

Stress osmotique

Définition du stress

Le stress est une condition hostile qui tend à empêcher un système de fonctionner d'une façon optimale. C'est un ensemble de facteurs et de conditions qui provoquent des changements de processus physiologiques conduisant éventuellement à une inhibition de la croissance voire des dommages cellulaires.

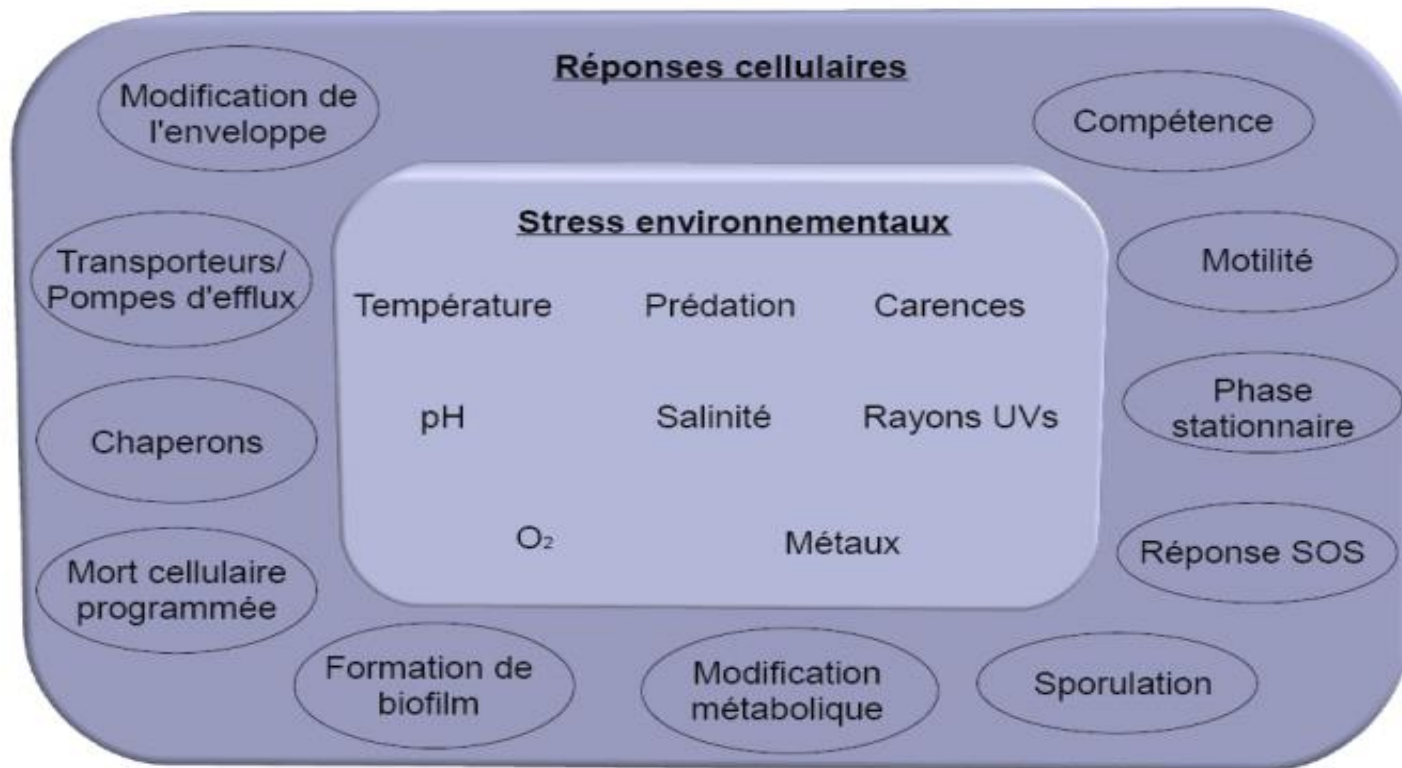


Figure 1 : Diversité des stress et des réponses aux stress chez les bactéries.

Définition du stress osmotique

Le stress osmotique correspond à **une diminution ou une augmentation de l'osmolarité de l'environnement** de la bactérie qui, en **modifiant la disponibilité de l'eau de la cellule**, affecte sa survie et/ou sa croissance.

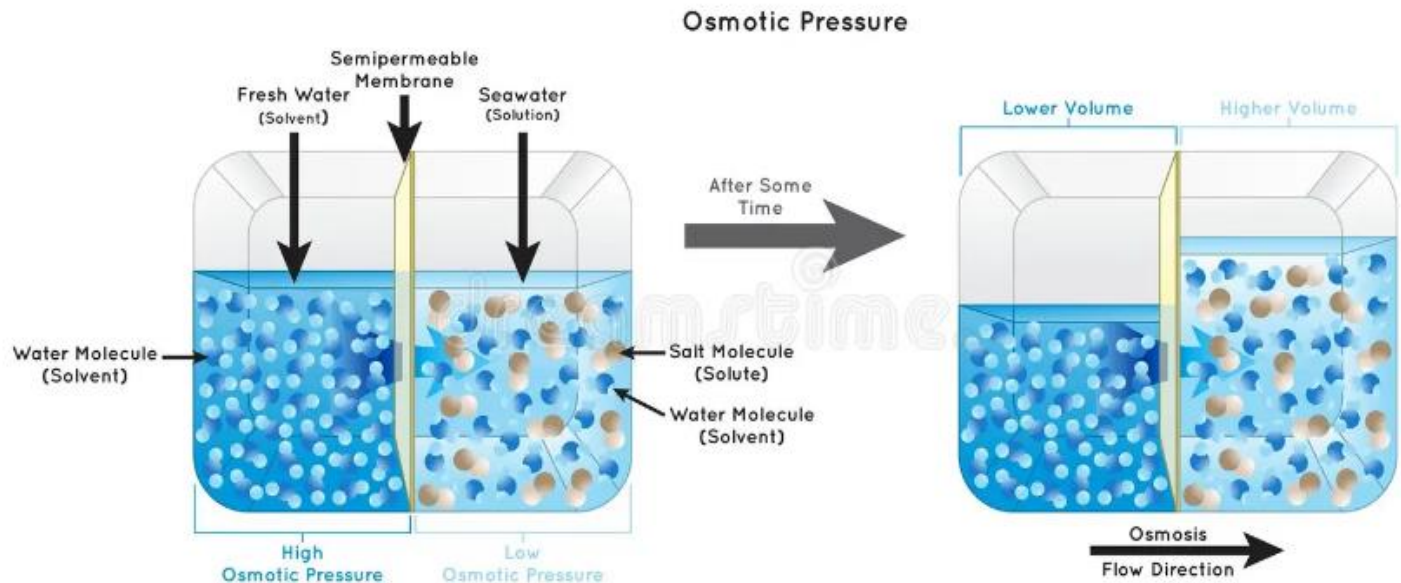
Les microorganismes doivent donc **maintenir une pression osmotique interne supérieure à celle de leur environnement** pour **assurer leur croissance**. Cette pression de turgescence est de l'ordre de 20 bars pour les bactéries Gram positif et de 3 à 10 bars pour les bactéries Gram négatif

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**.

Remarque : la pression de turgescence est définie comme la pression exercée sur la membrane cytoplasmique de la bactérie

Définition de l'osmose :

Le **phénomène d'osmose** correspond à la **diffusion spontanée**, sous la seule influence de l'agitation moléculaire, d'un composé chimique à travers une membrane semi-perméable. Il se produit lorsqu'une substance est présente à **des concentrations différentes de part et d'autre de la membrane**.



- Les bactéries vivent dans des milieux à faible pression osmotique par rapport à la pression osmotique de leur cytoplasme.
- Le PDG et la membrane externe protègent la cellule contre les effets néfastes de cette différence de pressions osmotiques, que l'on dénomme « **turgor pressure** » ou « **pression de turgescence** ».

Choc hyper-osmotique

Réponse des bactéries aux stress osmotique

I- une phase passive purement thermodynamique

II-une phase active

III- une phase d'osmorégulation homéostatique

La réponse cellulaire à la suite d'un choc hyper-osmotique peut se décomposer en 3 phases

I- une phase passive purement thermodynamique:

Lorsque l'équilibre osmotique de chaque côté de la membrane cellulaire est perturbé par l'ajout d'un osmolyte dans le milieu extracellulaire, **un efflux (sortie) d'eau de la cellule est observé.**

- Ce mouvement d'eau est **passif et simplement régi par la loi de l'osmose.**
- Cette sortie d'eau entraîne souvent une variation du volume cellulaire.
- Cette phase est très rapide et dure quelques secondes.

II-une phase active: au cours de cette phase, **la cellule tend à restaurer son volume initial.** Elle va accumuler un certain nombre de solutés dans le cytoplasme afin de rétablir une pression de turgescence.

Réponse primaire : 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^+).

Réponse secondaire : Cette accumulation de solutés peut se faire par **synthèse ou simplement par transport** s'ils sont présents dans le milieu de culture.

- **Les molécules accumulées par synthèse de novo** sont appelées **solutés compatibles** du fait de leur compatibilité avec les fonctions cellulaires même à des concentrations élevées.

- **Les molécules accumulées par transport** sont appelées composés **osmo-protecteurs**

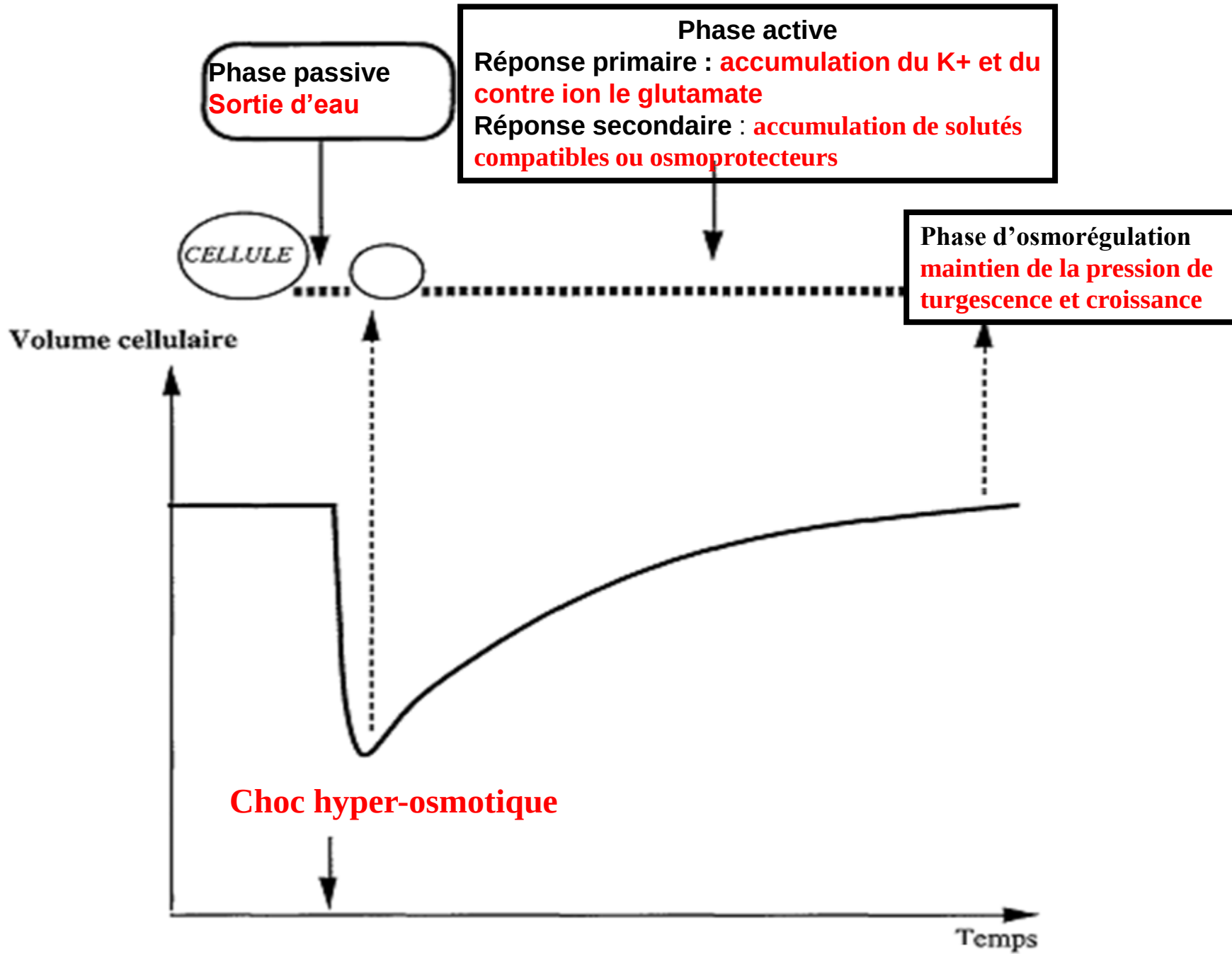
Cette accumulation de solutés entraîne un flux d'eau vers l'intérieur de la cellule et permet donc de restaurer le volume cellulaire initial.

Cette phase active, consommatrice d'énergie, a une durée plus longue que la première.

III- une phase d'osmorégulation homéostatique :

Les cellules doivent maintenir une osmorégulation permanente.

Blomberg et al. (1988) ont introduit une troisième phase qui correspond au maintien de la pression de turgescence.



Phase active de l'osmorégulation : principe

1. **Le terme osmoadaptation** décrit l'ensemble des manifestations physiologiques et génétiques de l'adaptation à un environnement de forte ou de faible osmolarité.
2. **L'osmorégulation** est le processus majeur d'osmoadaptation contrôlant l'afflux et l'efflux de solutés de la cellule lorsqu'elle est dans des conditions hyper- ou hypo-osmotiquement stressantes

OSMOADAPTATION

Osmoadaptation

1. Les bactéries non halophiles accumulent dans leur cytoplasme des **molécules actives** : **des ions potassium et du glutamate** puis des **petites molécules organiques si le choc persiste et/ou augmente en intensité**, afin de **restaurer une pression de turgescence cellulaire compatible avec les fonctions cellulaires**.

2. Les bactéries halophiles se sont adaptées, quant à elles, à la vie dans un environnement hyper salé en développant une **machinerie cellulaire capable de supporter de fortes concentrations en ions** dans le cytoplasme.

Réponse primaire



Accumulation de solutés
ioniques (k⁺)

Accumulation du
contre ion glutamate

Transporté

Réponse secondaire



Accumulation des
Solutés compatibles

Transporté = **Osmoprotecteur**

Synthèse *de novo* = **solutés
compatibles**

Réponse primaire

I-Rôle osmotique des ions

I-Cas du potassium: La réponse la plus rapide au stress salin, que ce soit chez les G^- où G^+ est la stimulation de l'apport du potassium.

- a. Le potassium est le cation le plus abondant dans le cytoplasme des bactéries afin de maintenir la pression de turgescence cellulaire.
- b. En fortes osmolarités ce sont les vitesses d'**influx** qui sont **modifiées**, la vitesse **d'efflux du potassium reste inchangée**.
- c. Une accumulation initiale de potassium (**et de sont contre ion**) restore la pression osmotique en préservant l'équilibre entre le cytoplasme et le milieu externe et permet l'expression des gènes et l'activation des enzymes.

Accumulation du potassium

- a. L'accumulation du potassium est **transitoire**. Après 30 minutes, la concentration intracellulaire du potassium est proche de celle mesurée avant le choc osmotique
- b. Le mouvement des ions potassium est le **seul mécanisme primaire de la régulation osmotique** c'est-à-dire le seul mécanisme sur lequel la pression osmotique est une influence directe.
- c. Le transport du K^+ est actif (transporteur ABC) et nécessite l'hydrolyse de ATP
- d. **à de fortes concentrations intracellulaires, le potassium peut entraîner des inhibitions importantes de certaines activités enzymatiques (glycolyse).**

Systèmes de transport du potassium

Chez *Escherichia coli*, les transporteurs de potassium, **Trk et Kup**, **constitutivement exprimés**, ont une faible affinité pour K^+ , mais ils sont suffisamment compétents pour **maintenir les niveaux requis de K^+ sous conditions physiologiques normales**.

Dans le cas d'un choc osmotique, **une ATPase K^+ (Kdp) dépendante à haute affinité ($K_m = 2 \mu M$) est exprimée**, ce qui permet de réduire la concentration en K^+ dans le milieu extérieur à moins de 50 nM.

Ainsi, l'ATPase K^+ dépendante est un système de piégeage du K^+ très efficient, qui est **exprimé lorsque d'autres transporteurs ne peuvent pas répondre aux besoins cellulaires en K^+** .

Systèmes de transport du potassium

Les systèmes TrkA, TrkF et Kup possèdent une faible affinité alors que Kdp ont une forte affinité.

E. coli

Forte affinité

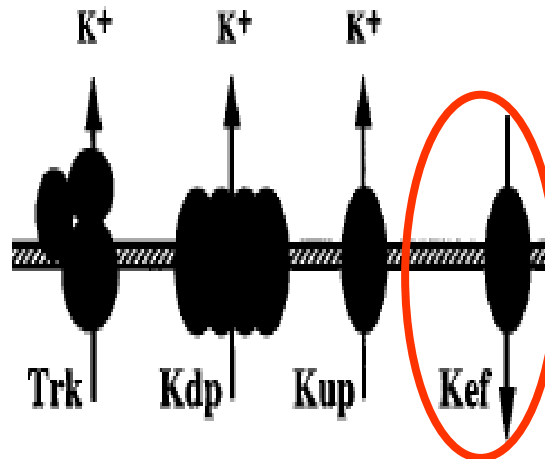
Kdp

Faible affinité

TrkA/F

Kup

Efflux de K^+
KefB et Kefc



-Inductif par un choc osmotique élevée

-Membranaire

- ATP- dépendent

- Active lorsque la concentration de K^+ dans le milieu est faible ($< 0,1$ mM) ou très forte

-Constitutifs

-transport élevée

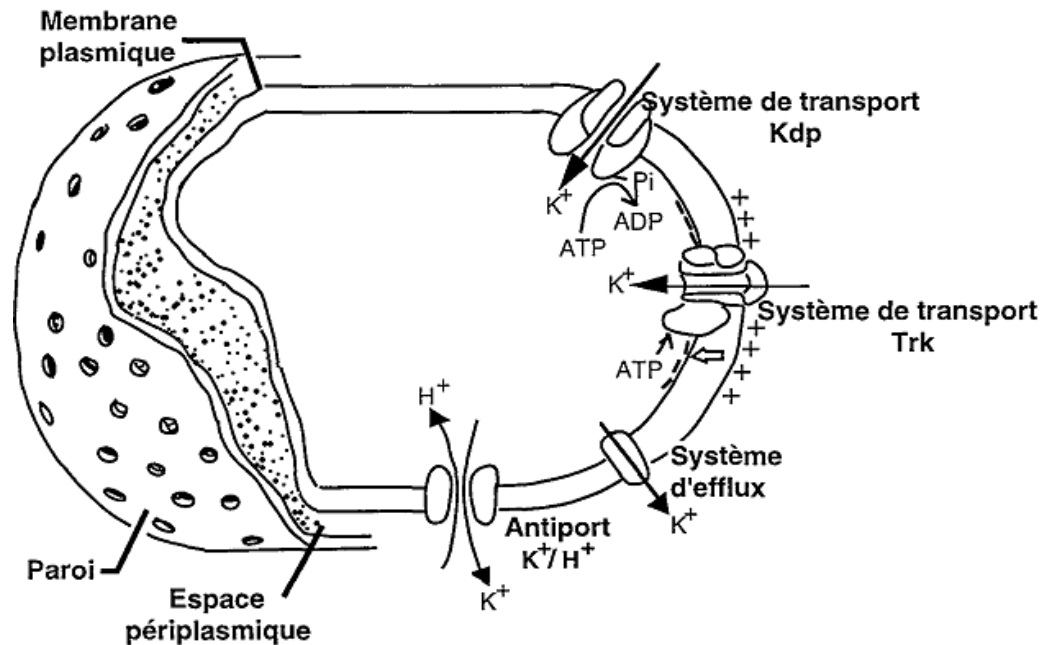
- ATP dépendant

- Active lorsque la concentration de K^+ dans le milieu est élevée

Transport de potassium

- Le système **Kdp**, commun à de nombreuses bactéries à Gram -, possède une **haute affinité pour le K^+** . Son activité est **stimulée sous forte pression osmotique**
- Ce système prend le relais quand les autres ne fonctionnent plus comme lors de **mutations**, de **faible concentration externe en K^+ ($< 0,1 \text{ mM}$)** ou de **chocs hyper-osmotiques élevés**.

- **Kup** ou **TrkF**, ont une très faible affinité pour le potassium et ne **semblent pas jouer de rôle important dans la réponse au stress osmotique**



- l'activité de **TrkA** est également **stimulée (induite) lors d'une croissance sous forte pression osmotique** lorsque la **concentration externe en K est élevée $> 1 \text{ mM}$ de K^+** .

Le transport du K^+ chez E. coli

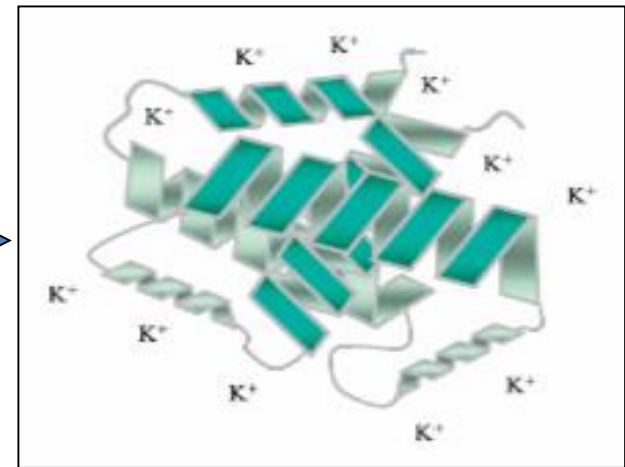
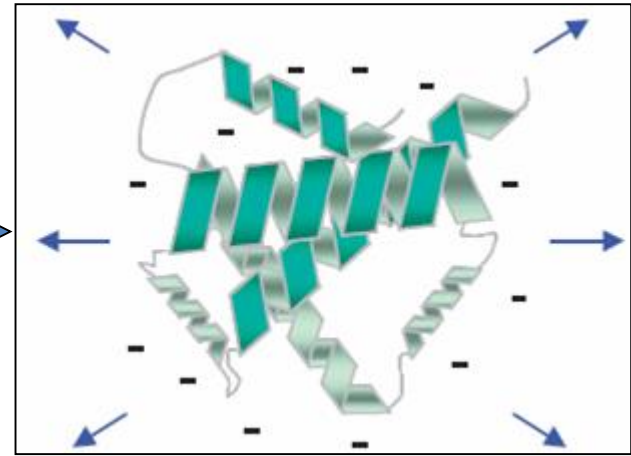
- Chez E. coli, les transporteurs de K^+ constitutive **Trk et Kup**, ont une faible affinité pour K^+ mais sont compétents pour maintenir les niveaux requis de K^+ dans des **conditions physiologiques normales**.
- **Lors d'un stress hyper-osmotique**, **TrkA est le système majeur** avec un taux d'absorption de K^+ relativement élevée dans un milieu où la concentration de K^+ est plus élevée **>1mM. K_m 0.3-3. mM et $V_{max}=200$ nmol/min**
- Le système constitutif Kup (K^+ Uptake) contribue modestement à l'augmentation de K^+ . **Il devient important lorsque l'activité de TrkA et Kdp est insuffisante.**
- K_m of 0.3-0.4 mM et $V_{max} = 30$ nmol/min
- Lorsque les cellules d'E. coli sont soumises à une diminution du taux de K^+ extrême ou à un choc osmotique élevé, **la Kdp-ATPase à haute affinité est exprimée**. L'importation de K^+ est en grande partie due au transporteur Kdp hautement spécifique au potassium et Trk.

Effet de l'osmolarité sur la structure et la fonction des enzymes

Dénaturation de l'enzyme native suite aux forces répulsives résultantes des charges négatives

Les charge – viens d'ou ? L'eau sort a vitesse élevée et dénature les protéines

Neutralisation des charges négatives par les ions K^+ et réduction des forces répulsives à la surface de l'enzyme et renforcement des interactions hydrophobes



La totalité **du pool de potassium n'est pas osmotiquement active** : une proportion neutralise la charge négative des macromolécules. Seul la fraction du pool de potassium qui est contrebalancée par le glutamate (contre-ion) contribue à rétablir la pression de turgescence

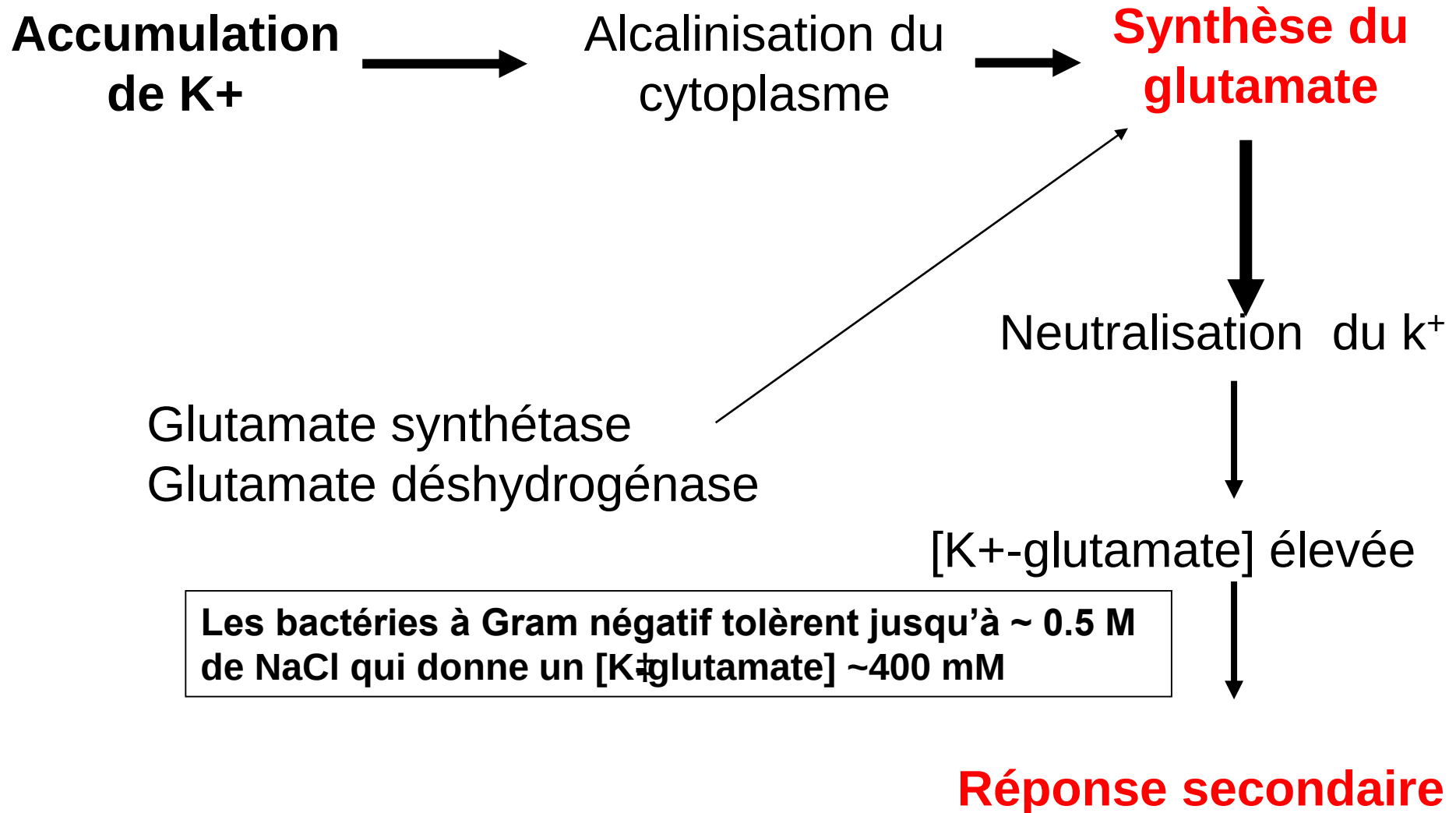
Accumulation du glutamate comme contre ions

Du fait de sa charge négative à pH neutre, le glutamate joue un rôle de contre-ion de la charge positive des ions K^+ .

- Il est **synthétisé** chez les entérobactéries (*E. coli*, *Enterobacter aerogenes*)
- Il est **accumulé** chez les espèces de *Pseudomonas* et *Azospirillia* dans des conditions de stress osmotique.
- Le glutamate est retrouvé en concentration plus faible chez les Gram positif.

Remarque : Chez les *Streptomyces* sp., les ions chlorures (Cl^-) jouent le rôle du contre-ion du potassium lors de l'augmentation de l'osmolarité du milieu.

Accumulation du glutamate comme contre ions

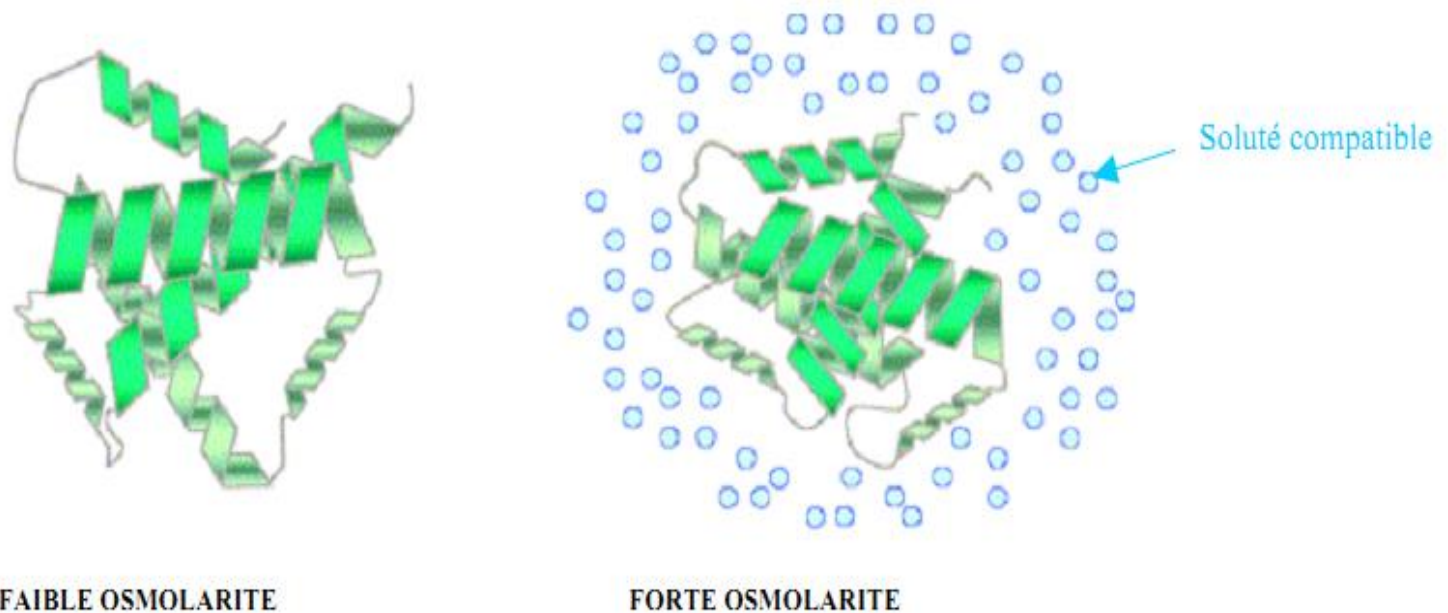


Réponse secondaire

Réponse secondaire

- La réponse secondaire correspond à l'accumulation de solutés compatibles.
- Le terme de **soluté compatible** a été introduit par Brown et Simpson en 1972
- Les solutés compatibles sont en général de **petites molécules sans charge nette à pH physiologique, hautement solubles.**
- 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.**
- Ces solutés peuvent être des **amines quaternaires** (bétaine, carnitine), **acides aminés** (proline), **dérivés d'acides aminé** (proline bétaine), **sucres** (tréhalose, mannitol), et même de **petits peptides.**

Le rôle des solutés compatibles



Figure₍₁₎ 8 : représentation de la stabilisation de la structure d'une protéine d'une Halobactérie à forte osmolarité (d'après la revue Sleator et Hill 2002).

Les solutés compatibles (cercles bleus), exclus de la surface de la protéine, permettent le maintien de la structure de la protéine dans des conditions de fortes osmolarités.

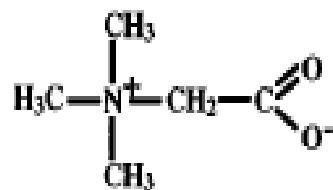
Ainsi, l'accumulation de solutés compatibles en réponse à un choc hyper-osmotique

- (i) **stabilise la structure des protéines** en améliorant l'état d'hydratation et de compaction,
- (ii) **participe au maintien de la pression de turgescence** en augmentant le volume cellulaire.

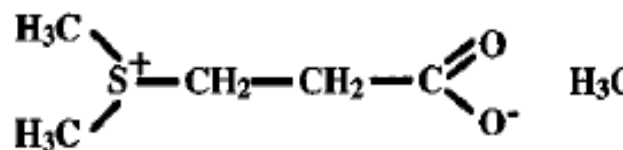
Classifications des solutés compatibles

Bremer et Kramer (2000) ont classé les solutés compatibles selon leurs caractéristiques biochimique en :

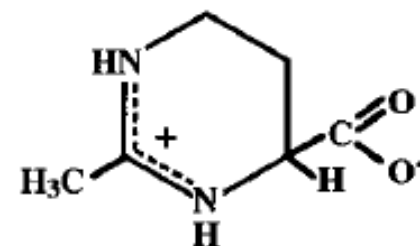
- Acides aminés (glutamate, proline).
- Dérivés des acides aminés (ectoïne).
- Ammoniums quaternaires appelés bétaines (glycine bétaine, carnitine) et leurs dérivés (proline-bétaine, alanine-bétaine, sérine bétaine, valine bétaine, trigonelline, dimethylsulfoniopropionate, diméthysulfonioacétate).
- Peptides courts (N-acétylglutamine amide, γ -glutamylglutamine).
- Ester de sulfate (Choline-*o*-sulfate).
- Polyols (glycérol, glucosylglycérol).
- Sucres (tréhalose, saccharose).



Glycine betaine

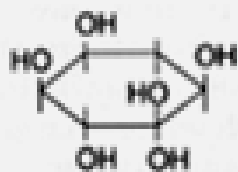


Dimethylsulfoniopropionate



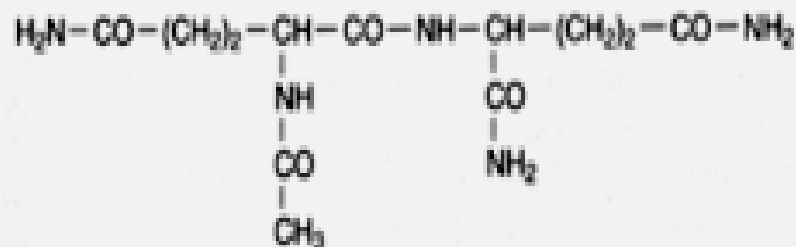
Ectoine

Polyols

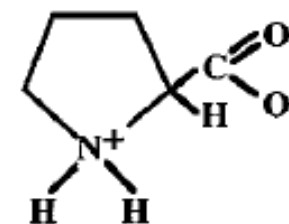


Mannitol

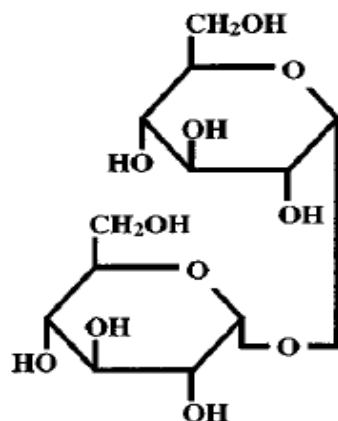
Dipeptide



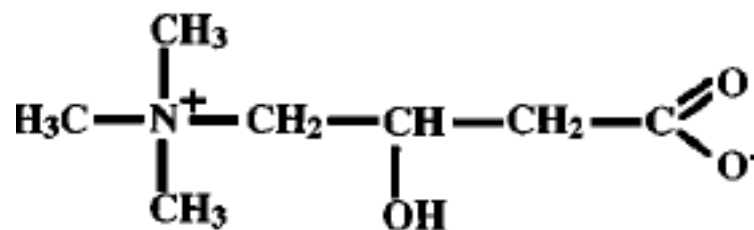
N-acetylglytaminyglutamine amide (NAGGN)



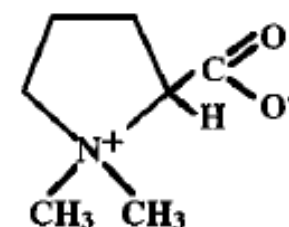
Proline



Trehalose



Carnitine



Proline betaine

Fig3 . Structures de certains solutés compatibles (Kempf et Bremer, 1998)

Nature des osmoprotecteurs accumulés et leurs origines

L'origine des osmoprotecteurs dans le milieux extracellulaire:

- ✓ Ces composés peuvent être libérés dans le milieu extérieur par d'autres microorganismes producteurs suite à une chute de l'osmolarité (**choc hypo**)
- ✓ Soit par les cellules végétales, animales ou bactériennes en cours de décomposition.
- ✓ Soit par les exsudats racinaires (proline, glycine, acide glutamique) et les mammifères via certains fluides excrétés comme l'urine (proline, glycine).

La nature des solutés compatibles accumulés par la bactéries dépend :

- 1- de la présence des précurseurs de synthèse dans le milieu
- 2- l'existence de systèmes de transport ou de synthèse adéquats chez la bactérie
- 3- intensité du stress osmotique

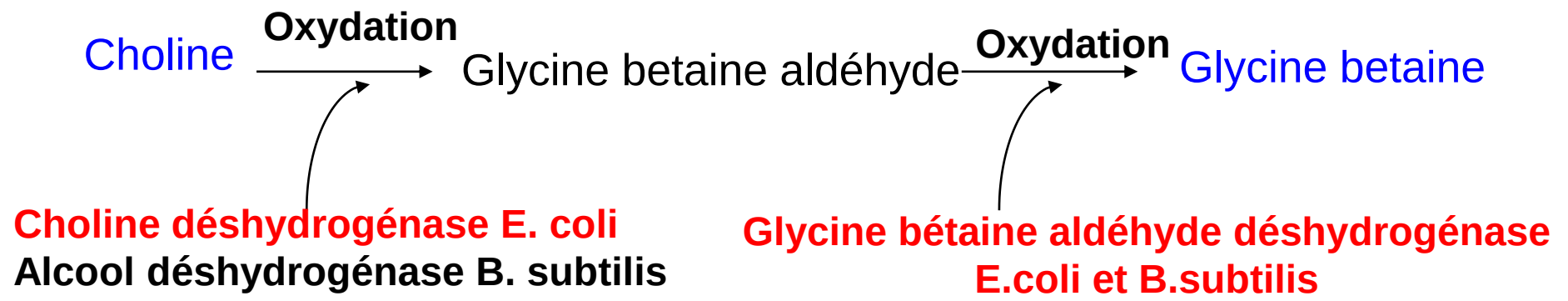
« Il existe une hiérarchie des osmoprotecteurs utilisés, la glycine betaine est

l'osmoprotecteur universelle et le plus efficaces »

1-Accumulation par Synthèse de la Glycine bétaine (GB)

Le soluté compatible universel est le triméthylammonium (N, N, N-triméthyl glycine) appelé **glycine bétaine**.

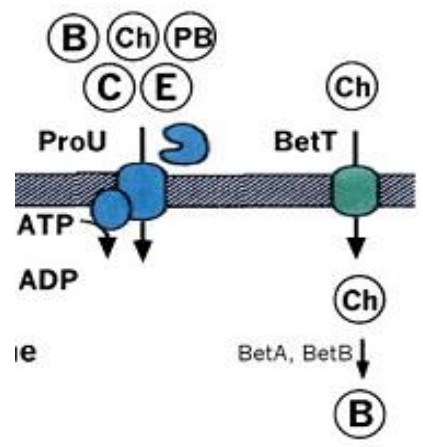
Les entérobacteries et *Bacillus subtilis*, utilisent **la choline ou la carnitine** comme précurseur de la synthèse de glycine bétaine.



La choline est apportée via :

- Forte affinité, Bet T
- Faible affinité, ProU

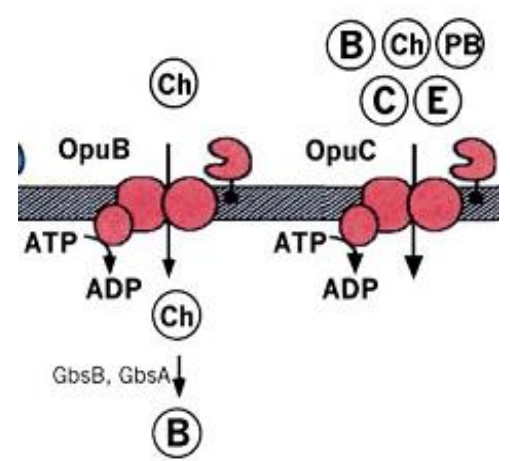
Chez E.coli



La choline est apportée via :

- Forte affinité OpuB
- Faible affinité OpuC

Chez B. subtilis



2- Accumulation par transport d'osmoprotécteurs

➤ En plus de la synthèse endogène, les bactéries ont développé des mécanismes sophistiqués pour l'absorption et l'accumulation des osmolytes libérés par les producteurs dans l'environnement externe.

➤ **L'accumulation de solutés compatibles à partir de sources exogènes inhibe généralement la synthèse endogène.**

Les systèmes de transports se répartissent en deux grandes familles structurales:

1-Transport actif primaire ou chimio-osmotique = Transporteurs ABC

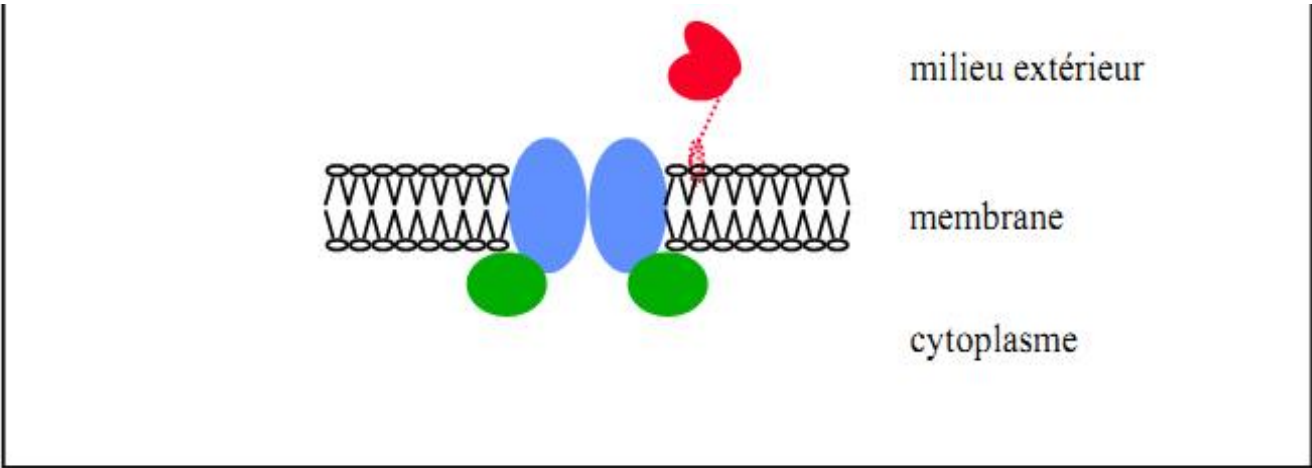
✓ Les systèmes **d'import de type ABC** est identifiés uniquement chez les Procaryotes tandis que **le système d'export** est rapporté chez les Procaryotes et les Eucaryotes

2- Transport actif secondaire ou osmo-osmotique

Systèmes de transport des solutés compatibles

Microorganisme	Systèmes de transport	Type de transporteur	Composants	Régulation par osmolarité		Substrats
				au niveau de l'expression génique	l'activité du transport	
<i>Bacillus subtilis</i>						
	OpuA	transporteur ABC	OpuAA (ATPase)			
			OpuAB (protéine membranaire)	+	+	GB, PB, DMSA, DMSP
			OpuAC (protéine affine)			
	OpuB	transporteur ABC	OpuBA (ATPase)			
			OpuBB (protéine membranaire)	+	+	Cho
			OpuBC (protéine affine)			
			OpuBD (protéine membranaire)			
	OpuC	transporteur ABC	OpuCA (ATPase)			
			OpuCB (protéine membranaire)	+	+	GB, PB, Car, DMSA, DMSP, Cho, BB, CB, Ect, Choline-O-sulfate
			OpuCC (protéine affine)			
			OpuCD (protéine membranaire)			
	OpuD	transporteur secondaire	OpuD	+	+	
	OpuE	transporteur secondaire	OpuE	+	-	Pro

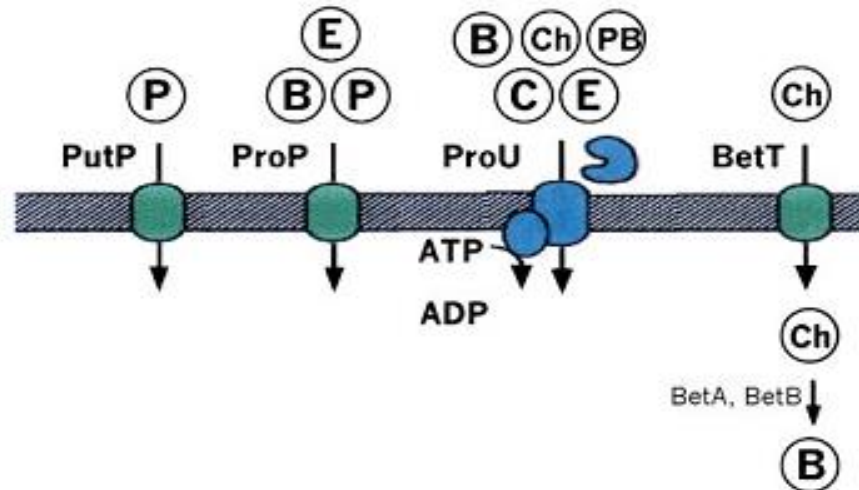
Microorganisme	Systèmes de transport	Type de transporteur	Composants	Régulation par osmolarité		Substrats
				au niveau de l'expression génique	au niveau de l'activité du transport	
<i>Escherichia coli</i>	ProU	transporteur ABC	ProV (ATPase) ProW (protéine membranaire) ProX (protéine affine)	+	+	GB, PB, Pro, Car, DMSP, HB, BB, Cho
	ProP	transporteur secondaire	ProP	+	+	GB, PB, Pro, Car, Ect, PIP, DMG, DMSP, HB, BB
	BetP	transporteur secondaire	BetP	+	+	Cho



Figure(1) 9 : représentation schématique d'un transporteur actif primaire de type ABC.

2- Systèmes de transport des solutés compatibles

E. coli



Bacillus subtilis
B

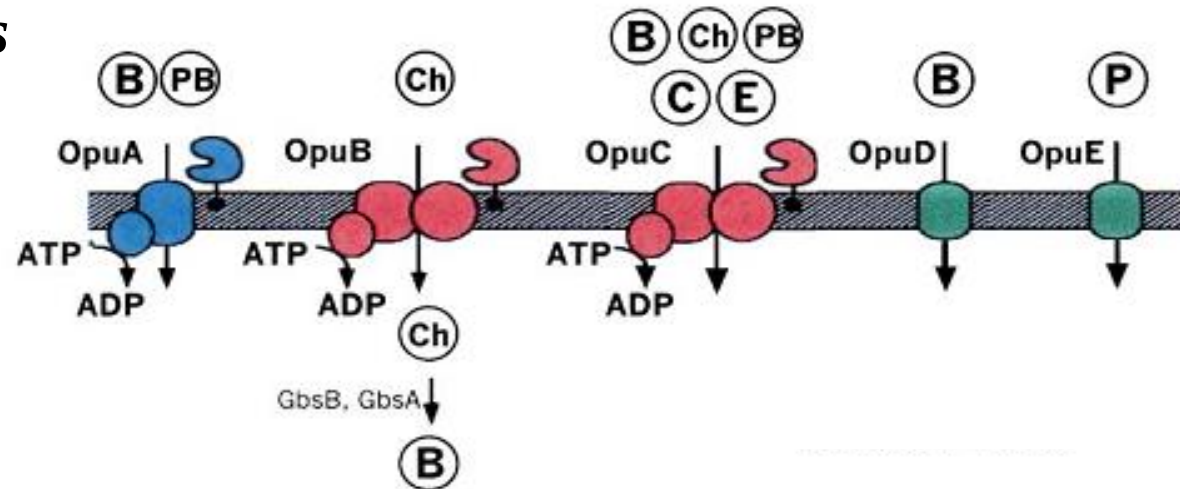


Fig. Compatible solute transport and synthesis systems in *E. coli* et *B. subtilis* models for Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively.

B glycine betaine, C carnitine, Ch choline, E ectoine, P proline, PB proline betaine

Transport de la glycine bétaine

➤ En présence de GB externe, les deux systèmes de *E. coli* (**Bet**) et de *B. subtilis* (**OpuB**) sont inhibés, favorisant ainsi le transport de la glycine bétaine plutôt que la synthèse

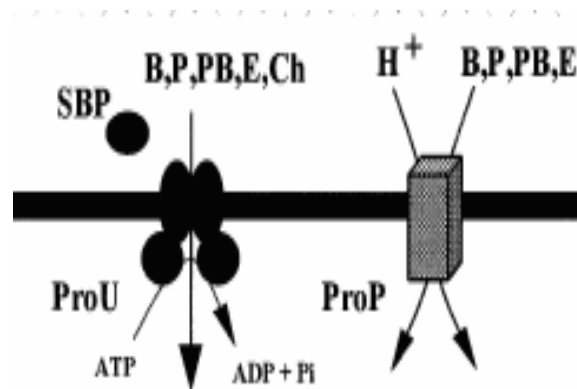
E. coli

ProU

Trois protéines

Transport primaire actif
(ABC)

Nécessite de ATP
Forte affinité pour la glycine bétaine
et moins pour l'éctoine et la proline



ProP

Une protéine membranaire

Transport secondaire actif

Système symport cationique

Transporte la glycine
bétaine, proline et éctoine
avec la même affinité

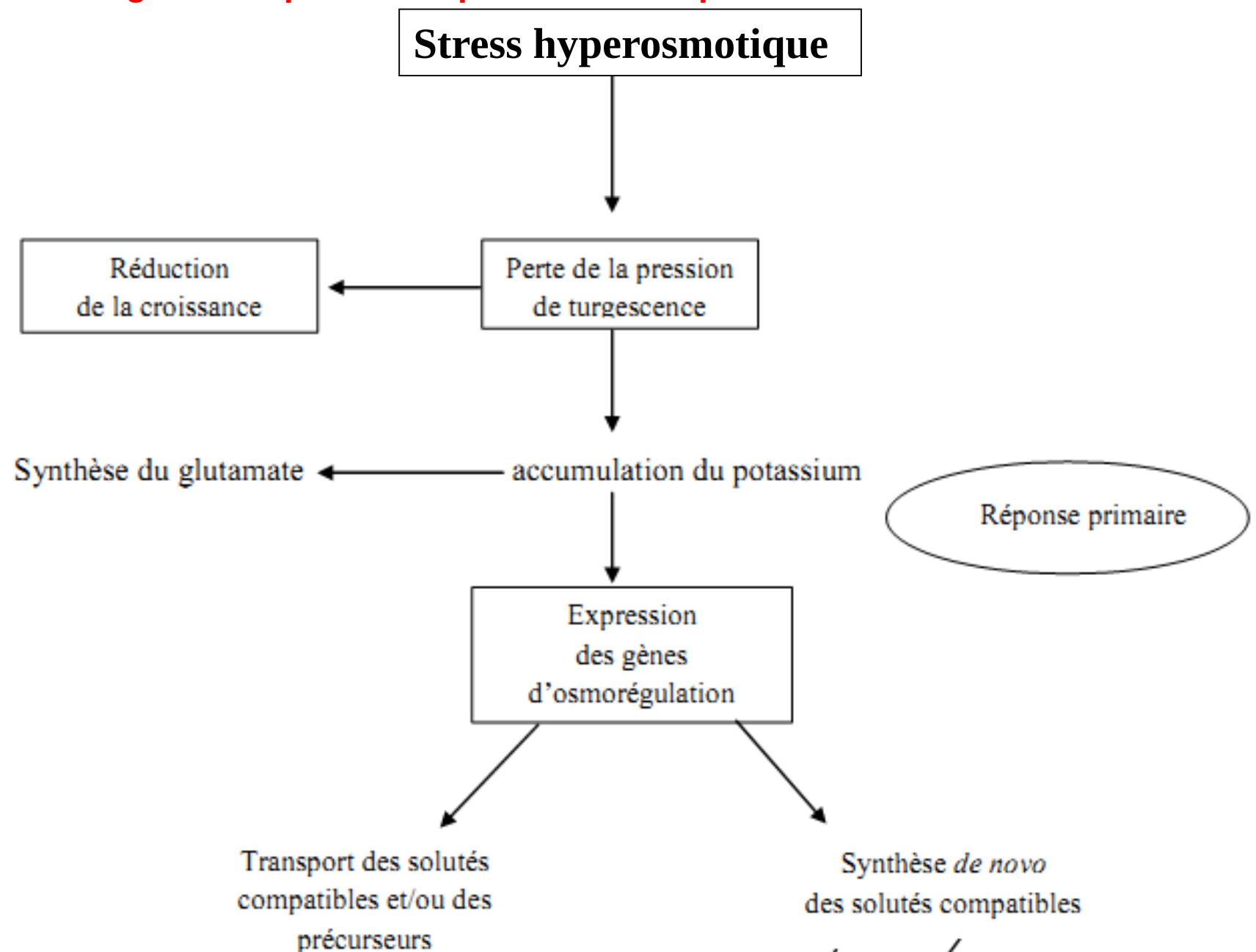
(Sleator et Hill, 2001 et O'Byrne et Booth, 2002.)

Tableau₍₁₎ XXI : mécanismes d'accumulation d'osmoprotectants chez *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *C. glutamicum*,

GB : glycine bêtaïne, Pro : proline, Tre : Tréhalose

	Synthèse	Transport	
		Transporteur ABC	Transporteur secondaire
<i>Staphylococcus aureus</i>	GB	-	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	GB, Pro	+	+
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Pro, Tre	-	+

Figure : étape de la réponse osmotique chez les bactéries



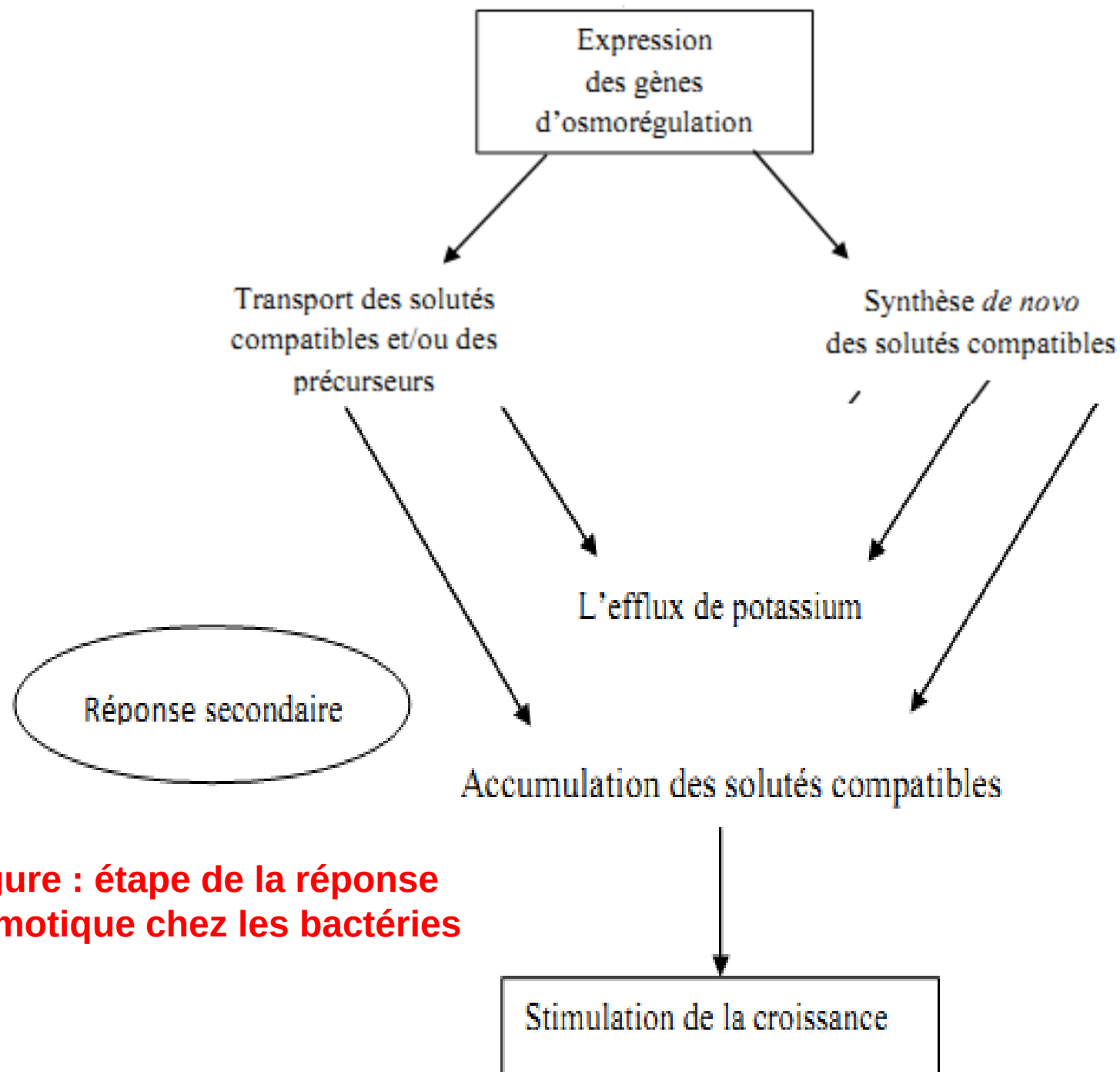
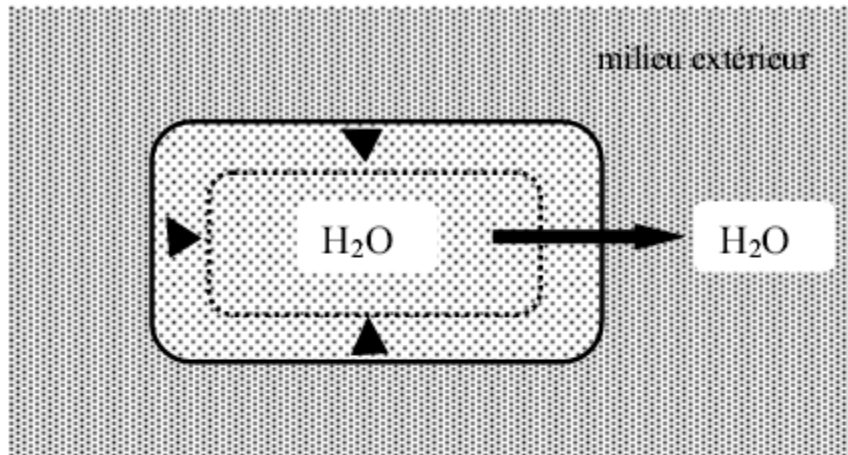
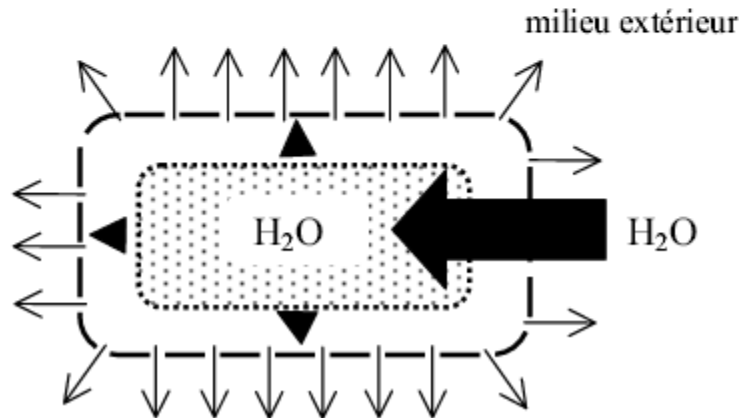


Figure : étape de la réponse osmotique chez les bactéries

Réponse au Choc hypo-osmotique



(b) choc hyper-osmotique



(c) choc hypo-osmotique

Choc hypo-osmotique

L'eau pénètre massivement dans la cellule et peut entraîner la lyse de la bactérie si aucun mécanisme d'osmoadaptation n'est mis en place.

L'osmorégulation consiste essentiellement à diminuer la pression de turgescence cellulaire en rejetant dans le milieu extérieur **des solutés compatible ainsi que des molécules d'eau**.

1- Efflux d'eau : Les mouvements de l'eau à travers les membranes biologique sont facilités par la présence des **aquaporines**.

Les aquaporines

Les aquaporines appartiennent à la famille des MIP (Major Intrinsic Protein),

une famille de canaux membranaires très répandue chez les bactéries, les champignons, les insectes, les animaux et les plantes.

La première aquaporine procaryote identifiée est **AqpZ**, un canal aqueux bidirectionnel qui est impliqué dans l'osmorégulation chez *E. coli*.

L'expression du gène *aqpZ* est induite durant la phase exponentielle de croissance dans un environnement hypo-osmotique et réprimée dans un environnement hyper-osmotique

2- Efflux de solutés compatibles:

Les bactéries possèdent deux types de système d'efflux de solutés compatibles

-des **canaux de type mécanosensibles (système efflux rapide)** : la voie principale d'efflux rapide des osmolytes permettant la réduction rapide de la pression de turgescence. Ils sont activés par l'étirement de la membrane.

- E. coli possède au moins **trois canaux mécanosensibles appelés MscL, MscS et MscM** (Membrane Stretch Channel of Large, Small or Mini conductance)

-**Des transporteurs membranaires secondaires** (système d'efflux lent). la GB est rejetée dans le milieu extérieur par

- (i) des canaux chez [Corynebacterium](#) glutamicum
- (ii) Des canaux et des transporteurs membranaires chez Lactobacillus plantarum et Listeria monocytogenes.

Les autres solutés compatibles semblent être expulsés uniquement par des systèmes d'efflux de type canal mécanosensible.

