

I.2. Les systèmes de sécrétion chez les bactéries

Les systèmes de sécrétion permettent le transport de macromolécules (protéines ou nucléoprotéines) entre le cytoplasme bactérien et le milieu extérieur, à travers les membranes internes et externes des bactéries. Plusieurs types de systèmes de sécrétion sont couramment décrits chez les bactéries, ils sont classés selon leur composition en protéines, leurs similitudes en acides aminés et leurs mécanismes de fonctionnement.

I.2.1. Système de sécrétion chez les bactéries gram négatifs

a- Système de sécrétion de type I

Le système de sécrétion de type I a une structure relativement simple et est composé de seulement trois sous-unités protéiques (Baron et Coombes, 2007). Il est composé d'une protéine OMP (pour outer membrane protein) et d'une protéine MFP (pour membrane fusion protein). La protéine MFP forme un complexe dans l'espace périplasmique avec une protéine ABC (pour ATP-binding cassette ; Angkawidjaja et Kanaya, 2006).

L' α -hémolysine (HlyA) de *Escherichia coli* est la première protéine découverte comme étant sécrétée par le SST1 (Goebel et Hedgpeth, 1982 ; Henderson et al., 2004). Par ailleurs, ce système est connu pour être responsable de la sécrétion d'enzymes extracellulaires, comme par exemple, des protéases chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *P. syringae* pv. Tomato DC3000 et *P. putida* KT2440 (Delepelaire, 2004).

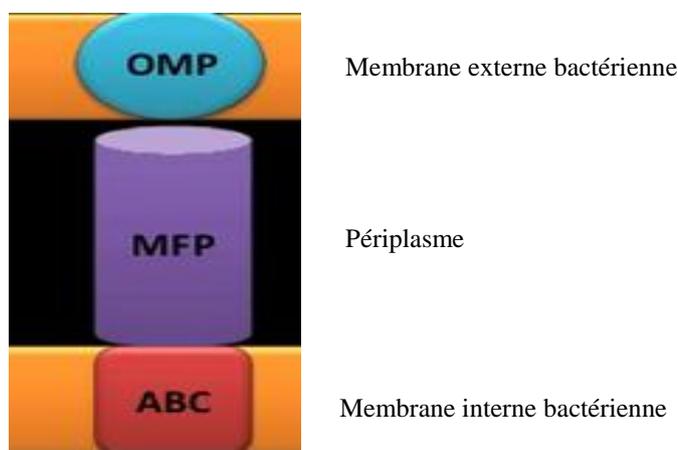


Figure : Système de sécrétion de type I

b- Système de sécrétion de type II

Le système de sécrétion de type II consiste en un assemblage de 12 à 16 protéines différentes comprenant notamment une ATPase, une protéine chaperonne et une peptidase (Cianciotto, 2005 ; Filloux, 2004)

Le SST2 met en jeu d'autres systèmes de transport moléculaires et est appelé système Sec-dépendant et/ou Tat-dépendant. La sécrétion des protéines est un processus en deux étapes par lequel les protéines sont d'abord transférées à travers la membrane interne de la bactérie par les systèmes de transport Sec ou Tat (Cianciotto, 2005). Le SST2 est un facteur important de virulence des bactéries pathogènes et sécrète des protéines dans l'environnement extracellulaire où elles sont capables de dégrader des composés des cellules hôtes, tels que des protéines, des lipides et des sucres de la matrice extracellulaire (Baron et Coombes, 2007 ; Cianciotto, 2005).

Ce système de sécrétion a d'abord été découvert chez *Klebsiella pneumoniae* où il est impliqué dans la sécrétion d'une lipoprotéine, l'enzyme pullulanase (PulA). Aujourd'hui, le SST2 de référence est celui de *K. oxytoca* également impliqué dans la sécrétion de la protéine PulA (Henderson et al., 2004). Par ailleurs, ces systèmes sont, par exemple, responsables de la sécrétion d'enzymes pectiques et de cellulase par *Erwinia* (Pallen et al., 2003) et de phosphatases et de lipases par *P. aeruginosa* (Cianciotto, 2005).

***Remarque :** Le processus de sécrétion par l'intermédiaire du SST2 n'est pas dépendant de la présence des cellules hôtes (Baron et Coombes, 2007). En revanche, SST3 et SST4 sont dépendants d'un contact avec les cellules hôtes (Baron et Coombes, 2007) et présentent la particularité d'être impliqués dans des interactions cellulaires directes entre les bactéries et d'autres organismes vivants (Pallen et al., 2003).

c- Système de sécrétion de type III

En forme d'aiguille, il est utilisé comme une sonde sensorielle pour détecter la présence d'organismes eucaryotes et sécréter des protéines bactériennes. Ces protéines sont sécrétées directement dans les cellules eucaryotes (hôte), où ils exercent un certain nombre d'effets qui permettent à l'agent pathogène de survivre et d'échapper à la réponse immunitaire. Il est décrit comme un système de micro-injection de facteurs de virulence et permet la sécrétion de protéines du cytosol bactérien directement dans le cytoplasme des cellules eucaryotes hôtes (Cornelis, 2006). D'abord décrits chez les pathogènes animaux du genre *Yersinia* (Michiels et al., 1990 ; Fig. 3), puis *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Shigella* et *Salmonella*.

Plus récemment, et en grande partie grâce au développement de la génomique, des SST3 ont été décrits chez des bactéries symbiotiques d'animaux. Des SST3 ou des séquences homologues à des gènes codant des SST3 ont également été décrits chez des bactéries non symbiotiques appartenant au groupe des *Pseudomonas* et connues pour être non pathogènes voire bénéfiques pour la croissance et la santé des plantes.

d- Système de sécrétion de type IV

Chez les bactéries à Gram négatif, les SST4 servent au transport de protéines mais aussi au transport de complexes macromoléculaires qui sont composés de protéines seules ou bien associées à de l'ADN.

On peut ainsi diviser les SS T4 en trois familles

- Les systèmes de conjugaison permettant le transfert d'ADN vers une cellule réceptrice cible en établissant un contact direct (conjugaison).
- Les systèmes de transport de protéines qui exportent les molécules effectrices du pathogène vers les cellules eucaryotes durant l'infection. La plupart de ces SST4 injectent leur substrat directement dans le cytosol de la cellule eucaryote comme pour les SST3.
- Les systèmes dites de « compétence » assurant l'échange d'ADN avec le milieu extracellulaire.

a- Le système de sécrétion de type V

On y retrouve les **autotransporteurs** (Va ou AT-1), **les systèmes à deux partenaires** (Vb) et plus récemment le système **chaperonne-usher** (Vc ou AT-2), ces trois systèmes ont aussi la particularité de fonctionner en absence d'ATP, ce qui est tout a fait atypique par rapport aux autres systèmes de sécrétion connus (Thanassi et al., 2005).

Les autotransporteurs :

Comme leur nom l'indique, les protéines secrétées par cette voie contiennent dans leur séquence toute l'information nécessaire pour être exportées. Cette séquence primaire peut être divisée en trois parties distinctes : la séquence signal, le domaine passager et l'unité de translocation (Henderson et al., 2004). Chaque partie aura un rôle à jouer dans l'acheminement de l'autotransporteur dans le milieu extracellulaire.

Les systèmes à deux partenaires :

Les systèmes à deux partenaires synthétisent deux protéines différentes dont l'une correspond au domaine passager (exoprotéines) et l'autre au domaine B (domaine transporteur).

La voie chaperon usher

Le système Vc (chaperons-usher) est constitué d'une protéine chaperonne périplasmique et d'une protéine intégrale de l'OM appelée usher. Ce système est dédié à la sécrétion et l'assemblage d'appendices de surface tels que les pili ou fimbriae mais interviendrait aussi dans la formation de la capsule bactérienne (Thanassi et al., 2005).

b- Le système de sécrétion de type VI

Responsable de la sécrétion des protéines Hcp (Hemolysin-Coregulated Protein), codé par les gènes *vas*. Les T6SSs seraient composées de 12 à 20 protéines selon les espèces. Chez *V. cholerae*, le cluster T6SS comprend 18 gènes au total : 4 semblent être des composants structuraux, 2 des molécules effectrices, une serait une chaperonne (Pukatzki et al., 2006) et la fonction des autres reste inconnue.

I.2.2. Système de sécrétion chez les bactéries gram positifs

- ✓ Composé de 12 à 25 protéines,
- ✓ La sécrétion se fait uniquement en une seule étape à travers des systèmes localisés au niveau de la membrane plasmique
- ✓ Les systèmes impliqués dans la sécrétion sont : système **sec** ou **Tat dépendant** :

Parmi ces systèmes cités, il y en a ceux :

- ✓ **sec indépendants** (type 1 et type 3),
- ✓ **sec ou tat dépendants** (type 2, 4, 5, et 6)

a- Système sec

C'est un système qui permet l'exportation des protéines non conformées en utilisant comme source d'énergie l'hydrolyse de l'ATP. Les substrats de ce système présentent en N terminal un peptide signal qui sera clivé dans le périplasme par une peptidase ce qui aboutit à la mise en conformation des protéines.

b- Système tat

C'est un système qui permet l'exportation des protéines mises en conformation dans le cytoplasme en utilisant comme source d'énergie la force protomotrice (gradient de protons de part et d'autre de la membrane), les substrats de ce système présentent en N terminal une séquence signal, contenant deux arginines consécutives, qui sera clivée après le passage dans le périplasme.

Chapitre II : Influence de l'environnement sur la croissance bactérienne

Introduction

La notion de stress est liée aux conditions hostiles auxquelles sont confrontés les êtres vivants dans les différents écosystèmes qu'ils occupent. Chez les bactéries, un stress est l'état physiologique dans lequel se trouve le microorganisme lorsqu'il est soumis à un traitement subléthal ou lorsqu'il se trouve dans un environnement défavorable.

Face à ces stress, les bactéries peuvent répondre selon 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 ;
- Eliminer le stress (dégradation des molécules toxiques tels que les antibiotiques) ;
- Tolérer le ou les stress : réparation des dommages intracellulaire et adaptation physiologique et moléculaire.

I-Stress thermique

La température influence la croissance, la physiologie et la survie des microorganismes. L'élévation ou l'abaissement de la température provoque des perturbations importantes de la croissance qui font suite à des lésions de la membrane et de la paroi ainsi que des altérations des macromolécules cytoplasmiques (protéine, ADN, ARN, ribosomes). La réponse face au stress thermique se traduit par la synthèse de protéines de type Hsp (pour Heat-Shock protein) ou de type Csp (pour Cold-shock protein) réparant les dommages (réduction des surenroulements négatifs de l'ADN, dégradation/ repliement des protéines dénaturées) et préparant la bactérie à survivre dans les conditions plus délétères (maintien du niveau de transcription et de la traduction, modification de la proportion d'acide gras courts et/ ou insaturés dans les lipides, activation des mécanismes de réponse générale au stress).

Choc thermique chaud

Provoque une dénaturation des protéines et leur agrégation, une déstabilisation des ribosomes et de l'ARN ainsi qu'une modification de la fluidité membranaire. Les protéines induites par un choc thermique chaud correspondent principalement à des protéines chaperonnes (DnaK, DnaJ, GrpE, GroES et GroEL) et à différentes protéases (Clp, HtrA, FstH), très conservées dans le monde bactérien. Les gènes correspondants sont inductibles par un choc hyper-thermique.

Choc thermique froid

La croissance à basse température provoque des modifications physiologiques importantes comme la baisse de la fluidité membranaire (et donc une perturbation de l'activité des protéines membranaires) et la stabilisation des structures secondaires des ARN et de l'ADN dont résulte une chute de l'efficacité de traduction, de transcription et de réplication de l'ADN. Les microorganismes sont capables de développer une réponse adaptative transitoire pendant laquelle un certain nombre de protéines de stress sont synthétisées. Ces protéines de choc froid auront des rôles différents au sein de la cellule en assurant par exemple le maintien de la fluidité membranaire par augmentation de la proportion de lipides à courte chaîne carbonée et/ou d'acide gras insaturés. Les protéines induites peuvent se révéler différentes (en nombre et/ou en structure et/ ou suivant leur fonction) selon que la contrainte est de type choc ou de type croissance prolongée à basse température (acclimatation). Chez *L.monocytogenes* différentes protéines sont induites en réponse à une diminution de la température de 37°C à 5°C, tandis que seules quatre protéines sont synthétisées en réponse à une croissance prolongée à 5°C (Wilkinson, 2000).

C'est également le cas chez *Escherichia coli* (**Richle et al., 2003**). Parmi les protéines induites par un choc froid, certaines sont appelées Csp (Cold Shock Protein) et auraient un rôle de régulation et d'induction d'autres protéines de froid. Cinq Csp ont été identifiées chez *Lc. Lactis* MG1363 et seulement deux chez *Lc. Lactis* (Guédonet al., 2001). Ces Csp sont capables structurellement de s'associer soit à l'ADN simple brin soit à l'ARN et de maintenir des niveaux de transcription et de traduction compatibles avec la croissance de la bactérie à basse température (**Phadtare et al., 2000**). Les protéines Csp maintiennent également le niveau de surenroulement de l'ADN, par réduction des surenroulements négatifs.

1. Les protéines de choc thermiques

Lorsque la bactérie est soudainement exposée à une température plus élevée (40 à 42°C) c'est-à-dire une élévation brutale de la température, le profil protéique des cellules qui la compose, révèle la disparition d'un grand nombre de protéines, leur masse moléculaire s'étage de 20 à 100 kDa.

1.1. La classification des protéines de choc thermique Hsp

Par immunodétection, sont identifiées 5 protéines interagissant avec des anticorps dirigés contre les hsp majeures d'*E. coli*: DnaK, DnaJ, GroEL, GrpE (**Auffray et al., 1992**), et Lon ; deux autres protéines (**Auffray et al., 1992**) réagissent avec les anticorps du facteur sigma majeur (σ^{43}) de *Bacillus subtilis* (J'I3), et de la hsp 104 de *Saccharomyces cerevisiae*, (homologue de la protéase ClpB d '*E. coli*) (**Boutibonnes et al., 1995**).

1.1.1. Dnak :

membre de la famille HSP70; sont des protéines chaperonnes (**Ellis, 1987; Hemmingsen et al., 1988**). Un mutant chez lequel le gène *dnak* a été délété ne montre aucun changement phénotypique apparent et pousse normalement, ce qui indique que DnaK n'est pas essentielle à la croissance ; par contre, la résistance aux chocs thermiques est grandement diminuée (**Reyes et Yoshikawa, 2002**).

1.1.2. DnaJ : Descend de la famille de HSP40, elles semblent être constitutivement mais faiblement produites chez *E. coli*, et d'ailleurs une surproduction de DnaJ chez cette dernière est toxique pour la bactérie (**Auffray et al., 1992**).

1.1.3. GroEL : Dans la famille des Hsp60, la protéine la plus étudiée est la protéine d'*Escherichia coli* appelée GroEL (57.3kDa) (**Kim et Batt, 1993**); ce sont des protéines chaperonnes (**Ellis, 1987; Hemmingsen et al., 1988**) (**Georgopoulos et al., 1973**), cette protéine est essentielle à la croissance bactérienne chez *E. coli* (**Auffray et al., 1992**). La séquestration individuelle des polypeptides néoformés à l'intérieur des protéines Hsp60 a été

considérée comme une dilution infinie de la protéine pour la prévenir de l'agrégation (**Auffray et al., 1992**).

1.1.4. GroES : La Co-chaperon GroES (10.3Kda) membre de la famille HSP10 (**Georgopoulos et al., 1973**), cette protéine est essentielle pour la croissance bactérienne chez *E.coli* (**Auffray et al., 1992**).

1.1.5. GrpE : protéines de 94 kDa alors qu'elle est chez *E. coli* classée parmi les hsp à faible masse moléculaire (**Auffray et al., 1992**).

1.1.6. Lon (55 kDa) : ce sont des protéases endocellulaires les composantes de la machinerie de chaperonnage, elles sont hautement conservées dans l'évolution et on la retrouve chez une grande variété de bactéries (**Boutibonnes et al., 1995**); elles ne représentent que le tiers des hsp repérées. (**Georgopoulos et al., 1990 ; Morimoto et al., 1994**).

1.1.7. ClpB : sont des protéases endocellulaires les composantes de la machinerie de chaperonnage, collaborent avec la machinerie DnaK lors de la solubilisation d'agrégats protéiques et peuvent être toxique pour la cellule (**Boutibonnes et al., 1995**). Par exemple, les protéines de hauts poids moléculaires sont particulièrement vulnérables à la dénaturation thermique ainsi qu'à l'agrégation et le coopératif ClpB-DnaK permet leur dégradation (**Mogk et al., 1999**) elles ne représentent que le tiers des hsp repérées, les protéines identifiées appartiennent à tous les grands groupes (**Georgopoulos et al., 1990 ; Morimoto et al., 1994**) ; clpB est l'homologue bactérien de la hsp 104 de *Saccharomyces cerevisiae* (**Sanchez et Lindquist, 1990**).

1.1.8. HflB : est une protéase membranaire ATP-dépendante homologue de FtsH, il est classé parmi les protéines de choc thermiques (**Nillson et al., 1994**).

1.1.9. Les smHsp des bactéries lactiques : Nouvellement, lors d'un choc thermique à 42 °C ou bien lors d'un passage rapide de 30 à 37 ou à 42°C quatre smHsp ont été étudiées chez des bactéries lactiques. Chez *Lactobacillus delbrueckii*, le gène d'une smHsp a été partiellement séquencé. Une smHsp de 16 kDa a été purifiée et entièrement séquencée chez *Streptococcus thermophilus* (**Gonzalez-Marquez, 1997**). D'autres smHsp ont fait l'objet d'études génétiques. Enfin, deux smHsp sont bien caractérisées au niveau moléculaire: une smHsp de 17 kDa chez *Lactobacillus helveticus* (**Timpone et al., 1996**) et Lo 18, une smHsp de 18 kDa chez *Oenococcus oeni* (**Jobin et al., 1997**).

1. 2. La structure des protéines de choc thermique Hsp

Le repliement d'une protéine requiert un temps de quelques millisecondes, tandis que sa formation sur le ribosome demande un temps de l'ordre de la seconde. Le repliement devrait donc théoriquement commencer avant la fin de la biosynthèse. De plus, la protéine nouvellement synthétisée, et non repliée, ne peut pas rester sous forme linéaire; elle adopte une conformation particulière dite "fondue". Dans cette conformation, les résidus hydrophobes sont tournés vers l'extérieur de la molécule et cette dernière devient très sensible à l'agrégation.

1.2.1. Dnak : celle-ci est ATP-dépendante et l'on remarque que sous sa forme couplée à l'ATP, elle ne possède qu'une faible affinité envers son substrat (**Winter et Jakob, 2004**) ; le système Dnak est le plus efficace parmi les systèmes de chaperonnes dans la prévention de l'agrégation protéique (**Mogk et al., 1999**).

1.2.2. DnaJ : ce sont identifiables par la présence d'un domaine J d'environ 70 acides aminés (**Ohki et al., 1986**). Les protéines DnaJ interagissent avec les protéines DnaK via ce domaine J de façon à faciliter et réguler le repliement protéique. DnaJ est ATP-indépendante, elle se lie au précurseur ou aux intermédiaires du repliement mais ne semble pas impliquée directement dans la transition vers la forme native de la protéine, elle transfère donc son substrat vers DnaK qui prendra en charge le repliement. En période de stress cellulaire, l'activité de DnaJ est augmentée et la protéine demeure liée au précurseur. Lorsque les conditions normales sont régénérées le précurseur est transféré vers DnaK qui effectuera l'étape du repliement (**Goloubinoff et al., 1999**).

1.2.3. GroEL : Chez *E.coli*, GroEL est une protéine oligomérique tétradécamère (14mers) arrangé en une structure de double anneau symétrique ATPase un anneau (7mers) de 60 kDa de GroEL; ces protéines est généralement localisées dans le cytoplasme, néanmoins quelques auteurs ont montré que certains de ces protéines localisent dans la membrane par exemple chez *Helicobacter pylori* et *Neisseria gonorrhoeae*.

GroEL est un complexe protéique composé de deux fois sept sous-unités identiques de 57 kDa arrangées en deux tores superposés. Cette structure caractéristique, de 14 nm de diamètre extérieur et 15 nm de hauteur, délimite un canal central de 4,5 nm de longueur. Elle a été observée en microscopie électronique à transmission, en cristallographie et en microscopie à force atomique. Le poids moléculaire du complexe est d'environ 840 kDa.

Chaque monomère est composé d'un domaine apical, d'un domaine intermédiaire et d'un domaine équatorial. Le domaine équatorial est le plus grand des trois, il est responsable des liaisons entre les différentes sous-unités du complexe. Il contient également le site de fixation

et d'hydrolyse de l'ATP. Le domaine intermédiaire est le plus petit, il sert probablement de charnière mobile lors des cycles d'association et de dissociation du substrat. Enfin, le domaine apical forme la paroi de la cavité centrale, véritable "banc de travail" de la protéine.

La protéine GroEL a la particularité de se lier à une autre molécule chaperon de la famille des Hsp10 appelée GroES chez *Escherichia coli*. Les protéines GroEL était phosphorylée en condition de choc thermique (**Sherman et Goldberg, 1992**).

1.2.4. GroES : Anneaux de 7 mers de 10kDa ; La forme native de GroES est un heptamère qui peut venir se fixer sur le tétradécamère GroEL pour former le complexe GroE. La liaison s'effectue au niveau d'un site particulier de GroES, une boucle de 17 acides aminés. La fixation et le relargage de cette protéine interviennent dans les mécanismes de régulation de l'activité de GroEL. La fixation éventuelle de deux heptamères GroES sur chacun des anneaux GroEL, de façon à former une structure symétrique. En effet, la fixation de GroES sur un anneau GroEL inhibe fortement la fixation d'un autre GroES sur l'anneau opposé. Mais à forte concentration en Mg (15 à 20 masse moléculaire) il est possible de former des complexes symétriques (**Sherman et Goldberg, 1992**).

1.2.5. GrpE : Le GrpE est un facteur d'échange de nucléotides au niveau de la machinerie de DnaK, un mutant pour GrpE devient également plus résistant à une température de 50°C que la souche sauvage (**Delaney, 1990**). Un gène homologue au gène *grpE* retrouvé chez *E.coli* a été séquencé chez *B.subtilis* (**Wetzstein et Schumann, 1990**).

1.2.6. Lon : immunologiquement semblables à leurs homologues bactériens connus, avec lesquels elles présentent des épitopes communs, elles s'en éloignent quelquefois par leur masse moléculaire ; les mutants *lon* sont viables mais sensibles aux dommages causés à l'ADN, Lon est un tétramère formé de quatre sous-unités identique, chaque monomère se divise en trois domaines : le domaine N-terminal ayant une fonction encore obscure, le domaine central porteur de l'activité ATPase et le domaine catalytique C-terminal (**Gottesman, 1996**).

1.2.7. ClpB : Bien que ClpB possède plusieurs caractéristiques communs aux autres composantes ; elle possède des propriétés fonctionnelles distincte.

Premièrement, elle ne reconnaît aucun substrat standard pris en charge par les autres chaperonnes et privilégie plutôt les agrégats protéiques; deuxièmement, elle ne possède pas de protéase comme les autres partenaires (**horwich, 2004**). Le ClpB possède une structure tridimensionnelle (**Lee et al., 2004**).

Une mutation au niveau de la protéine ClpB permet toujours à celui-ci de se lier à l'ATP mais inhibe l'étape de l'hydrolyse. Le mutant est par ailleurs apte à s'associer de façon stable avec

des substrats protéiques contrairement à la souche sauvage, l'hydrolyse de l'ATP est donc essentielle au relâchement du substrat (**Weibezahn et al., 2003**).

1.2.8. HflB : La protéine HflB possède un domaine de liaison au Zn et une activité envers σ^{32} et elle possède aussi des fonctions attribuées à la famille des ATP ases (**Deuerling et al., 1997**).

1.2.9. Les smHsp des bactéries lactiques : Les smHsp sont les protéines de stress les moins conservées dans leur séquence en acides aminés. Cela explique les pourcentages d'identités assez faibles au sein des bactéries lactiques (inférieurs à 38 %) par rapport aux Hsp de plus haut poids moléculaire qui sont souvent conservées pour plus de 50 % de leur séquence. Les smHsp des bactéries lactiques présentent cependant un motif consensus dans leur région C-terminale et appartiennent à une même famille apparentée aux α -cristallines des Eucaryotes. La région C-terminale bien conservée parmi ces protéines semble être impliquée dans cette activité de chaperonne (**Takemoto et al., 1993**) qui est localisée au centre des complexes multimériques (**Boyle et al., 1993**).

1. 3. La fonction des protéines de choc thermique Hsp

La fonction générale de la protéine de choc thermique Hsp est l'assistance et la réponse à l'état de repliement des protéines dans la cellule ; et chaperonnes la liaison aux protéines nouvellement synthétisées, partiellement repliées ou non repliées pour promouvoir leur repliement "folding" ou ré-repliement "refolding" pour limiter les interactions non productives qui conduisent à l'agrégation ou au mauvais repliement Ex GroEL-GroES et DnaK-DnaJ ; mais chacun de ces protéines portent une fonction spécifique.

Une protéine chaperon est une protéine dont la fonction est d'assister d'autres protéines dans leur maturation. En leur assurant un repliement tridimensionnel adéquat (Ellis, 1987; Hemmingsen *et al.*, 1988).

1.3.1. Dnak : Cette protéine participe au repliement dans une conformation correcte des protéines en cours de synthèse et sont capables de rompre des agrégats protéiques provoqués par le stress ; en séquestrant les régions hydrophobes des nouvelles chaînes pour les prévenir de l'agrégation (**Goloubinouff et al., 1999**).

1.3.2. DnaJ : Les DnaJ assistant les protéines chaperonnes. Il a été démontré que l'activité ATPase de DnaK est grandement stimulée (environ 5 fois) par la présence simultanée de DnaJ et de GrpE. L'action des deux protéines serait toutefois séquentielle puisque la présence unique de DnaJ accélère le taux d'hydrolyse de DnaK tandis que celle de GrpE seule n'a un effet que sur le relâchement d'ATP ou d'ADP sans toutefois affecter le taux d'hydrolyse (**Liberek et al., 1991**).

1.3.3. groEL : Elles participent au repliement dans une conformation correcte des protéines en cours de synthèse et sont capables de rompre des agrégats protéiques provoqués par le stress; en isolant les intermédiaires partiellement renaturés pour limiter les mauvaises interactions; en plus elle est impliquée dans la synthèse de la tête et de la queue de certains phages. Chez *E.coli*, il démontre que le repliement du précurseur de la β -lactamase purifié est inhibé par l'ajout de GroEL ou du complexe GroEL/ES à un ratio d'une molécule de pré- β -lactamase. GroEL et GroEL/ES en présence de précurseur sous sa forme replié induisent un « dépliement » de ce dernier, le phénomène peut être reversé par l'ajout de Mg^{+2} et d'ATP (**Laminet et al., 1990**).

1.3.4. GroES : Cette Hsp assistant les protéines chaperonnes; la présence de GroES seule n'a par ailleurs aucun effet sur le repliement, mais l'ajout de Mg^{+2} et d'ATP, occasionne un repliement permettant d'obtenir un taux de β -lactamase active supérieur à ce qui est observé en absence de GroEL ou de complexe GroEL/ES (**Laminet et al., 1990**).

1.3.5. GrpE : Sont des Hsp assistant les protéines chaperonnes; le GrpE se lie à DnaK et accélèrent la dissociation de l'ADP de DnaK pour le remplacer par de l'ATP. Chez *E. coli*, le facteur d'échange GrpE accélère la dissociation du complexe substrat/DnaK en présence d'ATP seulement (**Brehmer et al., 2004**). Il a été démontré que l'activité ATPase de DnaK est grandement stimulée (environ 5 fois) par la présence simultanée de DnaJ et de GrpE. L'action des deux protéines serait toutefois séquentielle puisque la présence unique de DnaJ accélère le taux d'hydrolyse de DnaK tandis que celle de GrpE seule n'a un effet que sur le relâchement d'ATP ou d'ADP sans toutefois affecter le taux d'hydrolyse (**Liberek et al., 1991**).

1.3.6. Lon : Cette famille de protéines dégradent les protéines repliées non correctement ou anormales, elle nécessite la présence d'une molécule d'ATP pour cette dégradation. Elles participent par un mécanisme ATP-dépendant à la désagrégation et à la restauration des protéines fonctionnelles endommagées par la chaleur (DnaK et GroEL) (**Craig et al., 1993**).

Lon contribue à la régulation de plusieurs fonctions cellulaires, dont la division cellulaire et la dégradation de certaines protéines anormales ainsi que des protéines régulatrices à courtes vies; elle a également été reconnue comme intervenant dans la réaction aux chocs thermiques (**Phillips et al., 1984**) et possède la capacité de se lier spécifiquement à l'ADN (**Fu Smith et Markovitz, 1997**).

1.3.7. ClpB : Le ClpB se lie directement aux agrégats protéiques et l'ATP serait responsable d'un changement structural chez ces derniers permettant une plus grande exposition de régions hydrophobes au niveau des agrégats, ceci permettrait ensuite à la machinerie DnaK de se lier et prendre en charge la dissociation et le repliement des polypeptides solubilisés en protéines natives et fonctionnelles (Goloubinouff *et al.*, 1999).

1.3.8. HflB : Chez *E. coli* le HflB dégrade le facteur (J32) donc il serait impliqué dans la dégradation de protéines cytoplasmiques ou membranaires. Un mutant de HflB présente un trouble de croissance cellulaire important (Shirai *et al.*, 1996); une surproduction de HflB accélère le processus de dégradation (Kihara *et al.*, 1995); de plus, bien que viables, ces mutants présentaient une incapacité à sporuler et une déficience au niveau de sécrétion d'une large variété d'exo-protéines (Deuerling *et al.*, 1997).

1.3.9. Les smHsp des bactéries lactiques : Elles possèdent une activité de chaperonne in vitro comparable aux Hsp de plus haut poids moléculaire. Elles limitent l'agrégation des protéines en conditions dénaturantes et favorisent leur renaturation en conditions normales de manière ATP-indépendante (Horwitz, 1992).

Au sein des procaryotes, il a été montré que chez *Mycobacterium tuberculosis*, une smHsp de 16 kDa homologue des α -cristallines est capable de former des complexes multimériques et possède une activité de chaperonne in vitro. La surexpression de cette smHsp limite l'autolyse des cellules lors de la phase stationnaire tardive (Yuan *et al.*, 1996). Cette smHsp est aussi l'un des facteurs antigéniques majeurs de *M. tuberculosis* (Chang *et al.*, 1996).

La membrane plasmique étant la première cible lors d'un stress thermique, il est possible que la smHsp Lo18 soit impliquée dans la réponse permettant le maintien de l'intégrité de la membrane d'*Oenococcus oeni* en participant par son activité de chaperonne à l'adaptation de la structure membranaire aux nouvelles conditions environnementales (Jobin *et al.*, 1997).

2. La régulation génétique de la synthèse des protéines de choc thermiques

2.1 Régulation de la synthèse des protéines de choc thermique

Six gènes des hsp majeures chez *Lactobacillus lactis* ont été reconnus, clonés puis séquencés, ce sont : *dnaJ*, *dnaK*, *groEL*, *groES*, *grpE*, *rpoD* et Un septième gène thermo-régulé, homologue de *ftsH* (*hf/8*) est identifié chez *E. coli* (Nilsson *et al.*, 1994) son produit, la protéine transmembranaire HflB, douée d'une faible activité ATPasique participerait - comme DnaK, DnaJ, GrpE - à la régulation négative de la réponse subordonnée à σ_{32} dont il contrôlerait la dégradation et par là le niveau endocellulaire (Herman *et al.*, 1995 ; Duwat *et al.*, 1995).

A cet ensemble non clos, il faut ajouter le gène *recA*, pièce centrale du régulon SOS, son produit, la protéine Rec A, exercerait un effet régulateur sur le système multigénique de choc thermique en contrôlant le taux de HflB (Duwat *et al.*, 1995).

Les gènes sont isolés ou groupés en petits opérons, qui rappellent ceux d'*E coli* (*groEL-ES*) (Kim et Batt, 1993), de *B subtilis* (*grpE-dnaK*) (Barril *et al.*, 1994), ou des deux espèces (*rpoD-dnaE*) (*B subtilis*) ou (*rpoD-dnaG*) (*E. coli*). Cependant, chez *L lactis* l'opéron *dnaK* comprend deux autres cadres ouverts de lecture (*ort*) (Eaton *et al.*, 1993).

Les cadres ouverts de lecture ou les opérons de *Lactobacillus lactis* sont précédés:

- par un promoteur végétatif présentant des séquences -35 et -10 caractéristiques (TTGACA et TAAAAT) (Eaton *et al.*, 1993).

- par une IR (répétition inversée) de 9 à 12 pb formant une structure en tige et boucle (stem-loop), identique à celle repérée chez *B subtilis* et chez d'autres bactéries Gram-positives (Eaton *et al.*, 1993).

- par un site de fixation des ribosomes, (séquence de Shi ne Dalgarno) complémentaire de l'ARN 16S (AGGAG pour *dnaK*). Chez certains d'entre eux (*rpoD*) sont inclus une séquence TGN, présente dans environ 50 % des gènes des bactéries Gram-positives et une autre répétition inversée faisant office de terminateur potentiel (Araya *et al.*, 1993). Aucun ne montre le motif consensuel qui signe l'existence d'un promoteur reconnu par un facteur sigma alternatif, comme σ_{32} ou σ_{24} (QE) d'*E coli* (Lindquist, 1986).

Le séquençage des gènes isolés, ou groupés en opérons et de leurs zones promotrices exclusivement végétatives remet en question l'universalité du seul modèle accepté ces dernières années (Neidhardt *et al.*, 1984 ; Neidhardt et Van Bogelen, 1987 ; Lindquist et Craig, 1988), celui d' *E coli*, qui se résume à une commutation transcriptionnelle.

Classiquement, la réponse à une stimulation thermique s'accompagne dans les minutes qui suivent par le remplacement du facteur sigma majeur (σ_{70}), dégradé à une température non permissive, par le facteur sigma alternatif (σ_{32}) (Calendar *et al.*, 1988) stable et même activé à haute température, et dont la synthèse est par ailleurs amplifiée sous l'effet d'un autre facteur (σ_{24} ou σ_E) qui reconnaît le promoteur P3 de *rpoH* et son propre promoteur P2, assurant ainsi son autorégulation (Bukau, 1993 ; Yura *et al.*, 1993).

L'inflexion de la réponse et le retour à l'état de repos est sous la dépendance de Hsps, DnaK, GroEL, GrpE, HflB ou FtsH (Herman *et al.*, 1995).

Le facteur σ_{32} conduit à la transcription de la vingtaine de gènes qu'il reconnaît grâce à leur motif hs (heat-shock) et qui composent ce régulon conventionnel. La majeure partie des protéines dont les gènes sont inclus dans le régulon dépendant de σ_{32} présentent une affinité

pour d'autres protéines cellulaires, cibles de la chaleur, qu'elles assistent, désagrègent, restaurent ou dégradent. Elles participent vraisemblablement à la protection des cellules ou à leur sauvetage lorsqu'elles sont menacées par leur environnement thermique. Le facteur σ_{24} ou σ_E classé dans le groupe des facteurs ECF (extracytoplasmic function) contrôle l'expression d'une dizaine de gènes (dont *rpoH* et *rpoE*) dont les produits sont impliqués dans la croissance aux températures élevées (42-44 °C) dans la survie aux épreuves thermiques létales (50 °C) (**Rouvière *et al.*, 1995 ; Raina *et al.*, 1995**). Les produits des gènes de ce second régulon interviendraient dans le compartiment extracytoplasmique (**Mecsas *et al.*, 1993**).

La régulation transcriptionnelle positive s'exprimant, chez *E coli*, par une permutation des facteurs σ_{70} aux facteurs σ_{32} et σ_{24} eux mêmes emboîtés, se substitue chez *B subtilis*, au moins pour un groupe de gènes, un mécanisme à régulation négative en cis faisant intervenir, outre le couple promoteur-facteur sigma végétatif, la reconnaissance d'un élément *hs* (CIRCE), couplé à l'altération d'un hypothétique répresseur (Fig 1). Deux modèles nous sont ainsi proposés l'un complexe, étranger semble-t-il aux éléments aujourd'hui reconnus, par l'analyse des gènes séquencés, chez *Lactobacillus lactic* l'autre moins élaboré, qui traduit une riposte plus fruste aux sollicitations thermiques (**Zuber et Schumann, 1994**).

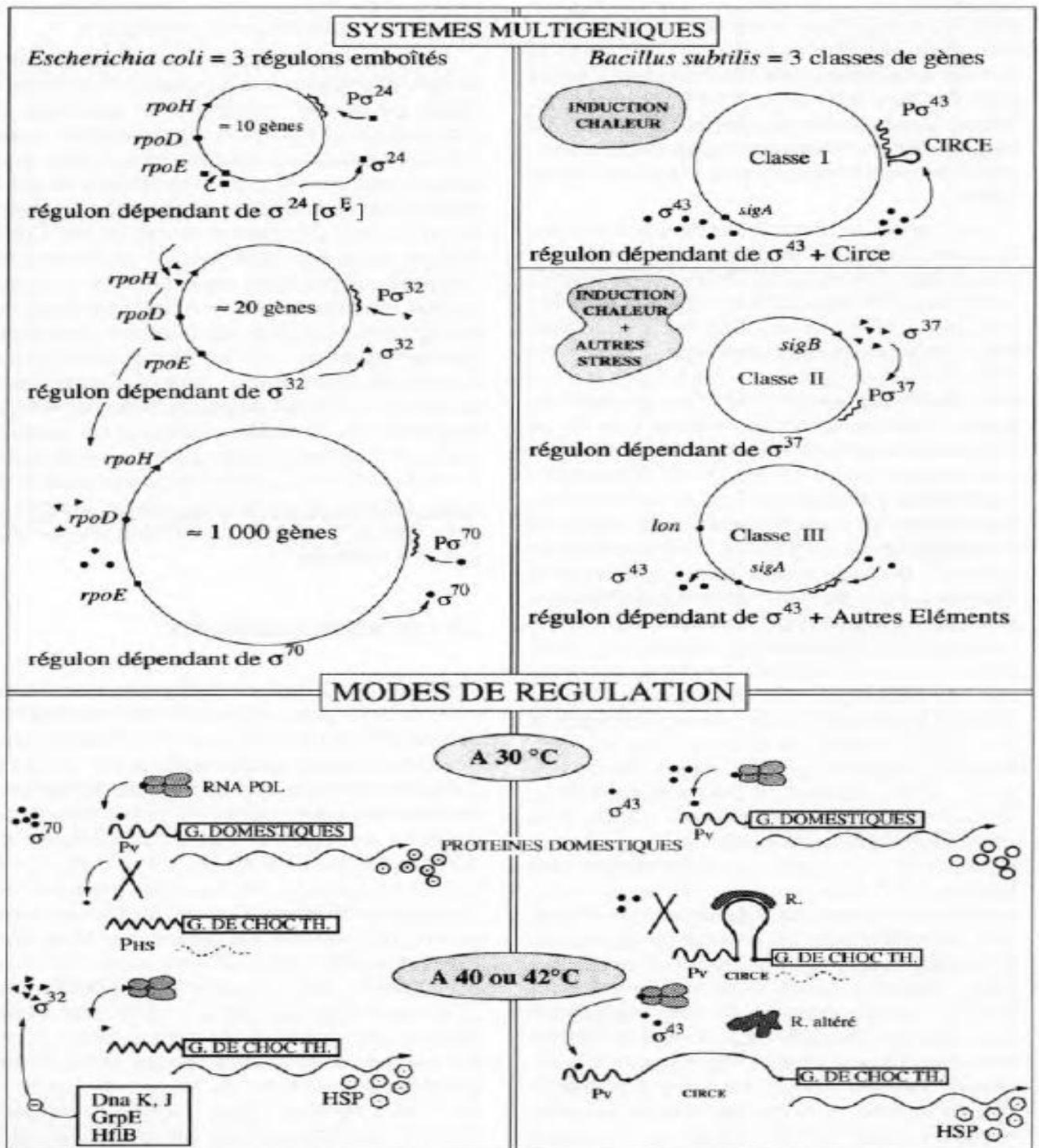


Figure 1. Régulation de l'expression des gènes de choc thermique chez *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*. A : Systèmes multigéniques impliqués dans la réponse au choc thermique chez ces 2 espèces. B. Modes de régulation de l'expression des gènes (σ^{70} (*rpoD*) ; (σ^{32} (*rpoH*) ; (σ^{24} ou (σ^E (*rpoE*) ; Pv : promoteur végétatif dépendant de (σ^{70} (*E. coli*) ou de (σ^{43} (*B. subtilis*), Phs: promoteur de choc thermique reconnu par (σ^{32}), hse: séquence IR (inversion répétée) constituant l'élément de choc thermique (CIRCE) de *B. subtilis*, ORF: cadre ouvert de lecture, T: terminateur potentiel R: protéine «répresseur» hypothétique .

II- Stress osmotique

L'osmose est le phénomène de diffusion de molécules de solvant, généralement l'eau, à travers une membrane semi-perméable (**Potss, 1994**), qui sépare deux liquides de concentration en soluté différentes. Par définition la membrane semi-permeable ne permet pas le passage de soluté. Le solvant diffuse de la solution la moins concentrée vers la solution la plus concentrée, de façon à équilibrer tant que possible la concentration de part et d'autre de la membrane et à atteindre ainsi la stabilité thermodynamique.

L'abaissement de l'activité de l'eau extérieur provoque un stress osmotique chez les bactéries qui se matérialise par une diminution de la pression de turgescence pouvant conduire à la plasmolyse cellulaire et une dénaturation des macromolécules causée par l'augmentation de la force ionique. La réponse des bactéries au stress hyper-osmotique consiste principalement à accumuler des composés dits compatibles avec les fonctions cellulaires (Sleator et Hill, 2002). Une augmentation brusque de l'osmolarité du milieu externe entraîne un rapide flux d'eau vers l'extérieur de la cellule, qui a pour conséquence une diminution de la pression de turgescence, le moteur de l'élongation des cellules, une variation de la concentration cytoplasmique en solutés et un changement du volume cellulaire (plasmolyse dans les cas extrême). A l'inverse, un choc hypotonique provoque une entrée d'eau dans la bactérie et une augmentation du volume cytoplasmique et de la pression de la turgescence.

Lors d'un choc **hyper-osmotique** (augmentation brusque de l'osmolarité du milieu extérieur), les bactéries non halophiles accumulent dans leur cytoplasme des molécules osmotiquement 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. 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.

Lors d'un choc **hypo-osmotique**, les bactéries mettent en place des mécanismes d'efflux :

- ✓ de solutés via des systèmes spécifiques (transporteurs secondaires) et non spécifiques (canaux mécanosensibles),
- ✓ d'eau à travers des canaux aqueux appelés aquaporines, afin de diminuer la pression de turgescence cellulaire.

Le terme osmoadaptation décrit l'ensemble des manifestations physiologiques et génétiques de l'adaptation à un environnement de forte ou de faible osmolarité (**Galinski**,

1995). L'osmorégulation est le processus majeur d'osmoadaptation contrôlant l'afflux et l'efflux de solutés de la cellule (les mouvements d'eau étant considérés comme essentiellement passifs) lorsque cette dernière est placée dans des conditions de culture hyper- ou hypo-osmotiquement stressantes (O'Byrne et Booth, 2002).

✓ *La stratégie des bactéries halophiles : « salt in cytoplasm »*

La stratégie « salt in cytoplasm » est un mécanisme spécifique aux Halobactéries (Martin et al., 1999) grâce auquel l'équilibre osmotique est obtenu en maintenant dans le cytoplasme une concentration en sel identique à celle du milieu extérieur. Chez certaines espèces du genre *Halobacterium*, la concentration en KCl dans le cytoplasme peut atteindre 7 M (Lanyi, 1974). Aussi, les Halobactéries ont développé des mécanismes d'adaptation qui leur permettent de disposer d'une machinerie cellulaire capable de supporter de fortes concentrations intracellulaires en ions (voir revue Sleator et Hill, 2002). Ainsi, la malate déshydrogénase de *H. marismortui* contient environ trois fois plus de résidus acides que son équivalent non halophile (Mevarech et al., 1977). La présence de sel dans le cytoplasme aura pour conséquence :

- ✓ de stabiliser cette protéine en réduisant les forces de répulsions entre les charges négatives,
- ✓ d'augmenter l'hydratation de cette protéine

III- Stress oxydatif

La toxicité de l'oxygène vis-à-vis des microorganismes est généralement attribuée aux molécules d'oxygène actives comme O₂⁻ (ion superoxyde) ou OH[•] (radical hydroxyle) qui détériorent les protéines, les lipides, les acides nucléiques et constituent ainsi une des causes majeures du vieillissement et de la mort cellulaire (Van de Guchte et al., 2002).

Les mécanismes de défense des bactéries vis-à-vis du stress oxydatif consistent à :

- a- Prévenir la formation des molécules d'oxygène actives en consommant l'oxygène libre [grâce à l'augmentation de l'activité désaturase consommatrice d'oxygène chez *Lb. helveticus* (Guerzoni et al., 2001) ou de l'activité NADH-oxydase chez *Lb. delbruekii* ssp. *bulgaricus* (Yi et al., 1998)
- b- Eliminer les molécules d'oxygène actives par dégradation enzymatique [grâce aux activités catalase/pseudocatalase chez *Lb. bulgaricus* (Engesser et Hammes, 1994), *Lb. Sakei* (Knauf et al., 1992) et *Lb. plantarum* (Kono et Fridovich, 1983) ou superoxyde dismutase chez *Lc. lactis* (Sanders et al., 1995)],

- c- Protéger les protéines des méfaits du stress oxydatif [protection des groupements thiol grâce au pool de zinc intracellulaire chez *Lc. lactis* (**Scott et al., 2000**),
- d- Réparer les dommages causés par le stress oxydatif [grâce au système RecA chez *Lc. Lactis* (**Duwat et al., 1995**) et des mécanismes généraux de la réponse au stress (**O'Connell-Motherway et al., 2000**).

IV- Stress acide

Est un stress provoqué par la diminution du pH extracellulaire, agit sur la croissance microbiennes en perturbant :

- ✓ L'équilibre ionique du milieu extérieur (certains ions métalliques, qui sont des cofacteurs enzymatiques précieux, formant alors des complexes insolubles non utilisables par la bactérie,
- ✓ La perméabilité membranaire des perméases cationiques, saturées en ions H⁺, n'assurant alors plus le transport d'autres cations indispensables à la bactérie,
- ✓ Certaines activités enzymatiques essentielles à la croissance microbienne

Les acides peuvent diffuser passivement à travers la membrane. Après leur entrée dans le cytoplasme, ils se dissocient rapidement en protons et en dérivés chargés, auxquels la membrane est imperméable. La chute de pH du milieu de culture entraîne celle du pH interne (pH_{int}). Ainsi, un abaissement du pH du milieu de 6.75 à 5 avec de l'acide lactique provoque une chute du pH_{int} de *Lc lactis* de 7.0 à 5.25, cette baisse du pH_{int} entraîne des dommages sur les protéines (dont la réduction de l'activité de certaines enzymes) et sur l'ADN (**Van De Dutche et al., 2002**).

D'autres travaux s'accordent sur le fait que la survie d'*E. coli* dans les aliments à pH acide, comme des jus de fruits, des produits carnés fermentés ou des salades, est favorisée lorsque ceux-ci sont conservés à des températures de réfrigération (**Conner et al., 1995**).

Les auteurs suggèrent fortement que lors de l'adaptation à un pH bas, des synthèses protéiques sont induites et sont responsables de l'amélioration de la tolérance au stress acide (**Heyde and portalier, 1990**). D'autres auteurs (**Barua et al., 2002**) ont évoqué des protéines liées à la membrane d'*E. coli* et notamment la nécessité d'une expression complète du lipopolysaccharide O et de l'ECA (Enterobacterial Common Antigen) pour résister à l'acide acétique et d'autres acides gras à courte chaîne. Ces protéines élaborées lors de l'adaptation permettent aux bactéries de restaurer des fonctions cellulaires après une exposition à des stress environnementaux rencontrés au cours de la transformation des aliments ou de leur conservation.