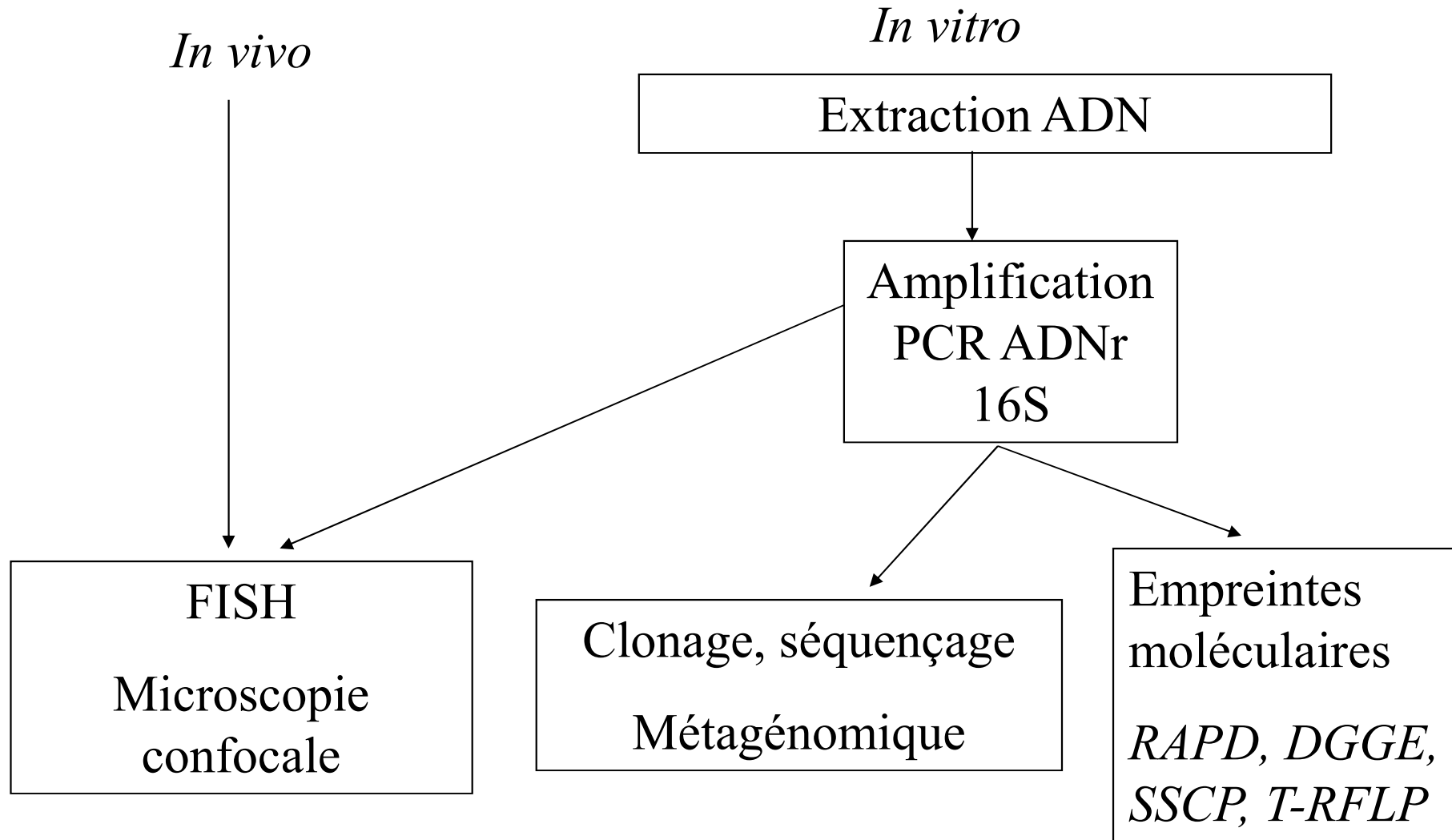


Alignment of a highly conserved region of the 16S/18S rRNA

```
Homo sapiens           ...GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAG...
S. cereviceae        ..GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAG...
Zea maize           ...GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAG...
Escherichia coli    ...GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCG...
Anacystis nidulans  ...GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGAGGCCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCG...
Thermotoga maritima ...GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTACCCGGAATTACTGGGCGTAAAGGG...
Methanococcus vannielii ...GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACCGACGGCCCGAGTGGTAGCCACTCTTATTGGGCCTAAAGCG...
Thermococcus celer  ...GTGGCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCGGCCCGAGTGGTGGCCGCATTATTGGGCCTAAAGCG...
Sulfolobus sulfotaricus ...GTGTCAGCCGCCGCGGTAATACCAGCTCCGCGAGTGGTCGGGGTGATTACTGGGCCTAAAGCG...
```



Les outils d'études





Outils pour la biodiversité

PCR:

Amorce universelle: amorces complémentaires des régions conservées

-> amplification de tous les ADN bactériens

PCR spécifique : amorces complémentaires des régions divergentes

-> amplification spécifiques par exemple au niveau de l'espèce ou du genre.

Variantes PCR

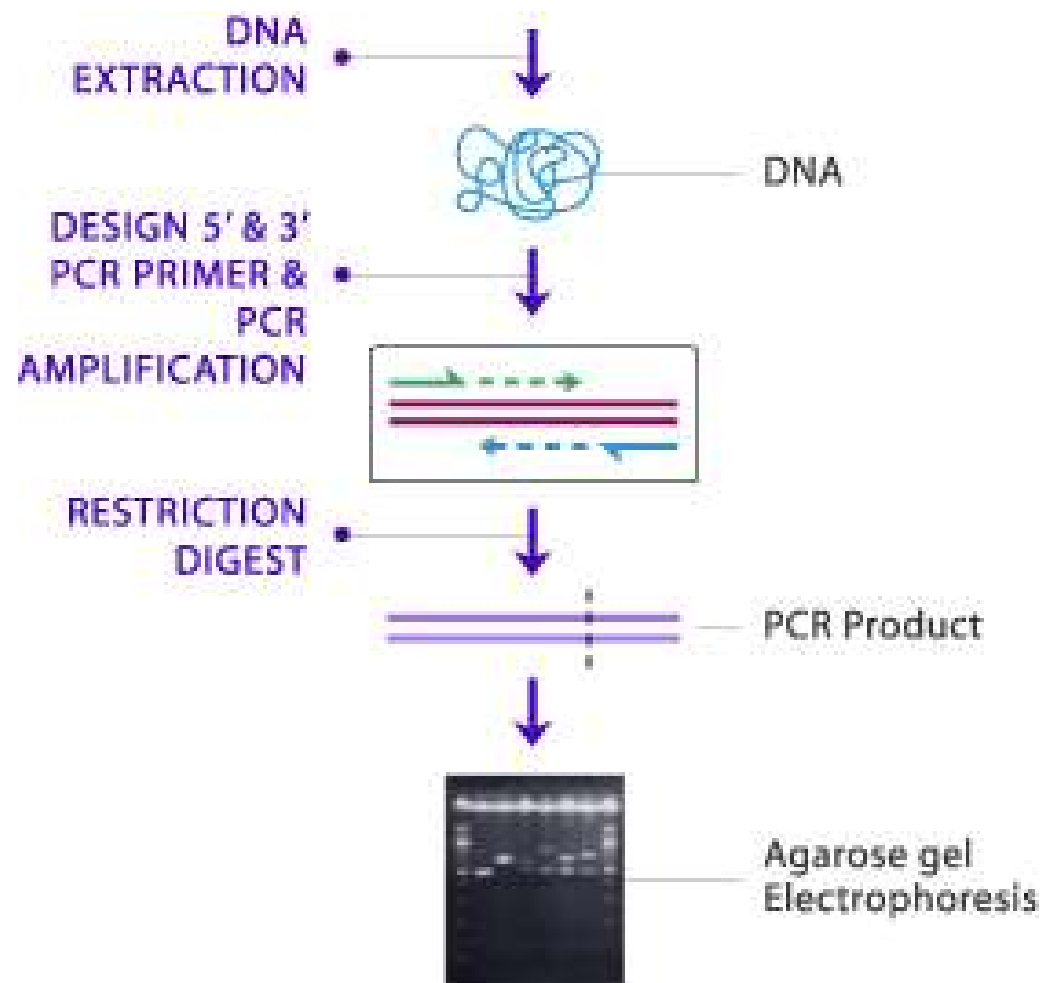
Nested PCR (PCR nichée)

La PCR multiplexe (amplification simultanée de plusieurs séquences cibles)

RT-PCR

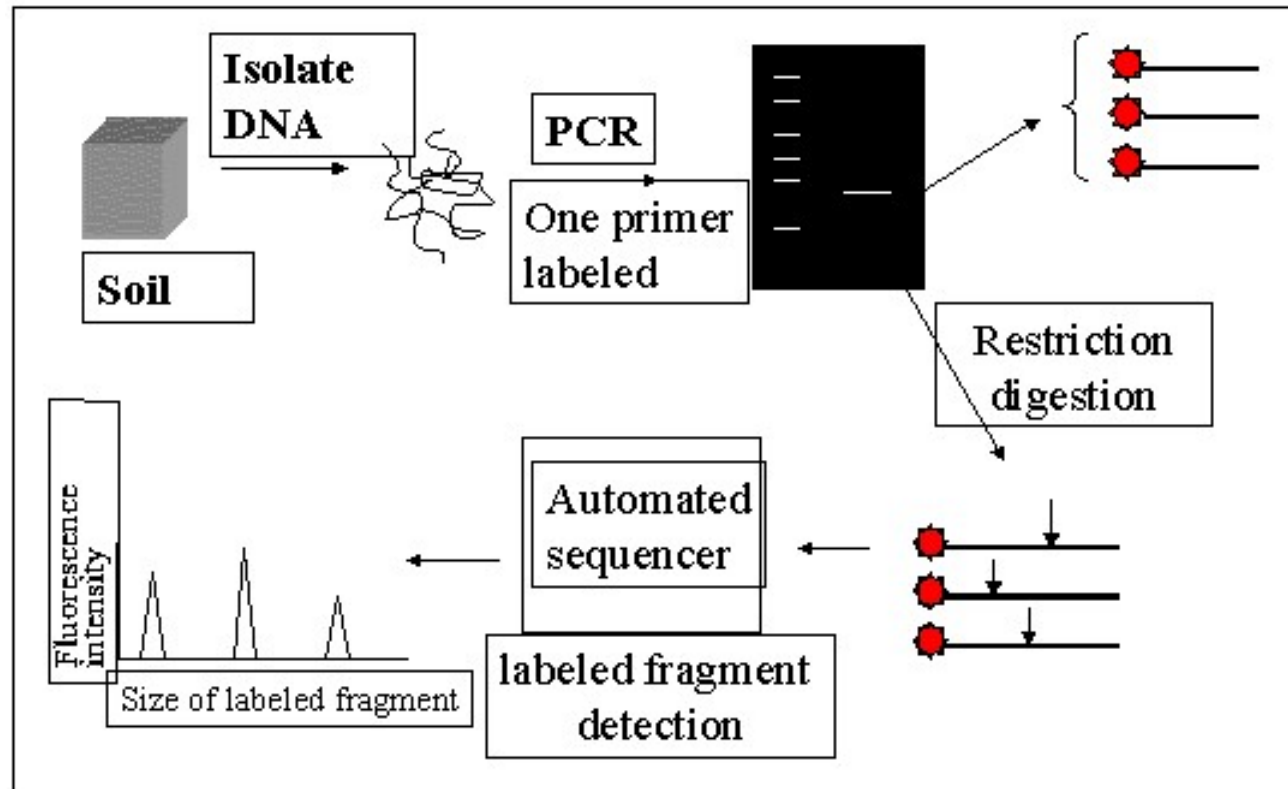


Outils pour la biodiversité: PCR-RFLP



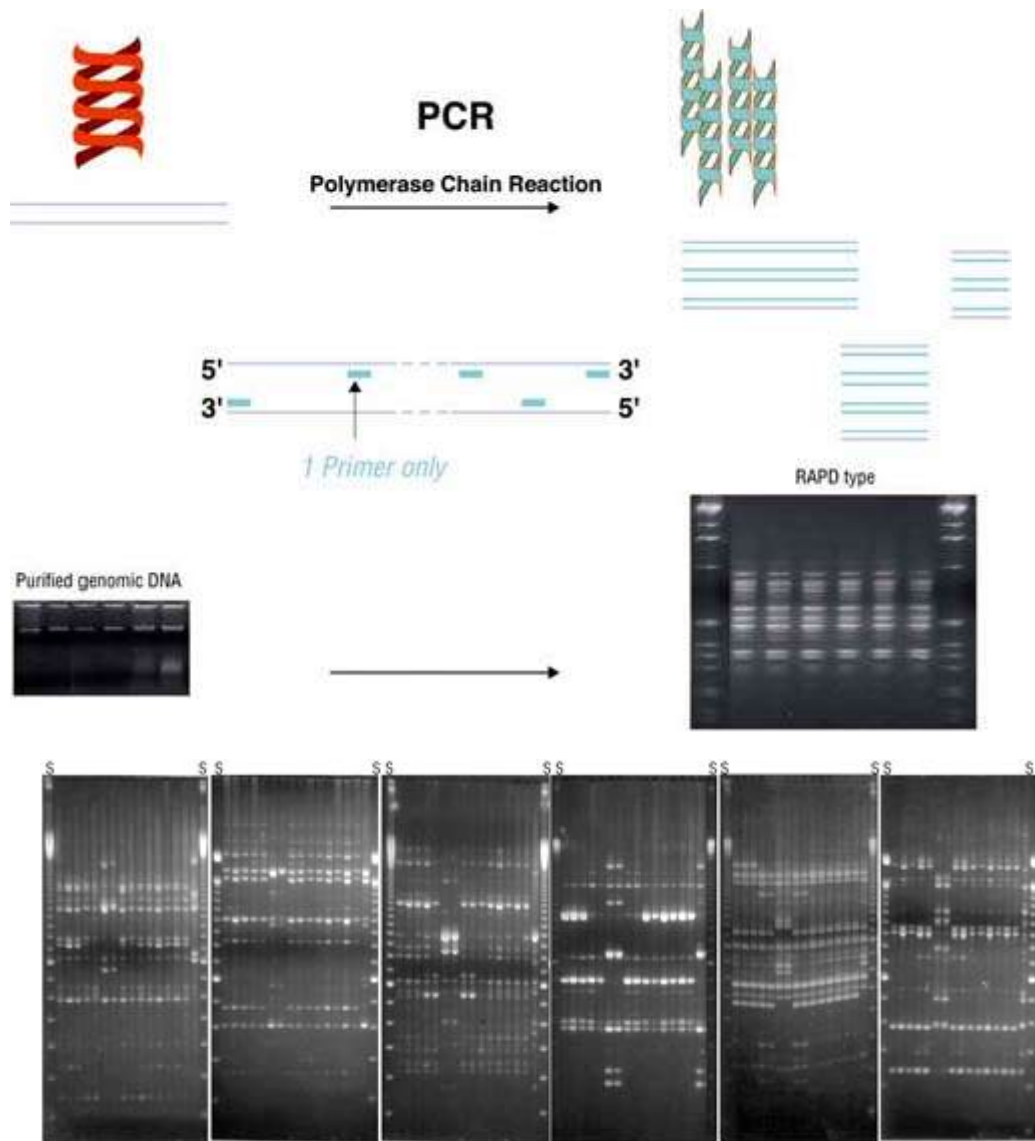


La T-(terminal) RFLP





Outils pour la biodiversité: PCR-RAPD



Example of RAPD-typing of *L. monocytogenes* isolates



Outils pour la biodiversité

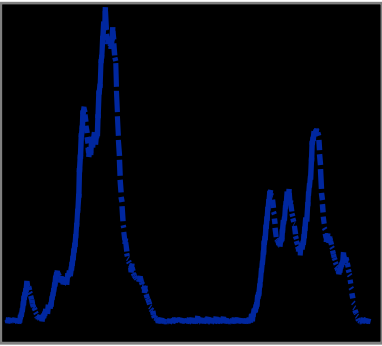
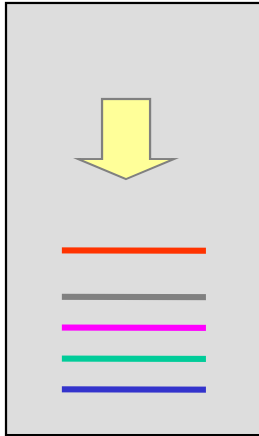
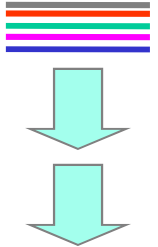
SSCP

ADNr 16S totaux
doubles brins

Dénaturation

Electrophorèse non dénaturante
sur séquenceur automatique

Séparation des fragments
simples brins de même taille en
fonction de leur conformation

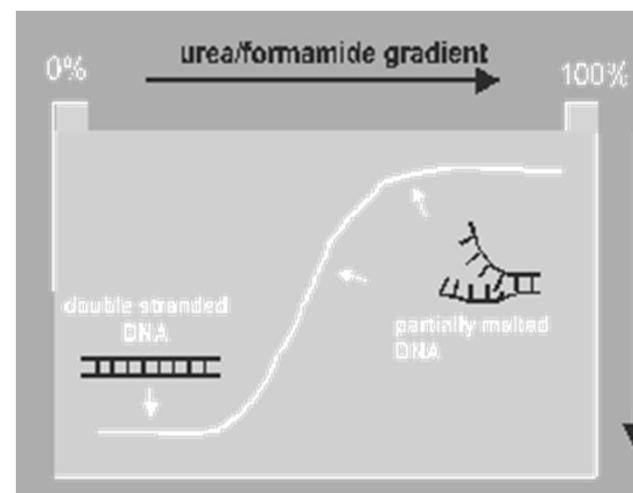
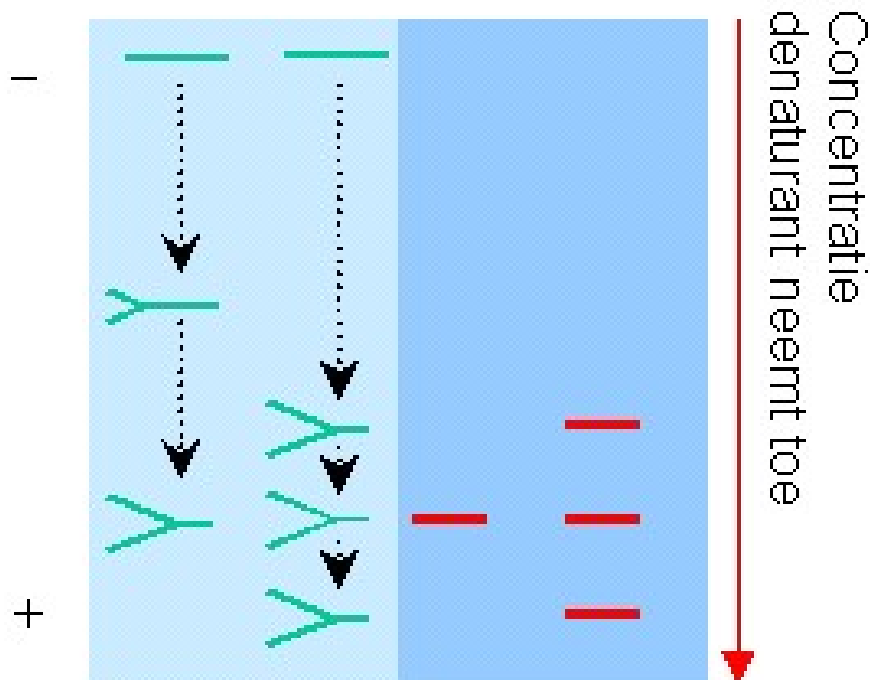




DGGE, TTGE

Tijdens DGGE proces:

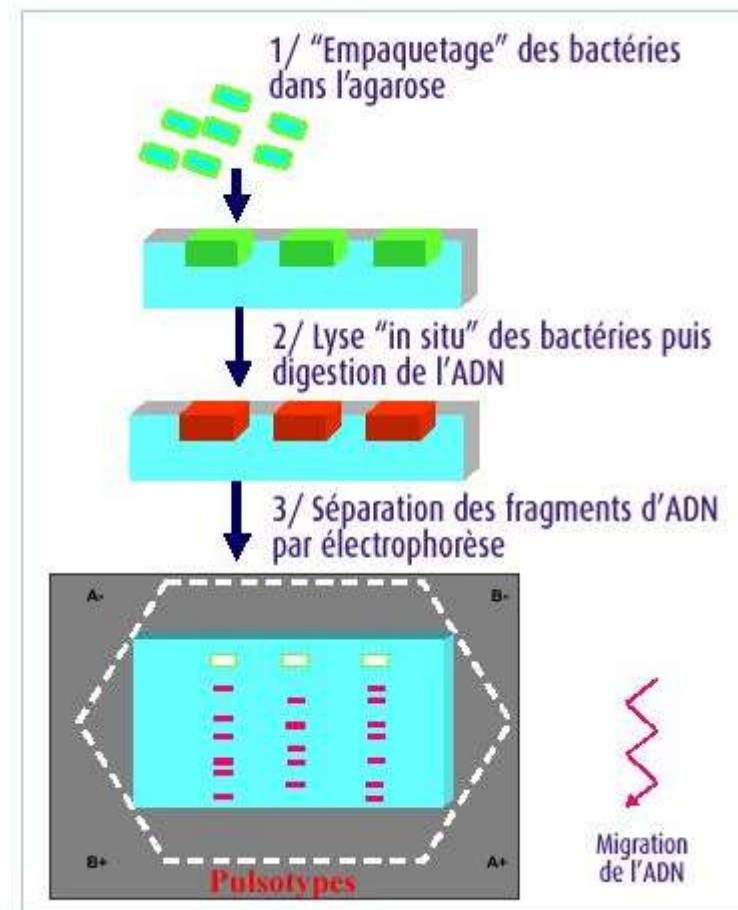
Resultaat na kleuring:





Outils pour la biodiversité

L'Electrophorèse en Champ Pulsé (ECP) ou "Pulsed Field Gel Electrophoresis" (PFGE) est, tout comme le ribotypage, une technique basée sur l'analyse de l'ADN bactérien qui permet d'associer à chaque souche son empreinte génétique caractéristique, appelée dans ce cas PULSOTYPE. Méthode de référence utilisée en bactériologie clinique, l'ECP est une technique manuelle, longue et délicate à mettre en œuvre, nécessitant un personnel technique hautement qualifié.



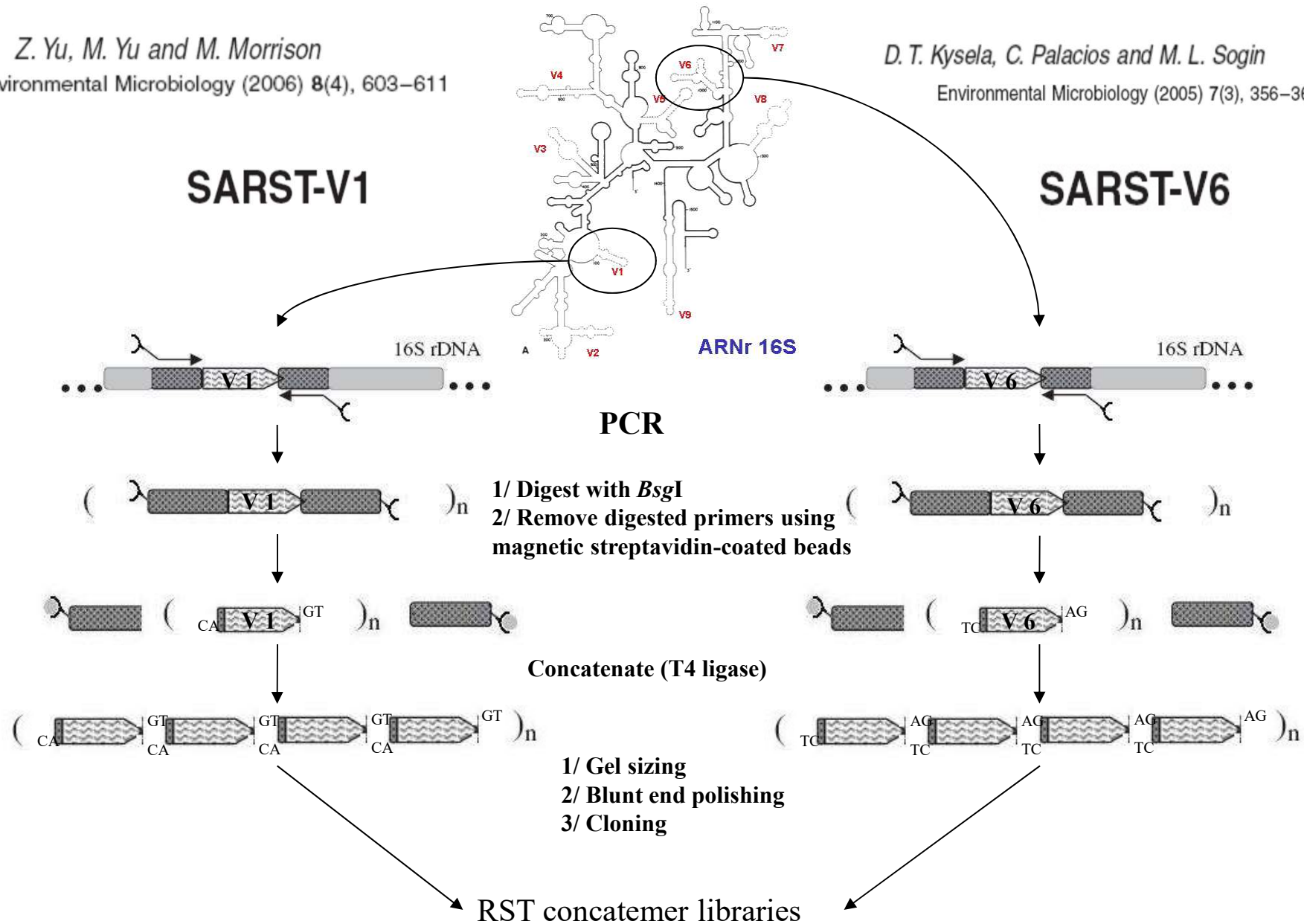
Overview of the Serial Analysis Ribosomal Sequence Tags (SARST)

Z. Yu, M. Yu and M. Morrison

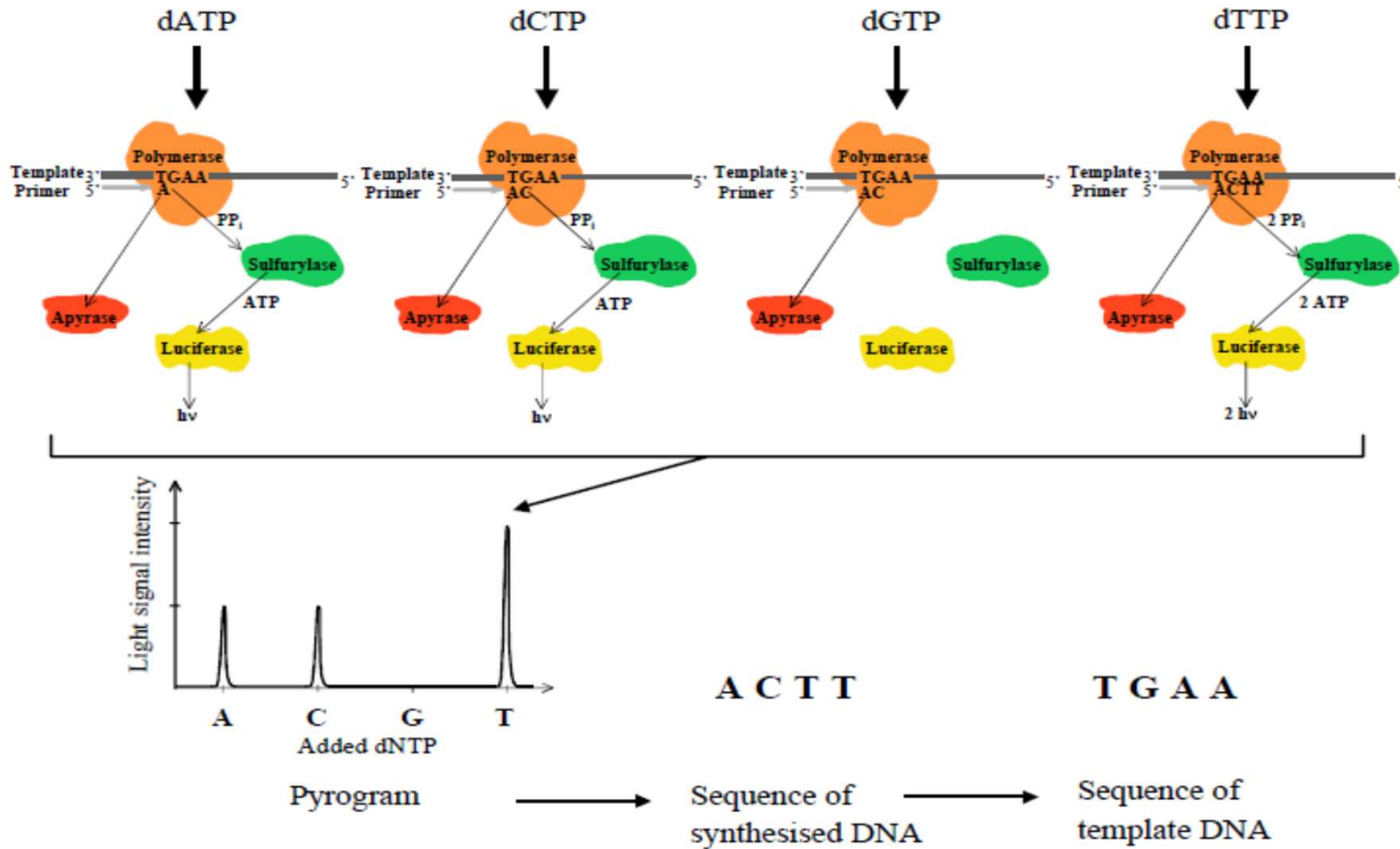
Environmental Microbiology (2006) 8(4), 603–611

D. T. Kysela, C. Palacios and M. L. Sogin

Environmental Microbiology (2005) 7(3), 356–364

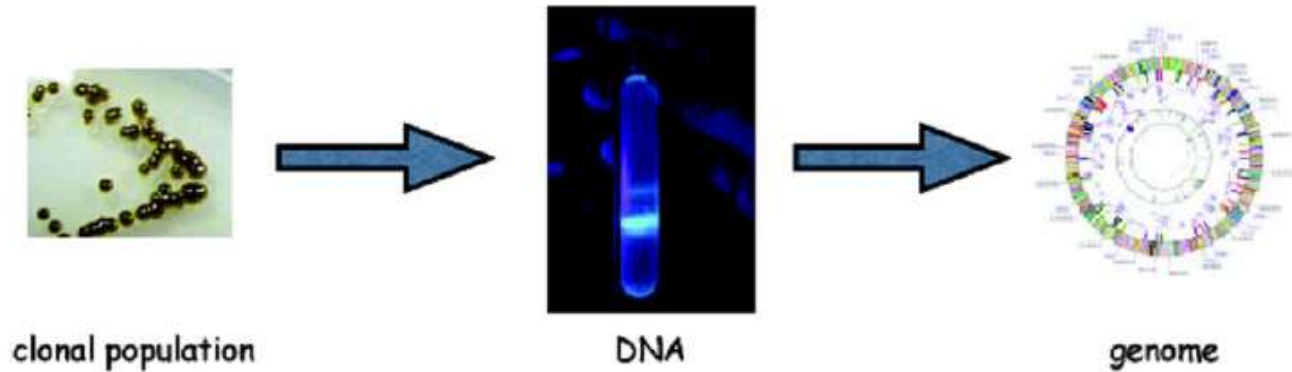


Outils pour la biodiversité: le pyroséquençage

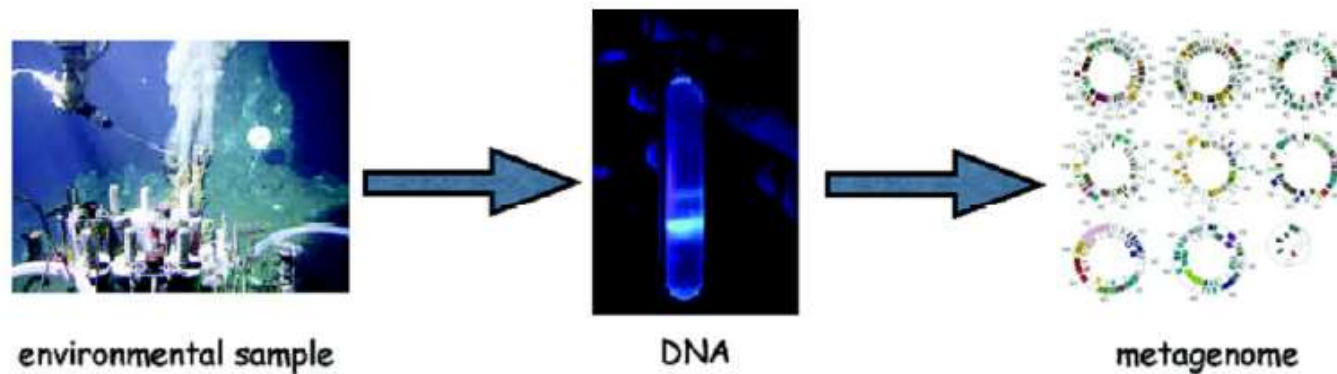




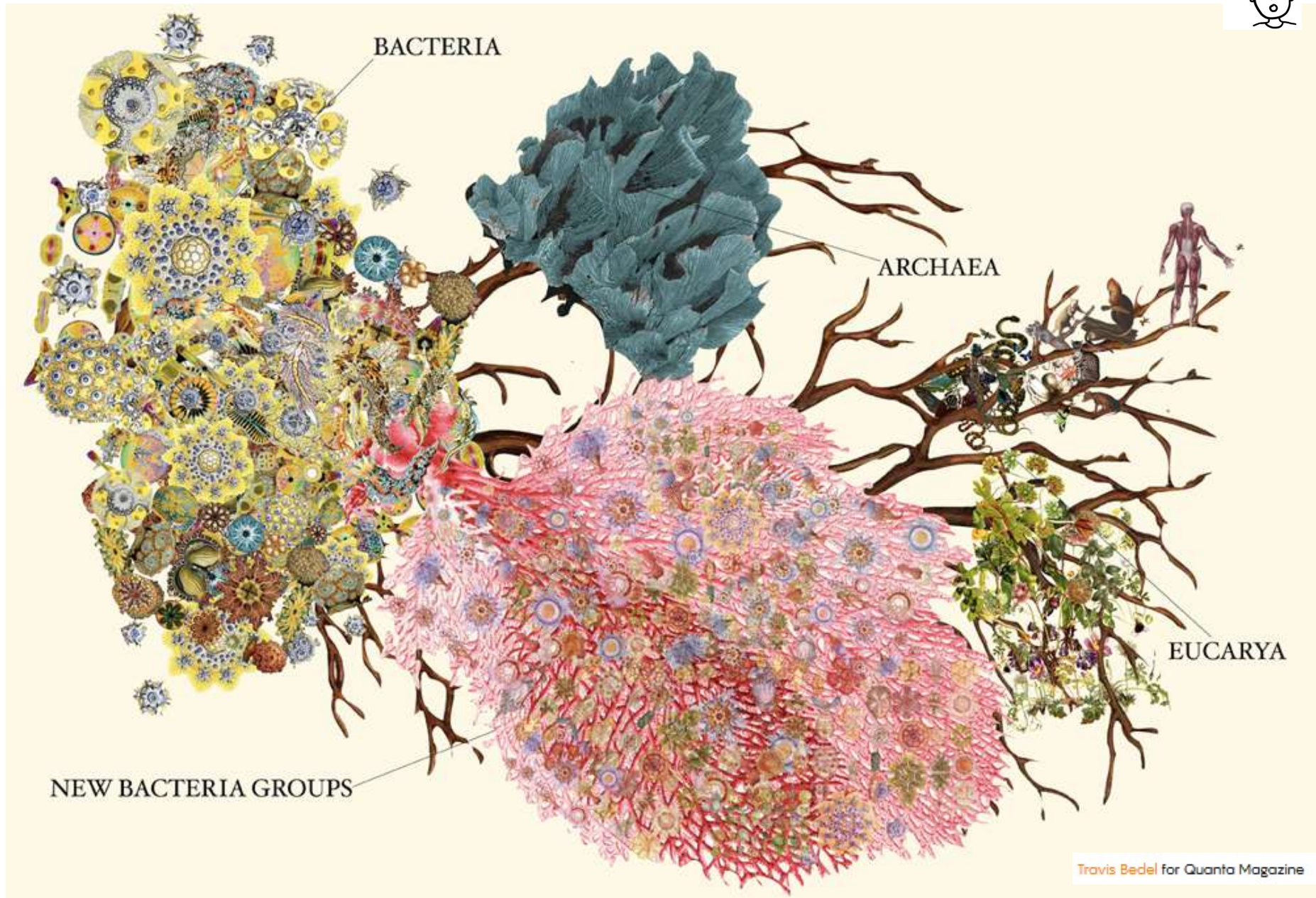
Genome : the complete genetic complement of an organism



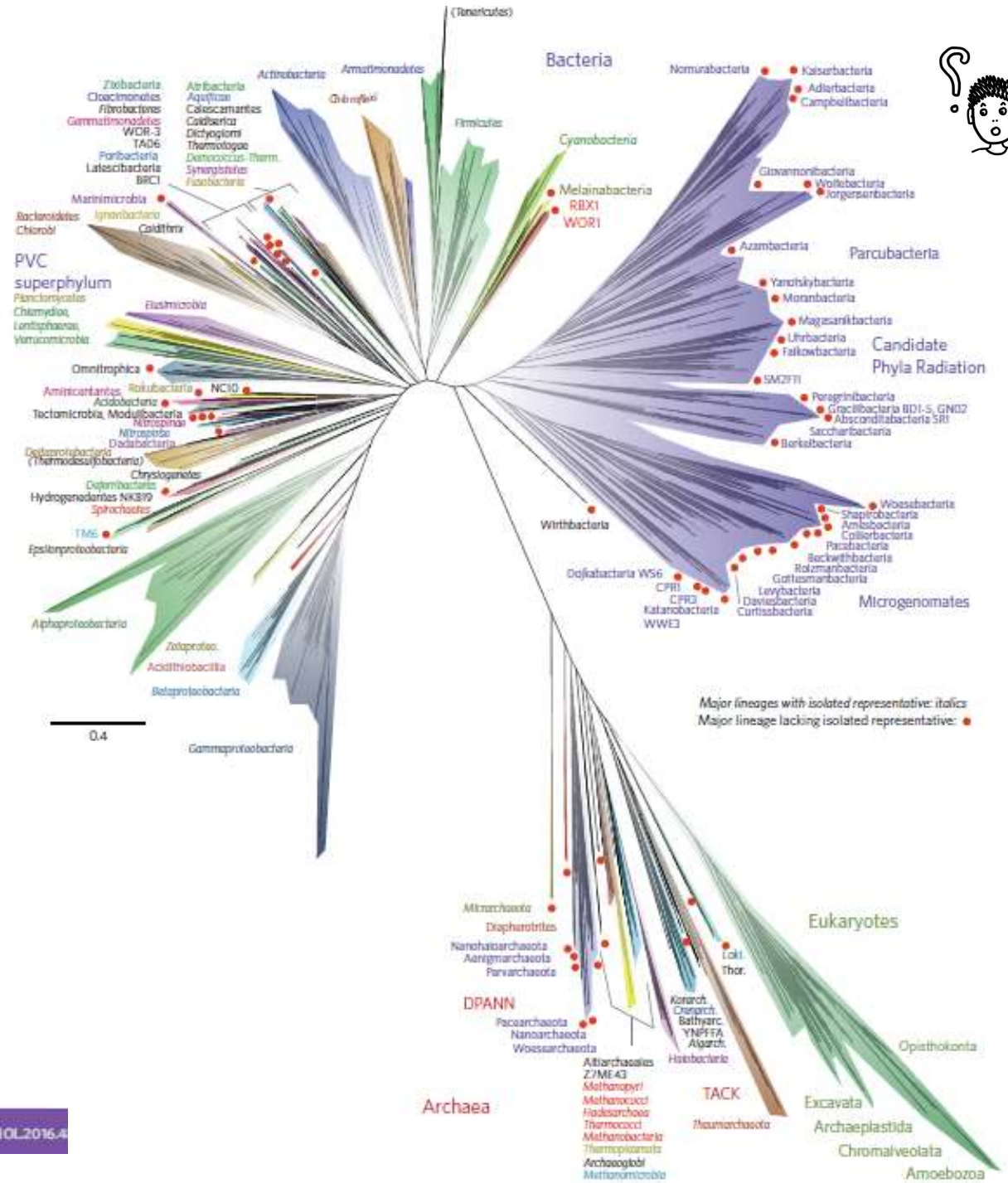
Metagenome : the complete genetic complement of an environment



Outils pour la biodiversité: la métagénomique



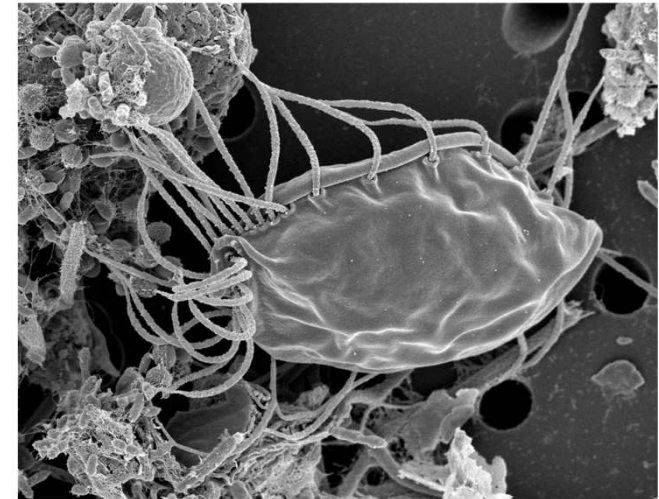
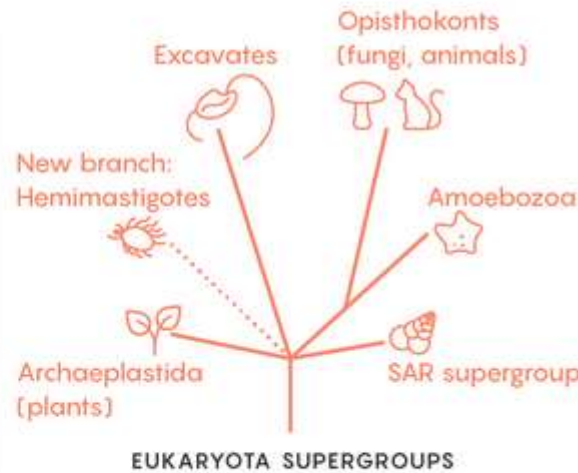
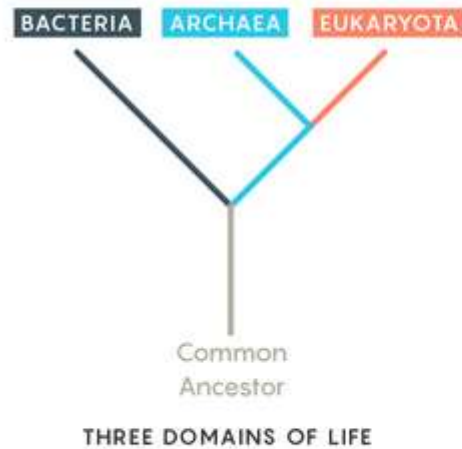
Outils pour la biodiversité: la métagénomique





An Old, Unnoticed Branch on the Tree of Life

The place of hemimastigotes within Eukaryota (the domain of eukaryotes, or life with complex cells) has always been contested. But a new DNA analysis revealed that hemimastigotes represent a novel supergroup that split off from all the known ones more than a billion years ago. Because some supergroups do not have well-established names, this tree shows one major lineage they include.



A view of the full body of a hemimastigote, the only known representative of a newly identified supergroup of organisms. The following series of images shows how a hemimastigote attacks and eats prey.

Outils pour la biodiversité:

