

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira
Bejaia



وزارة التعليم العالي
و البحث العلمي
جامعة عبد الرحمان ميرة
بجاية

Cours de Physiologie de la Cellule Bactérienne

Cours destiné aux étudiants de Master I Biotechnologie Microbienne

Par NOURI Hamid PhD

Sommaire

Liste des figures	2
Liste des tableaux	3
Objectifs du cours.....	4
Connaissances préalables recommandées	4
Chapitre I : Les systèmes de sécrétion chez les bactéries	6
Introduction	6
Rappel des différents structures membranaires bactérienne.....	6
Sécrétion à travers la membrane plasmique	9
Les différents systèmes de sécrétion chez les bactéries	10
La voie SecB.....	11
Le système Tat.....	13
Systèmes de sécrétion chez les bactéries à Gram-.....	14
Systèmes de sécrétion chez les bactéries à Gram+.....	21
Chapitre II : Influence de l'environnement sur la croissance	22
<i>Stress thermique, osmotique, acide et stress oxydatif</i>	22
1- La croissance bactérienne.....	22
Chapitre III : Réponses au stress nutritionnel chez les bactéries	32
Le stress chez les bactéries	32
Implication technologiques.....	32
Mécanismes senseurs de stress	33
Réponse générale au stress	34
Réponse à la carence en azote	36
Carence en phosphate	38
Carence en fer.....	39
Chapitre IV : Réponse au stress thermique	42
La thermotolérance	43
L'ARN polymérase et les facteurs de transcription.....	44
Le facteur de transcription et régulation de la réponse HS.....	44
Les "Cold Shock Proteins"	45
La réponse au stress acide	46
Réponse au stress osmotique	49
Références bibliographiques	

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de l'enveloppe d'une bactérie à Gram positif	7
Figure 2 : Représentation schématique de l'enveloppe d'une bactérie à Gram négati	8
Figure 3 : la voie SecB	11
Figure 4 : la voie SRP	12
Figure 5 : le système Tat	13
Figure 6 : différents systèmes de sécrétion chez les bactéries à Gram -	13
Figure 7 : La courbe de croissance est généralement divisée en 4 parties	22
Figure 8 : Cycle cellulaire chez les bactéries	24
Figure 9 : représentation des mécanismes d'action des protéines Noc et SlnA au cours de la réplication du chromosome	25
Figure 10 : Schéma du processus de construction et de séparation des deux cellules filles chez <i>E. coli</i> et <i>B.subtilis</i>	26
Figure 11 : Action de la supereroxyde dismutase, de la catalase et de la peroxydase	28
Figure 12 : Schéma de l'activation du gène <i>glnA</i> sous la	37
Figure 13 : réponse a la carence en phosphate chez <i>E.coli</i>	38
Figure 14 : Régulation de la transcription des facteurs liés à la réponse HS	42

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classe des systèmes de sécrétion bactériens	9
---	---

Objectifs du cours

Objectif : Comprendre et pouvoir expliquer certains aspects moléculaires de la physiologie bactérienne. Décrire les différents mécanismes cellulaires permettant à la cellule bactérienne de s'adapter aux variations de son environnement.

Connaissances préalables recommandées

Les étudiants doivent avoir des connaissances, en microbiologie et génétique bactérienne et en biochimie structurale, le cours aborde les aspects suivants :

- Les membranes bactériennes et les systèmes de sécrétion chez les bactéries.
- Influence de l'environnement sur la croissance : stress thermique, stress osmotique, stress acide et stress oxydatif
- Réponses au stress nutritionnel chez les bactéries (épuiement nutritionnel et carence en azote, phosphate, fer et carbone, protéines de carence et état de résistance, la réponse stringente et la réponse adaptative.
- Réponse au stress thermique (protéines Heat Choc)
- Réponse au stress oxydatif
- Test de survie au stress acide
- Etude de la tolérance et de l'adaptation au milieu acide.

Préambule

Ce cours est destiné aux étudiants de première année master, qui correspond à la première année du deuxième cycle universitaire. Il nécessite un pré acquis en microbiologie générale des bases de biologie moléculaire et des notions de génétique bactérienne.

Le document présent à pour objectif dans un premier temps d'exposer les différents mécanismes cellulaires chez les bactéries, et dans un deuxième temps comprendre comment les microorganismes puissent utiliser ces éléments qui composent leurs physiologie dans une réponse ciblé ou globale à leur environnement.

Chapitre I : Les systèmes de sécrétion chez les bactéries

Introduction

Le transport des protéines est l'une des fonctions les plus importantes chez les bactéries, ce processus est appelé **sécrétion de protéines**.

La sécrétion joue différents rôles, elle intervient dans plusieurs processus cellulaires tel que la virulence, les échanges génétiques, la formation de biofilms et la vie communautaire des microorganismes.

L'utilisation des microorganismes dans l'industrie requiert une parfaite connaissance des systèmes sécrétoires.

Rappel des différentes structures membranaires bactérienne

Une bactérie n'est pas un simple « sac » dans lequel beigne une soupe d'ADN et de petites molécules ; il est vrai que sa structure si simpliste a souvent laissé supposer que c'est le désordre qui régit cette substance intérieure, cependant aujourd'hui on en sait un peu plus sur sa fine structure et son organisation fonctionnelle. Si les bactéries, pour la plupart, disposent de structure rigide c'est grâce à la présence de la paroi.

La paroi des bactéries à Gram négatif s'organise en trois grandes parties (de l'intérieur vers l'extérieur):

- la membrane interne (IM),
- l'espace périplasmique (périplasma)
- la membrane externe (OM).

L'IM est principalement composée de phospholipides organisés en bicouche. Insérés à l'intérieur de cette bicouche se trouvent de nombreux complexes protéiques, d'une importance vitale pour la bactérie, ils sont impliqués dans le métabolisme bactérien (comme l'ATP synthase, les chaînes respiratoires,...).

L'espace périplasmique, qui se situe entre l'OM et l'IM, contient une couche de peptidoglycane. C'est un espace de stockage d'enzymes qui sont impliquées dans la

dégradation et le transport de nutriments ou dans le maintien de la structure de la paroi bactérienne.

L'OM est en contact direct avec le milieu extérieur. Elle est composée d'une couche de phospholipides et d'une couche de lipopolysaccharide (LPS). Elle contient de nombreuses protéines intrinsèques (OMPs, Outer Membrane Protein) comme par exemple les protéines de transports appelées porines. Le LPS est un composé peu immunogène qui permet à la bactérie de se cacher contre les défenses de l'hôte. Lors de la lyse de la bactérie, le LPS se dissocie permettant le relargage du lipide A qui joue un rôle dans le pouvoir pathogène de la bactérie.

Les protéines synthétisées dans le cytoplasme se confrontent au passage de l'IM. Une partie d'entre elles s'insèrent dans cette membrane et deviendront des protéines intégrales de la membrane interne (IMP) ou des lipoprotéines. Une autre partie passe l'IM et peut rester dans le périplasma, s'insérer dans l'OM ou être sécrétée dans le milieu extracellulaire. La dernière partie peut être directement sécrétée dans le milieu extracellulaire (passage direct du cytoplasme au milieu extérieur). Sémantiquement parlant, le terme de sécrétion désigne un transport actif d'une protéine du cytoplasme vers le milieu extracellulaire.

Les bactéries sont traditionnellement divisées en deux grands groupes : les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. Cette distinction est due à la structure et la perméabilité des parois.

La paroi des Gram+

Chez les bactéries à Gram+, la paroi, épaisse et uniforme, comprend de 40 à 80% de peptidoglycanes selon l'espèce et la culture, et entre 20 et 60% d'autres espèces comme les acides teichoïques et lipoteichoïque. Les premiers consistent en des polyalcools reliés par des esters de phosphate et ribitolphosphate sur lesquels nous trouverons des sucres (glucose, galactose, osamines (glucosamine)) ou un acide aminé : la DAlanine. Les seconds sont des polymères de différents acides uroniques comme l'acide glucuronique ainsi qu'un dérivé d'acide aminé, l'acide aminoglucuronique. Ceux-ci peuvent être libres, associés au feuillet externe de la membrane, ou liés aux peptidoglycanes via le groupement hydroxyle en C6.

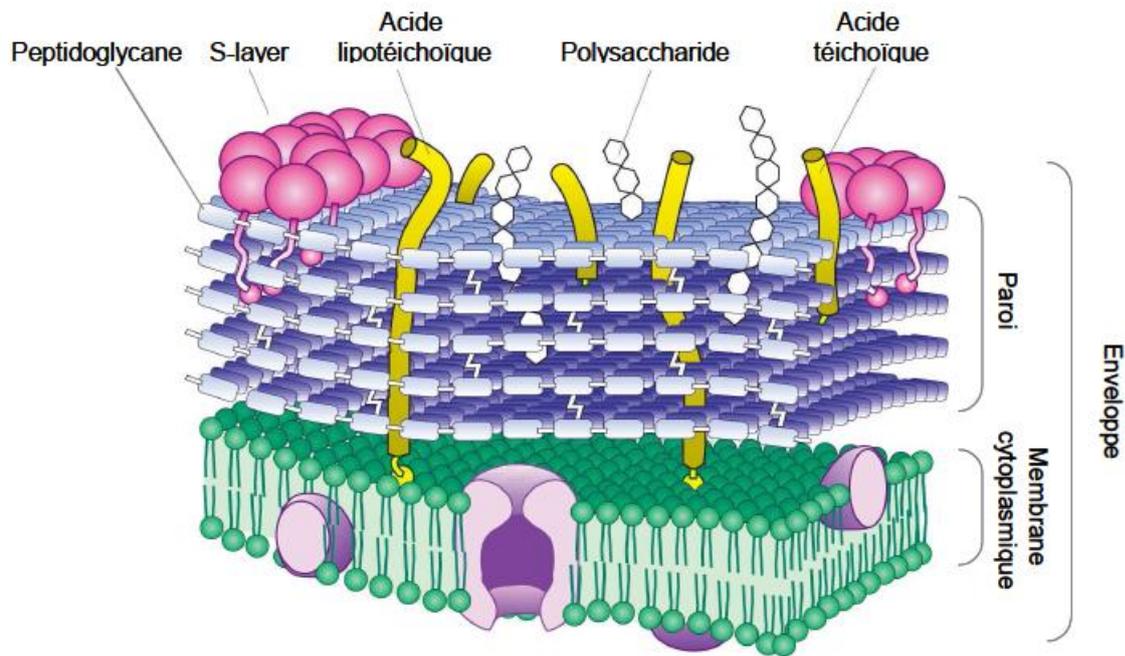


Figure 1 : Représentation schématique de la paroi de bactérie à Gram positif

La paroi des Gram-

La paroi est ici beaucoup plus complexe car hétérogène : une nouvelle bicouche phospholipidique fait son apparition en milieu extérieur. Le maillage peptidoglycanique ne représente que 5% de la structure de la paroi. Celui-ci est de faible poids moléculaire, et possède un empilement monocouche. On ne trouve ni acides téichoïques, ni acides lipoteichoïques.

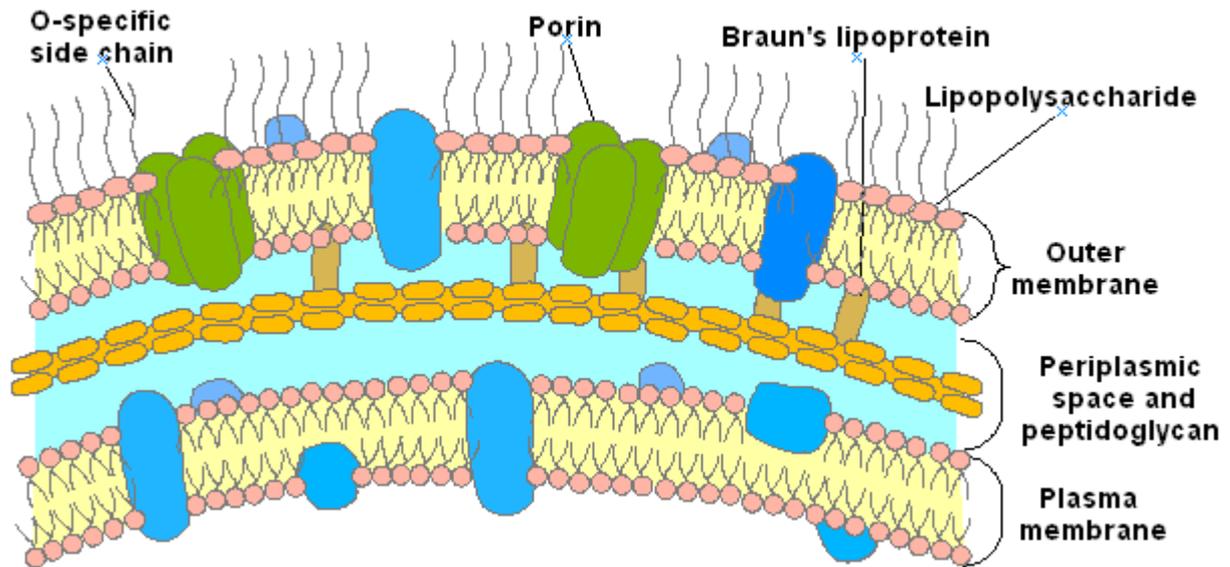


Figure 2 : Représentation schématique de la paroi de bactérie à Gram négatif

Perméabilité membranaire

La membrane plasmique est **semi perméable**. Cette sélectivité permet :

Le passage des molécules indispensables (acides aminés, sucre...) vers l'intérieur de la cellule
 - Aux métabolites intermédiaires de ne pas s'échapper de la cellule - Aux déchets métaboliques de quitter la cellule

La perméabilité des structures membranaires chez les bactéries dépendent de plusieurs facteurs à la fois intrinsèques (l'espèce bactérienne, l'âge de la culture ...) et environnementale (richesse du milieu, Il s'agit de la capacité de la membrane à laisser passer certaines molécules

La perméabilité membranaire vis-à-vis des molécules (quel soit volontaire ou involontaire : **transport passif ou actif**)

Sécrétion à travers la membrane plasmique

Les protéines de surface jouent un rôle important dans la physiologie bactérienne car ce sont elles qui, entre autres, régulent l'interaction avec l'environnement, facilitent l'import de nutriments, l'export de produits toxiques et qui participent à l'adhésion et la colonisation. Pour

être associées à la surface, ces protéines synthétisées dans le cytoplasme, doivent emprunter des voies de translocation communes à celles des protéines sécrétées

Les différents systèmes de sécrétion chez les bactéries

Il existe nombreux systèmes de transport transmembranaire chez les bactéries cependant le système Sec (The general Secretion) et le système Tat (Twin Arginin Translocation) sont les plus répondeur chez les bactéries. Ce sont des systèmes hautement conservés, on les retrouve dans tout les domaines de la vie (Bactéries, Archeae et procaryotes). La plupart de protéines sécrétées par ces deux systèmes restent soit dans la membrane interne soit dans le périplasme. Si non elles sont transportées à l'extérieur via d'autres systèmes. Si les deux system Sec et Tat ont plusieurs éléments en communs, ils transportent les protéines avec des mécanismes fondamentalement différents.

Tableau 1 : Classe des systèmes de sécrétion bactériens

Appareil sécrétoire	Signal de sécrétion	Etapes de sécrétion	Repliement du substrat	Nombre de membranes	G+/G-
Sec	N-terminal	1	non	1	Les deux
Tat	N-terminal	1	Oui	1	Les deux
T1SS	C-terminal	1	Non	2	G-
T2SS	N-terminal	2	Oui	1	G-
T3SS	N-terminal	1-2	Non	2-3	G-
T4SS	C-terminal	1	Non	2-3	G-
T5SS	N-terminal	2	Non	1	G-
T6SS	Pas de signal de sécrétion	1	Inconnu	2-3	G-

Le système Sec

La voie permettant la sécrétion du plus grand nombre de protéines est de loin la voie de sécrétion de type Sec. Elle permet la translocation des protéines dans leur état non replié. Elle est composée de trois parties : Une protéine de ciblage, une protéine moteur et un canal membranaire intégré appelé la translocase SecYEG. Chez les Gram+ il existe d'autres protéines accessoires qui ont un rôle important dans la sécrétion de protéines spécifiques.

Chez les bactéries pathogènes cette voie sert de transporteur de facteur de virulence à l'instar de *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Yersinia enterocolitica*.

La sécrétion par la voie Sec repose sur une séquence signal hydrophobe à l'extrémité N-terminale de la protéine sécrétée, qui est typiquement longue de 20 acides aminés et contient 3 régions:

- Un amino-acide-terminal chargé positivement.
- Un noyau hydrophobe
- Un groupe polaire carboxyle-terminal

Les protéines qui vont être sécrétées dans le périplasma ou à l'extérieur de la cellule par la voie Sec contiennent des séquences de signaux SecB spécifiques, tandis que les protéines destinées à rester dans la membrane interne contiennent une particule de reconnaissance du signal (signal recognition particle) (SRP).

La voie SecB

Dans de nombreuses bactéries à Gram-négatif, des protéines destinées à être exportées vers le périplasma ou à l'extérieur de la cellule contiennent une séquence signal amovible reconnue par la protéine SecB. Cette protéine sert de chaperon, (elle intervient notamment dans la protection contre le repliement). SecB délivre alors ces protéines à SecA, une protéine multifonctionnelle.

Les protéines sont guidées au canal SecYEG. Avant de traverser le canal, une protéase clive la séquence signal SecB de la protéine native, et celle-ci est sécrétée sous forme repliée.

Alors que de nombreuses protéines livrées par le système SecB restent dans le périplasma, certains vont finalement devenir extracellulaires.

Une fois que ces protéines sont livrées au périplasma, ils peuvent être transportés à travers la membrane externe à l'aide des systèmes de sécrétion II et V.

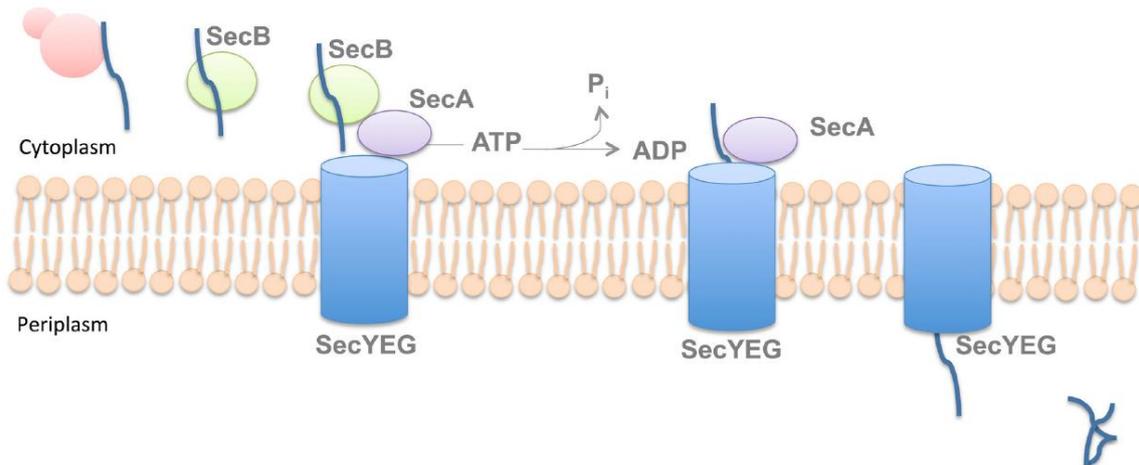


Figure 3 : la voie SecB

1- la voie SRP

Le système Sec peut aussi transporter des protéines qui sont destinées à rester dans la membrane interne par l'intermédiaire de la voie SRP. Les protéines transmembranaires contiennent souvent des domaines hydrophobes et sont donc instables lorsqu'elles sont dans le cytoplasme. Pour cette raison, la sécrétion par la voie SRP utilise un mécanisme de co-translation (associé à l'exportation) couplé au ribosome pour la sécrétion par la voie SecYEG.

La voie SRP repose sur la particule SRP, qui contient un petit ARN lié à une protéine appelée Ffh. Pendant la sécrétion de la protéine par cette voie, SRP se lie d'abord au domaine transmembranaire des protéines dès qu'elles ressortent du ribosome.

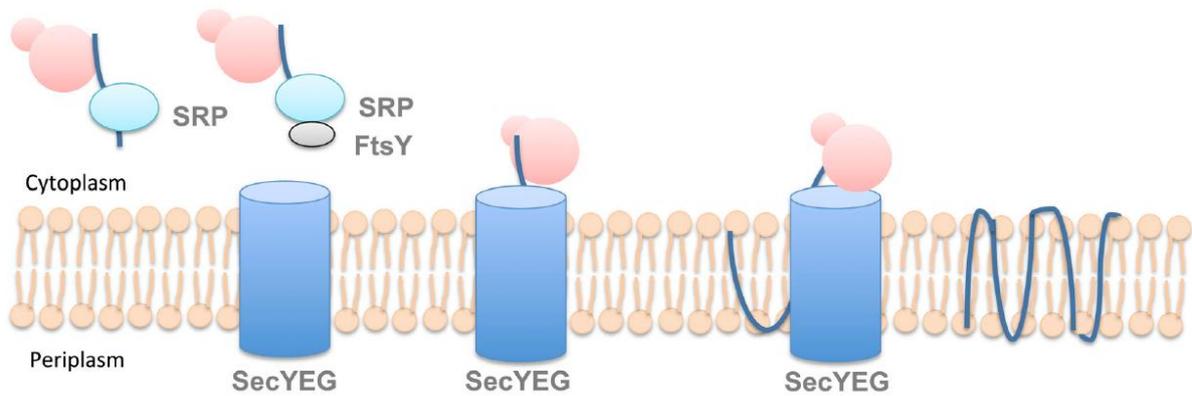


Figure 4 : la voie SRP

SRP se lie ensuite la protéine d'ancrage FtsY qui délivre le complexe ribosome-protéine au canal SecYEG. La traduction de la protéine entraîne alors la sécrétion de la protéine naissante dans le canal. Pendant ce processus, le domaine transmembranaire de la protéine échappe par le côté du canal dans la membrane, où elle reste attachée. Le mécanisme de cette dernière étape n'est pas encore connu.

Le système Tat

Contrairement à la voie Sec, la voie Tat sécrète principalement des protéines repliées. Cette voie est critique parce que toutes les protéines ne peuvent pas être sécrétées dans leur état non replié, comme certaines protéines qui contiennent des modifications post-traductionnelles, telles que les facteurs redox (synthétisés dans le cytoplasme). Les matériaux nécessaires à ces modifications ne seraient pas disponibles au niveau extracellulaire ou périplasmique et, par conséquent, ces protéines doivent se replier et être modifiées dans le cytoplasme avant la sécrétion dans leur état tri-dimensions.

La voie de sécrétion Tat est composée de sous-unités: TatA, TatB et TatC (chez les bactéries à Gram-positif, TatA et TatB sont combinés en une protéine multi-fonctionnelle).

Chez *Escherichia coli*, TatB et TatC lient le peptide signal de la protéine Tat-sécrétée puis recrute TatA, qui forme le canal traversant la membrane. La séquence signal Tat contient une paire d'arginines "jumelles" à l'extrémité N-terminale de la protéine repliée. Alors que la plupart des protéines sécrétées par le système Tat chez les bactéries à Gram-positif sont libérés dans le milieu extracellulaire, les protéines Tat sécrétées par les bactéries à Gram-négatif peuvent soit resté dans l'espace périplasmiques ou elles sont transportées hors de la cellule par le système de sécrétion de type II.

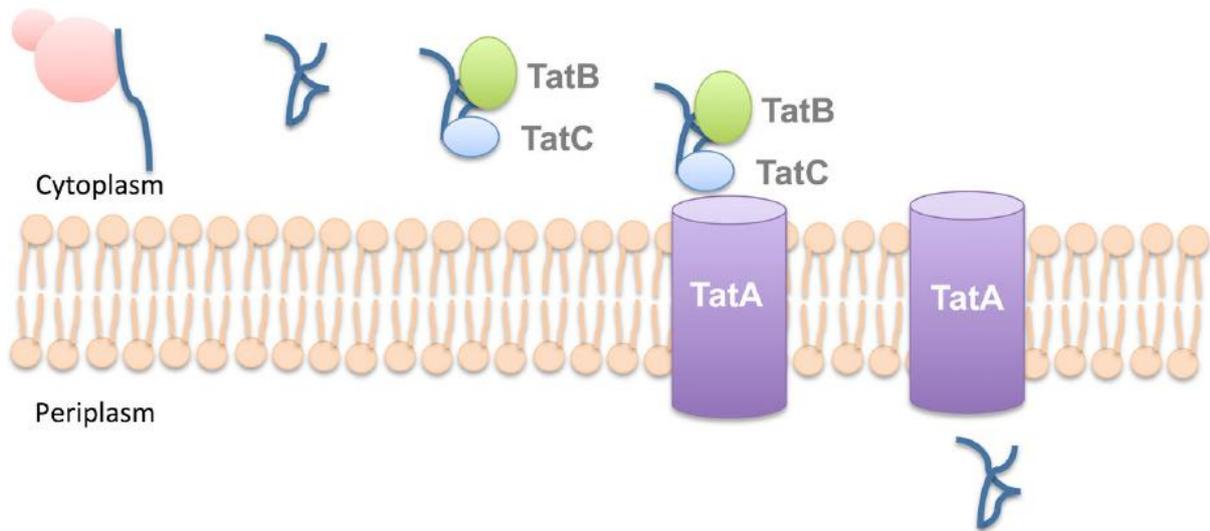


Figure 5 : le système Tat

Systèmes de sécrétion chez les bactéries à Gram-

Chez les Gram – les systèmes de sécrétion sont pour la plupart dédiés à la sécrétion de toxines, c’est un vrai challenge, car ces molécules doivent traverser deux membranes phospholipidiques afin d’atteindre leurs cibles.

Certains de ces molécules sont secrétées en deux étapes séparées : la 1ere consiste à délivrer la molécule dans le périplasm par la voie Sec ou Tat et la deuxième étape par le second système de transport. Ce processus est connu sous le nom de système de sécrétion de protéine Sec ou Tat dépendant.

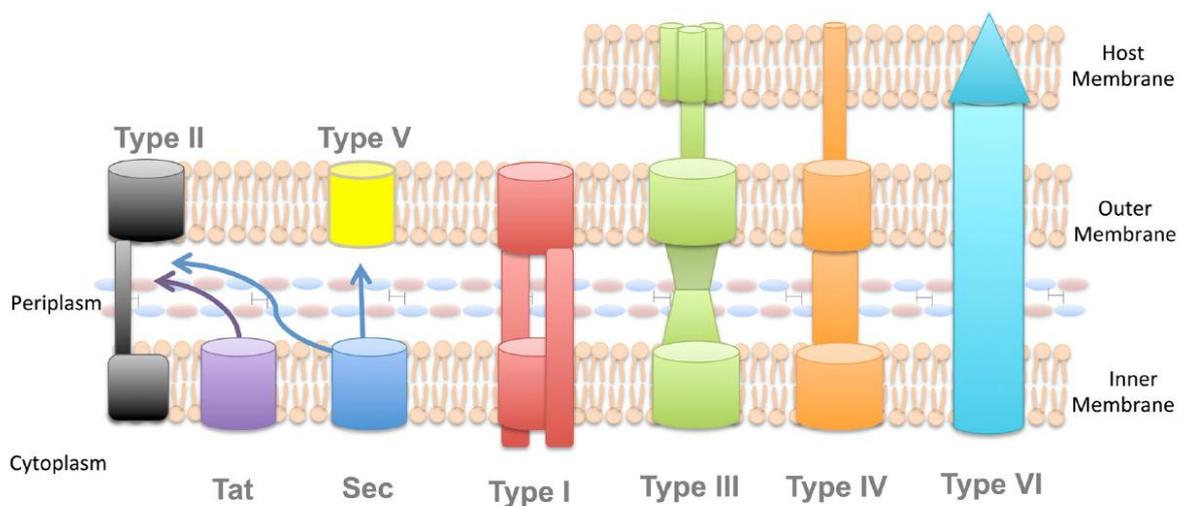


Figure 6 : différents systèmes de sécrétion chez les bactéries à Gram -

Type I: T1SSs

Ce type de système existe chez un nombre important de bactéries à Gram négatif, dont des pathogènes de végétaux ainsi que des animaux. Le transport de substrats se fait par un processus en une seule étape à travers les deux membranes. Les protéines secrétées via cette voie ne sont pas sujettes à un clivage protéolytique.

Certaines bactéries peuvent avoir plusieurs T1SSs, dont chacun est dédié au transport d'un ou de quelques substrats non repliés. Ces substrats varient en fonctions, dont des enzymes digestives, telles que les protéases et les lipases, ainsi que des adhésines, des protéines de liaison et des toxines. Les substrats T1SS sont généralement Sec-indépendant, mais pas toujours, elles contiennent une séquence signal C-terminal qui est reconnu par le T1SS et reste non clivée.

Trois composantes structurelles essentielles constituent T1SSs:

- ABC : Une protéine transporteur dans la membrane interne.
- MFP : Une protéine de fusion membranaire qui traverse la membrane interne
- OMP : Un pont à l'élément de membrane externe.

Le composant ABC associé à la T1SS à plusieurs fonctions essentielles:

- il catalyse l'ATP pour fournir l'énergie pour le transport du substrat,
- interagit avec le MFP, et participe à la reconnaissance de substrat.

Type II.

Ce système est conservé chez la plupart des bactéries à Gram-négatif, où ils transportent des protéines repliées à partir du périplasme vers le milieu extracellulaire. Comparé au Type I, il est beaucoup plus complexe.

Étant donné que le canal T2SS se trouve uniquement dans la membrane extérieure, cela explique le fait que ce système soit dédié seulement à la sécrétion extracellulaire. Les protéines secrétées à travers cet appareil doivent d'abord être livrées au périplasme via les voies de sécrétion Sec ou Tat, qui transfèrent des substrats protéiques à travers la membrane interne, tel que décrit précédemment.

Le T2SS sécrète des protéines repliées, les protéines transportées à travers la membrane cytoplasmique par la voie Sec doivent être repliées dans le périplasme avant l'exportation par la T2SS.

T2SS est capable de sécréter un large éventail de substrats à l'extérieur de la cellule bactérienne, dont certains contribuent à la virulence de bactéries pathogènes. Chez certaines espèces bactériennes, le T2SS est nécessaire pour la sécrétion de multiples substrats, tandis que dans d'autres, il est uniquement utilisé pour le transport d'une seule protéine. Ces protéines sécrétées ont une variété de fonctions biologiques, mais sont en général des enzymes telles que des protéases, des lipases, et les phosphatases ainsi que plusieurs protéines qui transforment les hydrates de carbone (glucides).

Le T2SS est complexe et se compose de pas moins de 15 protéines différentes, qui peuvent être décomposés en quatre sous-ensembles:

- le complexe de la membrane externe,
- la plate-forme interne (de la membrane),
- l'ATPase de la sécrétion
- le pseudopilus

Type III

Le système T3SS est partagé par plusieurs agents pathogènes et les symbiotes. Il est décrit comme étant "injectisomes" et "aiguille et la seringue" comme appareils en raison de leur structure. Ils sécrètent une grande variété de substrats protéiques à travers les membranes bactériennes internes et externes.

En outre, la plupart des T3SS transportent également des substrats dans une membrane cellulaire eucaryote cible, en une seule et même étape et, par conséquent, en fait le transport de protéines à travers trois membranes. La sécrétion de substrats T3SS est généralement considérée comme un processus en une seule étape, bien que récemment cette notion a été contestée dans *Yersinia*.

Les substrats T3SS sont génériquement appelés protéines effectrices. Les bactéries pathogènes peuvent sécréter seulement quelques protéines effectrices, comme dans les cas de *Pseudomonas* et *Yersinia*, ou plusieurs dizaines, comme dans les cas de *Shigella* et *EHEC*.

Les signaux de sécrétion sont intégrés à l'extrémité N-terminale de substrats T3SS et ne sont pas clivés. Beaucoup, mais pas tous les effecteurs T3SS ont des protéines chaperons qui les guident à la base de T3SS, où ils sont sécrétés dans un processus ATP-dépendant, dans un état non replié.

Le SST3 a un noyau de 9 protéines qui sont fortement conservées parmi tous les systèmes connus. Ils partagent 8 de ces protéines avec une partie du flagelle chez de nombreuses bactéries. En plus de ces 9 protéines essentielles, T3SSs ont 10 à 20 protéines supplémentaires qui jouent des rôles essentiels ou importants dans leur fonction.

Le T3SS peut être décomposé en trois composantes principales:

- Un complexe de base ou le corps de base,
- La composante de l'aiguille et le translocon.
- Le complexe de base contient des composants cytoplasmiques et enjambe la membrane interne et externe, formant une structure analogue à douille constituée de plusieurs anneaux avec une tige centrale.

Le complexe de la pointe SST3, qui se trouve à l'extrémité extérieure de l'aiguille, est critique pour le contact et la détection des cellules hôtes et la régulation de la sécrétion d'effecteurs. Le Translocon SST3 est essentiel pour le passage des effecteurs à travers les membranes de la cellule hôte, mais pas pour la sécrétion d'effecteurs en dehors de la bactérie, les Translocons sont assemblés au moment du contact avec les cellules hôtes et forment un pore qui est essentielle pour la distribution des effecteurs.

Type IV

Les systèmes IV de sécrétion de type (T4SS) sont ancestralement liés aux systèmes de conjugaison de l'ADN bactérien et peuvent sécréter une variété de substrats, y compris des protéines individuelles et de protéine-protéine et des complexes ADN-protéine. T4SSs sécrètent des substrats dans une large gamme de cellules cibles, y compris des bactéries (des espèces identiques ou différentes) et les cellules eucaryotes.

Ces complexes macromoléculaires sont principalement trouvés dans les bactéries Gram-négatifs, où ils transportent des substrats à travers les membranes intérieure et extérieure. Comme T3SS, T4SS peut recouvrir une membrane supplémentaire, celle de la cellule hôte, ce qui permet le transfert direct de substrats dans le cytoplasme de la cellule réceptrice.

Parce que T4SSs sont capables de transférer l'ADN et des protéines, ils peuvent assurer une variété de fonctions ; tel que le transfert conjugatif de l'ADN, l'absorption et la libération de l'ADN, et la translocation de protéines effectrices ou des complexes ADN / protéine directement dans les cellules receveuses.

Il existe une variété de systèmes T4SS, cependant ils partagent des composants communes et fonctionnent de manière similaire. L'exemple de VirB/D le système *d'Agrobacterium tumeficiens* qui utilise sont système T4SS pour transporter l'ADN-T oncogène dans des cellules végétales, a servi de model pour l'étude de l'assemblage et du fonctionnement du T4SS.

Le système de plasmide Ti contient 12 protéines, VirB1-VirB11 et VirD4, La majeure partie des protéines (VirB6-VirB10 et éventuellement VirB3) sont susceptibles de former le squelette de la voie de translocation du substrat qui traverse l'enveloppe de cellule entière. Des études structurales ont montré que VirB7, VirB9 et VirB10 assemblés et forme le «complexe de base» contenant 14 copies de chacune des protéines. VirB10 forme le canal de la membrane externe. En fait, VirB10 est une protéine très inhabituelle car il insère dans les deux membranes intérieures et extérieures VirB10 est connue pour jouer un rôle important dans la régulation du transfert du substrat vers l'espace extracellulaire.

T4SSs jouent un rôle pivot dans la pathogénicité d'une grande variété de bactéries. Des exemples notables de pathogènes bactériens qui emploient T4SSs pour la virulence sont *Neisseria gonorrhoeae*, qui utilise sa T4SS pour la médiation de l'absorption de l'ADN (ce qui favorise l'acquisition des gènes de virulence) et : *Legionella pneumophila*, *Brucella suis*, et *Helicobacter pylori*, qui utilisent leur systèmes T4SSs pour la translocation des protéines effectrices dans des cellules hôtes lors de l'infection afin de perturber leurs stratégies de défense. Ces protéines effectrices ont un large éventail de fonctions. Par exemple, l'agent pathogène intracellulaire de *L. pneumophila* utilise son T4SS pour déplacer plus de 200 protéines effectrices dans la cellule hôte, où elles jouent un rôle important dans le remodelage de l'architecture de la cellule hôte afin de créer une vacuole appropriée pour la réplication bactérienne.

Type V

Contrairement à d'autres substrats sécrétés qui traversent la membrane bactérienne à l'aide d'un appareil de sécrétion ou d'un canal dédié. Ces protéines ou des groupes de protéines

portent leur propre domaine β -baril, qui s'insère dans la membrane extérieure et qui forme un canal. Étant donné que la sécrétion de protéines par T5SSs se produit uniquement dans la membrane externe, ces protéines doivent d'abord être translocation à travers la membrane interne et dans le périplasma dans un état non replié par le système Sec. Par conséquent, les protéines T5SS portent une séquence signal N-terminale Sec qui est séparé par clivage lors de leur passage dans le périplasma.

La plupart des substrats de T5SS qui sont bien connus sont des protéines de virulence, servant comme toxines et des protéines de liaison aux récepteurs. Quelques exemples de substrats T5SS qui jouent des rôles importants dans la pathogénicité comprennent une protéase de l'immunoglobuline A, de *N. gonorrhoeae*, la protéine IcsA de *Shigella flexneri*, ce qui favorise la motilité intracellulaire actine dépendante et sert également comme adhésine.

T5SSs peut être divisée en trois classes, en fonction du nombre de protéines impliquées dans le processus de sécrétion. Ces classes comprennent

- la sécrétion par mécanisme auto-transporteur,
- la sécrétion par mécanisme à deux partenaires
- sécrétion à chaperon

1. la sécrétion par mécanisme auto-transporteur

C'est la forme la plus simpliste de ce type de transporteur, comme son nom l'indique, auto-transporteurs ; contiennent des composants qui leur permettent de s'auto- sécréter. Plus précisément, ils contiennent 3-4 domaines:

- un domaine de translocation à l'extrémité C-terminale qui forme le canal de la membrane externe.
- un domaine de liaison,
- d'un domaine passager qui contient la partie fonctionnelle de la protéine auto-transporteur, et parfois, un domaine de protéase qui clive après le domaine passager lorsqu'il passe à travers le canal.

La sécrétion à travers ce système s'effectue de la manière suivante :

À la suite de la sécrétion de la protéine auto-transporteur (forme non repliée) à travers la membrane interne, le domaine de translocation est assemblé dans la membrane externe, formant ainsi un β -baril de 12 brin, généralement avec l'aide d'un certain nombre de facteurs accessoires, (y compris le chaperon périplasmique Skp et le complexe Bam). Le domaine de liaison souple entraîne alors le domaine passager à travers le canal vers l'extérieur de la cellule. Une fois que le domaine transporteur a atteint l'extérieur de la cellule, il est soit libéré par son propre domaine de la protéase ou reste attachée au domaine de translocation et fait saillie à l'extérieur de la cellule

2. la sécrétion par mécanisme à deux partenaires

Alors que la plupart des substrats T5SS sont sécrétés par l'intermédiaire du mécanisme auto-transporteur, quelques-uns dépendent de différents polypeptides pour leurs transports à l'extérieur de la cellule. Dans ce processus, une paire de protéines participe au processus de sécrétion, dans lequel un partenaire porte le domaine β -baril, tandis que l'autre partenaire sert de protéine sécrétée. Ce mécanisme est principalement responsable du transport de grandes protéines de virulence, tels que l'hémagglutinine filamenteuse de *Bordetella pertussis* et les adhésines de poids moléculaire élevé.

3. sécrétion à chaperon

Un troisième mécanisme implique des protéines sécrétées à l'aide de deux autres protéines:

- La protéine qui ouvrira la voie, elle forme la chaîne β -canon (baril) dans la membrane externe, et la protéine chaperon, une protéine périplasmique qui facilite le repliement de la protéine sécrétée avant sa livraison au canal formé par la première protéine. Ce mécanisme est couramment utilisé pour assembler les pilis à la surface des bactéries Gram-négatives, telles que P pili de certaines souches d' *E. coli*

Type VI

Les systèmes de sécrétion de type (T6SSs) sont les plus récents systèmes de sécrétion bactérienne à découvrir et, par conséquent, il y a encore beaucoup à apprendre au sujet de leur structure et les fonctionnements. Le type VI permet le transport de protéines dans des cellules réceptrices, eucaryotes et procaryotes. Contrairement à de nombreux autres systèmes de

sécrétion chez les bactéries à Gram-négatives caractérisées, le système de type VI est capable de transporter des protéines effectrices d'une bactérie à une autre, ces protéines sont censées jouer un rôle dans la communication des bactéries et des interactions avec l'environnement.

Ce système est assez conséquent, avec un maximum de 21 protéines codées dans un cluster de gènes contigus. (Treize de ces protéines semblent être conservées dans tous les T6SSs et sont pensés pour jouer un rôle structurel dans l'appareil de sécrétion).

Curieusement, T6SSs partagent une homologie structurale avec la queue du phage, et il a été suggéré (hypothèse) que T6SSs peut être le résultat de queue de bactériophages inversées qui éjectent des protéines à l'extérieur de la cellule bactérienne, plutôt que de les injecter à l'intérieur de la cellule. Il a été proposé que des composants structurels du dispositif de T6SS puissent également servir de protéines effectrices. Ces effecteurs ont de nombreuses formes et fonctions, dirigés contre la paroi de la cellule bactérienne et la membrane, ils ont pour rôle la promotion de la compétition des bactéries.

Systèmes de sécrétion chez les bactéries à Gram+

Chez les bactéries à Gram +, le système Sec est plutôt plus complexe qu'il en est chez les bactéries à Gram-, un homologue de SecA (SecA1 et SecA2). SecA1 est essentiel, il intervient dans le système de sécrétion Sec. SecA2 est requis pour la sécrétion dans des conditions expérimentales (conditions de laboratoire) et les protéines secrétées sont généralement de protéines de réponse au stress et des protéines intervenant dans la modification de la paroi.

Chez les bactéries possédant des parois modifiées tel que les Mycobactéries et les Corynebactéries (parois riches en lipides et très dense très hydrophobes) une vraie barrière contre le stress environnemental et les thérapies antibactériennes. Toute fois cette paroi forme un véritable obstacle à la sécrétion de protéines, à cet effet ses micro-organismes utilisent un type de transporteurs membranaire appelé type VII (identifié en 2003 chez *Mycobacterium tuberculosis*)

Les composantes structurelles fondamentales de T7S, et souvent leurs substrats, sont généralement codés en groupes de gènes liés. Ces éléments de base, appelés EccB, EccC, EccD, EccE et MycP, sont toutes les protéines membranaires. Tous sauf EccD, elles possèdent toutes des domaines hydrophobes et ainsi tout peuvent interagir avec divers autres

composants accessoires dans le cytoplasme ou la couche de peptidoglycane, EccA, peut fournir la source d'énergie pour le transport de substrat.

Les quatre protéines associées à la membrane forment un grand complexe de membrane interne, qui contient vraisemblablement un canal par lequel les substrats traversent. La cinquième composante, MycP, est un mycosin, ou subtilisine protéase. Le rôle de la protéine MycP n'est pas complètement compris, cependant, on pense qu'il joue un rôle important dans la régulation de la sécrétion.

Chapitre III : *Influence de l'environnement sur la croissance*

Stress thermique, osmotique, acide et stress oxydatif

1- La croissance bactérienne

La croissance bactérienne peut être vue sous deux aspects : **la croissance cellulaire** en termes de taille, de masse, de volume. Et l'augmentation de la population par **division cellulaire**. Le métabolisme cellulaire (comprenant l'anabolisme et le catabolisme) conduit à la synthèse d'une masse cellulaire qui se traduit par une augmentation de la masse sèche. Cette masse cellulaire est le résultat d'un ensemble de processus cellulaire hautement coordonné. Lorsqu'une masse critique est atteinte les cellules entament un processus de division qui abouti à la naissance de deux cellules filles.

La croissance bactérienne est observée sur milieu liquide (bouillon de culture) ou solide (sur support solide tel que la gélose)

Lorsqu'un milieu liquide favorable est inoculé par une souche bactérienne, on peut réaliser un suivi de la croissance par des mesures spectrales en fonction du temps. Cette cinétique est appelé la courbe de croissance.

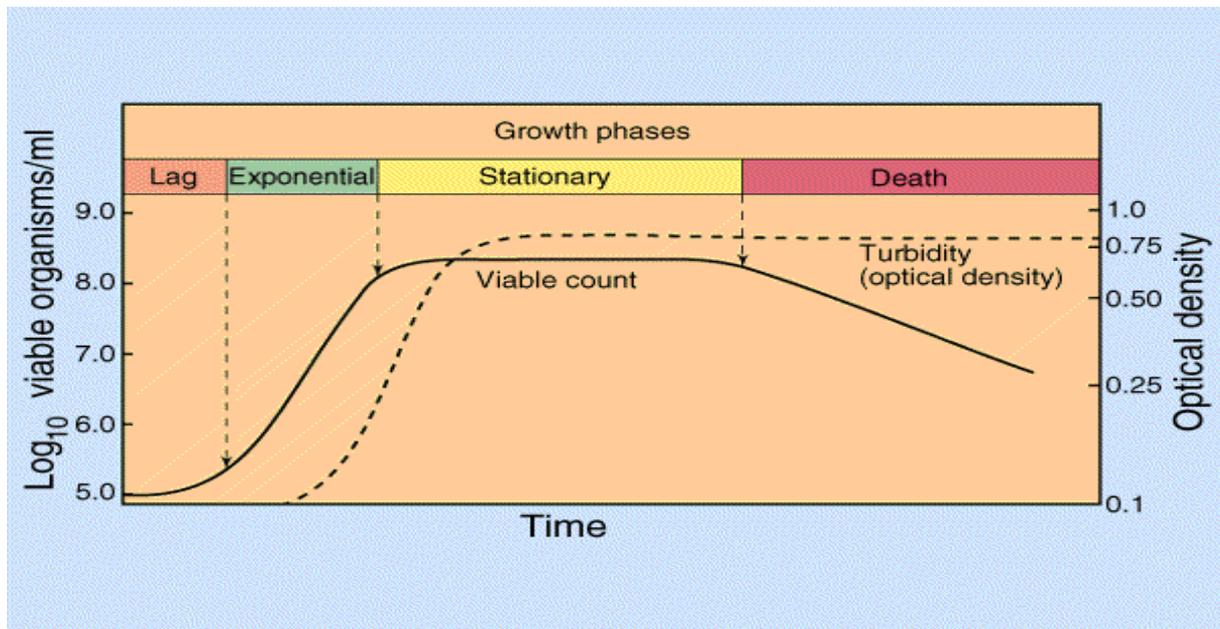


Figure 7 : La courbe de croissance est généralement divisée en 4 parties

- La phase de latence :

Lorsque les bactéries sont introduites dans un milieu de culture frais, elles ne commencent pas généralement à augmenter le nombre de cellules dans l'immédiat. Dans un premier temps, la division cellulaire n'a pas lieu, mais il y a une augmentation de la masse cellulaire; la synthèse de nouvelles molécules (composants nécessaires à la croissance), tels que l'ARN, les ribosomes, les enzymes et cofacteurs. Cette phase peut varier considérablement en longueur et peut être très longue selon la condition initiale des micro-organismes, par exemple, si l'inoculum provient d'une culture vieille ou il a été réfrigéré, si l'inoculation est effectuée dans un milieu chimiquement différent de la culture de départ. D'autre part, elle peut être courte ou absent, lorsqu'il s'agit d'une culture en phase exponentielle qui est transférée vers un milieu frais de même nature.

- La phase exponentielle (logarithmique) :

Pendant la phase exponentielle il y a croissance et division cellulaire, le nombre de cellule augmente. La vitesse de croissance est constante, cela signifie que les cellules se divisent avec un temps constant. Le doublement de la population est uniforme en termes de propriétés chimiques et physiologiques. Dans ces conditions tous les constituants cellulaires sont synthétisés à un taux constants (croissance équilibrée).

Néanmoins, en laboratoire dans des conditions expérimentales lorsque les bactéries sont cultivées en batch, elles maintiennent une croissance équilibrée que pour de courtes périodes

de temps en raison de la baisse des concentrations en nutriments et l'augmentation des concentrations de déchets.

Afin d'obtenir une culture en croissance exponentielle à l'état d'équilibre, les bactéries sont soit diluées soit cultivées dans un chemostat.

- **Phase stationnaire :**

C'est une phase de rééquilibrage, les cellules cessent de se multiplier et le métabolisme ralentit.

En situation de carence ou de stress, la bactérie peut adopter deux types de stratégie pour sa survie :

1 - la bactérie se différencie vers une forme de résistance métaboliquement inactive, c'est le cas chez *Bacillus* qui produisent une spore.

2 - la bactérie développe des systèmes de régulation pour contrôler cette période de carence en adaptant son métabolisme pour faire un maximum d'économie. C'est le cas d'*Escherichia coli*.

Dans ce type de situation, la bactérie présente les adaptations suivantes :

- Dégradation de l'ARN cellulaire total, libérant des nucléotides utilisables pour la synthèse de nouveaux ARN ou comme source d'énergie.

- Augmentation de cross-link au niveau du peptidoglycane.

- Dégradation des protéines : libération d'acides aminés réutilisés ou dégradés pour la production d'énergie

- Mise en œuvre de systèmes de transport et d'assimilation comme substituts aux éléments manquants qui sont essentiellement les composés azotés, phosphorés, carbonés et le fer.

- Synthèse de **protéines de stress** qui protègent la bactérie de la privation de nutriments et d'autres stress (existence de gènes impliqués dans les phénomènes de carence ou de stress).

- Augmentation de la production de ppGpp un effecteur de l'ARN polymérase.

- **Phase de déclin :**

Une lyse cellulaire est déclenchée lorsque les cellules ne peuvent plus se maintenir

2- La division cellulaire

La division cellulaire, dans son sens le plus large, est le processus qui génère deux descendants viables à partir d'une cellule souche. Cela implique deux événements majeurs qui sont bien coordonnés: la réplication et la ségrégation du chromosome bactérien et la division de la cellule progénitrice par la cytokinèse, ce qui est également connu chez les bactéries par la formation du septum (cloison)

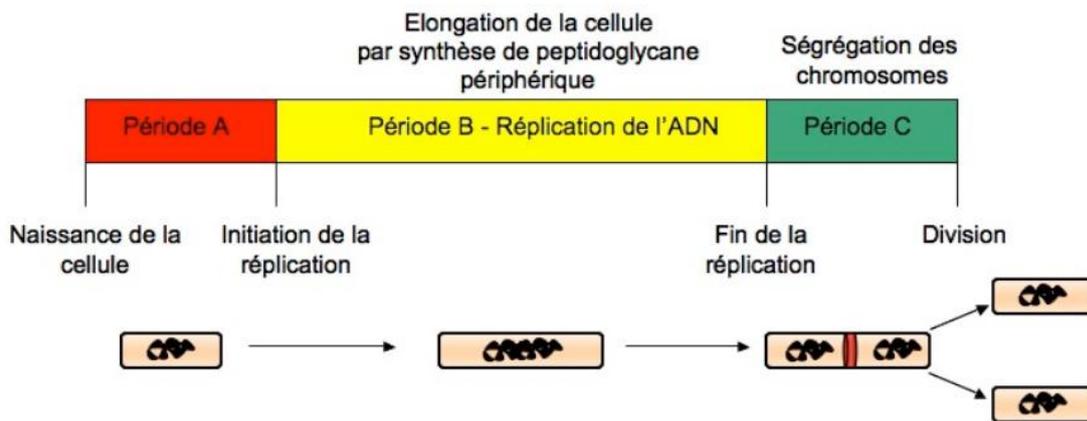


Figure 8 : Cycle cellulaire chez les bactéries

Le cycle cellulaire bactérien

En croissance lente, le cycle cellulaire bactérien est divisé en 3 périodes bien définies :

- **La période A**, de la naissance de la cellule à l'initiation de la réplication de l'ADN
- **La période B**, de l'initiation à la fin de la réplication (dans la majorité des cas, la croissance cellulaire est concomitante à la réplication de l'ADN) cette période dure 40 min et elle est constante.
- **La période C**, d'une durée de 20 min, de la fin de la réplication à la division cellulaire. La séparation des chromosomes frères commence dès l'initiation de la réplication. La division commence dès que la ségrégation des chromosomes est achevée ou en phase d'achèvement

Modèle de la division cellulaire :

Le modèle cinétique général de la division cellulaire (la cytokinèse) comprend les étapes suivantes:

- La sélection du site de division, généralement au milieu de la cellule (cytokinèse symétrique), entre les deux nucléoïdes nouvellement dupliqués et ségrévés (le nucléoïde définit la zone où est concentrée l'ADN bactérien et les protéines qui lui sont rattachées).
- La formation d'un anneau stable de polymères de la protéine FtsZ, **l'anneau Z**, au niveau du futur site de division (septation) des deux cellules filles.
- L'assemblage d'un complexe multi-protéique membranaire, ou septosome, au niveau de la « charpente » formée par l'anneau Z.
- L'activation par ce complexe membranaire de la machinerie de synthèse du peptidoglycane septal responsable de l'invagination du manteau cellulaire (comprenant la ou les membranes plasmiques et le peptidoglycane).
- La séparation physique des deux cellules filles.

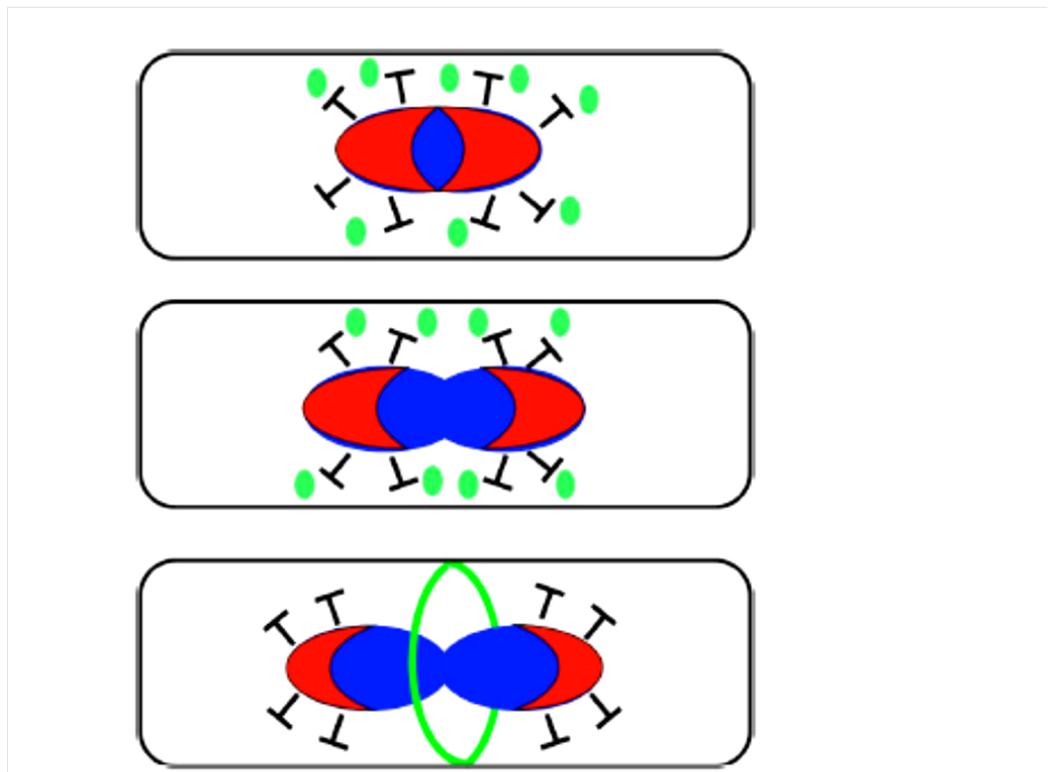


Figure 9 : représentation des mécanismes d'action des protéines Noc et SlmA au cours de la réplication du chromosome

Le nucléoïde est représenté en bleu. Les protéines Noc (*B. subtilis*) ou SlmA (*E. coli*) sont représentées en rouge. Les monomères de FtsZ sont représentés par des sphères vertes.

L'anneau Z (polymères de FtsZ) est représenté en vert. L'inhibition de la polymérisation de FtsZ par les protéines Noc ou SlmA est représentées par des T noirs

Chez les bactéries Gram positives, le septum est formé puis ensuite clivé ; tandis que chez les bactéries gram négatives, le clivage du septum est concomitant à la cytokinèse

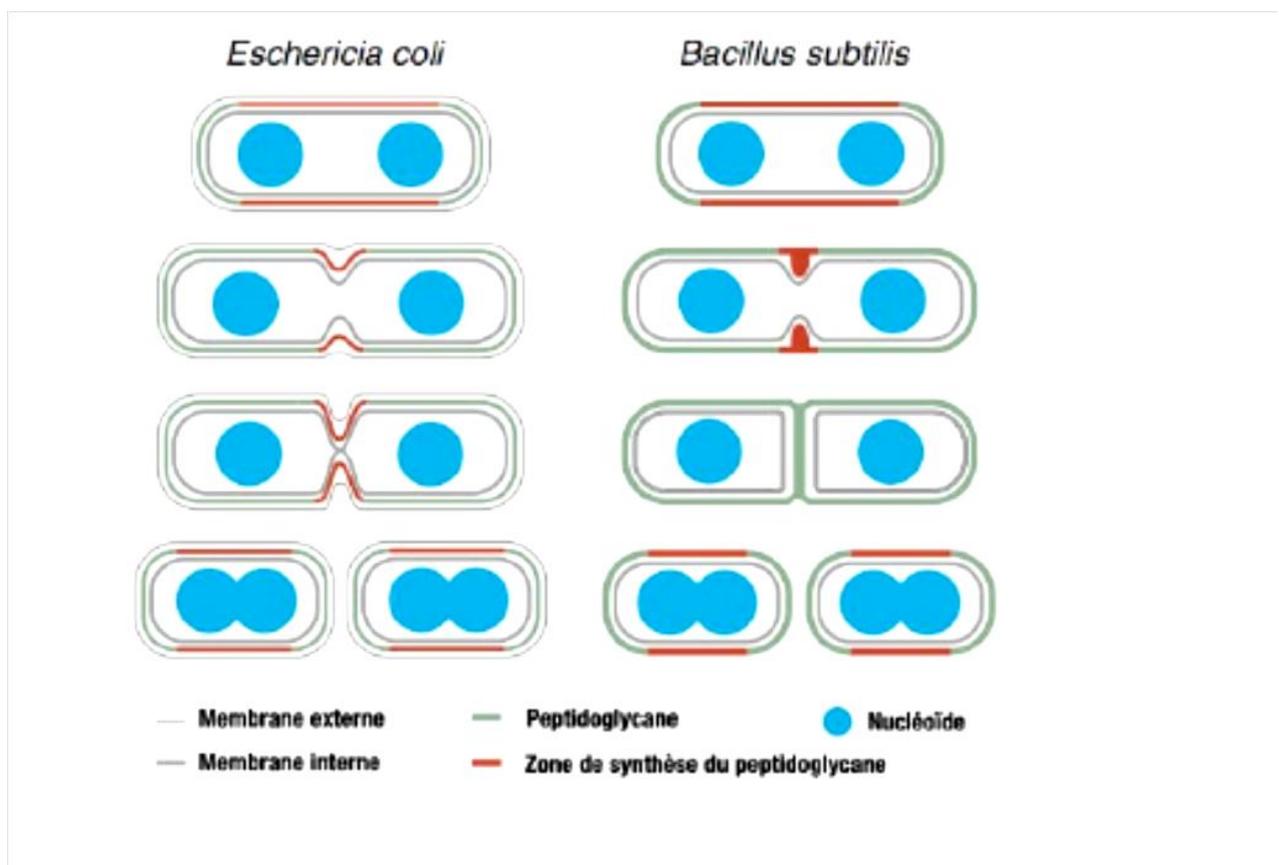


Figure 10 : Schéma du processus de construction et de séparation des deux cellules filles chez *E. coli* et *B.subtilis*

Influence de l'environnement

Si les courbes de croissances bactériennes sont souvent dessinées avec le même aspect, dans la nature il en est de rien. En effet la croissance bactérienne est largement tributaire de son environnement. Il existe plusieurs paramètres qui influencent leurs croissances :

L'Oxygène O₂ :

L'O₂, utilisé dans la respiration cellulaire, s'il est élémentaire pour certaines bactéries, il constitue un vrai poison pour d'autres. On distingue :

Les bactéries **aérobies strictes** qui ne se développent qu'en présence de l'air. On parle de respiration. L'oxygène moléculaire joue le rôle de l'accepteur d'électron, il est réduit en eau (*Pseudomonas, Acinetobacter, Neisseria*).

Les bactéries **microaérophiles** se développent mieux ou exclusivement lorsque la pression partielle d'oxygène est inférieure à celle de l'air (*Campylobacter, Mycobacteriaceae*).

Les bactéries **aéro-anaérobies** facultatives se développent avec ou sans air. C'est le cas de la majorité des bactéries rencontrées en pathologie médicale : les entérobactéries (*Escherichia, Salmonella*), les streptocoques, les staphylocoques.

Les bactéries **anaérobies strictes** ne se développent qu'en absence totale ou presque d'oxygène qui est le plus souvent toxique. Ces bactéries doivent être cultivées sous atmosphère réductrice. C'est le cas des bactéries intestinales (*Bacteroides, Fusobacterium, Clostridium*) et de nombreuses bactéries présentes dans les flores normales de l'organisme. La production d'énergie se fait grâce aux cytochromes membranaires couplés à des phosphorylations oxydatives mais en l'absence d'oxygène moléculaire.

La toxicité de l'oxygène réside dans la production de radicaux superoxydes que certaines bactéries ne peuvent pas détruire (bactéries dites anaérobies)

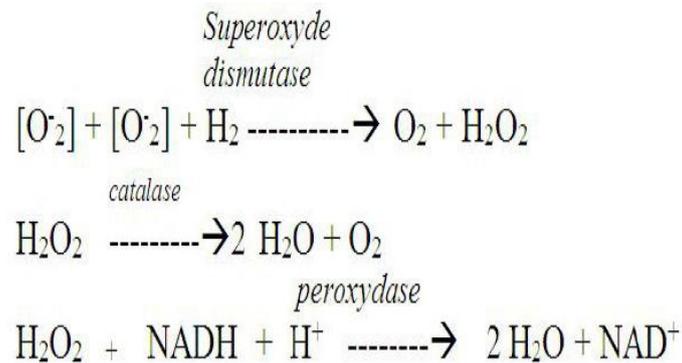


Figure 11 : Action de la superoxyde dismutase, de la catalase et de la peroxydase

La présence de l'oxygène devienne alors un facteur de stress appelé **stress oxydatif**. La présence de radicaux superoxydes s'attaquent aux différents constituants cellulaires (protéines, acides lipidiques, acides nucléiques...)

La température

La température de l'environnement affecte dans un premier temps l'activité enzymatique ce qui a des répercussions sur le métabolisme. Une augmentation ou baisse dans la température à des conséquences sur la fluidité membranaire. Les variations de température génèrent ce qu'on appelle le stress thermique.

Les bactéries prospèrent dans des environnements dont les températures échelonnent entre le 0°C et les 120°C. A ce titre on distingue :

- Bactéries **mésophiles** (Ex. : *Escherichia coli*) : température de croissance proche de celle du corps humain (37°C)
- Bactéries **thermophiles** (Ex. : *Thermus aquaticus*) : températures de croissance comprises entre 45°C et 70°C.
- Bactéries **hyperthermophiles** (Ex. : *Archaea*) : températures de croissance supérieures à 80°C.
- Bactéries **psychrophiles** (Ex. : *Pseudomonas*) : Températures proches de 0°C (optimum à 10-15°C).

- Bactéries **psychrotrophes** (Ex. : *Pseudomonas*) : températures de croissance proches de 0°C avec optimum de croissance proche des bactéries mésophiles

L'eau libre et pression osmotique

L'activité de l'eau (AW) ne représente pas la teneur en eau (ou humidité) mais bien la disponibilité de cette eau. Plus l'activité de l'eau est élevée, plus la quantité d'eau libre est grande (1 étant le maximum) Ce paramètre traduit les interactions de l'eau avec une matrice. L'AW elle est affectée par la présence plus ou moins importante de **sels** ou de **sucres** dissous dans l'eau. On peut définir les catégories suivantes :

Présence de sels

- Les **bactéries halophiles** nécessitent du sel (NaCl) pour leur croissance. Cette concentration peut varier de 1-6% pour les faiblement halophiles jusque 15-30% pour les bactéries **halophiles extrêmes** (*Halobacterium*). Dans ce cas, la bactérie accumule des quantités importantes de potassium pour rester hypertonique par rapport à son environnement.
- Les **bactéries halotolérantes** acceptent des concentrations modérées de sels mais non obligatoires pour leur croissance (Ex. : *Staphylococcus aureus*).

Présence de sucres

- Les **bactéries osmophiles** nécessitent des sucres pour leur croissance.
- Les **bactéries osmotolérantes** acceptent des concentrations modérées de sucres mais non obligatoires pour leur croissance.
- Les **bactéries xérophiles** peuvent se multiplier en l'absence d'eau dans leur environnement.

L'eau à l'extérieur des cellules joue un rôle dans le mouvement des solutés et de la concentration de celles-ci. Certains solutés tel que le Mg ou le Fe sont importants dans l'activité enzymatique (co-facteur) ils sont déstabilisés facilement par le mouvement de l'eau, d'autre part les protéines coagulent en présence de forte concentration de sels.

Le pH

Le pH ou potentiel d'Hydrogène, représente la concentration en $[H^+]$. Le pH est un élément important pour les réactions biochimiques ainsi que les structures des macromolécules tel que l'ADN et les protéines. On terme d'adaptation on distingue :

- Les bactéries **neutrophiles** se développent pour des pH sont compris entre 5,5 et 8,5 avec un optimum voisin de 7.
- Les bactéries **alcalophiles** préfèrent les pH alcalins: cas de *Pseudomonas* et *Vibrio*.
- Les bactéries **acidophiles** se multiplient mieux dans des milieux acides : cas des *Lactobacillus*

La pression

Généralement les bactéries supportent assez bien la pression cependant il existe des bactéries qui nécessitent des pressions élevée pour croître.

- Baro-tolérants (facultatif) : poussent à des pressions de 100 – 500
- Barophile (obligatoire): poussent à des pressions 400 – 500
- Barophile Extrême: poussent à des pressions supérieures 500 Atm.

Chapitre III : Réponses au stress nutritionnel chez les bactéries

Le stress chez les bactéries

Un micro-organisme survit et se développe lorsqu'il se trouve dans un état d'équilibre dynamique caractérisé par un cycle d'échanges avec le milieu extérieur. Une perturbation chimique ou physique survenant dans son environnement proche peut induire un éloignement de cet équilibre qui se traduit par un stress cellulaire.

Face à ces stress, les bactéries peuvent répondre par différentes stratégies :

- ▶ fuir le stress (bactéries possédant un ou des flagelles) ;
- ▶ produire des facteurs de virulence tels que des toxines (cas des bactéries pathogènes lors de l'attaque invasive) ;
- ▶ former des spores de résistances (*Clostridium* sp., *Bacillus* sp.) ;
- ▶ se développer sous la forme de biofilm ;
- ▶ éliminer le stress (dégradation des molécules toxiques tels que les antibiotiques) ;
- ▶ tolérer le ou les stress : réparation des dommages intracellulaire et adaptation physiologique et moléculaire.

Implication technologiques

Au cours des procédés industriels mettant en œuvre des micro-organismes (production et/ou incorporation de micro-organismes dans des produits finis), les stress physico-chimiques peuvent apparaître de façon brutale. Il peut s'agir de changements de température, de l'apparition de molécules toxiques, de variations de pression osmotiques qui peuvent affecter les cellules, influencer l'activité fonctionnelle des micro-organismes et entraîner une perte de viabilité ou d'activité. La production d'une bactérie en vue d'une application industrielle comporte plusieurs étapes clés qui peuvent devenir critiques si l'impact des stress technologiques sur la physiologie du micro-organisme n'est pas maîtrisé.

Mécanismes senseurs de stress

La mise en place des réponses au stress passe en premier lieu par la perception du stress permettant de déclencher les différents mécanismes de régulation. Les mécanismes de perception du stress sont encore peu connus. Cependant, les systèmes identifiés indiquent que la perception peut se faire aux niveaux membranaire ou cytoplasmique.

Systèmes à 2 composants

La membrane est une zone privilégiée pour percevoir tout changement de l'environnement car elle constitue le point de contact entre le "monde extérieur" et la cellule. Les systèmes à 2 composants (TCS) assurent la double fonction de détecteur d'un changement environnemental et d'inducteur de la réponse. Ces systèmes, mis en évidence chez de nombreuses espèces, sont constitués de 2 protéines : une histidine kinase (HK) ancrée dans la membrane et responsable de la perception du signal environnemental et un régulateur de réponse (RR) cytoplasmique assurant la transduction du signal *via* sa propriété d'ADN "binding" protéine. Sous l'influence d'un signal environnemental spécifique, un changement de conformation de l'HK assure son autophosphorylation sur un résidu histidine par un mécanisme qui reste encore mal compris. Le phosphate est ensuite transféré sur un résidu aspartate du RR associé, le RR ainsi activé devient capable d'induire la réponse au stress appropriée en stimulant la transcription de gènes spécifiques.

Pools intracellulaires

La perception du stress au niveau du cytoplasme est possible lorsque le signal parvient directement dans la cellule ou lorsqu'elle peut percevoir un des effets du stress sur le métabolisme ou les constituants macromoléculaires.

Les ribosomes pourraient être de bons indicateurs de l'état physiologique de la cellule en reflétant sa capacité de traduction, processus essentiel au fonctionnement de la cellule. Leur rôle de senseur de stress a été mis en évidence lors des stress hypo et hyperthermiques chez *E. coli*

Par ailleurs, d'autres senseurs de stress peuvent être envisagés. Lors de stress nutritionnels de type carence en acides aminés, l'augmentation de la proportion

d'ARN de transfert non chargés déclenche le mécanisme de réponse stringente en activant la synthèse de (p)ppGpp. L'endommagement des constituants macromoléculaires (ADN, protéines) pourrait constituer un autre type de signal de stress. L'accumulation de protéines dénaturées semble ainsi induire la réponse "heat shock" chez *E. coli*.

Réponse générale au stress

La notion de réponse générale au stress (GSR) peut être définie comme la réponse observée dans l'ensemble des conditions de stress rencontrées par la cellule. Cependant, chez *E. coli* et *B. subtilis*, ces réponses sont principalement sous le contrôle des facteurs σ alternatifs σ^S et σ^B respectivement. Les facteurs σ dits alternatifs autorisent la transcription de nouveaux groupes de gènes en permettant la reconnaissance spécifique de leurs promoteurs déviant du consensus. Les facteurs σ^S et σ^B sont essentiellement impliqués dans le contrôle de l'expression lors de la transition en phase stationnaire mais également en stress osmotique, thermique ou éthanol.

Quelques définitions :

- **Opéron** : ensemble de gène contigus sous control d'un seul promoteur.
- **Régulon** : ensemble d'opérons (ou gènes) régulé par la même molécule. Ils peuvent ne pas être contigus sur le génome.
- **Modulon** : groupe d'opérons, de régulons qui sont contrôlées par des protéines régulatrices individuelles (régulateur global commun).
- **Stimulon** : Ensemble de gènes qui répondent au même stimulus

Les produits des gènes ont une fonction commune. On peut définir les modulons suivants :

1. modulon de nutrition et énergie.
2. modulon de réponse au stress
3. Modulon de différenciation cellulaire
4. Modulons d'agrégation / interaction cellule-cellule

Epuisement nutritionnel

On parle d'épuisement nutritionnel lorsque l'un des éléments qui constitue une source élémentaire dans la nutrition de la bactérie vient de diminuer drastiquement, voir disparaître.

La réponse stringente

Lorsque les bactéries sont confrontées à des carences nutritionnelles, l'expression globale de leurs gènes est modifiée de façon à inhiber leur croissance, économiser de l'énergie et assurer leur survie jusqu'à la fin de la carence.

La réponse stringente a été initialement caractérisée lors de la carence en acides aminés comme étant le mécanisme responsable du contrôle négatif de la transcription des ARN.

La synthèse des macromolécules (protéines et des acides nucléiques), notamment les ARN stables, diminue alors que la dégradation des protéines et la synthèse d'acides aminés augmentent. Ce phénomène global est le résultat de l'intervention d'un réseau de régulation très complexe, appelé « réponse stringente », dont les effecteurs sont deux molécules signal : les nucléotides guanosine penta- et tétraphosphate, regroupés sous l'abréviation (p)ppGpp.

Lors de carences, ces molécules sont synthétisées et modifient la transcription globale. D'une part, elles inhibent la transcription des ARN stables, stoppant ainsi la croissance. D'autre part, elles activent la transcription de gènes nécessaires à la survie, par exemple les gènes de biosynthèse d'acides aminés. Quand les conditions redeviennent favorables, ces molécules sont dégradées et la croissance peut alors redémarrer.

Le (p)ppGpp peut être formé à partir du GDP et du GTP par une activité 3'-pyrophosphohydrolase utilisant l'ATP comme donneur de phosphate.

Chez *E. coli*, cette activité est assurée par 2 enzymes.

- La (p)ppGpp synthétase I (RelA) possède uniquement une activité de synthèse et conduit à la formation de ppGpp ou pppGpp en utilisant indifféremment le GDP ou le GTP.
- La (p)ppGpp synthétase II (SpoT) possède une activité de synthèse et une activité de dégradation qui est majoritaire.

La régulation concertée de ces 2 enzymes permet de contrôler le pool de (p)ppGpp en réponse à l'environnement. Le signal déclencheur de la synthèse de (p)ppGpp est l'accumulation dans la cellule d'ARN de transfert non chargés. Lorsque ces derniers viennent se positionner dans

le site A du ribosome, ils déclenchent l'activation de RelA fixée à la sous-unité 70S du ribosome. Cependant, alors qu'en carence en acides aminés, l'accumulation de (p)ppGpp semble assurée par RelA, lors de la carence en carbone, SpoT contrôlerait ce pool en voyant son activité de synthèse augmenter et/ou son activité de dégradation diminuer.

En premier lieu, la réponse stringente assure le contrôle négatif de la transcription des ARN ribosomiaux et des ARN de transfert (car les opérons *rrn* possèdent des promoteurs sensibles au (p)ppGpp). Parallèlement, l'expression des protéines ribosomiales est massivement affectée, de même que la formation des facteurs d'initiation et d'élongation de la traduction. Chez *E. coli*, ceci peut conduire à une inhibition de la vitesse de traduction de l'ordre de 90 %.

La transcription semble également affectée. (Puisqu'une sous-expression des gènes codants pour l'ARN polymérase et des facteurs de terminaison de la transcription a été mise en évidence chez *B. subtilis* et *E. coli* (*rpoB* et *C*) La vitesse de transcription est ainsi réduite d'un facteur 2 lors de la carence en isoleucine chez *E. coli*. La réplication serait également contrôlée négativement par la réponse stringente. En association avec ce contrôle négatif de la transcription et la réplication, le métabolisme des purines et pyrimidines est réprimé comme le confirme la sous-expression de 29 gènes chez *E. coli* et 3 gènes chez *B. subtilis*. De plus, certaines voies impliquées dans le métabolisme énergétique, comme l'ATPase et les NADH déshydrogénases, seraient contrôlées négativement. Enfin, la formation de la membrane ainsi que le métabolisme des lipides et des acides gras sont affectés lors de la réponse stringente.

Parallèlement à ce contrôle négatif des principaux processus physiologiques liés à la croissance, la réponse stringente assure un contrôle positif. Ce contrôle s'exerce en premier lieu sur certains opérons de biosynthèse des acides aminés, cependant il ne semble pas être généralisé à l'ensemble des acides aminés. Une induction des opérons histidine et arginine a été observée chez *E. coli* alors que chez *B. subtilis*, les voies de biosynthèse de l'arginine, l'histidine

Réponse à la carence en azote

L'azote est essentiel en tant qu'élément nécessaire pour la synthèse des acides aminés et des bases des acides nucléiques. L'azote (sous forme d'ammonium NH_4 ou ammoniac NH_3) est assimilé en composés organiques azotés par l'action de la glutamate déshydrogénase et de la glutamine synthétase. Étant donné que l'affinité de la glutamate déshydrogénase pour l'azote

est faible, sous faibles concentrations en azote, l'azote est alors, assimilé par la glutamine synthétase qui a une affinité plus importante.

Le système global de régulation de l'azote (Ntr) est composé de quatre enzymes:

- une uridylyltransferase (UTase / UR), codée par le gène *glnD*,
- glutamine synthétase (*glnA*)
- PII, encodé par *glnB*,
- Protéine NR_I (*glnG*)

L'azote inactive l'expression du régulon *nif* dans les microorganismes qui fixent l'azote. Le facteur alternatif sigma est le médiateur de cette régulation.

Escherichia coli transcrit faiblement le gène de la glutamine synthétase (*glnA*) dans des conditions riches en azote pour fournir de la glutamine en tant que donneur d'amine. Sous contrôle du facteur SigmaD (sigma70), mais le même gène est transcrit avec l'aide de sigma N (sigma 54) sous des conditions carencées en azote.

La transcription de la *glnA* assistée par sigma N nécessite la liaison avec la protéine NR_I déphosphorylée. GlnG et NtrC sont la même protéine. Sur la région amplificatrice, en amont du gène. La protéine NR_I est phosphorylée par une cascade complexe de réactions afin de transcrire le gène *glnA*.

La disponibilité de l'azote détermine le ratio de 2-cétoglutarate / Glutamine (2KG / Gln). Celui-ci augmente lorsque l'apport en azote est limitant. Ce rapport 2KG / Gln régule l'activité enzymatique ; uridylylase / deuridylylase de la protéine P II (produit du gène *GlnB*).

Lorsque l'apport en ammonium est limitant, la PII (uridylylates) transforme la forme P IIA à la forme P IID [P II (UMP)₄] consommant 4 UTP. PIIA forme un complexe avec une autre protéine, la NR_{II}. Lorsque la concentration en azote est élevée, et la protéine NR_{II} est libérée. Le complexe P II A-NR II possède une activité phosphatase sur le NRI phosphorylé, tandis que le NR_{II} libre a une activité kinase sur NRI. Comme une conséquence de ces réactions, la protéine NR I est phosphorylée et active la transcription du gène *glnA* liant l'amplificateur. Lorsque l'apport en ammoniac est limité.

La transcription du régulon *nif* est régulée de la même manière, sous conditions limitées de

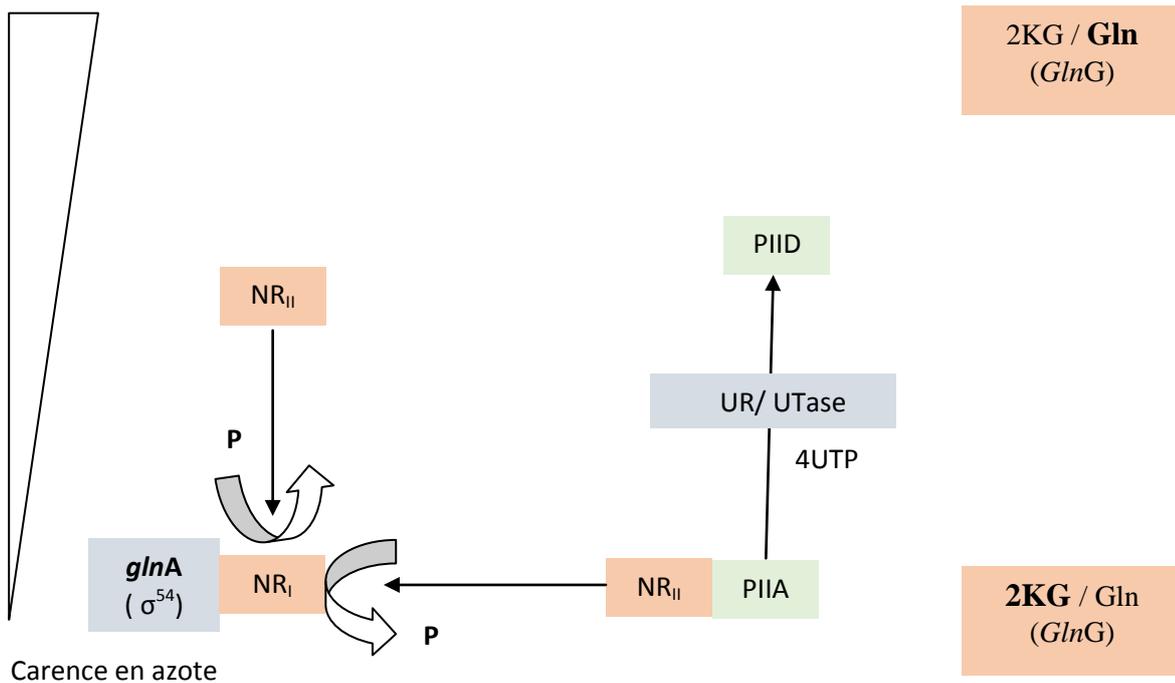


Figure 12 : Schéma de l'activation du gène *glnA* sous la

Carence en phosphate

Le phosphore est un élément abondant dans la nature mais il est très peu soluble ce qui le rend peu accessible au microorganisme. Sous une carence du phosphore *E. coli* produit une centaine de nouvelles protéines dont la phosphatase alcaline (PhoA). L'expression des gènes impliqués dans cette réponse sont sous control du système *pho*. Le système *pho* est un système a deux composants impliquant : les protéines sensor PhoU et PhoR, et la protéine modulatrice PhoB.

Lorsque la bactérie se trouve dans des conditions de carence, le système de transport membranaire du phosphate le ressent et l'information est reliée a la protéine PhoU. PhoR est phosphorylée (1ATP) PhoR transfère le phosphate a PhoB qui est alors activateur. Il active l'expression de plusieurs gènes *phoA*, *psiB*, *psiE*... etc.

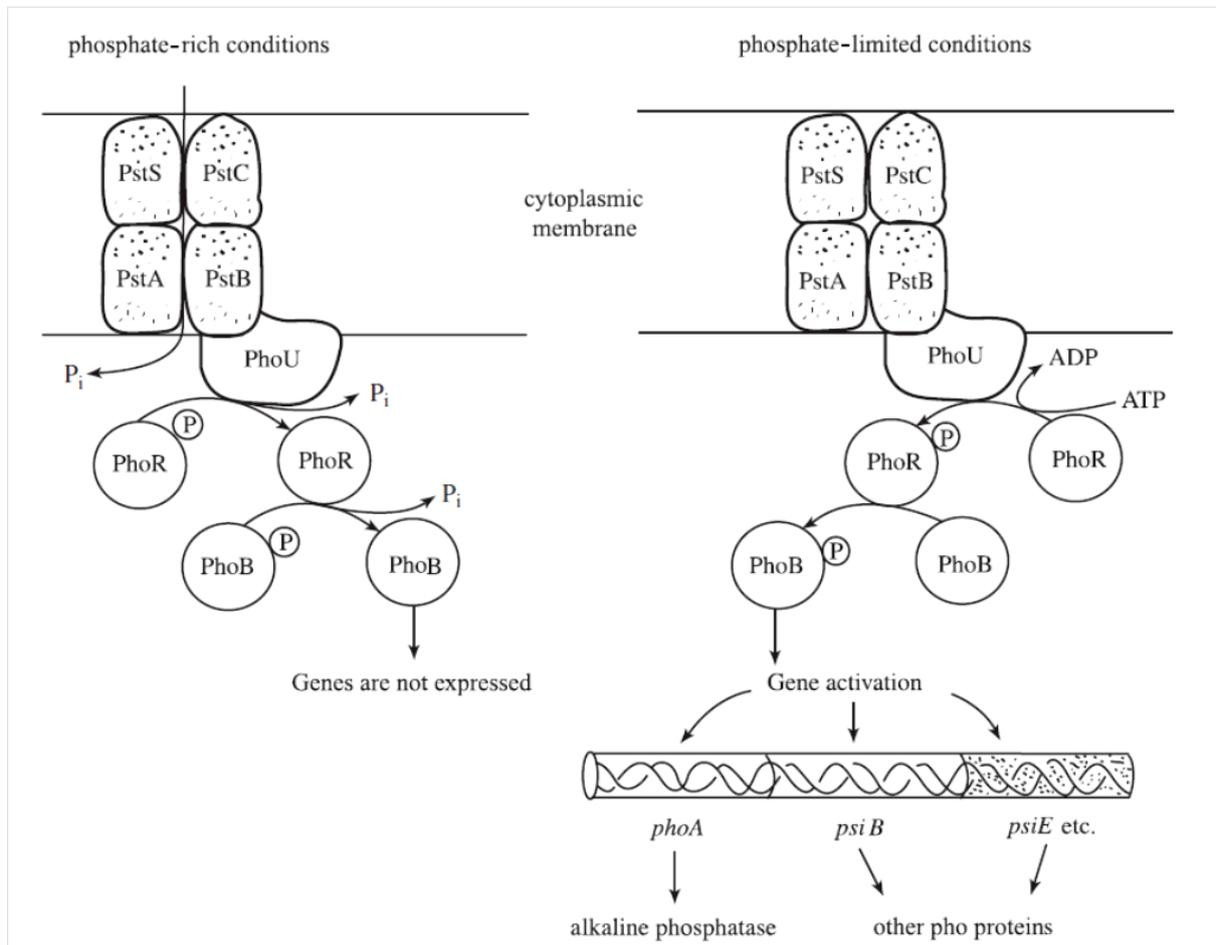


Figure13 : réponse a la carence en phosphate chez *E.coli*

Carence en fer

Le fer (Fe) est un micro-élément essentiel pour la plupart des microorganismes à l'exception des bactéries lactiques, ou le manganèse et le cobalt le remplace.

Le fer peut exister sous deux formes oxydées Fe^{2+} (fer ferreux) et Fe^{3+} (fer ferrique), il s'oxyde facilement dans un pH neutre en présence d'oxygène. Sa solubilité dans l'eau est très faible ce qui pose un problème pour les bactéries. Le fer est présent majoritairement sous forme ferrique. La réduction du fer ferrique en fer ferreux est une étape primordiale pour incorporer le fer dans les enzymes. Le fer peut être assimilé directement lorsqu'il se trouve dans le milieu environnant sous forme ferreux soit par diffusion directe à travers les porines de la membrane externe (Gram-).

Cependant beaucoup de bactérie synthétise et excrètent des molécules de faible poids moléculaire capables de chélater le fer, elles sont appelées les sidérophores. Les sidérophores forment des complexes avec le fer, elles sont ensuite récupérées par des systèmes de transport.

Le taux de fer (un stress réductif) dans les cellules est sous le contrôle du régulon Fur (ferric uptake regulator). Fur complexé aux ions réprime la synthèse de sidérophores et les systèmes de transport d'ions.

Chapitre IV : Réponse au stress thermique

Le stress thermique est induit lorsque les cellules sont confrontées à une augmentation de la température de leur environnement.

Dans des expériences menées sur la drosophile il fut observé qu'une élévation modérée de la température chez cet organisme induisait l'apparition d'un renflement (« puff ») au niveau des chromosomes géants des glandes salivaires ; ces renflements furent imputés à une activation locale importante de la synthèse d'ARN messagers. L'identification des gènes induits conduisit peu après à la description et au début de la caractérisation d'une nouvelle famille de protéines, les Heat Shock Protein (HSPs).

Par la suite, ce phénomène fut décrit dans d'autres tissus chez les espèces du genre *Drosophila* en réponse à d'autres stress environnementaux, puis observé au sein d'autres organismes autant procaryotes qu'eucaryotes.

Lorsque des cultures d'*E. coli* sont soumises à une augmentation de température allant de 30° à 42°C, les bactéries augmentent de façon transitoire le taux de synthèse des (HSPs). Beaucoup de ces HSP sont nécessaires pour la croissance cellulaire ou la survie à des niveaux élevés de températures.

Parmi les protéines induites sont :

- **DnaK** (membre de la famille de HSP70 doté d'une activité ATPase)
- **DnaJ** (HSP40) se lie à DnaK stimule son activité ATPase
- **GrpE** facteur d'échange se lie à DnaK accélère la libération d'ADP
- (rpoD), GroES, GroEL, la protéase Lon, et LysU.

Il ya près de 50 protéines inducibles par choc thermique identifiées dans *E. coli*, elles sont classé selon leur poids moléculaire : Hsp 27, Hsp32, Hsp 60, Hsp 70, Hsp90, Hsp110.

Beaucoup de ces protéines sont des protéines chaperones. Les protéines chaperones aident les autres protéines cellulaires à :

- se replier correctement pendant et après la traduction
- migrer vers localisation finale la ou elles vont fonctionner
- s'organiser lorsque ces protéines vont fonctionner en polymères.

Elles interviennent aussi dans la dégradation de protéines dénaturées pour éviter que celle-ci deviennent une menace en venant s'agréger à d'autres protéines.

La thermotolérance

Une étude datant de 1982 a mis en évidence un phénomène particulier baptisé **thermotolérance**. Ce fut la première description d'un rôle cytoprotecteur pour les HSPs. En effet, une brève exposition de fibroblastes de hamster à une augmentation de température sublétales, induit une résistance transitoire à un deuxième choc thermique a priori létal. Les auteurs ont identifié une correspondance entre les cinétiques d'acquisition de la thermotolérance et de synthèse des HSPs, ce qui suggère fortement l'implication de ces protéines dans ce processus. Ces résultats furent reproduits dans d'autres types cellulaires soumis à d'autres stress. De manière intéressante, l'induction des HSPs par une courte exposition à des températures élevées confère également un effet de protection croisée vis-à-vis d'autres formes de stress.

Les HSPs sont impliqués dans le rétablissement de l'homéostasie protéique au sein de la cellule après un stress. En effet, les processus de repliement et de réparation de protéines partiellement dénaturées requièrent moins d'énergie qu'une destruction systématique de l'ensemble des protéines endommagées, ce qui nécessiterait une synthèse de novo des protéines, et ce, à un coût considérable pour la cellule. C'est dans ce contexte qu'interviennent les HSPs, de par une de leurs fonctions principales qui est celle de « chaperon moléculaire ». Les HSPs sont capables d'interagir avec les protéines dénaturées afin de prévenir la formation d'agrégats protéiques, et d'assister des nouvelles protéines dans le recouvrement de leur structure tridimensionnelle native.

Les HSPs sont ubiquitaires ; leur présence est nécessaire pour assister le repliement protéique lors de la synthèse continue des protéines. Néanmoins leur expression doit être massivement augmentée en réponse à un stress, car les HSPs opèrent généralement dans un ratio stœchiométrique pour diminuer le potentiel d'agrégation des protéines. La réponse au stress est résolue par l'activation transcriptionnelle des gènes codants pour les formes inductibles des HSPs, ce qui mène à la prise en charge des protéines dénaturées. Lorsque les différentes altérations morphologiques consécutives au stress sont corrigées, les HSPs retrouvent leur niveau d'expression et leur activité de base.

L'ARN polymérase et les facteurs de transcription

Le cœur de l'enzyme ARN polymérase (ARNP) ou apoenzyme est composée de cinq sous-unités: deux sous-unité α , une sous-unité β , une sous-unité β' et une sous-unité ω ($\alpha_2 \beta \beta' \omega$). Les deux sous-unités α permettent l'assemblage de la molécule et lient des facteurs de régulation, la sous-unité β possède l'activité polymérase et β' assure la liaison à l'ADN, la sous-unité ω participe au bon repliement de la structure pentamérique. La reconnaissance spécifique des séquences promotrices par l'ARNP se fait par le biais d'une autre sous-unité : σ . L'association du facteur σ à l'ARNP crée l'holoenzyme (480 kDa), et diminue son affinité générale pour l'ADN, pour augmenter la reconnaissance pour certaines régions promotrices en fonction du facteur σ associé.

Les facteurs sigma sont des éléments indispensables à l'initiation de la transcription. Leur fixation permet à l'ARNP de reconnaître de façon spécifique une séquence promotrice. Chez *E. coli*, sept facteurs sigma ont été décrits $\sigma 70$ (σD), $\sigma 54$ (σN), $\sigma 38$ (σS), $\sigma 32$ (σH), $\sigma 28$ (σF), $\sigma 24$ (σE) et $\sigma 18$ ($\sigma FecI$), chacun étant requis pour l'expression d'un groupe de gènes spécifiques pour répondre à une condition particulière.

Le facteur sigma 70 ($\sigma 70$) est l'un des plus importants, il équipe l'ARNP pour la reconnaissance de la majorité des promoteurs responsables de l'expression des gènes dits « housekeeping ». Les autres facteurs sigma sont requis pour l'expression de gènes nécessaires lors de : la phase stationnaire ($\sigma 38$), la croissance en milieu à faible teneur d'azote ($\sigma 54$), la réponse au choc thermique ($\sigma 32$), le chimiotactisme ($\sigma 28$), le repliement de protéines dénaturées ($\sigma 24$) et le transport de citrate de fer ($\sigma FecI$). Les facteurs sigma sont classés dans deux groupes : la famille $\sigma 70$, pour tous les facteurs sigma structurellement proches de $\sigma 70$ et la famille $\sigma 54$ pour ceux qui sont structurellement différents.

Le facteur de transcription et régulation de la réponse HS

Un médiateur important qui induit cette production de HSPs est le facteur de transcription σ^{32} issu du gène *rpoH*. Dans des conditions optimales, sans stress, la concentration cellulaire de σ^{32} est maintenue entre 10 à 30 molécules par cellule à 30 °C.

Lors d'un stress à la chaleur, il y a une augmentation rapide du niveau de la protéine σ^{32} et de son activité. Au niveau transcriptionnel, *rpoH* est régulé par quatre promoteurs dont PI, P4 et

P5 sont sous le contrôle de σ^{70} (Sigma 70 est inactive a des températures elevées) et P3 est contrôlé par σ^{24} . L'utilisation de ces promoteurs change en fonction de la température.

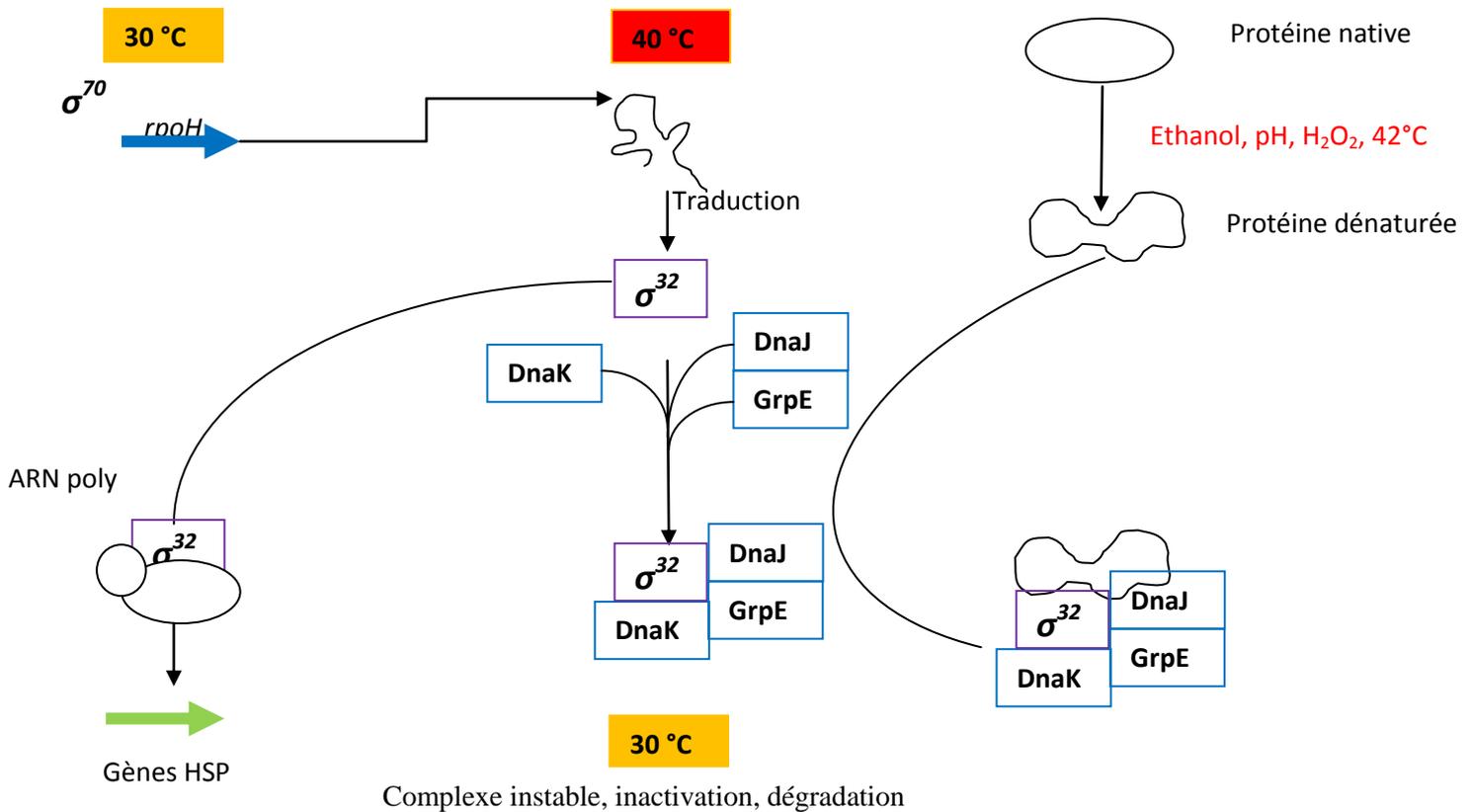


Figure 14 : Régulation de la transcription des facteurs liés à la réponse HS

Le signal qui induit la synthèse de la protéine σ^{32} , est l'accumulation de protéines dénaturées, cependant la température n'est pas le seule élément déclencheur, l'éthanol, l'acidité ou le H_2O_2 sont aussi capable avoir le même effet que la température élevée.

Les "Cold Shock Proteins"

L'effet de la baisse drastique de température provoque chez les bactéries une réaction d'adaptation avec deux réponses différentes. D'abord au niveau du cytoplasmique : la baisse de température entraîne la formation de structures secondaires sur l'ARNm, et par la suite une baisse de l'efficacité de la transcription et de la traduction. De ce fait les cellules augmentent

la production des protéines de choc au froid (cold choc proteins), qui déstabilisent les structures secondaires des ARNm, pour permettre le rétablissement optimal de la synthèse protéique.

La deuxième réponse se trouve au niveau membranaire : les faibles températures provoquent la diminution de la fluidité membranaire. La cellule réagit en augmentant la synthèse de lipides à courtes chaînes carbonées et acides gras insaturés, qui ont une température de fusion plus basse, pour restaurer une fluidité membranaire optimale.

Les "Cold Shock Proteins" (CSP) constituent une famille de petites protéines (< 7 kDa) très conservées. Les CSP sont, pour la plupart, inductibles au froid et semblent avoir 2 fonctions principales dans les réponses au stress.

- La première est d'agir comme chaperonne à l'ARN. Les CSP peuvent se fixer à l'ARN simple brin, ce qui permet de prévenir la formation de structures secondaires et ainsi faciliter la traduction.
- Les CSP possèdent un rôle de régulateur de transcription. Elles contrôlent notamment l'induction de protéines nécessaires à la réponse au choc froid. Chez *E. coli*, elles provoquent l'induction de RecA, NusA, GyrA et H-NS.

La réponse au stress acide

Dommages et altérations dus au stress acide

Dans l'environnement, les bactéries sont soumises à des variations de pH importantes. Un fromage par exemple peut voir son pH évoluer de plus de 3 unités au cours de son affinage.

L'acidification d'un milieu peut se faire par la modification de sa composition en acides organiques ou inorganiques. Si la paroi bactérienne empêche la diffusion libre des protons, elle reste perméable aux acides faibles.

Dissocier dans le cytoplasme, ils provoquent une chute du pH_{int} par la libération des protons, et par l'accumulation de la forme anionique (A^-).

Une baisse du pH_{int} va :

- Provoque l'oxydation des lipides, et modifier leur état d'ionisation ce qui a un impact sur leurs interactions avec les autres éléments cellulaires.

- pour les protéines, une baisse de pH va entraîner une augmentation des charges positives. La modification de leur état d'ionisation va modifier leur configuration spatiale et altérer leur fonctionnalité.
- elle va également perturber la transcription des gènes. Au bas pH, l'ADN lui-même est fragmenté, par altération des bases puriques et pyrimidiques.

Les premières structures touchées par l'acidification du pH extracellulaire sont évidemment les macromolécules situées à la surface bactérienne (flagelle, pili, récepteur chimique, protéines périplasmiques, paroi ...). Les microorganismes ont peu de possibilités de protéger ces structures : soit ils sont capables de produire une version modifiée de la structure résistante à l'acide, soit ils se passent de la fonction (perte de mobilité suite à un stress) ou la modulent (utilisation de voie métabolique alternative).

Mécanismes de résistance et adaptation au stress acide

Pour des espèces neutrophiles comme *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium*, un bouleversement de l'acidité de leur environnement entraîne des dommages cellulaires importants et de lourdes dépenses énergétiques pour maintenir le pH intracellulaire (pH_{int}) à une valeur compatible avec la vie. *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium* essaient de maintenir leur pH intracellulaire (pH_{int}) proche de la neutralité

L'exposition de cellules en phase exponentielle de croissance de *Salmonella typhimurium* à un pH modérément acide avant un stress, va lui conférer une résistance bien supérieure à celle observée quand le stress est appliqué directement. De même, les cellules en phase stationnaire de croissance sont plus résistantes que ces cellules en phase exponentielle. La réponse des bactéries au stress est donc une réponse **adaptative**.

La régulation de la réponse au stress acide

Les systèmes de transduction du signal

Les cellules bactériennes possèdent de nombreux capteurs internes, externes et mixtes, leur permettant de percevoir les variations des conditions externes et internes et de synchroniser la réponse transcriptionnelle.

Chez *Listeria monocytogenes*, deux systèmes existent :

- Le premier étant une sonde membranaire de type « histidine kinase », LisK, et un régulateur de réponse cytoplasmique.
- Le 2^{ème} est composé de PhoQ et de PhoP. PhoQ permet de détecter les ions Mg²⁺ et de Ca²⁺ en faible concentration et phosphoryle PhoP.

L'induction du système PhoPQ se fait en milieu modérément acide et riche en ion de magnésium. Les protons changent la conformation du site de liaison vis-à-vis du magnésium et permettent ainsi la phosphorylation de PhoP. L'activation de LisR et PhoP induit la synthèse de protéines de stress.

En général, la production PhoPQ est induite sous condition de stress acide, elle régule positivement, plus de 40 protéines.

Mécanismes de résistance directement impliqués dans l'homéostasie du pH

Une baisse du pH_{int} peut être régulée par la circulation de K⁺ et Na⁺ via les antiports ou les pompes à protons (F₀F₁-ATPase). Le complexe F₀F₁-ATPase assure la production d'ATP en utilisant la force proton-motrice produite par la respiration cellulaire.

Le complexe membranaire F₀ forme un canal à protons avec ces sous-unités a, b et c. Le composé périphérique F₁ (sous-unités α, β, γ, δ, ε) est responsable de l'activité ATPase, il synthétise ou hydrolyse de l'ATP selon que les protons entrent ou sortent dans la cellule.

Le rôle de la F₀F₁-ATPase est majeur pour la réponse adaptative au stress acide. La F₀F₁-ATPase est plus impliquée dans la résistance en phase stationnaire. En présence d'inhibiteur de l'activité ATPase (DCCD), les cellules sont plus sensibles que les cellules non traitées.

D'autres solutions peuvent être mises en place pour favoriser un retour du pH_{int} à une valeur normale.

- Lors d'un stress acide, la membrane change de composition pour mieux résister au stress. Les acides mono-insaturés et de chaînes plus longues sont préférés. Des molécules peuvent être produites afin de renforcer le pouvoir tampon du cytoplasme, comme le citrate et l'iso-citrate par *Salmonella typhimurium*.
- Le rôle des protéines chaperonnes est également important pour la résistance au stress acide. Elles participent à la configuration spatiale des protéines, mais aussi à leur renaturation et à leur protection. Elles permettent également d'évacuer les protéines endommagées.

- Pour lutter contre le phénomène de dégradation de l'ADN, les bactéries vont augmenter la production des enzymes ou des systèmes de réparations comme les endonucléases, et de protection, comme les méthyltransférases.
- Si dans le cas d'un stress alcalin le catabolisme des sucres peut aider à abaisser le pHint, dans le cas d'un stress acide la décarboxylation des acides aminés permet de diminuer la concentration intracellulaire en protons. La production de glutamate ou le catabolisme du γ - aminobutyrate sont des acteurs majeurs de la réponse adaptative au stress acide. A une moindre échelle, la lysine est convertie en cadavérine dans le cadre d'un stress acide.
- L'ammoniaque, l'urée et l'arginine jouent également un rôle dans l'alcalinisation du milieu interne. L'ammoniaque est convertie en ion ammonium, l'urée libère du dioxyde de carbone et de l'ammonium. Quant à la décarboxylation de l'arginine, elle produit selon l'enzyme de l'agmatine ou de l'ornithine, des ions ammonium et du dioxyde de carbone. Les produits finaux des décarboxylations sont ensuite échangés contre un nouveau substrat par le jeu d'antiports transmembranaires.

Réponse au stress osmotique

La diminution de l'activité de l'eau dans les aliments provoque une augmentation de la concentration des solutés et une perturbation dans les flux qui traversent la membrane bactérienne. La turgescence est nécessaire à la l'élongation cellulaire, permettant de garder la membrane plasmique proche de la couche de peptidoglycane. Les cellules bactériennes doivent donc maintenir leur turgescence cellulaire quelles que soient les variations de l'environnement. Les microorganismes doivent donc maintenir une pression osmotique interne supérieure à celle de leur environnement pour assurer leur croissance. Cette pression de turgescence est de l'ordre de 20 bars pour les bactéries Gram positif et de 3 à 10 bars pour les bactéries Gram négatif. Cependant la paroi bactérienne est très perméable à l'eau et ne présente pas de mécanisme particulier d'importation. Lorsque des variations de la pression osmotique de l'environnement se produisent, on assiste à un transfert passif de l'eau répondant au gradient osmotique.

Dommmages et mécanismes de résistance au stress osmotique

En cas de choc hypo-osmotique, l'eau entre massivement dans la cellule bactérienne. Pour éviter ce gonflement conduisant à la lyse cellulaire, les solutés intracellulaires sont libérés dans l'environnement. Cette libération est effectuée par le biais de transporteurs spécifiques ou de pores activés par les variations de tension membranaire. La présence d'aquaporines a été mise en évidence chez *Escherichia coli* permettant d'accélérer le passage de l'eau vers l'extérieur de la cellule. Dans le cas d'un choc hyperosmotique, l'eau sort de la cellule provoquant une baisse de la turgescence et un rétrécissement du cytoplasme, pouvant aller jusqu'à la plasmolyse. L'accumulation de solutés dans le cytoplasme permet d'inverser le gradient osmotique et de restaurer la turgescence cellulaire. Dans un premier temps, de petites molécules chargées sont accumulées, en général l'ion potassium (K^+), il s'agit de la réponse dite primaire. Mais de fortes concentrations en molécules chargées réduisent l'activité enzymatique et peuvent donc conduire à la mort cellulaire par l'altération des voies métaboliques. Progressivement, les molécules chargées sont remplacées par des solutés dits compatibles. Cette seconde phase est dite réponse secondaire.

La réponse primaire

La réponse primaire correspond à l'accumulation de molécules chargées, nécessaire au rétablissement de la turgescence cellulaire. L'accumulation de l'ion potassium est généralement observée dans les premiers instants suivant le stress osmotique. Cette accumulation de potassium est rattachée principalement à l'action de deux systèmes d'importation Kdp (K^+ DePendence) et Trk (Transport K^+).

L'importation de K^+ est en grande partie due au transporteur Kdp hautement spécifique au potassium. Principalement utilisé pour l'homéostasie en K^+ , ce transporteur nécessite un apport énergétique sous forme d'ATP (transporteur ABC). Il est régulé au niveau de sa transcription et de son activité par les variations de pression osmotique. Lors d'une baisse de turgescence, la kinase KdpD s'autophosphoryle et transfère son groupement phosphorylé au régulateur de réponse KdpE qui active alors l'expression de l'opéron *kdpFABCDE*. Cette activation est transitoire puisque la phosphorylation de KdpD est réprimée par l'accumulation

de potassium. Ce système permet une accumulation rapide mais brève d'ions potassium, évitant ainsi l'accumulation létale de molécules chargées.

Le glutamate est utilisé pour contrebalancer l'augmentation de la charge positive au sein de la cellule, due à l'importation de potassium. Les bactéries Gram négatif le synthétisent ou l'importent. Le glutamate est retrouvé en concentration plus faible chez les bactéries Gram positif. Ces bactéries possèdent en condition non stressante un pool d'acides aminés plus important que les bactéries Gram négatif. Le glutamate est majoritaire au sein de ce pool d'acides aminés, d'où peut-être la moindre nécessité de synthétiser du glutamate.

La réponse secondaire

La réponse secondaire au stress osmotique répond par l'accumulation de solutés compatibles. Il s'agit de petites molécules sans charge nette à pH physiologique, hautement solubles, et vis-à-vis desquels la perméabilité membranaire est contrôlée.

L'accumulation à de fortes concentrations de solutés compatibles n'altère pas le fonctionnement enzymatique, et aurait plutôt tendance à protéger les enzymes de la dénaturation par les sels. Ils permettent ainsi le maintien des mécanismes de réparation de l'ADN et du métabolisme. Ces solutés peuvent être des amines quaternaires (bétaine, carnitine), acides aminés (proline), dérivés d'acides aminés (proline bétaine), sucres (tréhalose, mannitol), et même de petits peptides.

La glycine bétaine est le soluté compatible le plus répandu chez les bactéries ainsi que dans le règne animal et végétal. Son accumulation peut s'effectuer par synthèse ou par un système d'importation. La synthèse de la glycine bétaine s'effectue à partir de choline ou de carnitine.

Références bibliographiques

- AM Giuliadori, CO Gualerzi, S Soto, J Vila, and Maria M Tavio Review on Bacterial Stress Topics Annals of the New York Academy of Sciences 1113: 95–104 (2007)
- A Świącilo, I Zych-Wężyk Bacterial Stress Response as an Adaptation to Life in a Soil Environment Pol. J. Environ. Stud. Vol. 22, No. 6 (2013), 1577-1587
- Barák Imrich, Anthony J. Wilkinson Division site recognition in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* FEMS Microbiology Reviews, Volume 31, Issue 3, April 2007, Pages 311–326,
- Chawla Shashi MICROBIAL PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY Carbon and nitrogen metabolism Department of Microbiology Gargi College New Delhi 03-Mar-2008
- Cordero Ninoska, Felipe Maza, Helen Navea-Perez, Andrés Aravena, Bárbara Marquez-Fontt, Paola Navarrete, Guillermo Figuero, Mauricio González, Mauricio Latorre and Angélica Reyes-Jara Different Transcriptional Responses from Slow and Fast Growth Rate Strains of *Listeria monocytogenes* Adapted to Low Temperature Front. Microbiol 1 March 2016. 7:2290
- Cornforth Daniel M. and Kevin R. Foster Competition sensing: the social side of bacterial stress responses Nature Reviews Microbiology volume 11, pages285–293 (2013)
- Dijkstra, A.R., Alkema, W., Starrenburg, M.J. et al. Fermentation-induced variation in heat and oxidative stress phenotypes of *Lactococcus lactis* MG1363 reveals transcriptome signatures for robustness. Microb Cell Fact **13**, 148 (2014). <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0148-6>
- J Schimel, TC Balsler, M Wallenstein Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function Ecology, 88(6), 2007, pp. 1386–1394
- Jun Jin Ding, Cedric Cagliero, and Yan Ning Zhou Growth rate regulation in *Escherichia coli* FEMS Microbiol Rev. 2012 March ; 36(2): 269–287
- Huang Ying-Min, Bernard Kan, Yue Lu and Sharon Szeto The Effect of Osmotic Shock on RpoS Expression and Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Journal of Experimental Microbiology and Immunology April 2009 Vol. 13:13-17
- Green Erin R. and Joan Meccas Bacterial Secretion Systems Microbiol Spectr. 2016 February ; 4(1): . doi:10.1128
- Kanjee Usheer, Koji Ogata, Walid A. Houry Direct binding targets of the stringent response alarmone (p)ppGpp Molecular Microbiology (2012) 85(6), 1029–1043
- N. Beales Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY—Vol. 3, 2004
- Sanders Jan Willem, Gerard Venema, Jan Kok Environmental stress responses in *Lactococcus lactis* FEMS Microbiology Reviews, Volume 23, Issue 4, July 1999, Pages 483–501,
- Sartori, M. , Nesci, A. , Magan, N. and Etcheverry, M. (2012) Accumulation of the betaine and ectoine in osmotic stress adaptation of biocontrol agents against *Fusarium verticillioides* in maize. Agricultural Sciences, **3**, 83-89. doi: 10.4236/as.2012.31011.

- Shimizu Kazuyuki Regulation Systems of Bacteria such as Escherichia coli in Response to Nutrient Limitation and Environmental Stresses *Metabolites* 2014, 4, 1-35; doi:10.3390
- Skriver Karen and John Mundy Gene Expression in Response to Abscisic Acid and Osmotic Stress *The Plant Cell*, Vol. 2, 503-512, June 1990
- Van de Guchte Maarten, Pascale Serror, Christian Chervaux, Tamara Smokvina, Stanislav D. Ehrlich & Emmanuelle Maguin Stress responses in lactic acid bacteria *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 187–216, 2002
- Varcamonti, M., Arsenijevic, S., Martirani, L. et al. Expression of the heat shock gene clpL of *Streptococcus thermophilus* is induced by both heat and cold shock. *Microb Cell Fact* **5**, 6 (2006). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-6>
- Wang Jue D. Petra A. Levin Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle *Nat Rev Microbiol.* 2009 November ; 7(11): 822–827