

*Adaptation des bactéries
au Stress Thermique*

M1 Ecologie Microbienne

Présentée par Dr. R. ALATOU

1. Introduction

De nombreuses équipes de recherche dans le monde étudient des micro-organismes qualifiés d'**extrêmophiles** qui, pour certains, vivent en **présence de sel à forte concentration (halophiles)**, pour d'autres à des **températures froides ou chaudes (psychrophiles et thermophiles)**, dans des milieux **très acides ou basiques (acidophiles et alcaliphiles)** ou sous **pression (piézophiles)**

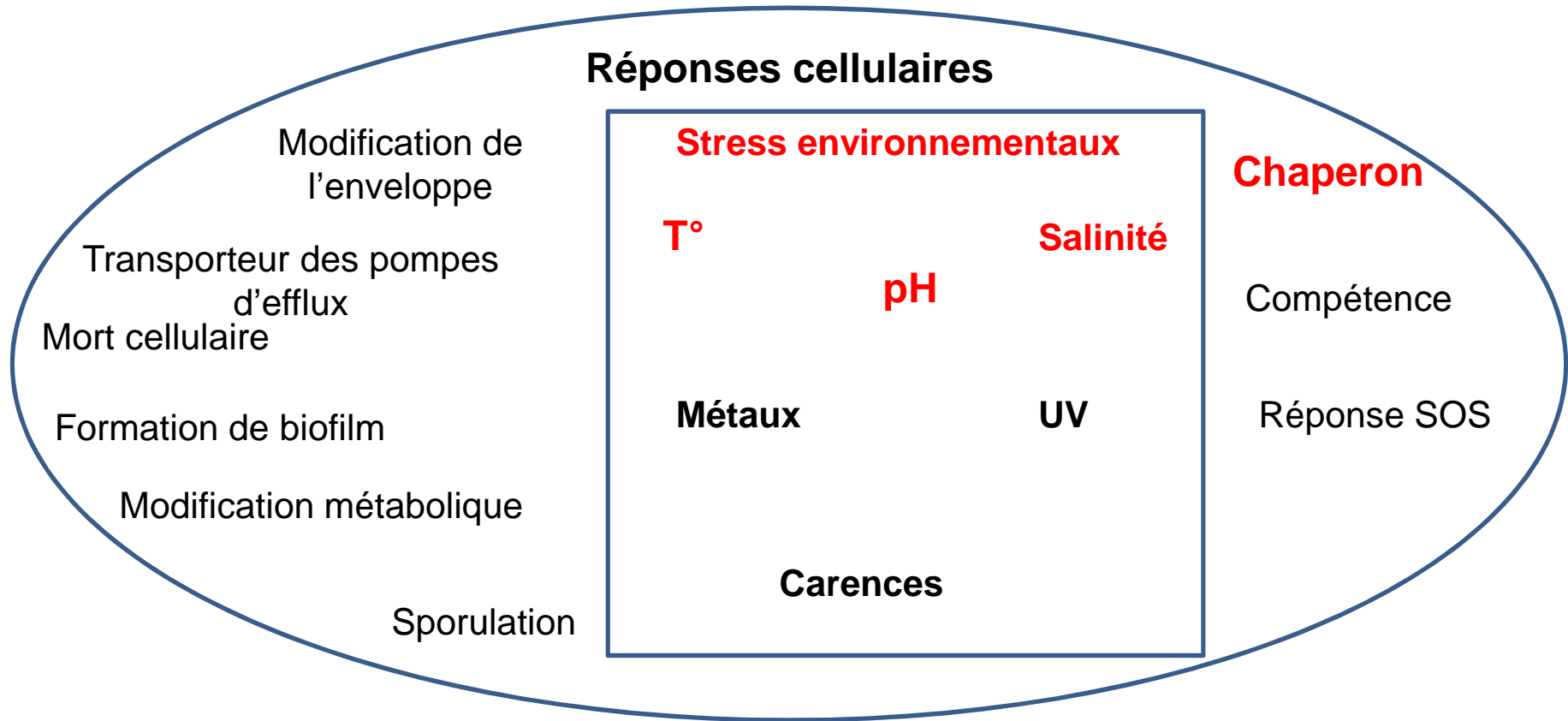


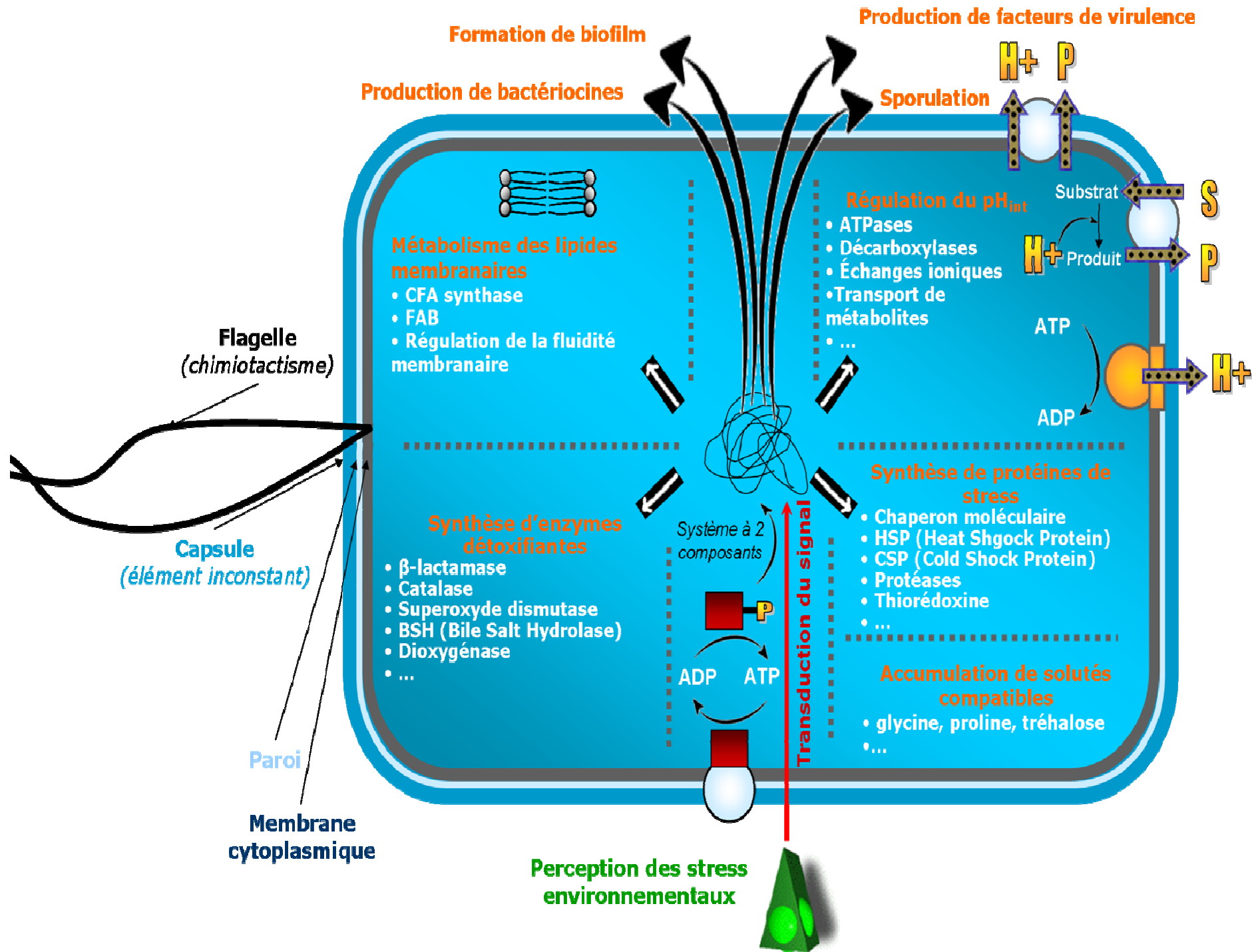
Conditions de vie non conventionnelles



La mise en place de **stratégies originales (protéines spécifiques)** pour **s'adapter** aux stress physicochimiques auxquels ils sont confrontés

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





2. Stress et généralités

A. Définition

Le stress correspond à toute **modification dans le génome / l'environnement** → **croissance réduite + faible capacité à survie**

➤ **Stress prolongé**: le milieu devient hostile, mais la bactérie peut croître. L'adaptation s'accompagne de modifications métaboliques profondes.

➤ **Stress de type choc**: Agression intense et rapide. Le taux de survie est en fonction de la physiologie, le genre voir même la souche. Réponse cellulaire très différentes.



De telles modifications conduisent la cellule à tenter de **restaurer un profil métabolique** qui serait favorable à **la survie**, ou à une **croissance plus rapide**



Modification métabolique = Les étapes de l'**expression des gènes (transcription, traduction, modification post-traductionnelle)**

La résistance d'un microorganisme face à un stress dépend de son **état physiologique + la composition du milieu où il se trouve**

La cellule stressée se développe lentement mais **acquière un niveau générale de protection au stress supérieur à celui d'une cellule en croissance normale**



Les bactéries répondent aux variations de leur environnement en **activant** ou en **réprimant certains gènes**



La détection du signal stress et la régulation des gènes protecteurs supposent l'existence de **systemes plus ou moins généraux de régulation**: Deux grandes familles de régulateurs existent : les systemes dits **à deux composants** et les **facteurs de transcription (facteurs sigma)**.

A.1. Les systèmes à deux composants

Le système de transduction de signal à deux composants est nommé ainsi car il est gouverné par **deux protéines**: la **première** est **un senseur** à fonction **Kinase**, ou **Kinase-Senseur**, qui traverse la membrane cytoplasmique, de sorte qu'une de ses parties est exposée à l'environnement extracellulaire, tandis qu'une autre est exposée au cytoplasme. De cette façon, il peut détecter des changements spécifiques dans l'environnement et communiquer l'information à l'intérieur de la cellule . Le second composant **est le régulateur réponse (RR)**, une protéine qui se **fixe à l'ADN** . Quand il **est activé par la kinase –senseur**, le régulateur-réponse **declenche la transcription des gènes ou opéron dont l'expression est nécessaire pour l'adaptation aux stimulus de l'environnement**

Principe

Donc présence d'une protéine **Histidine Kinase senseur (HK)**
et une protéine **régulatrice de réponse (RR)**

Les protéines senseurs intégrées dans la membrane **s'autophosphorylent** au niveau **de résidus histidine** lorsqu'elles perçoivent **un signal de type stress**.



Elles sont alors capables **d'activer** les protéines **régulatrices**



Le groupement phosphorylé est cédé au régulateur de réponse qui l'accepte sur **résidu aspartate**



Sous leur état **phosphoylé**, ces protéines **RR activent une réponse cellulaire appropriée**



Induction transcriptionnelle

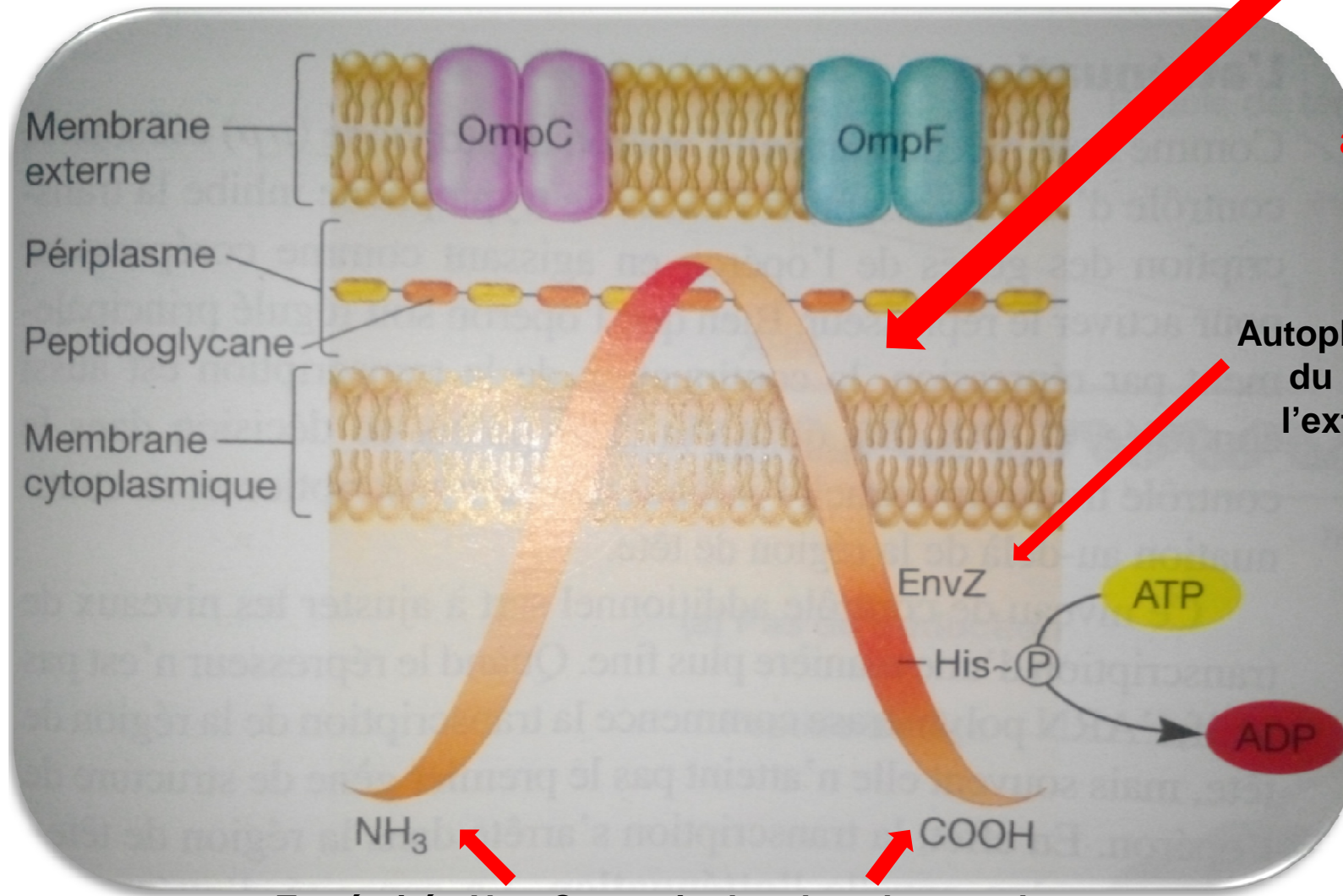
Exemple : Système de transduction de signal à deux composants chez *E. coli*

La kinase-senseur **EnvZ** forme une boucle à travers la membrane cytoplasmique

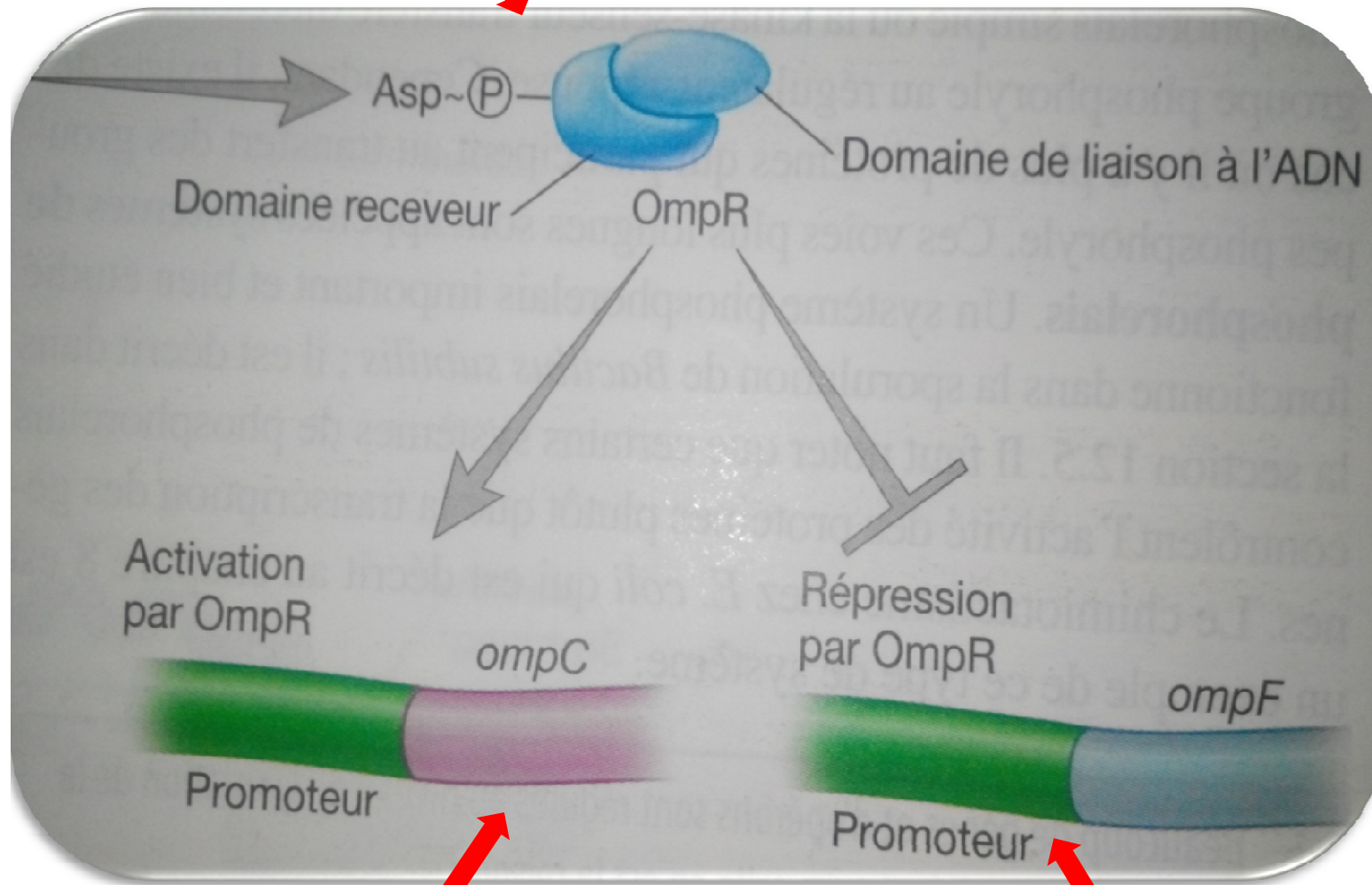
Détection d'une augmentation dans l'osmolarité

Autophosphorylation du résidu His à l'extrémité C-ter

Extrémités N-et C- terminales dans le cytoplasme



EnvZ cede le groupement phosphorylé au régulateur réponse (RR) **OmpR** qui l'accepte sur le résidu **Asp**



OmpR (Porines) :
protéine
Cytoplasmique
régule
l'expression des
gènes de
structure **ompF**
+ **ompC**

Osmolarité élevée
= **Expression**

Faible osmolarité
= **Expriession**

A.2. Les facteurs de transcription (facteurs sigma)

La régulation de la réponse générale au stress est également contrôlée par des facteurs de transcription (facteurs sigma) qui, en **se fixant à l'ARN polymérase, lui confèrent une spécificité de reconnaissance vis-à-vis de certains promoteurs**

Chaque facteur sigma reconnaît des promoteurs qui diffèrent en séquences, particulièrement dans la région -10 et -35. Les séquences reconnues par un facteur sigma sont nommées **Séquences Consensus**

Les nombreux facteurs sigma bactériens ont été regroupés dans **deux familles** d'après leurs similarités protéiques: la famille σ^{70} , facteur nommé ainsi d'après le facteur σ d'*E. coli* de 70 kDa) et la famille σ^{54} (nommée ainsi d'après le facteur σ d'*E. coli* de 54 kDa) . (La lettre ou le chiffre en exposant indique **la taille** ou **la fonction**)

σ^{70} : gènes de croissance exponentielle

σ^S : gènes de réponse générale au stress de la phase stationnaire

σ^F σ^{28} : gènes impliqués dans l'assemblage du flagelle

σ^E : gènes de la restauration de l'intégralité de la membrane et le repliement correcte des protéines membranaire

σ^{60} : gènes impliqués dans le métabolisme de l'azote

***L'adaptation bactérienne au
choc thermique***

II. Les protéines de choc thermique (*heat shock proteins*)

A. Définition


Exposées à **une température anormalement élevée**, la plupart des cellules activent l'expression d'une classe particulière de protéines appelées les protéines de choc thermique (*Heat Shock Proteins*, **Hsps**).



Ce phénomène physiologique est classiquement appelé: **réponse au choc thermique** (*heat shock response*).



Cette réponse est **universelle et représente le système génétique le plus hautement conservé dans des organismes aussi divers que les bactéries, les animaux et les plantes**

 Le choc thermique affecte l'hydratation des protéines+équilibre redox= agrégation des protéines+mauvais repliement = la perte momentanée ou définitive de l'activité enzymatique tandis **qu'il induit l'augmentation de l'expression des Hsp= repliement et maintient correcte des protéines endommagées.**

Les Hsp ainsi synthétisées permettent la « **renaturation** » des protéines et la **récupération de l'activité enzymatique**



De plus, quand des cellules sont soumises à un choc thermique, **subléta**l mais suffisant pour induire une **augmentation** de la synthèse des Hsp et leur **accumulation**, elles sont alors capables de **résister à un deuxième choc thermique de plus grande intensité** qui, lui, aurait dû être léta



Ce phénomène est dénommé « **thermotolérance** »



Suggère, une action **protectrice des Hsp envers un stress ultérieur**, la participation de ces protéines dans la protection étant appuyée par **la corrélation entre la cinétique de leur induction et celle de la thermotolérance**

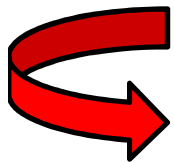
L'induction des Hsp par une courte exposition à des températures élevées peut conférer également **un effet de protection croisée vis-à-vis d'autres formes de stress: Acide, endotoxines...**



La synthèse des Hsp est induite non seulement par l'hyperthermie **mais aussi par une large variété de conditions toxiques** qui vont de l'exposition aux **métaux lourds** à l'infection virale, leur point commun étant de mener à **l'accumulation de protéines endommagées.**



Donc la présence de **protéines endommagées** **semble être par elle-même un signal important pour l'induction de l'expression des Hsp.**



Ceci désigne la réponse au choc thermique comme une stratégie précieuse pour la survie

B. Mécanisme générale

L'induction des gènes *hsps* requiert l'**activation et la translocation** d'un facteur de transcription, **HSF** pour « *Heat shock factor* »



celui-ci reconnaît alors des **séquences spécifiques présentes en copies multiples dans les promoteurs des gènes *hsps***



déclanchement de la transcription de ces gènes

Stresse thermique chez les bactéries lactiques (BL)

- Onze genres bactériens figurent dans la catégories des bactéries lactiques, cinq entre eux sont les plus connus: ***Bifidobacterium***, ***Streptococcus***, ***Lactococcus***, ***Leuconostoc***, ***Lactobacillus***.
- Les bacteries lactiques sont utilisées en industrie alimentaire (la production du yaourt, du lait, en fromagerie.....), certaines sont des bactéries commensales de l'homme (flore intestinale) .



Les protéines de choc thermique chez *Lactococcus lactis*: synthèse et régulation; thermotolérance

Travaux: P. Boutibonnes

*Laboratoire de microbiologie de l'environnement,
IRBA, Université de Caen, 14032 Caen cedex, France*

Introduction

On retrouve chez *Lactococcus lactis* les deux composantes habituelles de la réponse au choc thermique: **la synthèse d'un petit nombre de protéines spécifiques** les Hsps et **l'élévation phénotypique de la résistance naturelle à la chaleur dite thermotolérance.**

Le passage brutal de 30 à 40°C s'accompagne de l'amplification de la synthèse de **13 à 16 protéines**, 7 d'entre elles sont des **protéines homologues** des Hsps *d'E. coli* (**ClpB, DnaJ, Dnak, GroEL, GrpE, Lon**) et de *Bacillus subtilis* (**613**).

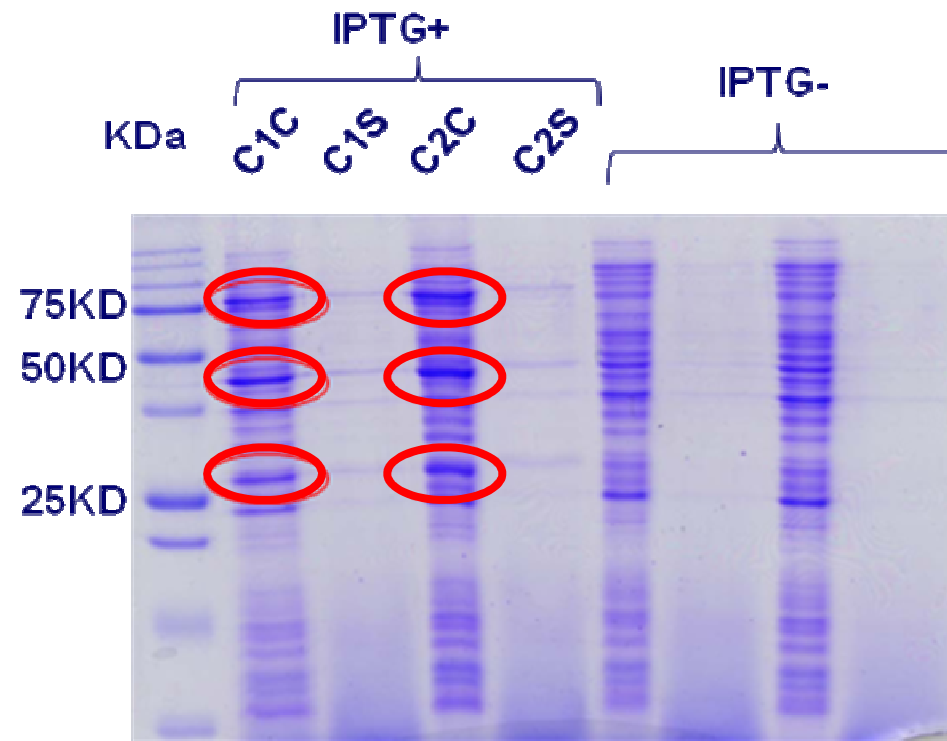
LES PROTÉINES DU CHOC THERMIQUE

Expérimentalement

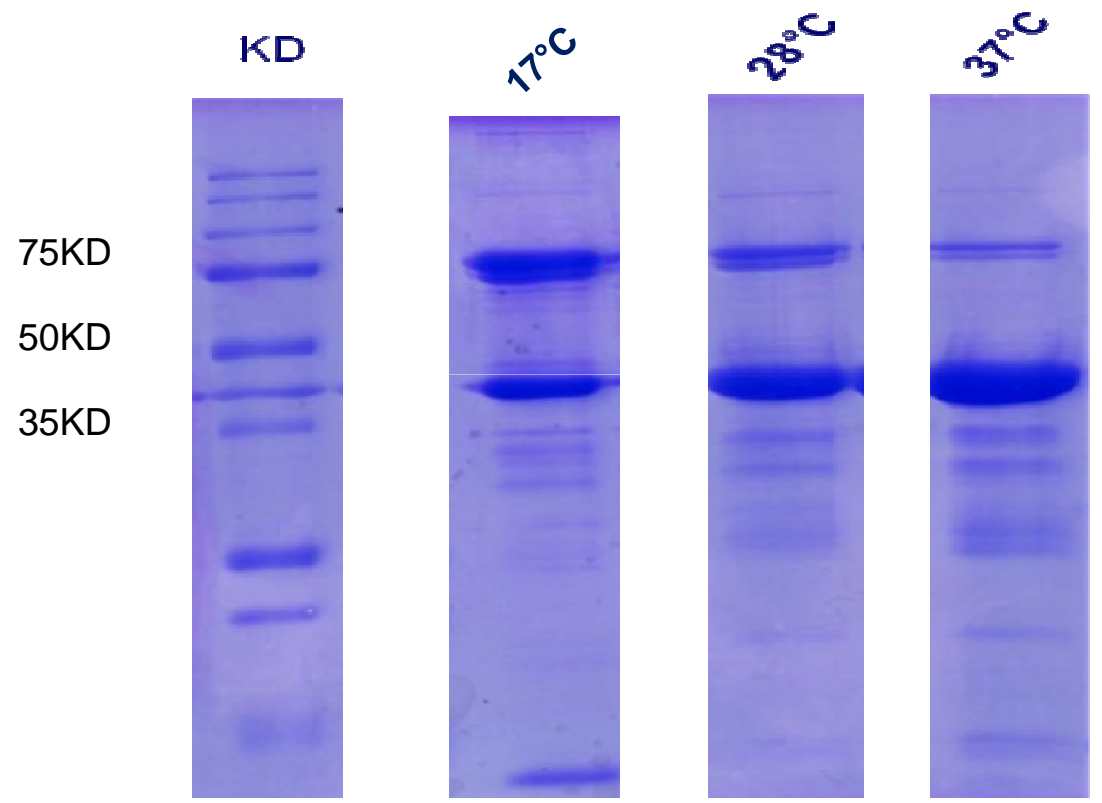
Lorsqu'une culture de *L. lactis*, incubée à 30 ou 35°C est soudainement exposée à une température plus élevée (40 à 42°C), le profil protéique des cellules qui la compose, analysé par **électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)**, révèle **la disparition d'un grand nombre de protéines, et l'amplification de la synthèse de 13 à 16 polypeptides** (Whitaker et Batt, 1991) et (Boutibonnes *et al*, 1991 ; Auffray *et al*, 1992)

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

Electrophorèse sur gel SDS-PAGE



↪ Présence de trois bandes 75KD, 45KD, 30KD



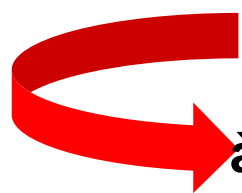
Bien qu'elles ne représentent que le tiers des hsps, identifiées elles appartiennent toutes au **grands groupes de protéines** (Georgopoulos *et al*, 1990 ; Morimoto *et al*, 1994).



✓ Ce sont des **protéases endocellulaires**(ClpB et Lon)

✓ Des composantes de la machinerie de **chaperon** (Onak ,GroEL, GroES, DnaK) : chargées d'assurer le **repliement** régulier des oligopeptides, elles participent à **la restauration des protéines fonctionnelles endommagées** par la chaleur (Craig *et al*, 1993)

✓ Des **protéines d'assistance des chaperons moléculaires** (*partner proteins*) (GrpE et OnaJ).



**Chaperon moléculaires et protéases endocellulaires
appartiennent**

**à des systèmes convergents dont l'activité est strictement
coordonnée**

Régulation

Classiquement, la réponse à une stimulation thermique s'accompagne dans les minutes qui suivent **par le remplacement du facteur sigma majeur (σ^{70}), par le facteur sigma alternatif σ^{32} (genes de protections, chaperons qui restaurent le repliement des proteines cytoplasmiques)** qui reconnaît son propre promoteur, assurant ainsi son autorégulation (Bukau, 1993 ; Yura *et al*, 1993); (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^E (gènes de restauration de l'intégralité de la membrane et du repliement correcte des protéines membranaire)

Le facteur 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)

Le facteur σ^{32} conduit la transcription d'une **vingtaine de gènes** qu'il reconnaît grâce à leur motif hs (*heat-shock*) et qui composent un régulon conventionnel

La majeure partie des protéines dont les gènes sont inclus dans le régulon dépendant du σ^{32} présentent une affinité pour d'autres protéines cellulaires cibles de la chaleur, qu'elles **assistent, désagrègent, restaurent** .

Ces protéines participent vraisemblablement à la protection des cellules ou à leur sauvetage lorsqu'elles sont menacées par leur environnement thermique.

L'inflexion (changement) de la réponse et le retour à état de repos **est sous la dépendance de 4 hsps, DnaK, GroEL, GrpE, HfIB ou FtsH** (Herman *et al*, 1995).

Chez *B. subtilis*, les promoteurs hs sont absents

L'expression de la réponse au choc thermique est une séquence inversée répétée de 9 pb appelée **CIRCE (controlling IR of chaperone expression: controle de l'expression des protéines chaperons par des IR)** (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, **le quel provoquerait le détachement du repereur de sur 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).= **DOUBLE FOCTION**


La présence des IR ont été, par ailleurs, reconnue chez une dizaine de bactéries Gram positives et apparentées ou appartenant à des groupes très variés comme *Clostridium* sp et *Mycobacterium tuberculosis*, chez lesquelles elles **représentent le motif le plus fortement conservé**

LA THERMOTOLERANCE

De 30 à 43°C, le taux de croissance d'une culture de *L. lactis* varie peu. 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** pour n'être que de **8 % et 0,06 %** après 15 minutes.

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 (péraprées), 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** cultivée à 30°C (Boutibonnes *et al*, 1991) = **ADAPTATION**

Les cellules conditionnées (Adaptées) par la chaleur, qui anticipent ou se préparent à une *épreuve thermique* létale, peuvent croître et présentent une **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

Ainsi un prétraitement à 42°C élève considérablement la résistance des bactéries à l'alcool et au pH acide (**d'alcoolotolérance** ou de **pH - tolérance**).



Bien que la présence des Hsp soit nécessaire, leur responsabilité dans la thermotolérance est sans cesse remise en question par des résultats expérimentaux contradictoires. Il y a vraisemblablement trois explications à cette incertitude:

1- Les hsps naturellement présentes, quelquefois même abondantes, ne nécessiteraient qu'une «activation» par les traitements de conditionnement pour devenir fonctionnelles et intervenir dans les processus de sauvetage thermique.

2- Les hsps «classiques» ne seraient peut-être pas les seuls agents prévenant ou restaurant les dégâts protéiques, impliqués dans les tolérances (Parsell et Lindquist, 1994). D'autres facteurs de protection pourraient être associés à l'induction de systèmes multigéniques discrets.

3- Certaines hsps qui sont aussi des protéases, exercent leur activité sur d'autres hsps les faisant «disparaître» après qu'elles ont assuré leur office de restauration: leur trace même ne serait pas repérable par analyse électrophorétique.

CONCLUSION

*La réponse au choc thermique, qui semble constituer **une réserve de mémoire** déposée dans le génome sous forme de traces mnésiques, de projets prêts à être réactualisés en certaines occasions, est maintenant reconnue chez d'autres bactéries lactiques : *Enterococcus faecalis*, dont l'un des traits singuliers est une résistance peu ordinaire à de nombreuses conditions «extrêmes» (Boutibonnes et al, 1993) ; *Streptococcus thermophilus* dont la synthèse d'hsps, stimulée à haute température (52°C), est accompagnée d'une viabilité importante à 58°C (Auffray et al, 1995).*

*Le phénomène s'impose comme le modèle d'étude de la régulation de l'expression de systèmes multigéniques conduisant à une authentique différenciation métabolique : **la cellule stressée n'est plus tout à fait la même que la cellule «naïve».***

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 déstabilisation des structures secondaires des ARN et de l'ADN dont résulte une chute de l'efficacité de la traduction, de transcription et de réplication de l'ADN