

UNIVERSITE FRERES MENTOURI CONSTANTINE1
FACULTE DES SCENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

ADAPTATION AU STRESS ACIDE

Master 1 Ecologie Microbienne

Dr R. ALATOU

1. RÉPONSE DES PROCARYOTES Á L'ACIDE

1.1. Adaptation et acido-tolérance

De nombreuses bactéries rencontrent un environnement acide. L'acidité peut nuire à la cellule en diminuant le pH interne, un paramètre déterminant pour le métabolisme cellulaire, qui affecte la croissance de la cellule. Lors du passage dans le tractus gastro-intestinal, les bactéries pathogènes dentaires et gastriques ainsi que les bactéries probiotiques doivent faire face aux fluides gastriques très acides de l'estomac (Van de Guchte *et al.*, 2002). Un pH de 1,5 est atteint à jeun et augmente entre 3 et 5 au cours de l'alimentation (Cotter et Hill, 2003).

De très nombreuses études ont été effectuées sur la résistance des bactéries à l'acide. Il a été montré que la résistance à l'acidité chez les procaryotes dépend de différents paramètres **comme la phase de croissance, le milieu de culture, le pH de culture ou encore l'état planctonique, sporulé ou adhérent des cellules**. La survie au stress acide a été étudiée en détail sur des bactéries prélevées à différents stades de la croissance. Chez *E. coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis* et *Listeria monocytogenes*, les cellules prélevées en phase stationnaire sont plus résistantes au stress (Cotter et Hill, 2003 ; Davis *et al.*, 1996 ; Alemayehu *et al.*, 2000 ; Lorca et Valdez, 2001). L'entrée en phase stationnaire peut induire des mécanismes qui permettent la résistance au stress acide. Cette résistance est appelée "Acid Tolerance Response" (ATR) naturelle, et son induction varie selon les organismes.

➤ Acido-tolérance

Une exposition préalable à un pH acide ou une culture à bas pH peut influencer sur la résistance au stress acide. En effet, il a été montré chez *L. monocytogenes* que des cellules cultivées à pH 7,0 et pré-adaptées à un pH acide 5,5 sont plus résistantes à une exposition à pH 3,5 que des cellules non pré-adaptées (O'Driscoll *et al.*, 1996). Chez *Streptococcus mutans* et *Enterococcus hirae*, des cellules en culture continue à un pH acide de 5 résistent mieux à un stress acide à pH 2,5 que des cellules cultivées à pH 7 (Belli et Marquis, 1991 ; O'Driscoll *et al.*, 1996). Ce phénomène d'adaptation de la cellule pré-exposée ou cultivée à un pH acide non létal puis soumise à un choc acide, est appelé ATR dépendante du pH. En plus d'une meilleure résistance à l'acidité, la pré-exposition à un pH acide non létal confère aussi aux cellules une capacité à survivre à d'autres types de stress (protection croisée). En effet, des cultures de *Listeria monocytogenes* et de *Lactobacillus delbrueckii* dans lesquelles l'ATR a été induite ont montré une meilleure résistance à un stress thermique ou à l'éthanol par rapport à des cultures non adaptées (O'Driscoll *et al.*, 1996, Casadei *et*

al., 2001). Chez *Salmonella typhimurium*, l'ATR peut également protéger les cellules contre l'exposition à la chaleur et aux sels NaCl et KCl (Greenacre et Brocklehurst, 2006). L'acidotolérance peut entre autres être affectée par différents facteurs. Ainsi, l'ATR de cellules de *L. monocytogenes* est dépendante de la température de pré-adaptation à pH 5,5 (Koutsoumanis *et al.*, 2003). Dans cette étude, la résistance au choc acide à pH 3,5 est 2 fois plus importante pour les cellules pré-incubées à pH 5,5 et 30°C que les cellules pré-incubées à pH 5,5 et 4°C. De même, l'ajout de 10,5 % de NaCl dans le milieu de pré-adaptation des cellules à pH 5,5 augmente la résistance des cellules soumises à pH 3,5 par rapport aux cellules pré-adaptées en absence de NaCl.

L'état des cellules planctoniques ou adhérentes influence aussi la résistance face à un stress acide. Par exemple, des cellules de *L. monocytogenes* adhérentes à l'inoculum survivent mieux à l'acide acétique ajouté dans le milieu que les cellules planctoniques (Oh et Marshall, 1996). De plus, les cellules survivent d'autant mieux que la culture vieillit. Chez *Streptococcus mutans*, il a été montré que la formation de biofilms semblait protéger les cellules vivantes qui se trouvent dans les couches profondes du biofilm de l'acidité exogène, car l'accès des protons à ces cellules serait limité par l'amas de cellules qui les recouvre (Svensater *et al.*, 2001). Chez cette bactérie, il a aussi été mis en évidence que la densité cellulaire peut affecter la résistance des cellules à l'acidité. En effet, des cellules planctoniques à forte densité résistent significativement mieux à un stress acide que des cellules à faible concentration (Li *et al.*, 2001). Ceci suggère que les systèmes de communication de cellule à cellule, regroupés sous l'appellation générique "Quorum sensing", pourraient être impliqués (Wen et Burne, 2004).

1.2. Mécanismes de résistance

L'acidité provoque de nombreux dommages à la cellule tant au niveau physiologique que moléculaire (dénaturation de protéines, de l'ADN). Un stress acide altère la membrane, cette dernière devenant plus perméable aux protons. L'entrée de protons dans la cellule diminue alors le pH interne (pHi). Cette diminution du pHi affectera le métabolisme en inactivant ou en dénaturant des protéines, et l'ADN par perte de purines et de pyrimidines (Cotter et Hill, 2003). Les microorganismes emploient divers mécanismes et stratégies pour se protéger de l'hostilité qu'impose un environnement à bas pH : **modification de l'architecture et de la composition de la membrane, changement de métabolisme et production de molécules alcalines, homéostasie du pH interne et production de protéines chaperonnes** par exemple

1.2.1. Modification de la membrane

La membrane cellulaire des bactéries est la première structure cellulaire en contact avec l'extérieur. Elle est donc la première à être affectée par les conditions environnementales néfastes pouvant impliquer l'acidité du milieu. La fluidité de la membrane est importante pour les cellules car elle peut affecter les fonctions membranaires comme les réactions biochimiques, les systèmes de transport et la sécrétion de protéines. Les bactéries ont développé des stratégies d'adaptation leur permettant de prévenir ces problèmes. Elles modifient la composition de leur membrane afin de diminuer sa fluidité et sa perméabilité aux protons. Ces modifications se font principalement au niveau des acides gras. Généralement, la quantité en acides gras saturés augmente et la longueur des chaînes diminue, ce qui réduit la fluidité membranaire comme c'est le cas chez *E. coli* ou *Salmonella typhimurium* (Yuk et Marshall, 2004 ; Kwon *et al.*, 2000). Cependant, chez certaines bactéries orales telles que *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii*, *Lactobacillus casei* et *Streptococcus macedonicus*, la membrane des cellules adaptées est enrichie en acides gras mono-insaturés et la longueur de leur chaîne est augmentée par rapport à celles des cellules non adaptées (Papadimitriou *et al.*, 2007 ; Fozo *et al.*, 2004 ; Fozo et Quivey, 2004), suggérant une fluidification de la membrane. Actuellement, la manière dont cette stratégie d'adaptation de la membrane aux bas pH permet aux cellules de mieux résister au stress acide n'est pas bien connue (Fozo et Quivey, 2004).

Toujours chez *E. coli*, le contenu de la membrane en acides gras à cyclopropane (CFA, "cyclopropane fatty acid") joue également un rôle important dans la diminution de la perméabilité aux protons au cours d'un stress acide. La formation de CFA est une modification post-synthétique des membranes lipidiques qui a lieu au cours de la transition de la phase exponentielle à la phase stationnaire (Merrell et Camilli, 2002). Les CFA sont formés par la CFA synthase, codée par le gène *cfa* lui-même régulé par le facteur sigma RpoS. Différentes études montrent qu'en absence du gène *cfa*, les cellules sont plus sensibles à pH 3 (Booth *et al.*, 2002). La conversion d'acides gras insaturés CFA diminue la perméabilité aux protons et contribue ainsi à augmenter la résistance à l'acide (Richard et Foster, 2003). Ce mécanisme intervient dans les trois systèmes de résistance à l'acide mis en place en phase stationnaire qui sont décrits plus loin (AR1, AR2 et AR3).

1.2.2. Production de composés alcalins

Certaines bactéries produisent des molécules acides en conditions de croissance alcaline ou des molécules alcalines en conditions de croissance acide. Dans cette dernière situation, de nombreuses

bactéries produisent des molécules alcalines et plus spécifiquement de l'ammoniaque. L'ammoniaque est générée par 2 voies, la voie de l'uréase et la voie de l'arginine déiminase (Cotter et Hill, 2003 ; Van de Guchte *et al.*, 2002). Ces deux systèmes protègent les cellules contre l'acidité de l'environnement par l'augmentation du pH externe (pHe) grâce à la production d'ammoniaque.

La voie de l'uréase résulte de l'hydrolyse de l'urée en deux molécules d'ammoniaque et une molécule de dioxyde de carbone. Elle participe ainsi au maintien de la force protomotrice à travers la membrane interne de la bactérie. Chez *S. salivarius*, la production d'uréase augmente au cours de la croissance alors que le pH de la culture diminue (Cotter et Hill, 2003). Cette enzyme a une activité maximale pour un pH de l'ordre de 5,8. Par contre, elle diminue lorsque le pH augmente, mais aussi lorsque le pH est extrêmement acide et est inactivée à pH 4,3. Son expression réprimée à pH 7,0 est induite à pH 5,5. Chez cette bactérie, l'uréase est codée par l'opéron *ureIABCEFGD* (Chen *et al.*, 1998)

L'arginine déiminase est un autre système connu pour intervenir dans la résistance au stress acide. Il a également été identifié chez une grande variété de bactéries, comme les bactéries lactiques, les mycoplasmes, les halobactéries, *Pseudomonas* sp., ou encore *Bacillus* spp. (Van de Guchte *et al.*, 2002 ; Cotter et Hill, 2003). Ce système d'arginine déiminase est composé de trois enzymes et d'un transporteur : l'arginine déiminase (ADI), l'ornithine carbamyl transférase, la carbamate kinase et un antiport arginine/ornithine codés respectivement par les gènes *arcA*, *arcB*, *arcC* et *arcD* (Cotter et Hill, 2003 ; Budin-Verneuil *et al.*, 2006).

1.2.3. Homéostasie du pH interne

Le pH interne (pHi) est un facteur important de la physiologie bactérienne pour lequel la cellule exerce une régulation pointue. Il n'existe pas une valeur de pHi physiologique commune à tous les micro-organismes. Ainsi, les organismes acidophiles ont un pHi compris entre 6,5 et 7,0, les neutrophiles ont un pHi compris entre 7,5 et 8,0 et les alcalophiles ont un pHi compris entre 8,4 et 9,0 (Booth, 1985). Les organismes fermentaires ont une gamme de pHi plus importante que celle des organismes non fermentaires, pour laquelle la croissance peut s'effectuer. La régulation du pHi implique un contrôle accru de la perméabilité membranaire envers les protons, qui peut s'effectuer via les transporteurs d'ions qui facilitent l'entrée des protons. De manière générale, des études de croissance ont permis de montrer que le pHi diminuait avec le pH de culture. Par exemple, *Streptococcus bovis* est capable de croître dans des milieux où le pH externe (pHe) est compris entre 6,7 et 4,5, son pHi diminuant respectivement de 7,8 à 5,6 (Russell, 1991). Avec un pH externe

de 2,5, le pH interne d' *E. coli* diminue de 7,5 à 4,5 (Foster, 2004). Ces études montrent que certaines bactéries sont capables de croître avec un pH cytoplasmique relativement bas. Lorsque le pHe diminue de 7,0 à 5,0, le pHi de *Listeria innocua* ne varie que de 8,0 à 7,1 (Siegumfeldt *et al.*, 2000), ce qui montre que la régulation du pHi diffère entre les bactéries.

1.2.3.1. Perturbation du pHi

Le pHi est perturbé par deux principaux facteurs, le mouvement passif des protons à travers la membrane cytoplasmique et la production d'acides et de bases dans le cytoplasme. Ainsi chez les bactéries fermentaires, l'accumulation des produits de fermentation dans le cytoplasme peut engendrer une diminution du pHi malgré une expulsion continue des protons (Russell, 1992 ; Russell et Diez-Gonzalez, 1998).

Les acides organiques présents dans le milieu de culture peuvent aussi être néfastes pour l'homéostasie du pHi surtout lorsque celui-ci est supérieur au pHe. Les bactéries qui laissent leur pHi diminuer, permettant de conserver un faible ΔpH ($\text{pHi} - \text{pHe}$), seraient plus résistantes aux acides que les bactéries qui maintiennent leur pHi neutre. C'est le cas pour *Lactobacillus delbrueckii*, *L. lactis* et *Streptococcus thermophilus* qui lorsqu'elles sont soumises à une baisse de pHe, leur pHi diminue tout en restant légèrement supérieur au pHe (Siegumfeldt *et al.*, 2000). Les acides organiques non dissociés passent librement à travers la membrane dont la bicouche lipidique est perméable ce qui limite leur accumulation dans la cellule. Chez les bactéries qui conservent un pHi plus élevé, les acides organiques, une fois dans le cytoplasme plus alcalin, se dissocient et vont s'accumuler dans la cellule, stoppant la croissance de la bactérie (Mercade *et al.*, 2000). Leur dissociation dépend de leur pKa, généralement inférieur à 5.0. L'accumulation de ces acides organiques sous forme anionique, dépend du gradient de pH à travers la membrane (ΔpH , Russell, 1991).

1.2.3.2. Régulation du pHi

Afin de maintenir le pH interne à une valeur conservant l'intégrité physiologique de la cellule, outre la capacité tampon du cytoplasme, les bactéries possèdent de nombreuses stratégies permettant de contrôler le flux de protons comme le transport actif de protons à travers la membrane (F1F0-ATPase) et les systèmes de décarboxylation (glutamate décarboxylase, par exemple). Les pompes à

proton permettent l'extrusion de protons du cytoplasme vers le milieu extérieur, générant ainsi un gradient de protons électrochimique trans-membranaire, appelée force protomotrice (fpm) indispensable à la production d'énergie. Les systèmes de décarboxylation sont constitués d'une ou plusieurs enzymes décarboxylase, qui convertissent leur substrat en un dérivé aminé et en CO₂ (ou en bicarbonate) et d'un antiport qui échange l'acide aminé contre le dérivé aminé qui est son produit de décarboxylation. La décarboxylation de la lysine, l'arginine et du glutamate prédominent dans l'acido-tolérance (Booth *et al.*, 2002).

Chez *E. coli*, il a été montré qu'au cours de la phase stationnaire, au moins trois systèmes distincts de résistance à l'acide sont déclenchés sous différentes conditions (Richard et Foster, 2003). Le premier système (AR1, "Acid resistance") est induit par l'acide et réprimé par le glucose. Les composants de ce système ainsi que ses mécanismes sont à ce jour inconnus. Les deux autres systèmes sont des systèmes de décarboxylation et font intervenir deux acides aminés (glutamate, AR2 et arginine, AR3).

Le système de résistance à l'acide AR1 est un système oxydatif qui se met en place au cours de la phase stationnaire de croissance. Ce système est induit par l'acide et est réprimé par le glucose. Il requiert le facteur sigma alternatif RpoS pour être exprimé. Sur un milieu dépourvu de glucose, ce système permet aux cellules cultivées à pH 5,5 de survivre à un pH de 2,5. Les facteurs clés intervenant dans la régulation de ce système comprennent le facteur sigma σ (RpoS), l'AMP cyclique (AMPC) et les protéines réceptrices de l'AMPC (CRP). Une mutation dans un gène correspondant bloque l'action du système AR1. Cependant, les mécanismes précis de cette protection AR1 ne sont pas encore parfaitement connus (Castanie- Cornet *et al.*, 1999 ; Richard et Foster, 2003).

1.2.4. Protection et réparation des protéines et de l'ADN

En situation de stress, les protéines peuvent subir des modifications, des changements de conformation allant jusqu'à la dénaturation, qui vont significativement affecter leur activité. Les protéines dénaturées sont prises en charge par des protéines chaperonnes dont les plus connues sont DnaK, DnaJ et GroES/L. Elles interviennent dans le repliement, l'adressage et la renaturation des protéines. Elles reconnaissent des régions exposées des protéines dépliées et de certaines protéines natives. Ces chaperonnes interviennent dans de nombreux stress. Deux mécanismes sont connus pour empêcher les interactions incorrectes et permettre un repliement correct (Jobin, 1999). Le

premier mécanisme, faisant intervenir les protéines chaperonnes de classe I, permet de protéger les surfaces hydrophobes des protéines exposées aux solvants hydrophiles afin de prévenir l'agrégation. Ces protéines chaperonnes de classe I comprennent DnaK, DnaJ, GrpE. DnaK (70 kDa). DnaJ se lie à la protéine dénaturée et exerce son activité de protéine chaperonne spécifique.

Le second mécanisme, faisant intervenir les protéines chaperonnes de classe II, permet d'éviter l'agrégation des protéines et de favoriser leur repliement dans leur conformation native. Ces protéines chaperonnes de classe II comprennent GroEL (60 kDa) et GroES (10 kDa). En cas de choc acide, chez *L. lactis*, les chaperonnes DnaK et GroES/L connues pour intervenir dans la réponse au stress thermique sont induites à pH 4,5, et non à pH 5,5. Ces protéines répondent donc à un certain niveau d'acidité dans le milieu ou à une certaine concentration de protéines dénaturées dans le cytoplasme (Frees *et al.*, 2003). De même, chez *S. mutans*, l'expression du gène *dnaK* et la quantité de protéine DnaK sont plus élevées dans les cellules adaptées à l'acide que dans les cellules non adaptées, et augmentent en réponse à un choc acide (Jayaraman *et al.*, 1997), ce qui suggère que la régulation de *dnaK* par le pH est transcriptionnelle chez cette bactérie.

Chez *Salmonella typhimurium* DT104, une augmentation des protéines chaperonnes DnaK et GroEL est observée chez les cellules adaptées à l'acide (Berk *et al.*, 2005). D'autres protéines de stress de classe III, ClpE et ClpP, sont aussi induites à bas pH, chez *L. lactis* par exemple (Frees *et al.*, 2003). Les protéines Clp sont des protéases ATPase-dépendant impliquées dans le turn-over des protéines dénaturées.

1.2.5. Systèmes d'acido-tolérance en phase exponentielle

Des systèmes de tolérance à l'acide en phase exponentielle ont été décrits chez de nombreux organismes. Plusieurs observations distinguent les systèmes d'acido-tolérance induits au cours de la phase exponentielle de ceux induits dans la phase stationnaire. Tout d'abord, les systèmes de la phase exponentielle ne peuvent pas protéger les cellules d'un pH inférieur à 3. De plus, il ne nécessite pas la présence d'acides aminés comme pour les systèmes AR2 et AR3. Les niveaux de résistance de la phase logarithmique sont significativement beaucoup moins efficaces que ceux de la phase stationnaire (Richard et Foster, 2003).

Parmi les systèmes observés en phase exponentielle, on trouve, par exemple, le phénomène d'adaptation appelé ATR ("Acid Tolerance Response") dépendante du pH qui permet aux cellules pré-adaptées à l'acide d'avoir une meilleure résistance. Ce type d'adaptation a été observé chez *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella spp.* ou encore *E. coli* où un pH acide

non létal de 5,5 ou une culture à bas pH induit une résistance à l'acide à des pH plus bas (pH 3, Richard et Foster, 2003). Chez *E. coli*, la production de CFA dans la membrane cellulaire joue également un rôle dans l'acidotolérance, au cours de cette phase de croissance (Richard et Foster, 2003).

La production de facteurs extracellulaires, encore non identifiés, a aussi été suggérée par Rowbury comme étant impliquée dans la résistance à l'acide de cellules d'*E. coli* préadaptées au cours de la phase logarithmique (Rowbury, 2001). Dans le modèle de Rowbury, les composants extracellulaires ("extracellular components", ECs) impliqués dans l'induction de réponse au stress fonctionnent par paire (ESC / EIC). Les composants extracellulaires ESC ("extracellular sensing components") sont impliqués dans la réception et dans la réponse aux agents de stress extracellulaire. Un régulateur constitutif interagit avec les opérons ESC générant ainsi une synthèse des composants ESC qui sont excrétés dans le milieu. En réponse à des modifications du pH du milieu, les récepteurs ESC détectent ce stress extracellulaire et interagissent avec lui. Une fois activés par ce stress, ils sont convertis en EIC ("extracellular induction components"), et ce, même en absence de bactéries. Les EIC sont de petites molécules qui, de ce fait, peuvent diffuser dans l'environnement bactérien permettant une communication intercellulaire et induire la synthèse de protéines intracellulaires qui entraînent une réponse dans l'ensemble de la population de cet organisme. Les EIC interagissent avec les cellules en présence ou en absence de stress et propagent l'induction de la réponse adaptative au stress acide au sein de la population. Ainsi, des filtrats neutralisés de cellules cultivées à pH 5 induisent une acido-tolérance chez des cellules non-stressées cultivées à pH 7 (Rowbury, 2001).

Les ESC sont donc à la fois des récepteurs de stress et des précurseurs des EIC formés à faible densité cellulaire. Ces récepteurs extracellulaires ont une fonction d'alerte avancée du stress et entraînent une réponse rapide, les molécules-signal agissant à l'extérieur des cellules. Contrairement aux EIC qui peuvent induire une tolérance dans toutes les cellules à proximité, les ESC n'induisent pas une tolérance au stress chez des cellules non-stressées sans être activées.