

Biosynthèse de la paroi bactérienne

Regina Tinelli
(Institut Pasteur Paris)

et

Jean-Marie Ghuysen
(Université de Liège)

Avant d'aborder l'étude de la biosynthèse de la paroi bactérienne, nous rappellerons succinctement quels sont les constituants de cette paroi. (*)

Chez les Bactéries Gram (+) qui représentent un stade primitif de l'évolution, la paroi ne forme qu'une seule couche, épaisse, perméable, où des polymères acides — acides teichoïques et lipoteichoïques, acides teichuroniques, polyosides — sont encastrés dans les multiples couches du peptidoglycane auquel ils peuvent être liés covalentiellement. Cette couche, à forte teneur en peptidoglycane, entoure la membrane cytoplasmique et assure la solidité de la cellule bactérienne.

Chez les Bactéries Gram (—) qui sont plus évoluées, la paroi présente une structure plus élaborée où les constituants sont répartis en deux couches distinctes. La couche la plus interne qui entoure la membrane cytoplasmique est constituée de peptidoglycane, tandis que la couche extérieure (outer membrane) appelée L, est constituée de lipopolyosides, de protéines, et d'une lipoprotéine particulière. Le peptidoglycane qui ne forme qu'une couche monomoléculaire est lié covalentiellement à la couche L extérieure et l'ensemble contribue à la rigidité de la paroi bactérienne.

BIOSYNTHÈSE DE LA PAROI

En raison de la situation de la paroi à l'extérieur de la bactérie, le processus de sa biosynthèse se fait en trois étapes localisées en des lieux différents de la cellule bactérienne :

- le premier stade se déroule dans le cytoplasme, où sont synthétisés les précurseurs nucléotidiques ;
- le second, dans la membrane où intervient un transporteur lipidique qui permet leur passage au travers de cette membrane cytoplasmique ;
- le troisième, dans la paroi en cours de croissance, à l'extérieur de la bactérie.

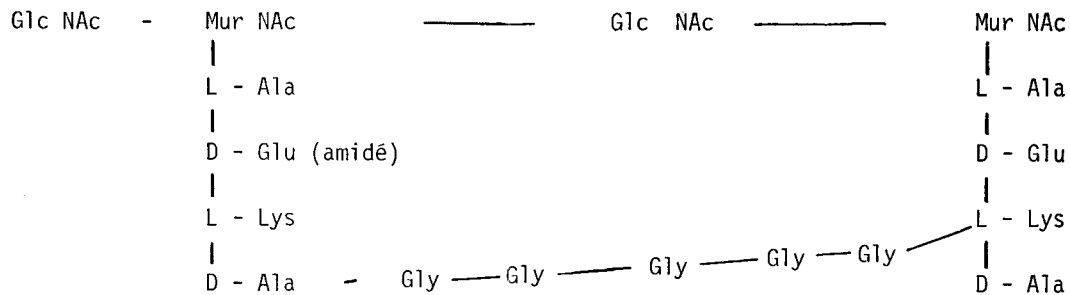
Les synthèses des différents constituants se font simultanément et nous examinerons successivement la biosynthèse de deux des principaux constituants pariétaux : peptidoglycane et lipopolyoside.

BIOSYNTHÈSE DU PEPTIDOGLYCANE

Grâce aux travaux de *Strominger, de Park et Neuhaus*, la synthèse du peptidoglycane a pu être élucidée au niveau moléculaire.

Pour fixer les idées, nous considérerons le cas de *Staphylococcus aureus* où le peptidoglycane contient de la L-lysine comme acide aminé dibasique et où les ponts interpeptidiques sont constitués de cinq résidus de glycine.

(*) Se reporter au précédent article : « Composition des parois bactériennes », par Regina TINELLI (bulletin de l'A.A.E.I.P., n° 65).

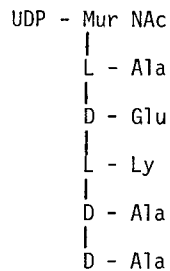


I. — 1^{er} STADE

CYCLE DES NUCLÉOTIDES dans le cytoplasme

L'ensemble des réactions aboutit à la formation des deux précurseurs nucléotidiques :

- a) *Puridine-diphospho-N-acétyl glucosamine (UDP-Glc NAc)* ;
- b) *Puridine-diphospho-muramyl pentapeptide* :



où figurent deux résidus D-Alanine, alors que dans la paroi, la chaîne est térapeptidique, avec un seul résidu D-Ala.

Ces précurseurs sont synthétisés à la suite de onze réactions ayant pour matériaux de départ : UMP, ATP, N-acétyl glucosamine-1-phosphate et acides aminés, et dont les enzymes sont connues (figure 1).

1. — SYNTHÈSE DE L'UDP-N-ACÉTYLGLUCOSAMINE

L'UTP produit par phosphorylation de l'UMP puis de l'UDP par l'ATP (réactions n° 1 et 2) réagit avec la N-acétylglucosamine-1-phosphate, pour donner l'UDP-N-acétylglucosamine et du pyrophosphate; cette réaction est catalysée par une pyrophosphorylase analogue à toutes les enzymes d'activation des sucres par réaction d'oses-1-phosphates avec l'UTP.



2. — SYNTHÈSE DE L'UDP-N-ACÉTYLMURAMYL-PENTAPEPTIDE

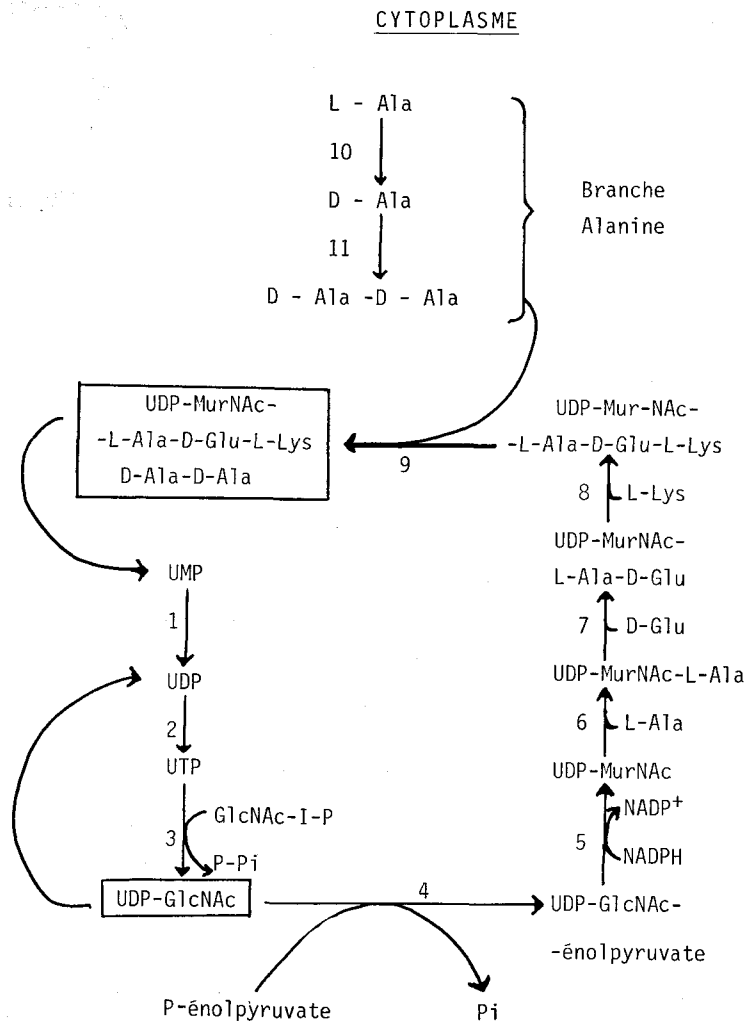
- a) LA SYNTHÈSE DE L'UDP-ACIDE-N-ACÉTYL MURAMIQUE (UDP-MUR-NAC) :

Elle se fait par transfert d'un phosphoénolpyruvate sur l'UDP-N-acétylglucosamine; il y a formation d'UDP-N-acétylglucosamine-énolpyruvate avec libération de phosphate. Cette réaction (n° 4) est catalysée par une transférase. Dans la réaction suivante (n° 5), il y a réduction en UDP-acide-N-acétylmuramique, réaction catalysée par une réductase, l'UDP-N-acétylglucosamine pyruvate réductase.

- b) SYNTHÈSE DE L'UDP-N-ACÉTYL-MURAMYL-PENTAPEPTIDE :

Chaque acide aminé de la chaîne pentapeptidique s'ajoute un à un à l'UDP-Mur-NAc (réactions n° 6-7 et 8), sauf les deux résidus terminaux de D-Alanine qui s'ajoutent sous forme d'un dipeptide D-Ala-D - Ala (réaction n° 9).

Ces quatre réactions sont catalysées chacune, en présence d'ATP, par une enzyme spécifique qui nécessite un cation divalent (Mn^{++} ou Mg^{++}). L'enzyme qui, chez *S. aureus*, catalyse l'addition de L-lysine ne peut catalyser l'addition d'acido-méso-diaminopimélique.



- Figure 1 -

ToxHAtest-Wellcome

sérodiagnostic de la toxoplasmose
réaction d'hémagglutination passive



Immunglobuline "19 S"

SENSIBILITÉ : supérieure à l'agglutination directe.

SPÉCIFICITÉ : dans les taux faibles supérieure à l'agglutination directe
peu influencée par les anticorps hétérogènes dits "naturels",
les réactions du sérum humain normal
en présence d'hématies de dinde sont très rares.

RAPIDITÉ : détermination qualitative ou quantitative en 90 minutes.

PRÉSENTATION : TA 21 : 100 tests (2 x 50).



Laboratoires Wellcome s.a. Département réactifs, 159 rue Nationale 75013 Paris, Tél. 585.04.60. Télex 204276 F

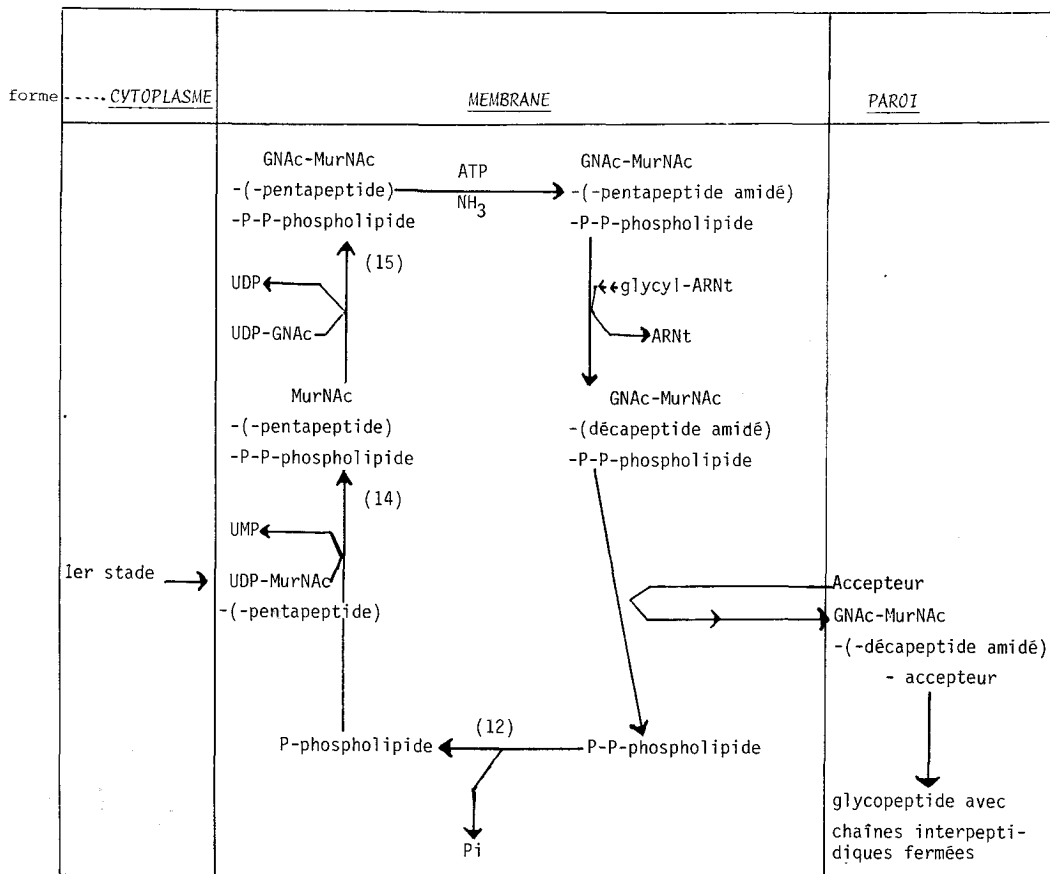
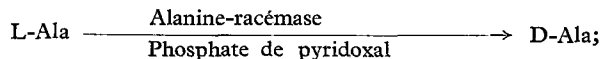


Figure 2 -

CYCLE DU PHOSPHOLIPIDE (*st. aureus*) -

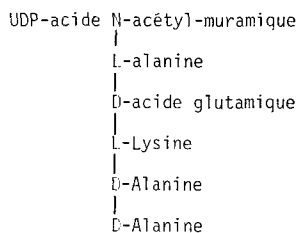
La synthèse du dipeptide D-Ala-D-Ala (réactions n° 10 et 11) et son addition au nucléotide tripeptide UDP-N-acétylmuramyl-L-Ala-D-Glu-L-lysine sont catalysées par trois enzymes :

— l'alanine-racémase (réaction n° 10)



— la D-Alanyl-D-alanine-synthétase ou D-Ala - D-Ala ligase (ADP) (réaction n° 11);

— l'UDP-Mur NAc — L-Ala - D-Glu - L-Lys : D-Ala - D-Ala ligase ou enzyme d'addition (réaction n° 9) permettant la formation du précurseur :



La séquence D-alanyl-D-alanine est impliquée dans la dernière réaction de la biosynthèse du peptidoglycane, la réaction de transpeptidation.

Il est à noter que ce premier ensemble de réactions enzymatiques permettant la synthèse de l'UDP-N-Acétyleglucosamine et de l'UDP-muramyl-pentapeptide est caractérisé, d'une part par l'activation d'oses à l'état d'uridine-nucléotides comme on le voit dans la synthèse des polysides et, d'autre part par l'addition directe — séquentielle — d'acides aminés et d'un dipeptide : processus original ne nécessitant pas l'assemblage d'acides aminés sur une matrice.

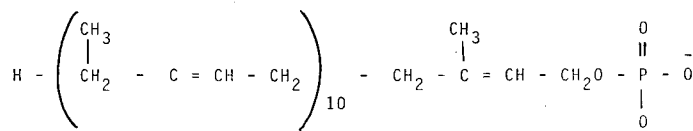
II. — 2^e STADE

CYCLE DU LIPIDE dans la membrane cytoplasmique (figure 2)

Les intermédiaires lipidiques sont des substances-clés dans la biosynthèse des complexes polyosidiques, tant chez les procaryotes que chez les eucaryotes.

Le transporteur lipidique chez *S. aureus* a été isolé à l'état pur et sa structure établie par spectrométrie de masse : c'est un alcool polyisoprénolide à 55 atomes de carbone, c'est-à-dire un polymère contenant onze unités « isoprène » et se terminant par une fraction alcool. Son rôle est d'assurer le transport des précurseurs du peptidoglycane du milieu cytoplasmique hydrophile à la membrane hydrophobe, puis de transporter ces unités jusqu'aux sites extérieurs de polymérisation.

Ce lipide, pour être fonctionnel, doit être phosphorylé (schéma).



ALCOOL POLYISOPRENOÏDE PHOSPHATE ou UNDECAPRÉNYL PHOSPHATE

a) Au début de ce cycle lipidique, le N-acétylmuramyl-pentapeptide est transporté de l'UDP-N-acétylmuramyl-pentapeptide au transporteur membranaire undécaprényl-phosphate avec formation d'UMP et d'undécaprényl-P-P-N-acétylmuramyl-pentapeptide (réaction n° 14). La N-acétyleglucosamine est alors véhiculée de l'UDP-N-acétyleglucosamine à l'undécaprényl-P-P-N-acétylmuramyl-pentapeptide avec formation d'UDP et d'undécaprényl-P-P-dioside-pentapeptide (réaction n° 15).

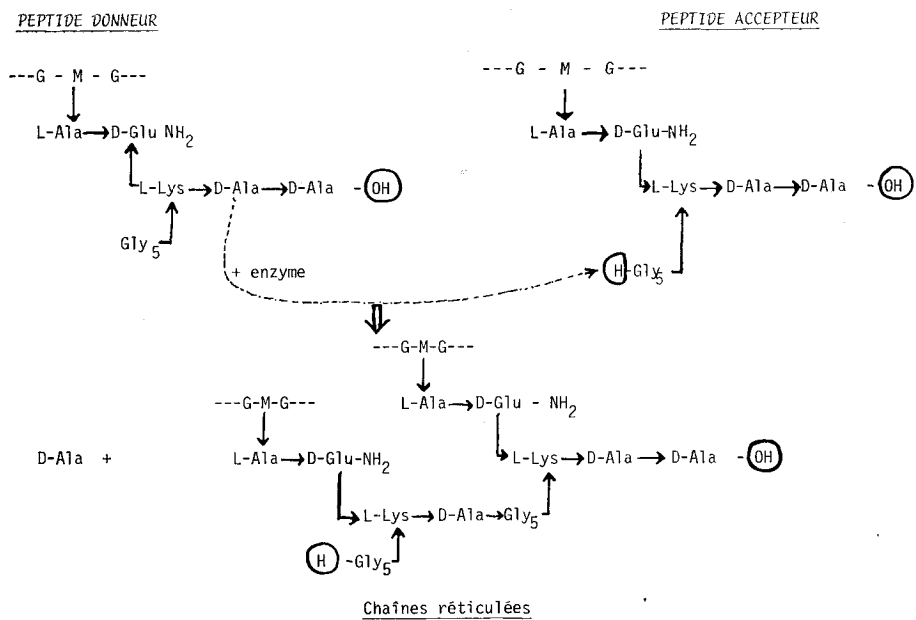


Figure 3 - TRANSPEPTIDATION chez *S. aureus*

b) *Au cours du cycle lipidique*, les unités undécaprényl-P-P-dioside-pentapeptide subissent également des modifications propres à la bactérie. Chez *S. aureus*, il y a amidation de l' α COOH de l'acide glutamique et addition d'une chaîne pentaglycine au groupement ϵ - N H₂ libre de la lysine. Ces cinq résidus glycine, activés sous forme de glycy-t-RNA, sont ajoutés séquentiellement au groupement ϵ - aminé du résidu L-lysine de l'intermédiaire undécaprényl-P-P-dioside-pentapeptide.

c) *Enfin*, ces unités linéaires dioside-pentapeptide amidé-pentaglycine sont transférées du transporteur membranaire jusqu'au site — extérieur — d'incorporation dans le peptidoglycane pariétal en croissance. Au cours de cette dernière réaction, l'undécaprényl-pyrophosphate est produit et par déphosphorylation, il redonne naissance au transporteur initial, l'alcool polyisoprénoïde-phosphate, qui peut alors recommencer un nouveau cycle.

III. — 3^e STADE (à l'extérieur de la bactérie)

Dans le troisième stade, le dernier, il y a formation des ponts interpeptidiques par fermeture des chaînes interpeptidiques de façon à produire un réseau à trois dimensions, insoluble et rigide. Cette réaction se produit à l'extérieur de la bactérie, où il n'y a pas d'ATP pour fournir l'énergie nécessaire à la synthèse interpeptidique : elle est réalisée par une réaction de transpeptidation dont le mécanisme est représenté dans la figure 3.

Le groupement C-terminal de l'avant-dernier résidu D-alanine d'un peptide donneur est transféré au groupement N-terminal de la lysine d'un peptide accepteur (peptidoglycane en croissance).

Des liaisons interpeptidiques sont formées et des quantités équivalentes de résidus D-alanine sont libérées des peptides donneurs. Cette réaction, au cours de laquelle l'énergie contenue dans la liaison D-alanyl-D-alanine du peptide donneur est utilisée pour la synthèse de la liaison interpeptidique est catalysée par une transpeptidase membranaire.

Le peptidoglycane ainsi synthétisé ne possède donc plus que des chaînes tétrapeptidiques avec un seul résidu D-alanine.

C'est à ces différents stades de cette biosynthèse que l'action inhibitrice des antibiotiques se manifeste.

BIOSYNTHÈSE DU LIPOPOLYOSIDE (LPS)

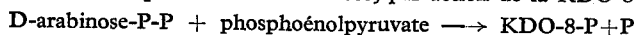
Nous rappellerons que la structure de cet hétéropolymère, qui est caractéristique des bactéries Gram (—), comprend trois parties (figure 4) :

1. Une chaîne oligosidique formant le noyau central (« core ») reliée par son extrémité non réductrice à :
2. la chaîne latérale O ;
et par l'extrémité réductrice au :
3. Lipide A par l'intermédiaire de 3 résidus d'un ose en C₆, le 2-céto-3-désoxyoctonate (KDO).

Il existe de nombreuses souches mutantes (rough) incapables de former un noyau central complet; le nombre de résidus d'oses diminue progressivement jusqu'au KDO (figure 4). L'utilisation de telles souches a permis d'élucider le mécanisme de la biosynthèse.

Comme les autres constituants de la paroi, le LPS est synthétisé dans la membrane cytoplasmique, à partir de précurseurs qui sont des nucléotides-sucres. Cependant, ce mécanisme de biosynthèse est particulier car les différentes parties de la molécule sont assemblées selon des mécanismes différents. En effet, le noyau central oligosidique est fabriqué par extension d'un lipide préexistant grâce à des transferts de KDO, d'heptose, de galactose et de glucose, jusqu'à obtention de la séquence de base, tandis que les chaînes latérales O sont synthétisées et polymérisées indépendamment. La jonction de ces deux macromolécules a lieu dans la membrane cytoplasmique et l'ensemble est aussitôt transporté vers la membrane externe de la bactérie.

Les nucléotides-sucres précurseurs sont synthétisés par des enzymes cytoplasmiques solubles. Le précurseur nucléotidique servant à l'incorporation du KDO est la cytidine-monophosphate-KDO (CMP-KDO). Le KDO provient de l'arabinose, par action de la KDO-8-P synthétase selon la réaction :



1. — SYNTHÈSE DU LIPIDE A

Le mécanisme de cette synthèse n'est pas encore élucidé : on pense que des transférases spécifiques amènent chaque acide gras à sa place sur le dioside glucosaminyl-glucosamine de base. Mais aucun essai de transfert n'a été réussi, pas même celui de l'acide-3-hydroxytétradécanoïque (3-hydroxymyristique) qui est un composant spécifique du lipide A.

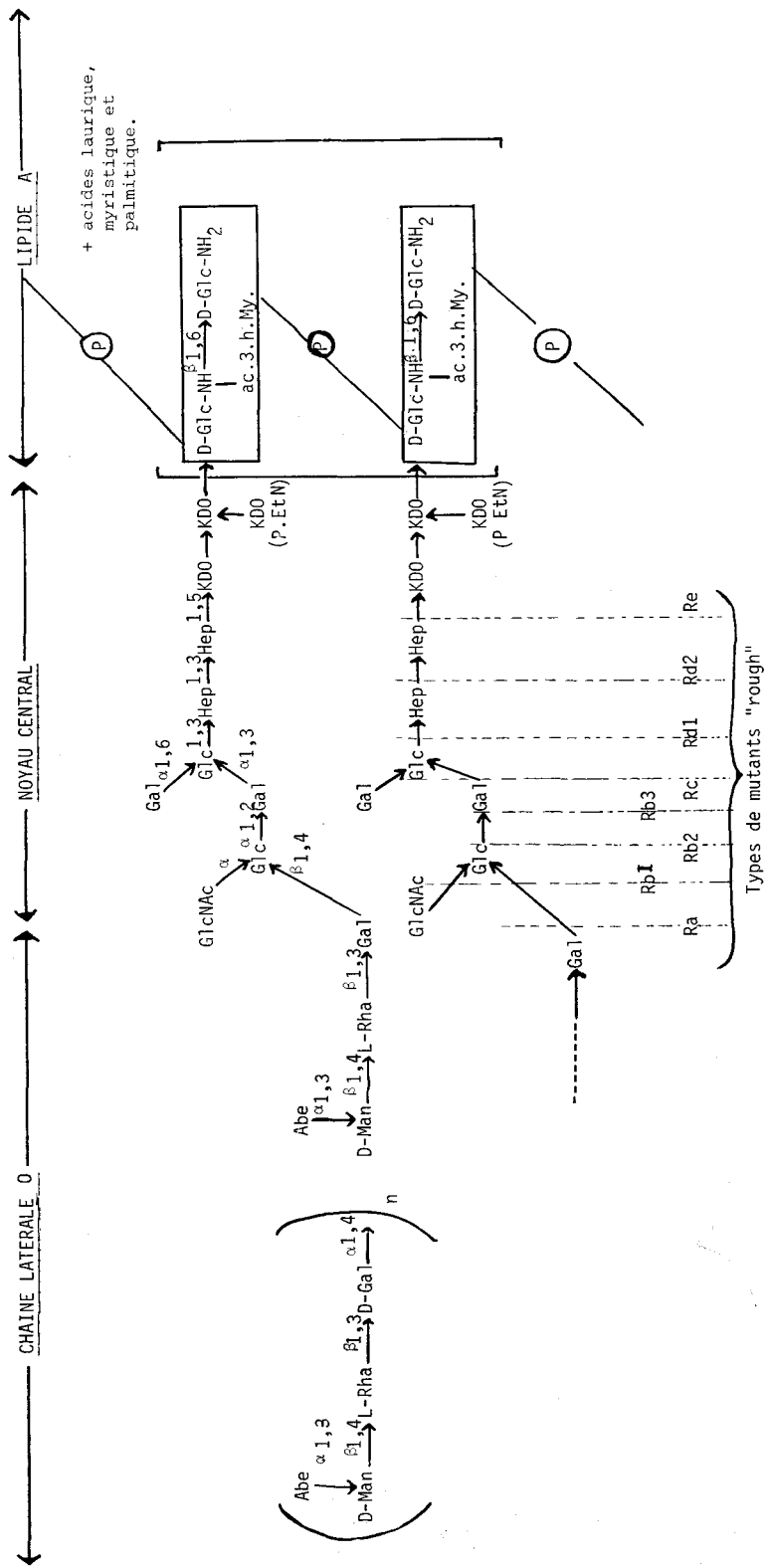


Figure 4 -

SCHEMA DE LA STRUCTURE DU LPS de *Salmonella typhi-muticum*

(P Et N : phosphoéthanolamine - ac 3 h My : acide 3-hydroxymyristique)

2. — SYNTHÈSE DU NOYAU CENTRAL (« core »)

La synthèse de la fraction interne du noyau contenant heptose et KDO n'est pas connue. On sait seulement que le premier stade de l'extension du lipide est le transfert d'un résidu KDO à partir du CMP-KDO (Heath et al, 1966).

La synthèse des oligosides ramifiés qui constituent la fraction externe du noyau central du LPS est mieux connue (Rothfield et al, 1972). Elle consiste en classiques réactions de transfert de résidus glycosylés. Chaque résidu est transféré de son propre précurseur, directement sur l'extrémité non réductrice d'un LPS en croissance. Simultanément, le nucléotide-diphosphate correspondant est libéré.

Il n'y a pas d'intermédiaire, lipidique ou autre, entre les nucléotides-sucres et le LPS. Il faut bien remarquer que c'est le complexe lipopolyoside-phospholipide et non le LPS seul qui est l'accepteur lors des réactions de transfert des résidus glycosylés (en présence de Mg^{++}).

3. — SYNTHÈSE DES CHAINES LATÉRALES O

Les chaînes latérales sont assemblées indépendamment des autres parties du LPS. Leur synthèse comprend un système multienzymatique lié à la membrane et le même transporteur lipidique, l'undécaprényl-P ou lipide transporteur de glycosyl (« glycosyl-carrier-lipid » P-GCL) que celui utilisé dans la synthèse du peptidoglycane.

La séquence des réactions est comparable à celle qui conduit à la formation du peptidoglycane figure c 5). En premier, se déroule une réaction de transphosphorylation : le galactose-1-P est transféré de l'UDP-Gal au transporteur undécaprényl-phosphate avec formation de galactose-P-P-undécaprényl et libération d'UMP.

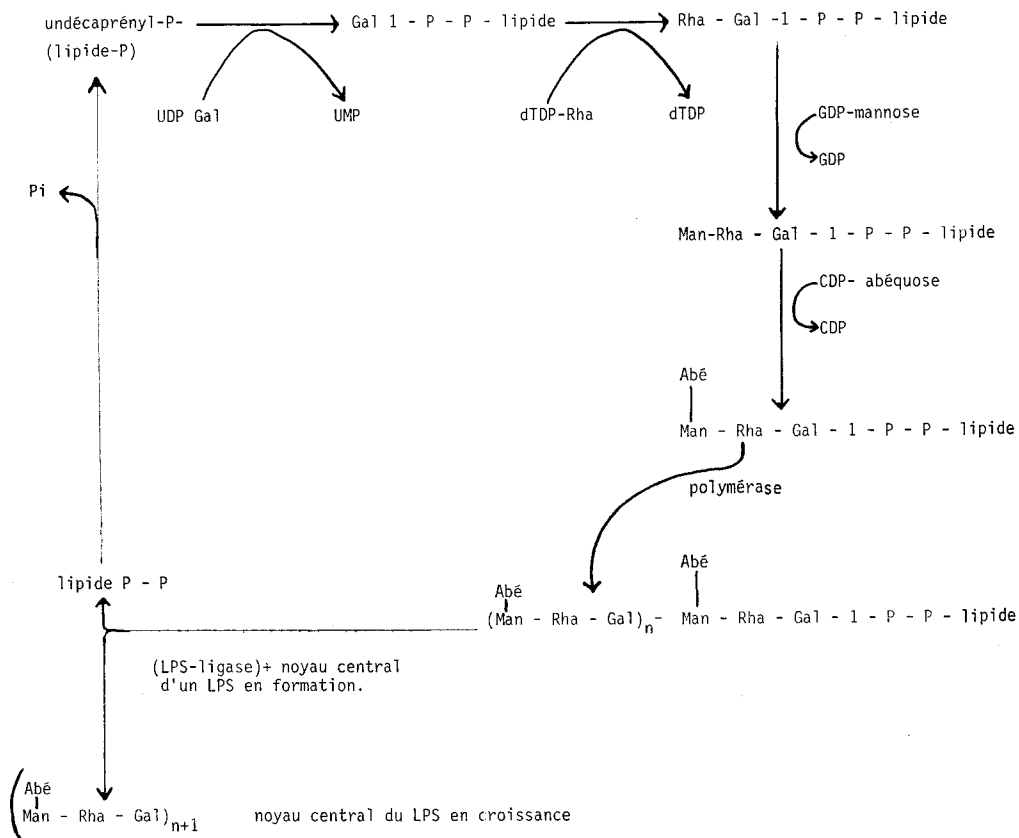


Figure 5 -

SCHEMA DE LA BIOSYNTHESE DE LA CHAÎNE LATÉRALE DE LPS DE *Salmonella typhi-murium* et ASSEMBLAGE FINAL DE LA MACROMOLÉCULE -

Les résidus des sucres suivants sont alors ajoutés séquentiellement, grâce à des séries de transglycosylations (avec, chaque fois, libération du nucléotide-diphosphate) jusqu'à ce que les unités correspondant à la chaîne O soient complètes, (séquence rhamnose, mannose, abéquose pour *S. typhi murium*). Grâce à une série de cycles lipidiques où chaque unité répétitive nouvellement synthétisée liée au lipide accepte la chaîne en croissance faite durant le cycle précédent, une longue chaîne polymérisée intermédiaire est synthétisée tout en restant liée par son extrémité réductrice au transporteur lipidique.

ASSEMBLAGE DU LIPOPOLYOSIDE COMPLET; SON TRANSFERT SUR LA MEMBRANE EXTERNE DE LA BACTÉRIE

Le transfert des chaînes latérales O polymérisées sur le lipopolyoside est catalysé par une lipopolyoside-ligase; le mécanisme qui n'est pas connu comprend peut-être tout un ensemble de réactions.

Lorsque les deux macromolécules préformées ont été réunies, pour donner une molécule complète de lipopolyoside, celle-ci est transportée dans la membrane externe grâce aux sites d'adhésion (zones où la membrane cytoplasmique est attachée à la membrane externe — 200 à 400 par cellule en croissance).

A leur sortie de ces sites, les molécules de lipopolyoside sont distribuées sur toute la surface de la cellule mais de préférence sur la face extérieure de la membrane externe.

Ce processus de transport ne concerne pas seulement les lipopolyosides, mais également tous les composants de la membrane externe : protéine, lipoprotéine et phospholipides qui sont d'abord synthétisés dans la membrane cytoplasmique.

Les bases moléculaires de ce mode de transfert à sens unique, qui ne sont pas encore connues, seront — et sont déjà — l'objet d'intéressantes recherches.

BIBLIOGRAPHIE

J.-M. GHUYSEN, « *Biosynthesis, and Assembly of Bacterial Cell Walls* » in *Cell surface reviews*, Vol. 4 éd. G. Poste; et G.-L. NICOLSON, Elsevier, Amsterdam (sous presse).

R. TINELLI, cette revue, décembre 1975.

