



Université Constantine I
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale



Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie Animale

Spécialité : Génétique Moléculaire

Intitulé :

Etude de la réponse des bactéries au choc thermique

Présenté et soutenu par : KEROUMI Farouk

le : 23/06/2014

RACHI Rahil

SLIMANI Hana

Jury d'évaluation :

Présidente du jury: D. SATTA

Professeur - Université Constantine 1

Rapporteur : R. GHARZOULI FERTOUL

Maitre de Conférence « B » - Université Constantine 1

Examinatrice : S. BECHKRI

Maitre Assistante « A » - Université Constantine 1

Année universitaire
2013 - 2014

Remerciements

Nous remercions sincèrement **Mm. R. Gharzouli** d'avoir accepté de consacrer du temps, en tant que rapporteur pour juger et aider à l'amélioration de ce travail, merci pour tous vos efforts et patience.

Nos remerciement vont également à **Mme D.Satta** professeur de l'université Constantine 1 et présidente de jury et responsable de la filière de génétique, vous nous faite l'honneur de présider ce travail, soyer assuré madame de nos sincères gratitudes, et à **Mme Bechkri** maitre assistante « A » de l'université Constantine 1 d'avoir accepté examiner ce travail.

Nos remerciements s'adressent également à toutes et à tous qui, de loin et de près ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

Nous souhaitons remercier chaleureusement toutes les personnes du département de biologie animale.

Merci également à nos collègues étudiants, merci spécial aux personnes qui ont partagé notre vie pendant ces cinq années.

Nous souhaitons également de remercier chaleureusement tout mes familles surtout les parents.

Liste des abréviations

Liste des abréviations

AA : Acide Aminé

ADN : Acide Désoxyribo Nucléotide

ADP : Adénosine Di Phosphate

ARN : Acide Ribo Nucléotide

ARNm : Acide Ribo Nucléotide messagers

ARNP : Acide Ribo Nucléotide Polymérase

ATP : Adénosine Tri Phosphate

CIRCE : Controlling IR of Chaperone Expression

Csp : Cold Shock Protein

DTT : DithioThréiTol

ECF : Extra Cytoplasmic Function

hs : heat shock

HSE : Heat Shock Element

HSF : Heat Shock factor

Hsp : Heat Shock Protéin.

HSP : La famille des protéines de choc thermiques

hsp : Les gènes des protéines de choc thermiques

IPTG : Iso Propyl Thio Galactoside

IR : Répétition Inversée

kDa : Killo Dalton

LPS : Lipo Poly Saccharides

MM : Masse Moléculaire

nm : nano mètre

OMPs : Porines de la membrane externe

ORF: Cadre ouvert de lecture

Pb : Pair de base

Phs: Heat Shock Promotor

Pv : Promoteur Végétatif

RE : Réticulum Endoplasmique

smHsp : small Heat Shock Protéin

UV : Ultra Violet

Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre I : Les conditions optimales et les agents physiques et chimiques qui menaçant la croissance bactérienne.	
1. Les conditions optimales pour la croissance bactérienne.....	2
1. 1. Les besoins nutritifs des bactéries.....	2
1. 2. Les milieux de culture.....	2
1. 3. Les conditions de la croissance bactérienne.....	3
1. 3. 1. Les substances nutritives.....	3
1. 3. 2. L'énergie.....	4
1. 3. 3. L'eau.....	4
1. 3. 4. La température.....	4
1. 3. 5. Le pH.....	5
1. 3. 6. L'oxygène moléculaire.....	5
1. 3. 7. La pression osmotique.....	5
1. 3. 8. La pression mécanique ou hydrostatique.....	5
2. Les agents physiques et chimiques qui menaçant la croissance bactérienne.....	6
2. 1. les agents physique.....	6
2. 1. 1. Le stress thermique.....	6
2. 1. 1. 1 Le stress hyperthermique.....	6
2. 1. 1. 2. Le stress hypothermique.....	6
2. 1. 2. Le stress osmotique.....	7
2. 1. 3. Les radiations.....	7
2. 1. 3. 1 Les radiations électromagnétiques.....	7
2. 2. Les agents chimique.....	7
2. 2. 1. Le stress acide.....	7
2. 2. 2. Le stress oxydatif.....	8
2. 2. 3. Les métaux lourds.....	8
2. 2. 4. La salinité.....	9
Chapitre II : La réponse au choc thermique et les protéines de choc thermiques	
3. La mise en évidence de la réponse au choc thermique.....	10
Historique.....	10

3. 1. Le choc thermique affecte la structure de la cellule.....	11
3. 1. 1. L'augmentation de la fluidité membranaire.....	11
3. 1. 2. La désorganisation du cytosquelette.....	11
3. 1. 3. La déstabilisation de l'architecture nucléaire.....	11
3. 1. 4. La dénaturation des protéines.....	11
3. 1. 5. L'agrégation protéique.....	12
3. 2. Le choc thermique affecte le fonctionnement de la cellule.....	12
3. 2. 1. Le choc thermique inhibe l'expression des gènes.....	12
3. 2. 2. Le choc thermique modifie le potentiel d'oxydo-réduction intra-cellulaire.....	13
3. 2. 3. Le choc thermique conduit à l'apparition des protéines mal conformées.....	13
4. Les protéines de choc thermique.....	15
4. 1. La classification des protéines de choc thermique.....	15
4. 1. 1. Dnak.....	15
4. 1. 2. DnaJ.....	15
4. 1. 3. GroEL.....	15
4. 1. 4. GroES.....	15
4. 1. 5. GrpE.....	15
4. 1. 6. Lon.....	16
4. 1. 7. clpB.....	16
4. 1. 8. HflB.....	16
4. 1. 9. Les smHsp des bactéries lactiques.....	16
4. 2. La structure des protéines de choc thermique.....	16
4. 2. 1. Dnak.....	17
4. 2. 2. DnaJ.....	17
4. 2. 3. GroEL.....	17
4. 2. 4. GroES.....	18
4. 2. 5. GrpE.....	18
4. 2. 6. Lon.....	18
4. 2. 7. ClpB.....	18
4. 2. 8. HflB.....	18
4. 2. 9. Les smHsp des bactéries lactiques.....	19
4. 3. La fonction des protéines de choc thermique.....	19
4. 3. 1. Dnak.....	19

4. 3. 2. DnaJ.....	19
4. 3. 3. GroEL.....	20
4. 3. 4. GroES.....	20
4. 3. 5. GrpE.....	20
4. 3. 6. Lon.....	20
4. 3. 7. ClpB.....	21
4. 3. 8. HflB.....	21
4. 3. 9. Les smHsp des bactéries lactiques.....	21
Chapitre III : La regulation génétique de la synthèse des protéines de choc thermique	
5. Regulation de la synthèse des protéines de choc thermique.....	22
6. Regulation de l'expressioin des smHsp des bactéries lactiques.....	25
7. Influence de la température sur la physiologie d' <i>E.coli</i>	26
8. Les constituants généraux nécessaires à la réponse au choc thermique chez les eubactéries.....	27
9. Réponse au choc thermique chez <i>E. coli</i>	29
9. 1. la Régulation de RpoH (σ^H ou σ^{32}).....	29
9. 2. Régulation de RpoE (σ^E ou σ^{24}).....	30
10. La thermotolérance.....	32
Conclusion.....	35
Listes de références.....	36

Introduction

La bactérie vit dans un milieu où toutes les conditions doivent être réunies pour sa croissance. Si ces conditions changent et plus précisément, la chaleur, la bactérie doit nécessairement s'adapter à son tour pour donner une réponse au choc thermique.

La réponse à ce «choc» thermique, comme toutes celles déclenchées par d'autres stress physico-chimiques, permet aux organismes de mettre en place des dispositifs physiologiques temporaires qui assurent un ajustement des voies métaboliques aux nouvelles contraintes ou menaces de l'environnement. Ces réponses sont bénéfiques puisqu'elles confèrent aux organismes la capacité de survivre, du moins transitoirement, à des conditions ou épreuves létales, homologues ou proches de celles qui en ont commandé le déclenchement.

On nommera tolérance cette amélioration phénotypique de la survie et, plus précisément thermotolérance, l'exhaussement de la résistance «naturelle» de l'organisme à la chaleur (Boutibonnes *et al.*, 1992).

La réponse au choc thermique peut être considérée comme l'exemple des stratégies d'adaptation ou d'ajustement (*coping*) à l'environnement. Elle représente aussi un modèle simple et efficace de différenciation programmatique : son recours puis sa mise en œuvre révèlent, au sein du génome, l'existence de projets enfouis, occasionnellement réactivés.

La réponse au choc thermique, est se référé, à ce qui, aujourd'hui, fait figure de système codifié (Rouvière *et al.*, 1995 ; Raina *et al.*, 1995). Les protéines du choc thermique (Hsp : Heat Shock Protein) ont été regroupées en familles principales en fonction de leur masse moléculaire chez les bactéries (Burel *et al.*, 1992).

Dans notre travail, nous avons fait une étude bibliographique à fin de :

- Décrire les conditions optimales pour la croissance bactérienne et résumer les principaux agents chimiques et physiques qui menacent la croissance bactérienne.
- Expliquer les mécanismes d'adaptation bactérienne devant les menaces environnementales, notamment la chaleur (choc thermique).
- Mettre en évidence le phénomène de la réponse au choc thermique et de définir les différentes classes des protéines du choc thermique (structure, classification et fonction)
- Déterminer les différents mécanismes de la régulation génétique des protéines du choc thermique.

Chapitre I : Les conditions optimales et les agents physiques et chimiques menacent la croissance bactérienne

1. Les conditions optimales pour la croissance bactérienne

1.1. Les besoins nutritifs des bactéries

Les bactéries sont des organismes vivants, elles trouvent dans l'environnement l'ensemble des substances nécessaires à leur énergie et à leurs synthèses cellulaires.

Leur source d'énergie peut être de nature lumineuse (bactéries phototrophes) ou représentée par des composés minéraux ou organiques divers : on parle alors des bactéries chimiotrophes. Parmi cette dernière catégorie, on distingue les bactéries chimiolithotrophes tirant leur d'énergie d'un élément minéral et les bactéries chimioorganotrophes pour lesquelles la source d'énergie est un élément organique.

La source de carbone nécessaire à la vie bactérienne peut être le dioxyde de carbone qui est la source de carbone exclusive pour les bactéries autotrophes alors que les bactéries hétérotrophes utilisent le carbone de substances organiques diverses comme un alcool, l'acide acétique, l'acide lactique, des sucres divers, ...). Les bactéries doivent également trouver dans leur environnement une source d'azote et une source de soufre. Les bactéries ont des besoins inorganiques (exemple du phosphore). Les autres éléments nécessaires à la vie bactérienne sont les ions comme le sodium, le potassium, le magnésium, le chlore ; divers oligo-éléments comme le manganèse, le nickel, le zinc, le sélénium, ... ; divers facteurs de croissance comme des acides aminés (acide folique, acide nicotinique, ...) ou des dérivés des vitamines : B6 (pyridoxine) (Marchanda, 2007).

1.2. Les milieux de culture

Leur composition doit permettre la croissance bactérienne et doit donc tenir compte des besoins nutritifs des bactéries. La composition de base de ces milieux comprend :

- des substrats nutritifs : acides aminés, peptides, bases nucléiques, sucres.
- un système tampon assurant la constance du pH.
- des sels minéraux.
- des vitamines.
- d'autres facteurs de croissance pour certaines bactéries dites exigeantes : sang, protéines, hémoglobine, vitamines supplémentaires.

On distingue plusieurs types de milieux de culture :

Selon leur composition :

- Les milieux synthétiques de composition définie.

Les conditions optimales pour la croissance bactérienne

- Les milieux semi-synthétiques qui sont des milieux synthétiques additionnés d'un extrait d'organismes comme un extrait de levures contenant des facteurs de croissance pour les bactéries.
- Des milieux complexes de réalisation empirique (extraits de viande, de levure, extraits enzymatiques, protéines ou peptones).

Selon leur fonction :

- Les milieux d'isolement permettant la croissance de plusieurs espèces bactériennes,
- Les milieux d'enrichissement permettant de favoriser la croissance d'une espèce en faible quantité dans un échantillon.
- Les milieux enrichis permettant la croissance des bactéries exigeantes.
- Les milieux sélectifs favorisant la croissance d'un type bactérien particulier tout en inhibant celle des autres types bactériens (exemple des milieux sélectifs pour les bactéries à Gram positif contenant des antibiotiques inhibiteurs des bactéries à Gram négatif).

Ces milieux peuvent se présenter sous forme liquide : bouillons de culture en tubes ou en flacons (exemple des flacons d'hémoculture).

La croissance bactérienne peut alors être objectivée par un trouble du bouillon après incubation de 2 à 15 jours à 37° C.

Les milieux solides sont le plus souvent des milieux gélosés en boîte de Pétri. Après incubation de 24 à 72 heures à 37° C, la croissance bactérienne est objectivée par la mise en évidence de colonies bactériennes à la surface du milieu gélosé.

Chaque bactérie présente initialement dans l'échantillon cultivé va donner une colonie (Marchanda, 2007).

1.3. Les conditions de la croissance bactérienne

1.3.1. Les substances nutritives

Les substances nutritives servent de matières premières aux cellules pour leur croissance, leur entretien et leur division. Les bactéries utilisent pour se nourrir une vaste gamme de composés; ceux-ci incluent divers sucres et hydrates de carbone, des acides aminés, des stérols, des alcools, des hydrocarbures, du méthane, des sels inorganiques et du dioxyde de carbone. Cependant individuellement, aucune bactérie ne peut utiliser tous ces composés car elle ne dispose pas de toutes les enzymes requises et son enveloppe cellulaire ne contient pas tous les systèmes d'absorption nécessaires (Marchanda, 2007).

1.3.2. L'énergie

Beaucoup de réactions chimiques essentielles qui se déroulent dans une cellule vivante consomment de l'énergie. Celle-ci est également nécessaire, par exemple, pour la mobilité flagellaire et pour l'absorption de diverses substances nutritives. Toute cette énergie provient de l'une ou plusieurs sources présentes dans le milieu. Les espèces photosynthétiques tirent leur énergie principalement ou exclusivement de la lumière, tandis que les espèces chimiotrophes trouvent leur énergie en transformant des produits chimiques extraits du milieu environnant. Certaines espèces sont capables d'employer les deux méthodes (Marchanda, 2007).

1.3.3. L'eau

L'eau contribue à la masse d'une bactérie pour 80 % ou plus et, au cours de leur croissance, les substances nutritives et les déchets pénètrent et quittent respectivement la cellule, en solution. Par conséquent, les bactéries ne peuvent croître que dans ou sur des matières contenant suffisamment d'eau libre (disponible). Dans une matière donnée, toute l'eau n'est pas nécessairement disponible pour la croissance bactérienne; une partie peut, par exemple, être liée à des gels hydrophiles ou à des ions en solution.

Les différentes espèces de bactéries tolèrent, à divers degrés, un fort déficit en eau (dessiccation). Beaucoup d'espèces, toutefois, ne peuvent survivre longtemps à l'état desséché (Marchanda, 2007).

1.3.4. La température

Cinq catégories de bactéries sont différenciées sur la base de leur fourchette de températures de croissance :

- **Les bactéries mésophiles** dont la croissance est possible de 10 à 45°C mais ayant une température optimale de croissance comprise entre 30 et 37°C.
- **Les bactéries psychrophiles** poussant de -15 à 20°C (optimum : 5-10°C) (exemple : *Listeria monocytogenes*, agent de la listériose, dont la croissance est optimale à la température des réfrigérateurs).
- **Les bactéries psychrotropes** se développant à des températures de -5 à 35°C (optimum : 20-25°C).
- **Les bactéries thermophiles** poussent à des températures comprises entre 45 à 70°C.
- **Les bactéries hyperthermophiles** pouvant croître à des températures supérieures à 80°C.

1.3.5. Le pH

Certaines bactéries se développent à pH compris entre 6 et 8 : elles sont appelées bactéries neutrophiles (exemple : *Escherichia coli*), d'autres se développeront préférentiellement à pH alcalin (>8) et sont appelées bactéries alcalinophiles (exemple : *Pseudomonas*) (Marchanda, 2007).

Enfin, la croissance de certaines bactéries dites acidophiles est optimale à pH acide (<6) (exemple : *Lactobacillus*) (Marchanda, 2007).

1.3.6. L'oxygène moléculaire

Les bactéries possèdent des modes respiratoires variés : certaines nécessitent de l'oxygène pour leur croissance alors que, pour d'autres, l'oxygène peut être délétère. On distingue :

1. Les bactéries aérobies strictes (exemple : *Pseudomonas*) nécessitant une teneur en oxygène moléculaire suffisante pour pouvoir se multiplier.
2. Les bactéries micro-aérophiles (exemple : *Campylobacter*) se développant uniquement lorsque la teneur en oxygène moléculaire est réduite.
3. Les bactéries aéro-anaérobies facultatives (exemple : *Escherichia coli*) dont la croissance n'est pas affectée par la concentration en oxygène moléculaire,
4. Les bactéries anaérobies strictes ne se développant qu'en absence d'oxygène (exemple : *Clostridium*) (Marchanda, 2007).

1.3.7. La pression osmotique

Les bactéries sont assez tolérantes aux variations des concentrations ioniques. Des espèces pathogènes sont osmotolérantes (staphylocoques, *Vibrio cholerae*) : elles supportent une salinité élevée (ceci est utilisé pour la réalisation de milieux sélectifs) ; on les appelle aussi *halotolérantes*. On connaît cependant des bactéries pathogènes *halophiles* exigeant plus de 2% de NaCl pour se multiplier (*Vibrio parahaemolyticus*) mais certaines espèces vivant dans des saumures, tolèrent des concentrations de NaCl supérieures à 20-30% (Marchanda, 2007).

1.3.8. La pression mécanique ou hydrostatique

Les bactéries ont une bonne tolérance générale à la pression ; certaines espèces vivant dans les grands fonds marins supportent une pression très importante et sont dites *barophiles* (Marchanda, 2007).

2. Les agents physiques et chimiques menaçant la croissance bactérienne

2.1. Les agents physiques

2.1.1. Le stress thermique

La conservation par élévation ou 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 (protéines, ADN, ARN, ribosomes).

La réponse au stress thermique se traduit par la synthèse de protéines de type Hsp (Heat Shock Protein) ou de type Csp (Cold Shock Protein) réparant les dommages et préparant les bactéries à survivre dans des conditions plus délétères (réductions des super-enroulements de l'ADN, dégradation, repliement des protéines dénaturées) (Abee et Wouters, 1999 ; Phadtare, 2004)

2.1.1.1. Le stress hyperthermique

Un 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 chez certaines bactéries à gram positif (Whitaker et Batt, 1991; Auffray *et al.*, 1992 ; Kilstrup *et al.*, 1996).

Les protéines induites par le choc thermique chaud correspondent principalement à des protéines chaperonnes (DnaK, DnaJ, GrpE, GroES, GroEL) et à différentes protéases (Clp, HtrA, FstH), très conservées dans le monde bactériens (Csonka et Hanson, 1991).

2.1.1.2. Le stress hypothermique

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 la traduction, transcription, et la réplication de l'ADN (Jaenicke, 1991 ; Berry et Foegeding, 1997).

Les protéines induites par le choc froid, certaines sont appelées les Csp qui auraient un rôle de régulation et d'induction d'autres protéines de froid, cinq Csp sont identifiées chez

Lactobacillus. Lactic MG1363 et deux chez *Lactobacillus. Lactic* IL1403 (Guédon *et al.*, 2001).

2.1.2. Le stress osmotique

Le stress osmotique correspond à une diminution ou augmentation de l'osmolarité de l'environnement de la bactérie (Csonka, 1989) qui en modifiant la disponibilité de l'eau affecte sa survie et sa croissance (Potts, 1994).

Une diminution rapide de l'osmolarité du milieu extérieur (choc hypo-osmotique) ne provoque en générale, qu'une faible augmentation du volume cellulaire (Elmnasser *et al.*, 2006).

Une augmentation brusque de l'osmolarité du milieu extérieur (choc hyper-osmotique) inhibe certaines fonctions cellulaires comme l'adsorption de nutriments, la réplication de l'ADN ou la biosynthèse de macromolécules (Lim *et al.*, 2001).

2.1.3. Les radiations

On connaît depuis longtemps l'effet des rayonnements sur les bactéries, c'est un effet bactéricide. Le rayonnement solaire et plus particulièrement les radiations UV sont des agents naturels de stérilisation. C'est ce qui fait que la surface des eaux est dépourvue de microorganismes.

2.1.3.1. Les radiations électromagnétiques

Les radiations électromagnétiques sont des agents stérilisants utilisés notamment pour la conservation des aliments. L'action des radiations sur les microorganismes dépend des longueurs d'ondes. Cette action sera d'autant plus efficace que la longueur d'onde est faible, Les premiers rayonnements connus pour leur action antimicrobienne sont les UV, ce sont aussi les moins efficaces du fait de leur grande longueur d'onde. Viennent ensuite les rayons X et les rayons gamma beaucoup plus efficaces et pouvant pénétrer dans la matière de quelques centimètres pour les rayons X et quelques dizaines de centimètres pour les rayons gamma. (Zahran *et al.*, 1994).

2.2. Les agents chimiques

2.2.1. Le stress acide

Le stress acide est un stress important pour les bactéries lactiques puisqu'elles acidifient leur milieu au cours de la croissance. La diminution du pH extracellulaire agit sur la flore microbienne des aliments en perturbant l'équilibre ionique du milieu extérieur (Brul et coote, 1999).

Comme par exemple les bactéries lactiques produisent au cours de la croissance de l'acide lactique qui induit l'acidification du cytoplasme et l'accumulation de lactate dans la cellule (Van De Guche *et al.*, 2002). Outre les effets délétères de l'acidification du cytosol, l'accumulation de lactate dans la cellule peut conduire à l'inhibition de la fermentation lactique, à une perte d'activité de l'eau et à la chélation d'éléments nécessaires (Presser *et al.*, 1997).

2.2.2. Le stress oxydatif

La toxicité de l'oxygène vis-à-vis des microorganismes comme les bactéries est généralement attribuée aux molécules d'oxygène actives comme l'ion superoxyde ou le 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).

C'est l'un des principaux agents responsables de la dégradation des produits alimentaires au cours du temps. Les conséquences sont multiples : formation de composés indésirables, altération des produits, baisse de la valeur nutritionnelle (O'byrne et Booth, 2002).

2.2.3. Les métaux lourds

Les métaux lourds, éléments chimiques possédant des propriétés métalliques complexant, sont nombreux et très répandus dans l'environnement. Certains sont essentiels pour les fonctions biologiques, comme la croissance, la reproduction et la survie, d'autres n'ont aucune fonction biologique connue (Giller *et al.*, 1998). Plusieurs métaux, nécessaires en quantité infime pour certains processus, peuvent devenir néfastes quand ils sont présents à doses élevées et polluantes. La toxicité des métaux lourds dépend donc de leur concentration dans le sol, de leur nature, de la présence d'autres métaux et du type d'organisme qu'ils affectent.

Pour les rhizobiums, de nombreuses études ont rapporté l'effet néfaste de ces métaux aussi bien sur la survie que sur le processus de la fixation d'Azote. Il a été rapporté qu'un excès en manganèse altère la composition des exopolysaccharides chez *S. meliloti* (Appana et Preston, 1987), de même que le zinc et le cuivre sont inhibiteurs de la croissance bactérienne à des concentrations supérieures à 100 ppm, alors que le molybdène et le manganèse ne le sont pas.

2.2.4. La salinité

Les sols salins constituent un environnement défavorable pour la croissance de la plupart des plantes et de leurs bactéries par exemple les bactéries endophytes symbiotiques et associatives peuvent tolérer et survivre en présence d'une salinité élevée, que se soit en culture (El Sheikh et Wood, 1989; Reva *et al.*, 2002) ou dans le sol (Nautiyal *et al.*, 2000; Tilak *et al.*, 2005) mais de nombreuses études ont rapporté que la plupart des endophytes symbiotiques sont sensibles à des concentrations de sel supérieures à 1.5% (Graham et Parker, 1964; Batzli *et al.*, 1992). Au delà de cette concentration, En effet, la croissance des espèces *R. galegae*, *M. loti* et *S. fredii* était totalement inhibée en présence de 2% de NaCl, et seule *R. leguminosarum* et *S. meliloti* tolèrent cette concentration (Lindström et Lehttomäki, 1988). Toute fois, les rhizobia isolées des plantes ligneuses (*Acacia*, *Prosopis*, etc.) peuvent tolérer une concentration en NaCl de 3 à 5%, Par ailleurs, ont constaté que les isolats du Lupin étaient capables de croître en présence de 10% de NaCl. (Mohammed *et al.*, 2000; Tilak *et al.*, 2005).

Chapitre II : La réponse au choc thermique et les protéines de choc thermique

Historique

En 1962 Ritossa a pu observer dans un élevage de drosophiles: «Si les larves écrivait-il, sont soumises à un choc thermique à 30 °C pendant 30 minutes environ, il s'ensuit un brutal changement du profil des «putts» ou boursouflures au niveau des chromosomes polytènes des glandes salivaires» (Ritossa, 1996). Par la suite, différents travaux ont pu montrer que ces renflements spécifiques correspondaient toujours à l'expression de gènes particuliers : les gènes de choc thermique codant les **protéines de choc thermique** (Hsp pour Heat Shock Protein) et que ce phénomène existe chez tous les organismes, des archéobactéries à l'homme (Nover et Scharf, 1997 ; Tissières *et al.*, 1974).

Cette première observation ouvrit des perspectives fertiles; le même phénomène, marqué par un bouleversement du spectre protéique, consécutif à une augmentation de température, fut reconnu chez de très nombreuses espèces animales ou végétales avant d'être identifié chez *Escherichia coli* (Lemaux *et al.*, 1978 ; Yamamori *et al.*, 1978). La réponse à ce «choc» thermique, permet aux organismes de mettre en place des dispositifs physiologiques temporaires qui assurent un ajustement des voies métaboliques aux nouvelles contraintes ou menaces de l'environnement (Rouvière *et al.*, 1995 ; Raina *et al.*, 1995).

Ces réponses sont bénéfiques en ceci qu'elles confèrent aux organismes la capacité de survivre, à des conditions ou épreuves létales, qui en ont commandé le déclenchement. Universelle, la réponse est transitoire: elle est manifeste quelques minutes après le choc mais elle est de courte durée. En général 1 ou 2 h après le déclenchement du dispositif, les organismes ou les cellules retournent à un état de repos qui est une nécessité, pour obéir à une nouvelle sollicitation du milieu extérieur. Universelle et transitoire, la réponse qui s'est sans doute mise en place précocement au cours de l'évolution, est conservée dans tout le monde vivant: on retrouve, même si elles portent des noms différents les mêmes protéines présentant, au moins dans leurs zones fonctionnelles, les mêmes structures, et assurant les mêmes fonctions. Elles possèdent toutes trois la propriété de veiller au repliement orthodoxe des protéines immatures, ou de restaurer la conformation native de leurs structures anormales irrégulières ou agrégées, provoquées par des agents chaotropiques. Parce qu'elle est universelle et conservée, parce qu'elle est la plus anciennement connue, parce qu'elle permet aux organismes de s'affranchir de l'impérieux pouvoir du réel, la réponse au choc thermique peut être considérée comme l'exemple des stratégies d'adaptation ou d'ajustement à l'environnement (Rouvière *et al.*, 1995 ; Raina *et al.*, 1995).

3. La mise en évidence de la réponse au choc thermique

Le choc thermique ou hyperthermie est l'un des inducteurs du mécanisme de défense cellulaire appelé **réponse au choc thermique**. Cette réponse est induite quand l'environnement de la cellule devient délétère et altère le repliement des protéines (comme le choc thermique, présence de métaux lourds, stress oxydant, irradiation UV...).

3.1. Le choc thermique affecte la structure de la cellule

De nombreux processus sont affectés par le choc thermique : parmi ceux-ci, le repliement des protéines, la fluidité membranaire, ou encore le cycle cellulaire.

3.1.1. L'augmentation de la fluidité membranaire

Les membranes biologiques ont des structures particulièrement sensibles à la température. La réponse des membranes cellulaires au choc thermique dépend en grande partie aux caractéristiques des lipides qui les constituent. Les mouvements divers des lipides confèrent une certaine fluidité aux membranes, cette dernière augmente avec la température. La membrane plasmique semble être la première cible du choc thermique (Bowler, 1987), mais des modifications des membranes mitochondriales, du réticulum endoplasmique (RE) et aussi de l'enveloppe nucléaire sont également observées (Iwagami, 1996).

3.1.2. La désorganisation du cytosquelette

L'hyperthermie provoque des changements d'organisation du cytosquelette dépendant du type cellulaire et de l'intensité du traitement (Coakley, 1987) telles qu'une perturbation de la polymérisation des filaments d'actine et de tubuline conduisant à des défauts d'adhésion cellulaire (Huang *et al.*, 1999) ou une destruction des centrosomes conduisant à une organisation incorrecte des microtubules (Nakahata *et al.*, 2002).

3.1.3. La déstabilisation de l'architecture nucléaire

Les premiers travaux de microscopie électronique ont permis de mettre en évidence des changements dans la structure nucléaire de cellules dans des conditions de stress thermique (Heine *et al.*, 1971). En effet, la matrice nucléaire est une structure thermolabile qui présente une forte agrégation protéique suite à une hyperthermie (Lepock *et al.*, 2001).

3.1.4. La dénaturation des protéines :

De nombreux travaux rapportent une inactivation et une insolubilisation des protéines cellulaires suite à un choc thermique (Pinto *et al.*, 1991). Les polypeptides en cours de

formation sont plus sensibles au choc thermique que les protéines déjà conformées, qui sont plus stables (Baler *et al.*, 1992). Le choc thermique déstabilise les protéines de telle sorte que les zones hydrophobes, enfouies au sein de la macromolécule dans les conditions physiologiques normales, soient exposées à leur surface. Ces zones hydrophobes interagissent entre elles et génèrent ainsi des agrégats résistants à la protéolyse appelés lipofuscine (Burgman et Konings, 1992), ces agrégats sont le plus souvent délétères pour la cellule.

L'altération des protéines à l'issue d'un choc thermique est probablement l'événement majeur qui pourrait expliquer la diversité des effets d'un choc thermique tels que l'altération de la morphologie et de l'adhésion cellulaire, l'inhibition de la prolifération cellulaire, la modification du patron d'expression génique ou encore la mise en route de certaines voies de signalisation (Kampinga, 1993).

3.1.5. L'agrégation protéique

Le repliement des protéines nouvellement synthétisées est couplé à la traduction (Harms *et al.*, 2001). Une absence de repliement ou un repliement incorrect conduisent à des interactions protéines-protéines inappropriées et à l'apparition d'agrégats protéiques.

Le mécanisme général de formation des agrégats protéiques suit 4 étapes : la conversion de la conformation des protéines, la nucléation, la formation de protofibrilles et la condensation (Roberts, 2007 ; Uversky, 2007 ; Saraiva, 2001 ; Bhak *et al.*, 2009)

3.2. Le choc thermique affecte le fonctionnement de la cellule

Ici ; il existe aussi des nombreuses processus qui sont affectés par le choc thermique : permet ceux-ci ; la transcription, l'état d'oxydo-réduction intra-cellulaire, mal conformation des protéines.

3.2.1. Le choc thermique inhibe l'expression des gènes

Il a pu être montré chez la drosophile que pendant et après un choc thermique, la transcription des gènes est réprimée (Lindquist, 1986). D'autres études ont montré que l'épissage d'ARN pré-messagers existants est interrompu pendant le choc thermique (Yost et Lindquist, 1986 ; Yost et Lindquist, 1991). De même, la traduction des ARN messagers (ARNm) pré-existants est abolie ; en effet, on observe une inhibition de l'interaction des protéines de la coiffe avec l'extrémité 5' de l'ARNm (Lamphear et Panniers, 1991), une

inhibition des facteurs d'initiation de la traduction par phosphorylation (Murtha-Riel *et al.*, 1993) et une altération de la phosphorylation des protéines ribosomiques (Scharf et Nover, 1982). Lorsque la température revient à la normale, la synthèse protéique reprend graduellement, le temps nécessaire à la reprise étant proportionnel à la sévérité du choc thermique subi.

3.2.2. Le choc thermique modifie le potentiel d'oxydo-réduction intra-cellulaire

Il a été confirmé que le peroxyde d'hydrogène est capable d'activer, *in vivo* et *in vitro*, le facteur de transcription HSF. L'induction transcriptionnelle en réponse au choc thermique est, de plus, très fortement inhibée en conditions d'hypoxie ou en présence d'agents réducteurs tels que le dithiothréitol (DTT) (Jacquier-Sarlin et Polla, 1996 ; Kretz-Remy et Arrigo, 2002). HSF1 peut être directement activé *in vitro* par un choc thermique ou par le peroxyde d'hydrogène ; cette activation est inhibée par l'utilisation de composés réducteurs (Ahn et Thiele, 2003). L'activation de HSF1 dépendante du potentiel redox nécessite la formation d'un pont disulfure entre deux résidus cystéine en position 35 et 105. La mutation de ces résidus cystéine inhibe l'induction des Hsp en réponse au choc thermique, ce qui suggère que la fonction *in vivo* d'HSF1 est dépendante d'une régulation par le potentiel redox intra-cellulaire (Ahn et Thiele, 2003).

3.2.3. Le choc thermique conduit à l'apparition des protéines mal conformées

L'expression inductible des Hsp est régulée par la famille des facteurs de transcription de choc thermique HSF (Heat Shock Factor) (Pirkkala *et al.*, 2001; Morimoto, 1998). Les HSF acquièrent une capacité de liaison à l'ADN et se lient au niveau de séquences HSE (Heat Shock Element) sur les promoteurs des gènes de choc thermique, ce qui permet leur transcription et donc l'accumulation des Hsp (Fernandes *et al.*, 1994).

Parmi les quatre facteurs de transcription HSF, le facteur HSF1 joue le rôle le plus central dans la réponse au choc thermique. Dans les cellules non stressées, HSF1 existe sous forme de monomères inertes cytoplasmiques ou nucléaires, dont la liaison à l'ADN est inhibée à la fois par des interactions intramoléculaires, par une phosphorylation constitutive sur certains résidus sérine et par l'interaction avec les molécules chaperons Hsp70 et Hsp90. A la suite d'un stress, l'apparition de protéines mal conformées dans la cellule nécessite l'intervention de chaperons pour leur reformation.

- a. Les chaperons se détachent alors d'HSF1 et le facteur de transcription se trimérise.
- b.** HSF1 subit une hyper phosphorylation et se lie à l'ADN, ce qui induit la transcription des gènes de choc thermique (Pockley, 2001).
- c. L'arrêt de la transcription se fait par une régulation négative de l'activité transcriptionnelle grâce à la protéine HSBP1.
- d.** La protéine Hsp70 et son co chaperon se lient à HSF il y a alors dissociation des trimères HSF et donc répression de la transcription des gènes codant les protéines Hsp (Satyal *et al.*, 1998).

4. 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.

4. 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* (J13), et de la hsp 104 de *Saccharomyces cerevisiae*, (homologue de la protéase ClpB d '*E. coli*) (Boutibonnes *et al.*, 1995).

4. 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).

4. 1. 2. DnaJ : Descendre 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).

4. 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).

4. 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).

4. 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).

4. 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).

4. 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).

4. 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)

4. 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 *Lacto bacillus 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 *O. oeni* (Jobin *et al.*, 1997).

4. 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.

4. 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).

4. 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 (Goloubinouff *et al.*, 1999).

4. 2. 3. GroEL : Chez *E.coli*, GroEL est une protéine oligomérique tétradécamère (14 mers) arrangé en une structure de double anneau symétrique ATPase un anneau (7 mers) 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).

4. 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).

4. 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).

4. 2. 6. Lon : Elles soient 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).

4. 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 lie 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 a la souche sauvage, l'hydrolyse de l'ATP est donc essentielle au relâchement du substrat (Weibezahn *et al.*, 2003).

4. 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).

4. 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).

chez *O. oeni*, la localisation cellulaire de Lo 18 est détectée à la fois dans la fraction cytoplasmique et la fraction membranaire. Lo 18 est reliée de manière périphérique à la membrane plasmique par des interactions protéine-protéine faibles (Jobin *et al.*,1997). La détection d'une smHsp à la fois dans le cytoplasme et la membrane plasmique a déjà été rapportée chez *Stigmatella aurantiaca* (Lünsdorf *et al.*,1995).

4. 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).

4. 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).

4. 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).

4. 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).

4. 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).

4. 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).

4. 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).

4. 3. 7. ClpB : Le ClpB se lie directement aux agrégats protéique et l'ATP serait responsable d'un changement structural chez ces derniers permettant une plus grande exposition de région 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).

4. 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 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).

4. 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 -crystallines 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 '*O. oeni* en participant par son activité de chaperonne à l'adaptation de la structure membranaire aux nouvelles conditions environnementales (Jobin *et al.*, 1997).

Chapitre III : La regulation génétique de la synthèse des protéines de choc thermiques

5. Régulation de la synthèse des protéines de choc thermique

Six gènes des hsp's 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 4 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 (Fig. 1). 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 (Meccas *et al.*, 1993).

Au contraire chez *B subtilis*, les promoteurs hs sont absents, ceux d'*E coli* fusionnés à des gènes rapporteurs sont inactifs (Wetzstein et Schumann, 1990). L'expression de la réponse au choc thermique procède de promoteurs canoniques, reconnus par σ_{43} (homologue de σ_{70} d'*E coli*), qui ont été identifiés en amont d'un groupe de gènes thermo-régulés de classe 1, et d'une séquence inversée répétée de 9 pb appelée CIRCE (controlling IR of chaperone expression) (Zuber et Schumann, 1994), habituellement intercalée entre le signal de transcription et le début du cadre ouvert de lecture. La fixation supposée d'une protéine répresseur sur ce motif récurrent limiterait ou interdirait l'expression du gène. Ce même répresseur constituerait le capteur ou «senseur», l'une des cibles sensibles, qui obéirait à la sollicitation thermique par un changement conformationnel, lequel provoquerait son détachement de l'IR suivi par la transcription du gène correspondant (Wetzstein *et al.*, 1992 ; Zuber et Schumann, 1994 ; Volker *et al.*, 1994 ; Yura *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

6. Régulation de l'expression des smhsp des bactéries lactiques

Les gènes de smHsp clonés chez *O. oeni* et *L. helveticus* (respectivement hsp 18 et hsp 17) ont été séquencés, et leurs régions promotrices déterminées (Jobin *et al.*, 1997 ; Timpone *et al.*, 1996). Les cadres de lecture de ces gènes sont précédés par des promoteurs caractéristiques de type domestique dits « végétatifs », le gène hsp17 de *L. helveticus* possède une séquence inversée-répétée (CIRCE) que l'on retrouve en amont de tous les gènes de protéines de stress connus chez *L. lactis* (Boutibonnes, 1996). Aucune séquence similaire n'est présente en amont du gène hsp18 chez *O. oeni*.

Le mécanisme de régulation établi chez *E. coli* ne peut pas servir de modèle pour les smHsp des bactéries lactiques. En effet, la réponse au stress d'*E. coli* est sous le contrôle des facteurs sigma alternatifs σ_{32} et σ_{24} qui reconnaissent des promoteurs de type « heat shock » (promoteur de protéine de stress) et chez *B. subtilis*. Il existe trois classes de régulation des gènes de stress :

La classe I : regroupe les opérons dnaK et groE qui possèdent un promoteur végétatif et une séquence CIRCE stabilisée par le répresseur HrcA (Fig. 2). L'inactivation du répresseur lors d'un stress déstabiliserait la séquence inversée-répétée, et permettrait la transcription des gènes (Fig. 2). Ce modèle pourrait être retenu pour expliquer la régulation du gène hsp17 de *L. helveticus* comme celle des gènes de stress connus chez *L. lactis*.

La régulation des gènes **de classe II** (une quarantaine de gènes de stress) ne peut pas s'appliquer aux gènes de smHsp, des bactéries lactiques, puisqu'elle fait intervenir un facteur sigma alternatif, crB qui permet à l'ARN-polymérase de se fixer sur des promoteurs particuliers.

La classe III : comprend les gènes des protéases ATP-dépendantes Ion, ClpC, clpP et ftsH. Ces gènes possèdent un promoteur végétatif sans séquence CIRCE, et font intervenir pour leur régulation un ou plusieurs éléments inconnus. Il a été récemment montré que le gène htp G appartient à cette classe et est soumis à une régulation transcriptionnelle négative puisque la délétion d'une partie en amont de son promoteur permet la transcription du gène (Schulz *et al.*, 1997).

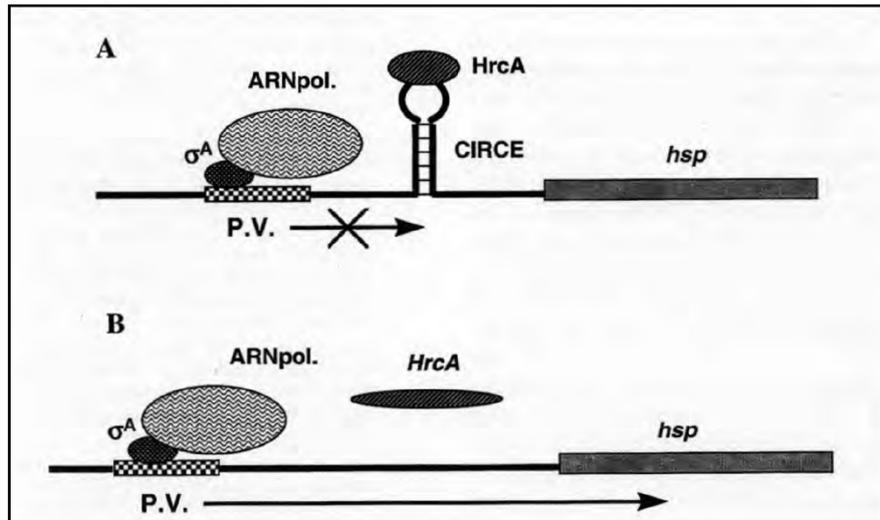


Figure.2 : Régulation des gènes de choc thermique de classe 1 chez *Bacillus subtilis*. A. Conditions normales de croissance. B. Après choc thermique. hsp: gène de protéine de stress; P.V: promoteur végétatif CIRCE : séquence inversée-répétée HrcA : régulateur; HrcA : régulateur dénaturé, ARN-pol. : ARN-polymérase (Schulz *et al.*, 1997).

7. Influence de la température sur la physiologie d'*E.coli*

Une baisse de température engendre une perte de la fluidité des phospholipides et vient compromettre les fonctions cellulaires. Chez *E.coli*, et certains microorganismes, la cellule a recours à un mécanisme permettant de changer le niveau de saturation des chaînes carbonées de la couche phospholipidique. Il a été démontré chez *E.coli* qu'à une température de 15°C, la composition de la membrane cytoplasmique est riche en acides gras insaturés tel que les acides palmitoléiques (C16:1) et l'acide oléique (C18:1), tandis que la composition en acides gras saturés est faible tel que l'acide palmitique (C16:0) (Katsui *et al.*, 1981). Ce changement permet de réduire le point de fusion des phospholipides, et donc d'accroître la fluidité membranaire (Garwin et Cronan, 1980; De Mendoza *et al.*, 1983). Inversement, à 37 °C, la membrane augmente sa quantité en acides gras saturés tandis que celle en acides gras insaturés diminue (Katsui *et al.*, 1981).

La synthèse de tréhalose joue un rôle important dans la survie bactérienne à basse température. (Kandror *et al.*, 2002) ont démontré que chez des souches de *E.coli* mutants, incapables de synthétiser le tréhalose, le taux de viabilité est faible à 4 °C. Le mode d'action du tréhalose à basse température reste encore inconnu. Cependant, il a été suggéré que le mécanisme de protection était semblable à celui du tréhalose lors des stress oxydatifs et des stress thermiques. Ainsi, le tréhalose préviendrait la dénaturation et l'agrégation des protéines,

offrirait une protection contre les radicaux libres et stabiliserait la membrane (Kiandor *et al.*, 2002).

L'effet de la température influence la synthèse protéique chez *E. coli*. Un passage rapide de 37 °C à 15 °C provoque une baisse temporaire du nombre des polyribosomes et un arrêt provisoire de la synthèse protéique (Jones et Inouye, 1996) qui s'explique par un blocage de l'initiation de la traduction des ARN messagers. Dans de telles situations, la bactérie entre dans une phase de latence et son adaptation se traduit par l'expression et la synthèse de protéines appelées « cold shock proteins » (CSP). Le même processus a été observé lorsque la bactérie *E. coli* est soumise à une température très élevés. Il y a alors une faible diminution de la synthèse protéique suivie de l'expression et de la synthèse de « heat shock proteins » (HSP) (Leinaux *et al.*, 1978).

8. Les constituants généraux nécessaires à la réponse au choc thermique chez les eubactéries

Les microorganismes dans leur environnement sont soumis à des conditions hostiles qui entraînent des changements dans leur métabolisme nécessaires à leur adaptation et à leur survie. L'évolution des espèces au fil du temps permet l'acquisition des mécanismes de résistance vis-à-vis les différents types de stress environnementaux.

Ces mécanismes sont répandus chez les protéobactéries, les facteurs de transcription sigma (es) sont à la base de la réponse cellulaire au stress. Ces petites protéines se lient à l'ARN polymérase et vont augmenter l'affinité de cette dernière pour certaines régions promotrices de l'ADN. Par conséquent, pour chaque type de facteur sigma, il y a une augmentation de la transcription et de l'expression des gènes servant à répondre au stress. La protéine σ^{32} codée par le gène *rpoS*, agit comme régulateur de la réponse générale au stress chez les protéobactéries (Hengge-Aronis, 2000).

Chez *E. coli*, les facteurs σ^{32} et σ^E (σ^{24}) contribuent respectivement à la réponse au stress thermique dans le cytoplasme et dans la membrane cytoplasmique (Abee et Wouters, 1999).

L'évolution a conféré aux bactéries un mécanisme de résistance au stress thermique en induisant la transcription des gènes portant le nom de « heat shock proteins » (HSP). Chez *E. coli*, l'augmentation de la transcription des gènes des HSP est directement liée aux facteurs de transcription régulant la réponse au stress tel que σ^H (Morimoto *et al.*, 1994).

9. Réponse au choc thermique chez *E. coli*

9.1. La Régulation de RpoH (σ^H ou σ^{32})

Un médiateur important qui induit la production de HSPs est le facteur de transcription σ^{32} codé par le gène *rpoH*. Dans des conditions optimales (sans stress), la concentration cellulaire de σ^{32} est maintenue à 10 à 30 molécules par cellule à 30 °C (Craig et Gross, 1991). Lors d'un stress thermique, il y a une augmentation rapide dans la synthèse de la protéine σ^{32} et de son activité. Au niveau transcriptionnel, le gène *rpoH* est régulé par quatre promoteurs dont P1, P4 et P5 sont sous le contrôle de σ^{70} et P3 est contrôlé par σ^{24} . L'utilisation de ces promoteurs change en fonction de la température (Bukau, 1993; Georgopoulos *et al.*, 1994 ; Connolly *et al.*, 1999).

Après la transcription des ARNm du gène *rpoH*, la traduction de *rpoH* est régulée en « cis2 » par les régions A, B et C sur l'ARNm. La région A située entre les nucléotides 6 et 20 contient le codon d'initiation et une région complémentaire à l'ARNr16s en 3' qui favorise la traduction (Morita *et al.*, 1999).

En absence de stress, la région B située entre les nucléotides 110 et 247 joue un rôle de répresseur de la traduction en formant une structure secondaire de l'ARNm avec la région A. Cette structure secondaire rend inaccessible la région Shine-Delgarno et le codon d'initiation pour le ribosome. Lors d'un choc thermique, la stabilité de la structure secondaire est réduite par la haute température (Morita *et al.*, 1999), et permet chez *E.coli* de déclencher rapidement la traduction de *rpoH*. On remarque une forte traduction de *rpoH* allant jusqu'à 12 fois entre 2 et 4 minutes lorsque la bactérie subit une variation de température de 30 à 42 °C (Nagai *et al.*, 1991).

La région C, située entre les nucléotides 364-433, a aussi un rôle de répresseur et permet l'arrêt de la traduction de *rpoH* lors de la fin du choc thermique. (Fig.3) (Nagai *et al.*, 1994).

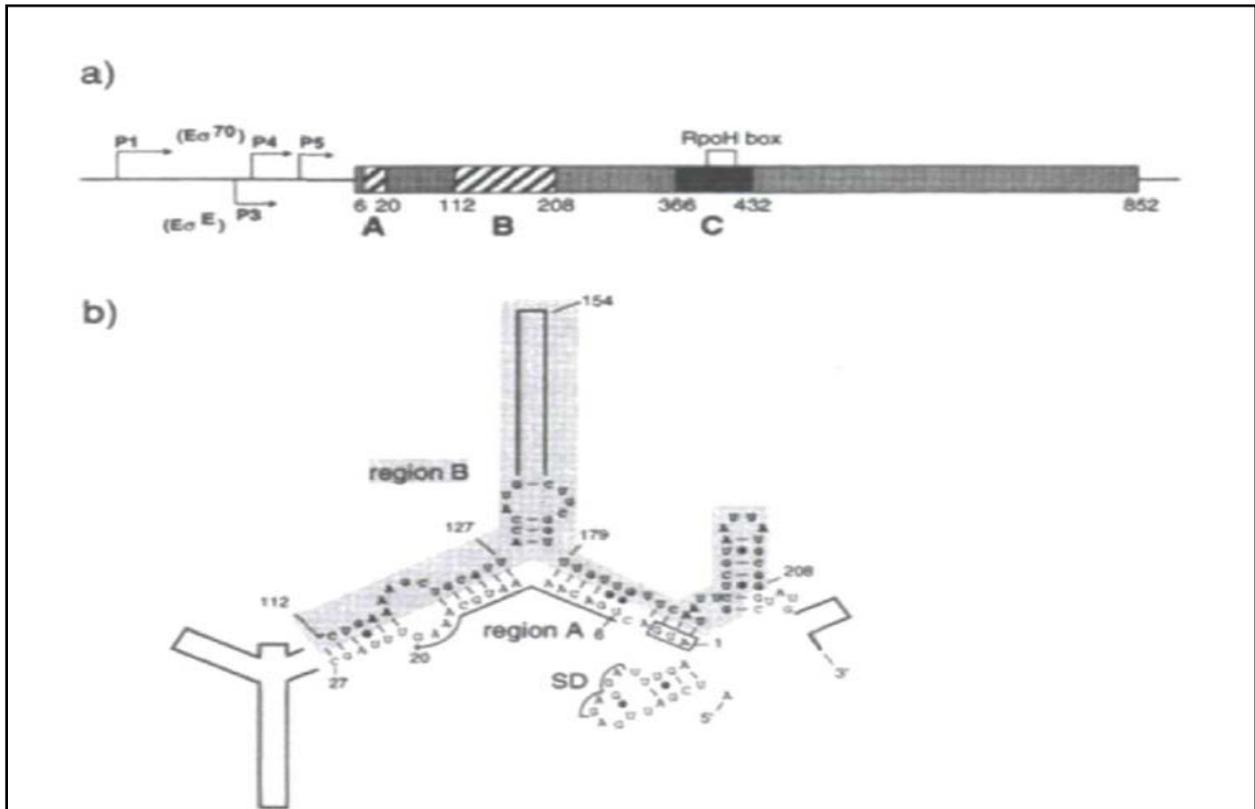


Figure 3. Organisation du gène *rpoH* et la structure de son ARNm. **a)** Promoteurs connus de *rpoH* (P1, P3, P4 et P5) et localisation des régions régulatrices sur le gène *rpoH* (A, B et C). **b)** implication des régions A et B dans la formation des structures secondaires de l'ARNm de *rpoH* (Yura *et al.*, 2000).

La compétition entre les facteurs sigma est un autre moyen de régulation négative observé dans la cellule. Dans les conditions normales (sans stress) σ^{70} se lie majoritairement aux ARN polymérase libres dans la cellule laissant peu de place à σ^{32} . De plus, σ^{32} contribue à sa propre régulation post-transcriptionnelle. Le complexe ARN polymérase σ^{32} (ARNP- σ^{32}) transcrit les gènes codant pour la protéine chaperonne DnaK et les protéines co-chaperonnes DnaJ et GrpE qui séquestrent σ^{32} . Cependant, DnaK a peu d'affinité avec σ^{32} et requiert la présence du médiateur DnaJ et GrpE pour la formation du complexe DnaK/J-GrpE- σ^{32} . (Laufen *et al.*, 1999).

Lors d'un choc thermique, la protéine chaperonne DnaK se lie préférentiellement aux protéines mal repliées plutôt qu'à σ^{32} . Ainsi, les σ^{32} libres se fixent à des ARNP et elles sont alors protégées de l'action de la protéase et de sa dégradation (Georgopoulos *et al.*, 1994; Grosset *et al.*, 1996). De plus, l'inactivation de σ^{70} par des températures supérieures à 42 °C fait en sorte que σ^{32} n'entre pas en compétition avec ce facteur de transcription sigma que lors de

son association à l'ARNP (Blaszczak *et al.*, 1995). Une fois le complexe ARNP- σ^{32} formé, il y a transcription des gènes liés à la réponse au choc thermique. À l'arrêt du stress thermique, la réduction des protéines agrégées et mal repliées entraîne une saturation en protéines chaperonnes tels que DnaK/J et GrpE. Cela permet un retour rapide aux conditions normales à l'intérieur de la cellule puisque cette forte concentration de chaperonnes va induire une baisse du niveau et de l'activité de σ^{32} par la séquestration de DnaK-DnaJ-GrpE (Fig4) (Tomoyasu *et al.*, 1998).

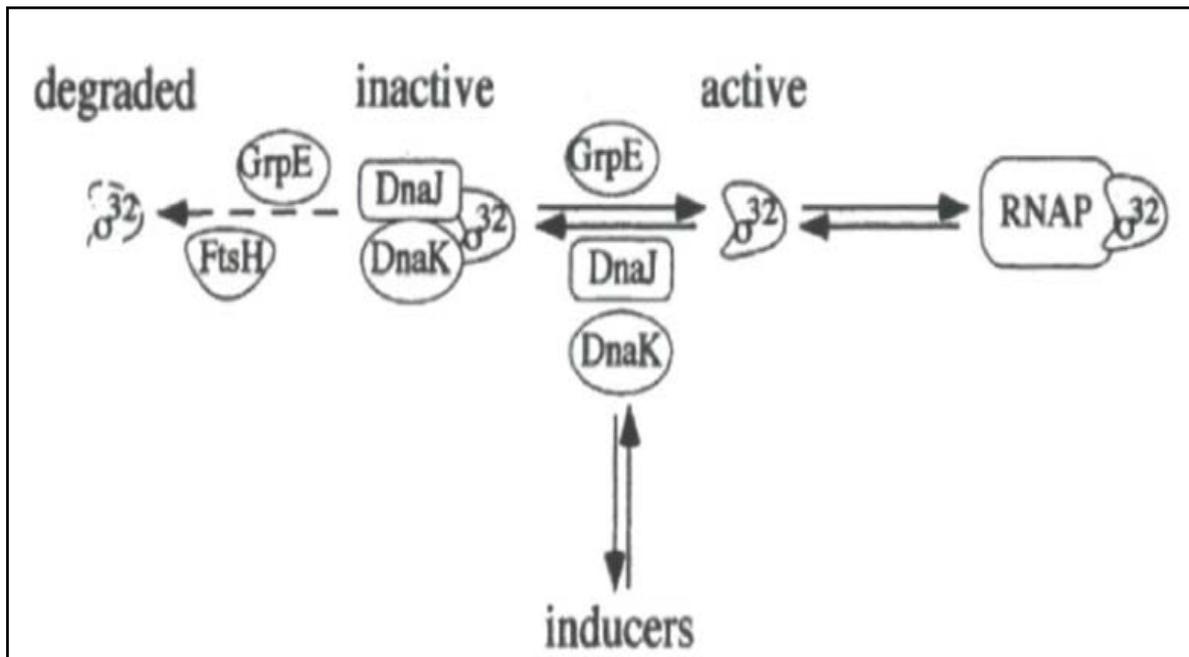


Figure 4. Modèle de régulation de σ^H maintenu en équilibre sous forme active associée avec l'ARNP et sous forme inactive séquestrée par DnaK et DnaJ à l'intérieur de la cellule (Arsène *et al.*, 2000).

9.2. Régulation de RpoE (σ^E ou σ^{24})

Parmi les systèmes de réponse aux stress membranaires, la voie de signalisation régulée par le facteur σ^E (ou σ^{24}) permet chez *E.coli*, de moduler une réponse au choc thermique dès un passage de 30 à 43 °C (Ades *et al.*, 2003). Les gènes régulés par σ^E jouent un rôle important dans le maintien des fonctions de dégradation, de biosynthèse, et du bon repliement des protéines et lipoprotéines membranaires. Il a été démontré que σ^E était essentiel à la croissance de *E.coli* durant le choc thermique, mais aussi à toutes les températures (De Las Penas *et al.*, 1997).

La réponse au stress thermique liée ou σ^E est induite par une voie de signalisation appelée «regulated intramembrane proteolysis» (Fig.5). Ce système consiste en un clivage successif de plusieurs protéines membranaires, qui vont mener à l'activation de σ^E . Le signal s'active au moment où la température ou un autre stress perturbe l'intégrité des porines de la

membrane externe (OMPs) (Walsh *et al.*, 2003), suggèrent que les OMPs sont des bons indicateurs de l'intégrité de la membrane externe de la bactérie, en raison de la complexité de leur processus d'assemblage. Ainsi, le bon repliement des OMPs serait plus sensible aux perturbations causées par un stress que les autres protéines membranaires ou les lipopolysaccharides (LPS) et elles seraient les premières à activer la voie de signalisation RIP. Les mauvais repliements des OMPs exposent une séquence de trois acides aminés, soit Tyrosine-aa-Phénylalanine sur la région C-terminale des OMPs (Walsh *et al.*, 2003).

Ce segment est reconnu par DegS, une protéine périplasmique ancrée à la membrane interne par son domaine transmembranaire N-terminal (Alba *et al.*, 2001). Normalement, DegS est maintenue sous forme inactive par des interactions avec son domaine PDZ et son domaine protéolytique (Walsh *et al.*, 2003; Hasselblatt *et al.*, 2007; Sohn *et al.*, 2007). La liaison des trois acides aminés des OMPs au domaine PDZ de DegS mène à l'activation de son domaine protéolytique par un changement allostérique. La voie de signalisation RIP menant à l'activation de σ^E . La cascade protéolytique est terminée ainsi que la voie de signalisation (Raina *et al.*, 1995; Rouvière *et al.*, 1995).

Le régulon σ^E comprend des gènes des protéases, protéines périplasmiques et des protéines chaperonnes servant à l'assemblage et au transport des OMPs et des LPS (Ruiz *et al.*, 2006; Sperandio *et al.*, 2007). En outre, le complexe σ^E -ARNP transcrit des gènes codants pour un nombre important de protéines et de lipoprotéines membranaires ainsi que des enzymes impliquées dans la synthèse et le transport de phospholipides, d'acide gras et d'oligosaccharides (Dartigalongue *et al.*, 2001; Rezuchova *et al.*, 2003; Rhodius *et al.*, 2006).

Aussi, on remarque la transcription de petits ARNs non-codant jouant le rôle d'ARN interférents réduisant l'expression des OMPs (Johansen *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2007; Udekwu et Wagner, 2007). Ceci a mis en évidence un mécanisme qui réduit la production d'OMPs durant le stress. En conditions normales de la cellule. La baisse de l'activité de σ^E et du niveau des σ^E libres dans le cytoplasme s'enchaînent immédiatement après l'arrêt du signal de stress (Ades *et al.*, 2003).

Ainsi, σ^E contrôle sa propre régulation en transcrivant les gènes de ses propres répresseurs RseA et RseB situés sur le même opéron que σ^E et DegS, comme mentionné précédemment, RseA séquestre σ^E à la membrane plasmique (Missiakas *et al.*, 1997), et l'empêche du même de s'associer avec l'ARNP (Fig.5) (Campbell *et al.*, 2003). De son côté, RseB est aussi considéré comme un répresseur de σ^E (De Las Penas *et al.*, 1997; Missiakas *et al.*, 1997) parce qu'il stabilise RseA à la membrane plasmique (Ades *et al.*, 1999) et la protège de la protéolyse de DegS (Cezairliyan et Sauer, 2006).

DegS joue un rôle clé dans l'activation et l'inactivation de la voie RIP régulée par σ^E et le niveau de σ^E libre dans le cytoplasme. Sa capacité de se mettre rapidement en forme active, ou inactive témoigne de l'efficacité et de la rapidité de la voie RIP régulée par σ^E , à s'adapter au stress (Ehrmann et Clausen, 2004). Ainsi, σ^E joue un rôle important durant la réponse de la cellule bactérienne au choc thermique. D'une part, son activité permet à la cellule de réagir au stress thermique extracytoplasmique. D'autre part, ARNP- σ^E induit la transcription de *rpoH*, qui est un régulateur positif de σ^H , ce dernier est un autre facteur de transcription σ , responsable de la réponse au choc thermique cytosolique (Raina *et al.*, 1995; Rouvière *et al.*, 1995).

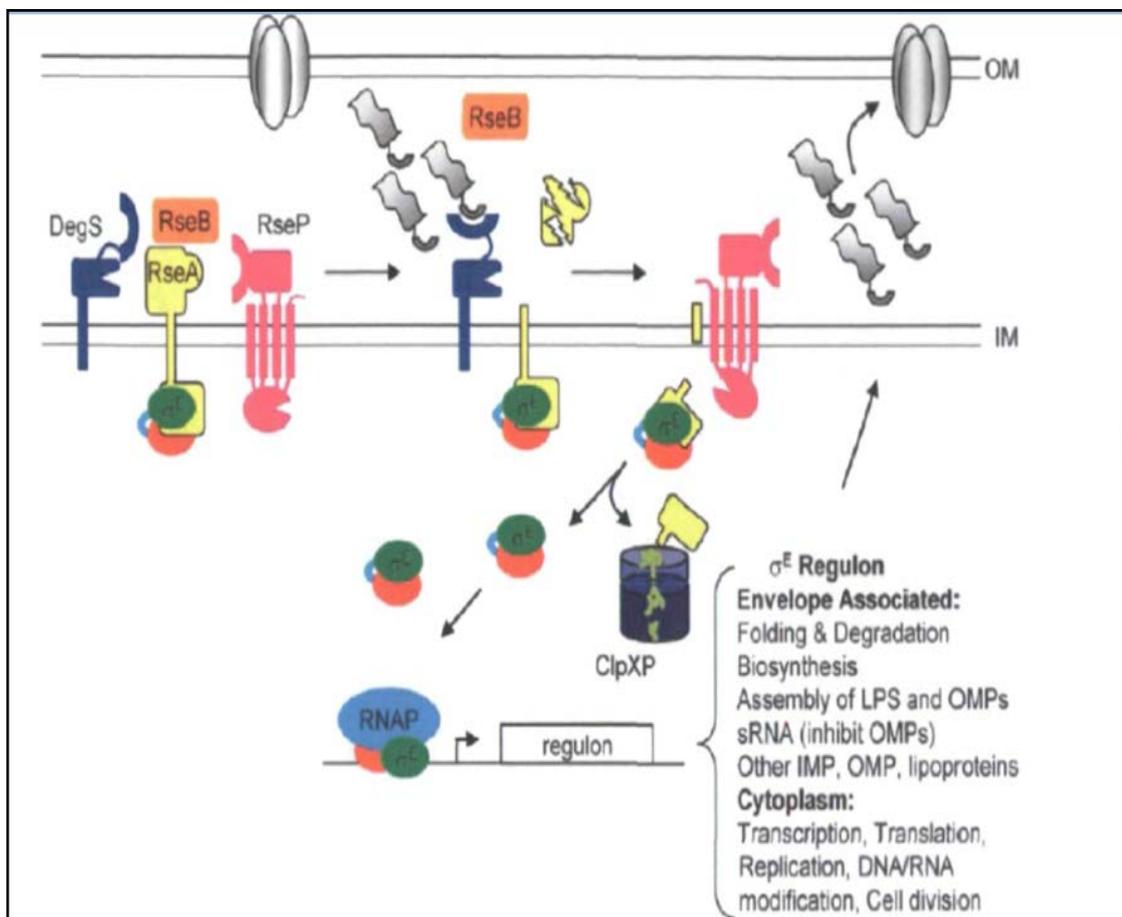


Figure 5. Voie de signalisation RIP face à un stress membranaire régulé par σ^E (Hayden et Ades, 2008).

10. La thermotolérance

Le taux de croissance d'une culture de *Lactobacillus. lactic* a une faible variation à une température de 30 à 43°C. De 40 à 48°C, la viabilité d'une population cellulaire prélevée en phase exponentielle (à 30°C) n'est pas affectée, elle décroît très rapidement, en revanche à

partir de 50°C, elle est de 8 % et 0,06 % après 15 minutes et 30 minutes de chauffage à 51°C (Fig. 6). À 55°C et au-delà, les cellules meurent en quelques minutes. Cependant le taux de survie des cellules exposées aux températures élevées dépend des conditions de croissance. Ainsi, il est considérablement plus élevé, si les bactéries avant d'être exposées à une épreuve thermique létale, sont soumises, durant des temps qui correspondent à peu près au temps de génération (30 à 40 min), à des températures de 5 à 10°C supérieures à la température habituelle de croissance. L'appréciation quantitative de ce phénomène d'exhaussement de la survie cellulaire basale, appelé résistance induite ou thermotolérance, observé chez tous les représentants du monde vivant (bactéries, champignons, plantes et animaux) (Lindquist et Craig, 1988) est fournie par le facteur de thermotolérance, c'est à- dire le rapport du pourcentage de survie d'une population adaptée, ou conditionnée à telle épreuve sur le pourcentage de survie d'une population témoin, «naïve» cultivée à 30°C (Boutibonnes *et al.*, 1991).

Ce facteur varie avec la température de la préculture (égal à 1 à 30°C), il est maximal à 42°C où sa valeur dépasse 100 (Fig. 6), puis il décroît rapidement quand la température d'adaptation se rapproche de la température d'épreuve (52°C). Si les cellules «conditionnées» par la chaleur, qui anticipent ou se préparent à une épreuve thermique létale, meurent lentement ; le processus d'adaptation entraîne une augmentation de tolérance hétérologue vis-à-vis d'autres modalités qui menacent la survie cellulaire. Ces résistances croisées s'expriment vis-à-vis d'agents létaux, dont la nature et les fonctions cytotoxiques sont éloignées de celles de la chaleur (Boutibonnes *et al.*, 1991).

De nombreux travaux, portant sur les bactéries mais aussi sur les cellules eucaryotes en culture *in vitro*, confirment l'existence de cette interdépendance, par exemple chez *E.coli*, la surexpression des gènes du régulon σ_{32} , en recrutant le gène *rpoH* sous le contrôle d'un promoteur tac inductible par l'IPTG (isopropyl thio β -galactoside), suivi de la synthèse d'hsps à hauts niveaux endocellulaires, ne conduit pas au développement de thermotolérance (VanBogelen *et al.*, 1987). Ainsi chez *Lactobacillus.lactic* des thermomimétiques qui induisent la synthèse des hsps, impliquées dans l'augmentation de résistance à la chaleur (DnaK, GroEL, GrpE, hsp 104 ou ClpB) (Parsell et Lindquist, 1994).

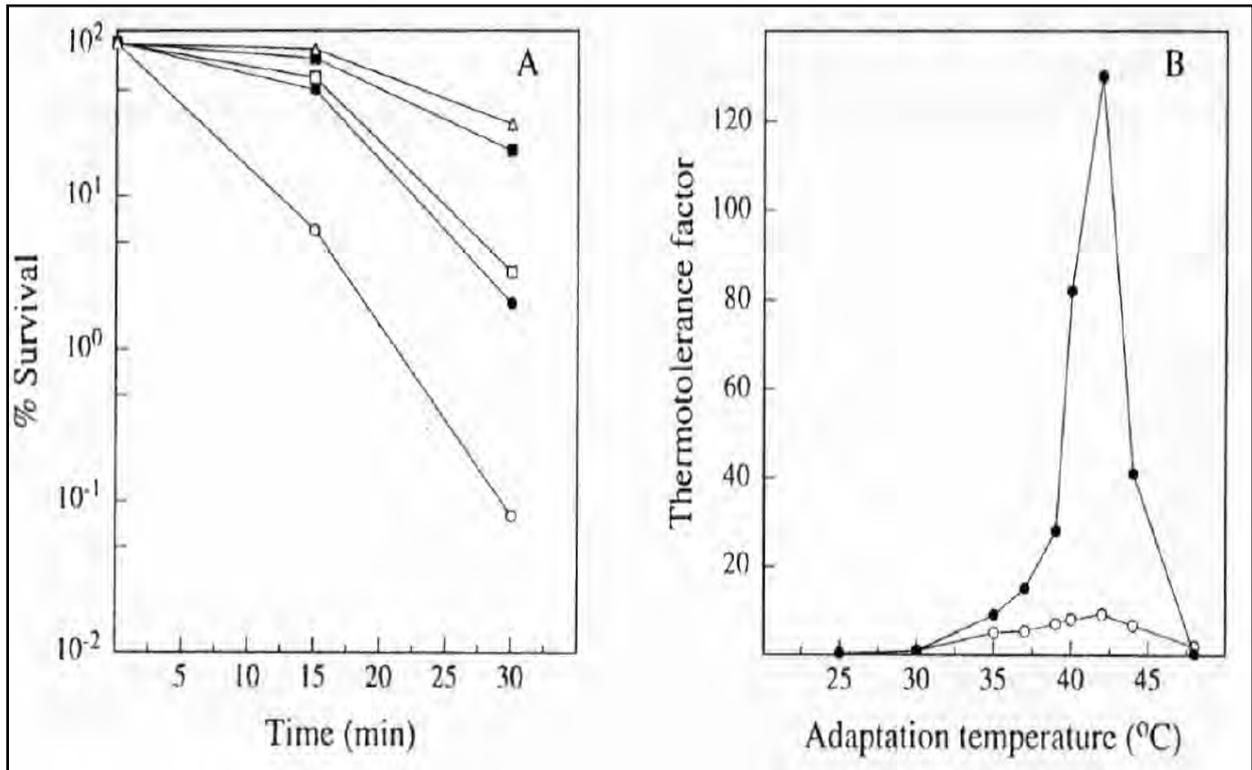


Figure 3. A. Thermotolérance (à 52 °C) développée par diverses cultures de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* IL 1403 à 30 °C, 35 °C, 37°C ,40 °C, 42 °C. B. Facteurs de thermotolérance (à52 °C) après 15 min, ou 30 min, développés par diverses cultures de *L. lactis* subsp *lactis* IL 1403 (Boutibonnes *et al.*, 1995).

Le facteur de thermotolérance est égal au rapport du pourcentage de survie d'une population «conditionnée» ou adaptée à différentes températures (de 25 à 48°C) exposée à 52 °C pendant 30 min, sur le pourcentage de survie de la population témoin cultivée à 30 °C (Boutibonnes *et al.*, 1995).

Conclusion

Comme tous les organismes unicellulaires, les bactéries doivent en permanence adapter leur physiologie aux fluctuations des facteurs physico-chimiques du milieu environnant. Les mécanismes adaptatifs mis en œuvre incluent une régulation de la transcription de gènes dont les produits contribuent à la résistance et/ou à la survie des bactéries dans les conditions de stress.

Les mécanismes de régulation de l'expression génique impliqués dans les réponses aux stress environnementaux chez la bactérie *Escherichia coli* sont nombreux et diversifiés.

Il existe plusieurs partenaires impliqués dans les régulations transcriptionnelles consécutives à ces stress (protéines régulatrices et régions effectrices au voisinage des promoteurs), ainsi que les mécanismes de perception et de transduction des signaux régulateurs.

En perspectives, il est important de mettre en évidence le phénomène de choc thermique par l'étude de profil protéique d'une bactérie tel que *Escherichia coli* avant et après la soumission d'un stress thermique.

Les références bibliographiques

- Abee T, Wouters JA.** 1999. Microbiol stress reponse in mineral processing. *Int Food Microbiol.* **50**(1-2) :65-91.
- Ahn SG, Thiele DJ.** 2003. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev.* **17**(4): pp.516-28.
- Alba BM, Zhong HJ, Pelayo JC, Gross CA.** 2001. DegS (hhoB) is an essential *Escherichia coli* gene whose indispensable function is to provide σ^E activity. *Mol Microbiol.* **40**: 1323-1333.
- Auffray Y, Gansel X, Thammavongs B, Boutibonnes P.** 1992. Heat shock-induced protein synthesis in *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. *Curr Microbiol.* **24** :281-284.
- Baler R, Welch WJ, Voellmy R.** 1992. Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured proteins: hsp70 as a potential autoregulatory factor. *The Journal of Cell Biology.* **117**(6): pp.1151-1159.
- Barril JS, Kim SG, Balt CA.** 1994. Cloning and sequencing of the *Lactococcus lactis* subsp *lactis* *dnak* gene using a PCR - based approach. *Gene.* **142** : 91-96.
- Batzli JMC, Graves WR, Berkum PV.** 1992. Diversity among rhizobia effective with *Robinia pseudoacacia* L. *Appl Environ Microbiol.* **58**:2137-2143.
- Berry ED, Foegeding PM.** 1997. Cold temperature adaptation and growth of microorganisms. *J Food protect.* **60** :1583-1594.
- Bhak G, Choe YJ, Paik SR.** 2009. Mechanism of amyloidogenesis nucleation dependent fibrillation versus double concerted fibrillation. *BMB Reports.* **42**(9): pp.541-551.
- Blaszczak A, Zylicz M, Georgopoulos C, Liberek K.** 1995. Both ambient temperature and the DnaK chaperone machine modulate the heat shock response in *Escherichia coli* by regulating the switch between σ^{70} and σ^{32} factors assembled with RNA polymerase. *EMBO J* **14**: 5085-5093.
- Boutibonnes P, Bisson V, Thammavongs B, Hartke A, Panoff JM, Benachour A, Auffray Y.** 1995. Induction of thermotolerance by chemical agents in *Lactococcus actis* IL 1403. *Int J Food Microbiol.* **25** : 83-94.

- Boutibonnes P, Gillot B, Auffray Y, Thammavongs B.** 1991. Heat shock induces thermotolerance and inhibition of Iysis in a Iysogenic strain of *Lactococcus tectis*. *Int J Food Microbiol.* **14** : 1-10.
- Boutibonnes P, Tranchard C, Hartke A, Thammavongs B, Auffray Y.** 1992. Is thermotolerance correlated to heat shock protein synthesis in *Lactococcus lactis* subsp *lactic*. *Int J Food Microbiol.* **16** : 227-230.
- Boutibonnes P.** 1996. Les protéines de choc thermique chez *Lactococcus lactis* : synthèse et régulation. Thermotolérance. *Lait.* **76** : 111-128.
- Brehmer, DC Gassler, W Rist, MP Mayer, B Bukau.** 2004. Influence of GrpE on DnaK substrate interactions. *J Biol Chem.* **279**(27) : 27957-64.
- Brul S, coote P.** 1999. Preservative agents in foods. Mode of action and microbiol resistance mechanisms. *Int J Food Microbiol.* **50**(1-2): 1-17.
- Bukau B.** 1993. Regulation of the *Escherichia coli* heat shock response. *Mol Microbio.* **9** : 671-680.
- Burel C, Mezger V, Pinto M, Rallu M, Trigon S, Morange M.** 1992. Mammalian heat shock protein families. Expression and functions *Experientia.* **48** : 629-634.
- Burgman PW, Konings AW.** 1992. Heat induced protein denaturation in the particulate fraction of HeLa S3 cells: effect of thermotolerance. *J Cell Physiol.* **153**(1): pp.88-94.
- Cezairliyan BO, Sauer RT.** 2007. Inhibition of regulated proteolysis by RseB. *Proc Natl Acad Sci.* **104**: 3771-3776.
- Connolly L, Yura T, Gross CA.** 1999. Autoregulation of the heat shock response in procaryotes. Dans : Bukau B, Cellular Function and Mechanism. Harwood Academic Publishers Amsterdam, Pays-Bas. p. 13-33.
- Craig EA et Gross CA.** 1991. Is hsp70 the cellular thermometer. *Trends Biochem Sci.* **16**: 135-140.
- Craig EA, Gambill BD, Nelson RJ.** 1993. Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol Rev.* **57**:402-414.

- Csonka LN, Hanson AD.** 1991. Prokaryotic osmoregulation :genetics and physiology. *Annu Rev Microbiol.* **45** :569-606.
- De Las Penas A, Connolly L et Gross CA.** 1997. The mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of σ^E . *Mol Microbiol.* **24**:373-385.
- Delaney JM.** 1999. A grpE mutant of *Escherichia coli* is more resistant to heat than the wild-type. *J Gen Microbiol.* **136**(5) : 797-801.
- Deuerling E, A Mogk, C Richter, M Purucker et W Schumann.** 1997. The ftsH gene of *Bacillus subtilis* is involved in major cellular processes such as sporulation stress adaptation and secretion. *Mol Microbiol.* **23**(5): 921-33.
- Duwat P, Ehrlich SD, Gruss A .** 1995. The *recA* gene of *Lactococcus lactis*: Characterization and involvement in oxydative and thermal stress. *Mol Microbio.* **17** :1121-1131.
- Eaton T, Shearman C, Gasson M.** 1993. Cloning and sequence analysis of the *dnaK* gene region of *Lactococcus/actis subsp lactis*. *J Gen Microbio.* **139** : 3253-3254.
- Ellis R.** 1987. Proteins as molecular chaperones. *Nature* . **328**-378-379.
- Elmnasser N, Ritz-Bricaud M, Guillou S, Leroi F, Orange N, Bakhrou A, Federighi M.** 2006. Réponse adaptative de *Listeria monocytogenes* au stress osmotique et froid : implication en sécurité des aliments. *Revue Méd Vét.***157**:92-101.
- Fernandes M, Xiao H, Lis JT.** 1994. Fine structure analyses of the *Drosophila* and *Saccharomyces* heat shock factor heat shock element interactions. *Nucleic Acids Research.* **22**(2): pp.167-173.
- Fu GK, MJ Smith, DM Markovitz.** 1997. Bacterial protease Lon is a site specific DNA binding protein. *J Biol Chem.* **272**(1): 534-8.
- Garwin JL, Cronan Jr JE.** 1980. Thermal modulation of fatty acid synthesis in *Escherichia coli* does not involve de novo synthesis. *J Bacteriol.* **141**:1457-1459.
- Georgopoulos C, Liberek K, Zylicz M, Ang D.** 1994. Properties of the heat shock proteins of *Escherichia coli* and the autoregulation of the heat shock response. Dans: R I

Morimoto, A Tissieres et C Georgopoulos. The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York, Etats-Unis. p. 209-249.

Georgopoulos C, Ang D, Liberek K, Zylicz M. 1990. Properties of the *Escherichia coli* heat shock proteins and their role in bacteriophage growth. In: Stress proteins in biology and medicine (Morimoto RI, Tissière A, Georgopoulos C). Cold Spring Harbor Laboratory Press New York.

Giller KE, Witter E, Mc Graft SP. 1998. Toxicity of heavy metals to micro-organisms and microbial processes in agricultural soils. *Soil Biology Biochem.* **30** : 1389-1414.

Goloubinouff P, A Mogk, AP Zvi, T Tomoyasu, B Bukau. 1999. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by chaperone network. Proc Natl Acad Sci. U S A. **96**(24) : 13732-7.

Gonzalez-Marquez H. 1997. Réponse au stress acide chez *Streptococcus thermophilus*. Purification, identification et caractérisation d'une protéine surexprimée, Ph. D Thesis université. Henry-Poincaré Nancy France.

Gross CA. 1996. Function and regulation of the heat shock proteins. Dans : Bock AR Curtiss, JB Kaper, FC Neidhardt et T Nystrom, EcoSal - *Escherichia coli* and Salmonella : Cellular and Molecular Biology. ASM Press. Washington DC. Etats-Unis. p. 1382-1399.

Guédon E, Renault P, Ehrlich SD, Delorme C. 2001. Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptides supply. *Journal of bacteriology.* **183** :3614-3622.

Harms J. 2001. High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell.* **107**(5): pp.679-88.

Hasselblatt H, Kurzbauer R, Wilken C, Krojer T, Sawa J, Kurt J, Kirk R, Hasenbein S, Ehrmann M et Clausen T. 2007. Regulation of the σ^E stress response by DegS. how the PDZ domain keeps the protease inactive in the resting state and allows integration of different OMP-derived stress signals upon folding stress. *Genes Dev.* **21**:2659-2670.

Hayden JD et Ades SE. 2008. The extracytoplasmic stress factor, σ^E , is required to maintain cell envelope integrity in *Escherichia coli*. *PLoS One.* **3**: 1573-1586.

- Hengge-Aronis R, Klein W, Lange R, Riimnele M, Boos W.** 1991. Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by rpoS and are involved in stationary phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **173**: 7918-7924.
- Hengge-Aronis R.** 2000. The general stress response in *Escherichia coli*. Dans : Storz G et R Hengge-Aronis. 2000. Bacterial Stress Responses. ASM Press Washington DC, États-Unis. p. 161-178.
- Herman C, Thevenet D, D'Ari R, Boulloc P.** 1995. Degradation of cr32, the heat shock regulation in *Escherichia coli* is governed by HIIB. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92** : 3516-3520.
- Horwich AL.** 2004. Chaperoned protein disaggregation the ClpB ring uses its central channel. *Cell.* **119** (5) :579-81.
- Horwitz J.** 1992. α -Crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**: 10449-10453.
- Huang SH.** 1999. Effects of hyperthermia on the cytoskeleton and focal adhesion proteins in a human thyroid carcinoma cell line. *Journal of Cellular Biochemistry.* **75**(2): pp.327-337.
- Iwagami Y.** 1996. Changes in the ultrastructure of human cells related to certain biological responses under hyperthermic culture conditions. *Human Cell. Official Journal of Human Cell Research Society.* **9**(4): pp.353-366.
- Jacquier-Sarlin MR, Polla BS.** 1996. Dual regulation of heat-shock transcription factor (HSF) activation and DNA-binding activity by H₂O₂: role of thioredoxin. *Biochem J.* **318** (Pt 1). pp.187-93.
- Jaenicke R.** 1991. Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur J Biotechnol.* **37** :631-637.
- Jobin MP, Delmas F, Gannyn D, Diviès C, Guzzo J.** 1993. Molecular characterization of the gene encoding an 18-kilodalton small heat shock protein associated with the membrane of *Leuconostoc oenos*. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 609-614.
- Jones PG, Inouye M.** 1996. RbfA, a 30S ribosomal binding factor, is a cold-shock protein whose absence triggers the cold-shock response. *Mol Microbiol.* **21**:1207-1218.

- Kampinga HH.** 1993. Thermotolerance in mammalian cells. Protein denaturation and aggregation, and stress proteins. *J Cell Sci.* **104 (1):** pp.11-7.
- Kandror O, DeLeon A, Goldberg AL.** 2002. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proc Natl Acad Sci.* **99:** 9727-9732.
- Kihara A, Y Akiyama, K Ito.** 1995. FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of Sec Y, an essential protein translocase subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92(10):** 4532-6.
- Kilstrup M, Jacobsen S, Hammer K, Vogensen FK.** 1997. Induction of heat shock proteins Dna K, Gro EL, Gro ES by salt stress in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* **63 :**1826-1837.
- Kim SG, Balt CA.** 1993. Cloning and sequencing of the *Laetoeoeus lactis subsp lactis* GroESL operon. *Gene.* **127 :**121-126.
- Kretz-Remy C, Arrigo AP.** 2002. Gene expression and thiol redox state. *Methods in Enzymology.* **348:** pp.200-215.
- Lamiet A, Ziegelhoffer T, Georgopoulos C, Plückthun A.** 1990. The *Escherichia coli* heat shock proteins GroEL and GroES modulate the folding of the Iactamase precursor. *EMBO J.* **9:**2315-2319.
- Lamphear BJ, Panniers R.** 1991. Heat shock impairs the interaction of cap-binding protein complex with 5' mRNA cap. *J Biol Chem.* **266(5):** pp.2789-94.
- Laufen T, Mayer PM, Beisel C, Klostermeier D, Reinstein J, Bukau B.** 1999. Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by DnaJ co-chaperones. *Proc Natl Acad Sci.* **96:** 5452-5457.
- Lee S, ME Sowa, JM Choi, FT Tsai.** 2004. The ClpB /Hsp104 molecular chaperone a disaggregating machine. *J Struct Biol.* **146(1-2):** 99-105.
- Lepock JR.** 2001. The nuclear matrix is a thermolabile cellular structure. *Cell Stress and Chaperones.* **6(2):** pp.136-147.

- Liberek K.** 1991. *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **88**(7): pp.2874-2878.
- Lim EM, Lafon A, Dridi L, Boudelbouze S, Ehrlich SD, Maguin E.** 2001. Identification des protéines de stress chez *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* par électrophorèse bidimensionnelle. Lait. **81**:317-325.
- Lünsdorf H, Schairer HV, Heidelbach M.** 1995. Localization of the stress protein SP21 in indole induced spores, fruiting bodies, and heat -shocked cells of *Stigmatella aurantiaca*. J Bacteriol. **177**: 7092-7099.
- Marchandin H.** 2007. *B2 - Physiologie bactérienne*. Faculté de Médecine Montpelli : *Bactériologie*. **5** : 1-2.
- Mecas J, Rouvière PE, Erickson JW, Donohue TJ, Gross CA.** 1993. The activity of crE an *Escherichia coli* heat inducible cr factor is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Oev* **7** : 2619-2628.
- Missiakas D, Mayer MP, Lemaire M, Georgopoulos M C, Raina S.** 1997. Modulation of the *Escherichia coli* σ^E (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins. Mol Microbiol. **24**:355-371.
- Mogk AT, Tomoyasy P, Goloubinoff S, Rudiger D, Roder H, Langen, B Bukau.** 1999. Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins : prevention and reversion of agregation by Dna K and clpB. Embo J. **18**(24): 6934-49.
- Mohammed SH, Smouni A, Neyra M, Kharchef D, Filali-Maltouf A.** 2000. Phenotypic characterization of root nodulating bacteria isolated from *Acacia* spp. grown in Lybya. *Plant Soil*. **224**: 171-183.
- Morimoto RI, Tissières A, Georgopoulos C.** 1994. Progress and perpectives in the biology of heat shock proteins and molecular chaperones. In: The biology of heat shock proteins and molecular chaperones (Morimoto RI, Tissières A, Georgopoulos C). Cold Spring Harbor Laboratory Press New York.
- Morimoto RI.** 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes. Dev.* **12**(24): pp.3788-96.

- Morita M, Kanemori M, Yanagi H, Yura T.** 1999. Heat- induced synthesis of a in *Escherichia coli*: structural and functional dissection of rpoH mRNA secondary structure. *J Bacteriol.* **181**:401-410.
- Murtha-Riel P.** 1993. Expression of a phosphorylation-resistant eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit mitigates heat shock inhibition of protein synthesis. *J Biol Chem.* **268(17)**: pp.12946-51.
- Nagai H, Yuzawa H, Kanemori M, Yma T.** 1994. A distinct segment of the o³² polypeptide is involved in DnaK-mediated negative control of the heat shock response in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci.* **91**: 10280-10284.
- Nagai H, Yuzawa H, Yura T.** 1991. Interplay of two cis-acting mRNA regions in translational control of o³² synthesis during the heat shock response of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci.* **88**:10515-10519.
- Nakahata K.** 2002. Heat shock induces centrosomal dysfunction, and causes nonapoptotic mitotic catastrophe in human tumour cells. *International Journal of Hyperthermia: The Official Journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group.* **18(4)**: pp.332-343.
- Nautiyal CS, Bhaduria S, Kumar P, Lal H., Mondal R, Verma D.** 2000. An efficient microbiological growth medium for screenig phosphate solubilizing micoorganisms. *FEMS Microbiol Lett.* **182**: 291- 296.
- Nilsson D, Lauridsen AA, Tomoyasu T, Ogura TA.** 1994. *Laetoeoeus lactis* gene encodes a membrane protein with putative ATP-ase activity that is homologous to the essential *Escherichia coli* *ftsH* gene product. *Microbiology.* **140** : 2601-2610.
- Nover L, Scharf KD.** 1997. Heat stress proteins and transcription factors. *Cell Mol Life Sci.* **53(1)**: 80-103.
- O'byrne C, Booth IR.** 2002. Osmoregulation and its importance to food-borne microorganisms. *International Journal Of Food Microbiology.* **74** :203-2016.
- Parsell DA, Lindquist SL.** 1994. Heat shock proteins and stress tolerance. *In: The biology of heat snock proteins and molecular chaperones* (Morimoto RI, Tissières A, Georgopoulos C, eds). Cold Spring Harbor Laboratory New York.
- Phadtare S.** 2004. Recent developments in bacterial cold-shock reponse. *Curr Issues Mol Biol.* **6** :125-136.

- Pinto M, Morange M, Bensaude O.** 1991. Denaturation of proteins during heat shock. In vivo recovery of solubility and activity of reporter enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*. **266**(21): pp.13941-13946.
- Pirkkala L, Nykanen P, Sistonen L.** 2001. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *Faseb J*. **15**(7): pp.1118-31.
- Pockley AG.** 2001. Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. **3**(23): pp.1-21.
- Potts M.** 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev*. **58**(4) : 755-805.
- Presser KA, Ratkowsky DA, Ross T.** 1997. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of PH and lactic acid concentration. *Applied And Environmental Microbiology*. **63** :2355-2360.
- Raina S, Missiakas D, Georgopoulos C.** 1995. The *rpoE* gene encoding the σ^E (σ^{24}) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *EMBO J*. **14** : 1043-1055.
- Reva ON, Smirnov VV, Petterson B, Priest FG.** 2002. *Bacillus endophyticus* sp. Nov . Isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp). *Int J Syst Evol Microbiol*. **52**: 101- 107.
- Reyes DY, H Yoshikawa.** 2002. DnaK chaperone machine and trigger factor ara only partilly required for normal growth of *Bacillus subtilis* .*Biosci Biotechnol Biochem*. **66**(7) :1583-6.
- Roberts CJ.** 2007. Non-native protein aggregation kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*. **98**(5): pp.927-938.
- Rouvière PE, De Las Penas A, Meccas J, Lu Z, Rudd KE, Gross CA.** 1995. *rpoE*, the gene encoding the second heat shock sigma factor, σ^E in *Escherichia coli*. *EMBO J* **14** : 1032-1042.
- Sanchez Y, Lindquist S.** 1990. HSP 104 required for induced thermotolerance. *Science* **248**: 1112-1115.
- Saraiva M J.** 2001. Transthyretin amyloidosis: a tale of weak interactions. *FEBS Letters*, **498**(2-3): pp.201-203.
- Satyal SH.** 1998. Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1. *Genes. Development*. **12**(13): pp.1962-1974.

- Schulz A, Schwab S, Homuth G, Versteeg S, Schumann W.** 1997. The *htpG* gene of *Bacillus subtilis* belongs to class III heat shock genes and is under negative control. *J Bacteriol.* **179** : 3103-3109.
- Sherman M, Goldberg A.** 1992. Heat shock in *Escherichia coli* alters the protein-binding properties of the chaperonin *groEL* by inducing its phosphorylation. *Nature.* **357**: 167-169.
- Shirai Y, Y Akiyama, K Ito.** 1996. Suppression of *ftsH* mutant phenotypes by overproduction of molecular chaperones. *J Bacteriol.* **174**(4): 1141-5.
- Sohn J, Grant RA et Sauer RT.** 2007. Allosteric activation of DegS, a stress sensor PDZ protease. *Cell.* **131**:572-583.
- Takemoto L, Emmons T, Horwitz J.** 1993. The C-terminal region of α -crystallin involvement in protection against heat-induced denaturation. *Biochem J.* **294**: 435-438.
- Tilak KV, Ranganayaki N, Pal KK, de R, Saxena AK, Nautiyal CS, Mittal S, Tripathi AK, Johri BN.** 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Curr Sci.* **89**: 136-150.
- Timpone DE, Fenster KM, Wei L, Broadbent JR , Steele JL .** 1996. A small heat shock protein from *Laetobacillus helveticus*, In: G Venema, JHJ Huis in't Veld, J Hugenholtz. *Abstracts of the Fifth symposium on lactic acid bacteria: genetics metabolism and applications.* Veldhoven. The Netherlands.
- Tomoyasu T, Ogura T, Tatsuta T, Bukau B.** 1998. Levels of DnaK and DnaJ provide tight control of heat shock gene expression and protein repair in *E. coli*. *Mol Microbiol.* **30**: 567-581.
- Uversky VN.** 2007. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *Journal of Neurochemistry.* **103**(1): pp.17-37.
- Van De Guchte M, Ehrlich SD, Maguin E.** 2002. Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *J Appl Microbiol.* **55** :224-28.
- Walsh NP, Alba BM, Bose B, Gross CA, Sauer RT.** 2003. OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell.* **113**:61-71.
- Weibezahn J, C Schlieker, B Bukau, A Mogk.** 2003. Characterization of a trap mutant of the AAA+ chaperone. *J Biol Chem.* **278**(35) : 32608-17.

- Wetzstein M, Schumann W.** 1990. Nucleotide sequence of a *Bacillus subtilis* gene homologous to the *grpE* gene of *Escherichia coli* located immediately upstream of the *dnaK* gene. *Nucleic Acids Res.* **18** :1289.
- Wetzstein M, Vëlker U, Dedio J, Lobau S, Zuber U, Schiesswohl M, Herget C, Hecker M, Schumann W.** 1992. Cloning, sequencing and molecular analysis of the *dnaK* locus from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **174** :3300-3310.
- Whitaker RD, Batt CA.** 1991. Charaterisation of the heat shock response in *Lactococcus* subsp. *Lactis Appl Environ Microbiol.* **57** :1408-1412.
- Winter J, u jakob.** 2004. Beyond transcription-new mechanisms for the regulation of molecular chaperons. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **39**(5-6) : 297-317.
- Yost HJ , Lindquist S.** 1986. RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis. *Cell.* **45**(2): pp.185-93.
- Yost HJ, Lindquist S.** 1991. Heat shock proteins affect RNA processing during the heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **11**(2): pp.1062-8.
- Yuan Y, Crane DD, Barry CEIII.** 1996. Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial α -crystallin homolog, *J Bacteriol.* **178**: 4484-4492.
- Yura T, Nagai H, Mori H.** 1993. Regulation of the heat - shock response in bacteria. *Annu Rev Microbio.* **47** : 321-450.
- Zahran HH, Räsänen LA, Karsisto K, Lindström K.** 1994. Alteration of lipopolysaccharide and protein profiles in SDS-PAGE of rhizobia by osmotic and heat stress. *Word J Microbiol.* **10**: 100- 105.
- Zuber U, Schumann W.** 1994. CIRCE, a nover heat shock element involved in regulation of heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtitls*. *J Bacterio.***176** : 1359-1363.

Bacteria are microorganisms colonizing the environment where find all the conditions necessary and optimal for their survival. Environmental factors can affect protein folding, following its intensity. This may induce irreversible aggregation of proteins and results in cell death.

A cellular defense mechanism against this stress the integrity of proteins exists, it is conserved during evolution. Indeed, the bacterial cell responds to stress by activating the expression of certain genes encoding called Hsp (Heat Shock Protein) specific proteins they are grouped into classes and have well-defined functions.

The heat shock response is a very well known defense mechanism, in which the expression of heat shock protein Hsp allows the bacteria to recover the damage caused by thermal shock.

The synthesis of heat shock protein is under the control of a strictly ordered and at the bacterial genetic regulation. Factors (σ^{32}) and σ^E (σ^{24}) and rpoH and rpoE gene are implicated in this process (Ritossa, 1964).

Key words: Heat Shock, Heat Shock Proteins, Genetic Regulation, Sigma Factors and transcriptional regulation.

البكتيريا هي الكائنات الحية، والتي تجد في البيئة جميع المواد الضرورية والطاقة الأمثل، من أجل النمو. هناك ظروف أو عوامل تؤدي الى زعزعة الاستقرار في البيئة الخلوية كثيرا ما تؤثر على طي البروتينات، فينتج عن ذلك موت الخلية البكتيرية. (Ritossa, 1964)

آلية الدفاع الخلوية ضد هذا الهجوم تحافظ على سلامة البروتينات الموجودة لديها، والتي يتم حفظها أثناء التطور. في الواقع تستجيب الخلية لهته الضغوط و ذلك من خلال تفعيل التعبير عن عدد صغير من الجينات ترمز لعدد من البروتينات المجندة والمتخصصة تسمى HSp مجمعة في أقسام والتي لها وظائف محددة (Ritossa, 1964).
الا استجابة للصدمة الحرارية هي آلية دفاعية توجد على نطاق واسع، تساعد الخلية على التعافي من الأضرار الناجمة عن ارتفاع الحرارة، كما تمنع التصاق البروتينات و تحليلها (المقاومة الحرارية).
تركيب بروتينات الصدمة الحرارية يتطلب التنظيم الدقيق والمنظم على مستوى المعلومة الجينية للبكتيريا. بفضل عدة عوامل رئيسية مثل σ^{32} و σ^E (σ^{24}) وجينات معينة كما $rpoH$ و $rpoE$ المسؤولة عن تركيب هاته البروتينات.

الكلمات المفتاحية

الصدمة الحرارية، بروتينات الصدمة الحرارية، التنظيم الوراثي وعوامل سيغما والتنظيم النسخي.

Année universitaire : 2013 – 2014.

Présenté par : KEROUMI Farouk
RACHI Rahil
SLIMANI Hana

Titre du mémoire

Etude de la réponse des bactéries au choc thermique

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie Animale
Option : Génétique Moléculaire

Résumé :

Les bactéries sont des micro-organismes colonisant l'environnement où se trouve l'ensemble des conditions nécessaires et optimales à leur survie. Des facteurs environnementaux peuvent altérer le repliement des protéines, suivant son intensité. Ce phénomène peut induire une agrégation irréversible des protéines et entraîne la mort des cellules (Ritossa, 1964).

Un mécanisme cellulaire de défense contre cette situation de stress à l'intégrité des protéines existe, il est conservé au cours de l'évolution. En effet, la cellule bactérienne réagit au stress en activant l'expression de certains gènes codant pour des protéines spécifiques appelés les protéines du choc thermique (Hsp : Heat Shock Protein), ces dernières sont regroupées dans des classes et elles ont des fonctions bien déterminées (Ritossa, 1964).

La réponse au choc thermique est un mécanisme de défense très connu, au cours duquel l'expression des Hsp permet à la bactérie de restaurer les dommages causés par le choc thermique.

La synthèse des protéines du choc thermique est sous le contrôle d'une régulation stricte et ordonnée au niveau du patrimoine génétique bactérienne. Les facteurs (σ^{32}) et σ^E (σ^{24}) et les gènes rpoH et rpoE sont incriminés dans ce processus.

Mots clés :

Choc thermique, Protéines du choc Thermiques, Régulation Génétique, Facteurs sigma et régulation transcriptionnel.

Structure de recherche :

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire.