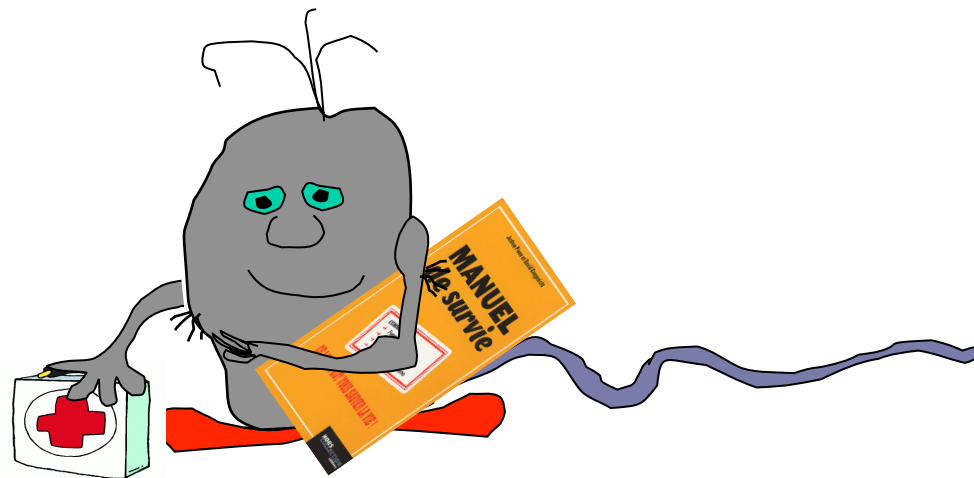


Survie des microorganismes dans l'environnement

Frédéric JORAND frederic.jorand@univ-lorraine.fr
Géosciences - M2-GPRE-SEE



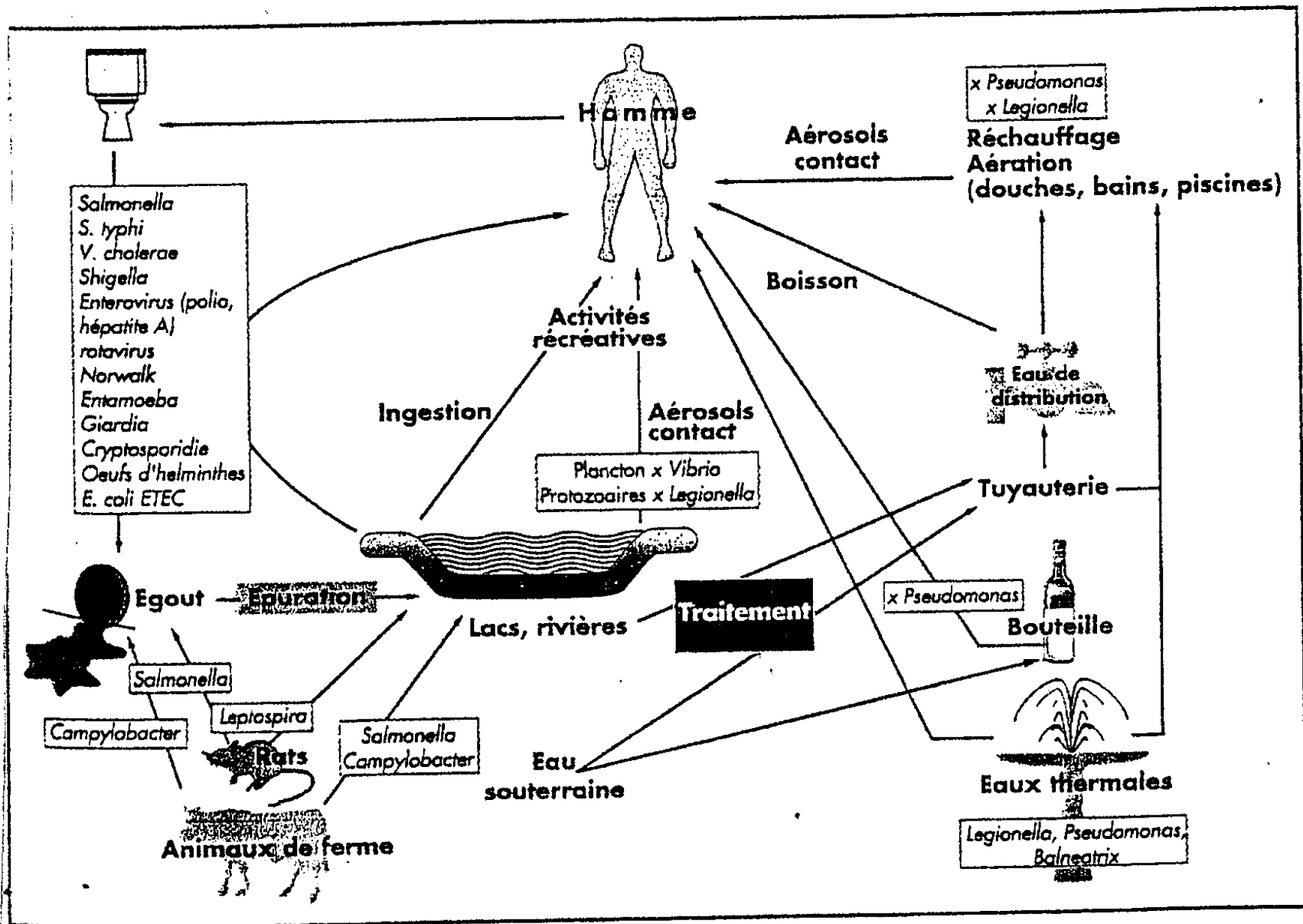
La survie, définitions

- « *Entretien du caractère viable (ou vivant) dans des conditions défavorables à la croissance* ».

Roszak and Colwell (1987, *Microbiol. Rev.*, 51:365).

- *définition **conceptuelle** de la viabilité : maintenir la capacité à se multiplier dans un temps acceptable (Barer and Harwood, 1999, *Adv. Microbiol. Physiol.*, **41**:93).*
- ***expérimentalement** la viabilité reste difficile à définir...*
- *des conditions défavorables : le sont-elles vraiment, ou correspondent-elles simplement à ce que les bactéries ont « l'habitude » de subir ? Un milieu de culture de laboratoire représente une situation artificielle probablement « paradisiaque » pour certaines bactéries, pour d'autres il peut représenter un stress nutritif car trop éloigné de leurs conditions de croissance.*

- D'une manière générale, les microorganismes tolèrent jusqu'à un certain point des contraintes nutritionnelles ou d'autres stress auxquels ils sont susceptibles d'être exposés (e.g. : alternance des saisons, ΔT_p , UV, ...).
- La survie des microorganismes soumis à ces stress est-elle le reflet des limites d'activité métabolique des cellules dans un état donné ou découle-t-elle de modifications physiologiques et métaboliques profondes ? La survie est-elle « programmée ? Existe-t-il un contrôle génétique de la survie ?
- Cas les plus étudiés : bactéries pathogènes et bactéries commensales.
 - Lors du transfert d'un pathogène d'un hôte à l'autre, le passage dans l'environnement (air, eau) est une étape obligatoire.
 - exemple : cycle de contamination *via* le milieu hydrique.
 - A quels types de stress, de pression les bactéries pathogènes et commensales sont-elles confrontées lors de leur passage dans l'environnement ?



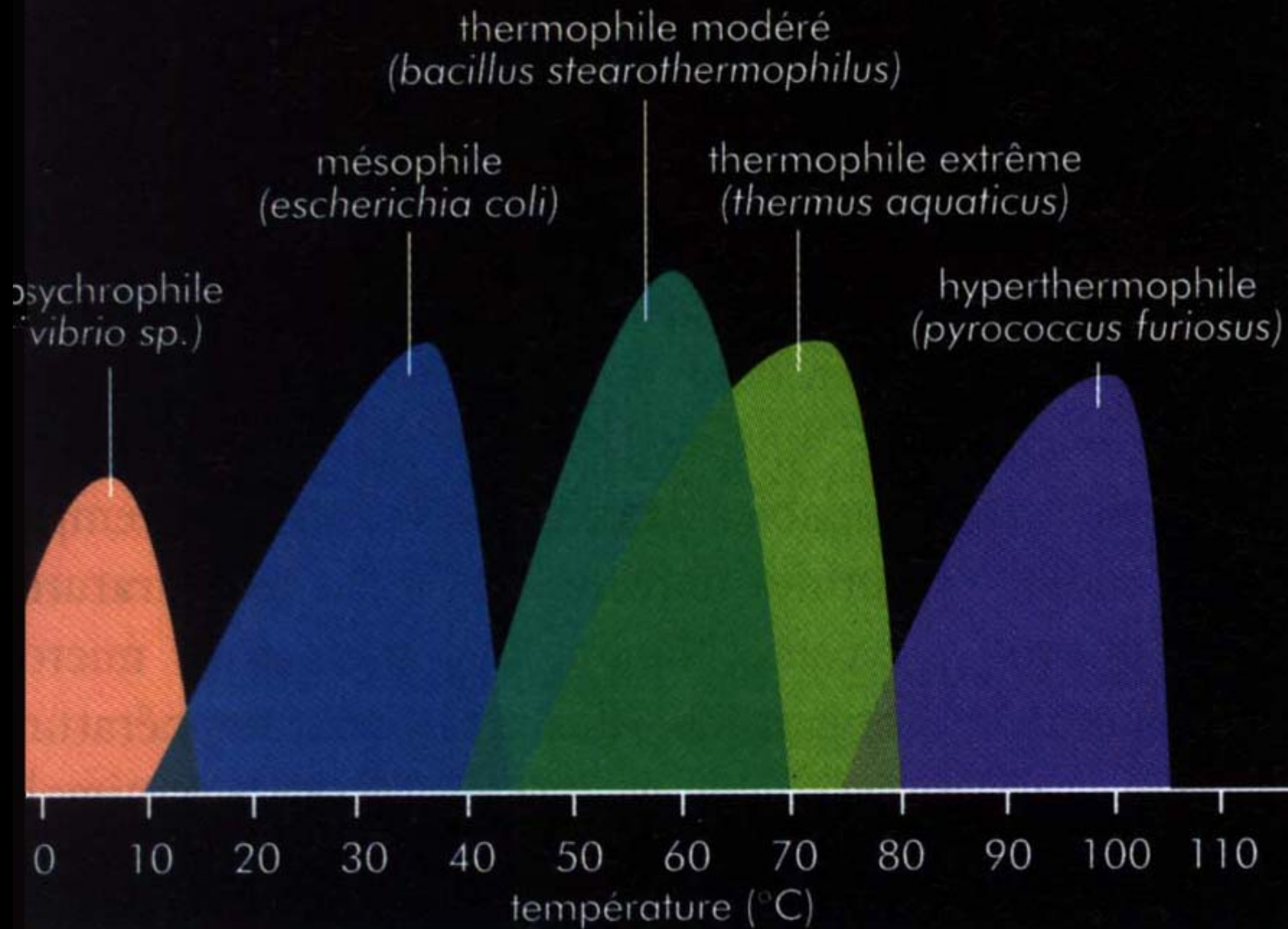
Principales voies de contamination de l'homme par les micro-organismes pathogènes véhiculés par l'eau.

La pression d'un environnement hostile à la croissance de commensales ou pathogènes conventionnels

Dans l'environnement naturel, les microorganismes commensales ou pathogènes (humains) se retrouvent en compétition avec des microorganismes adaptés aux facteurs environnementaux :

- UV (radiations solaires)
- stress osmotique (salinité forte ou très faible)
- variation de pH
- dessiccation
- variation de température (baisse généralement)
- présence de prédateurs (protozoaires, métazoaires)
- compétition avec les autochtones

TEMPÉRATURES DE CROISSANCE



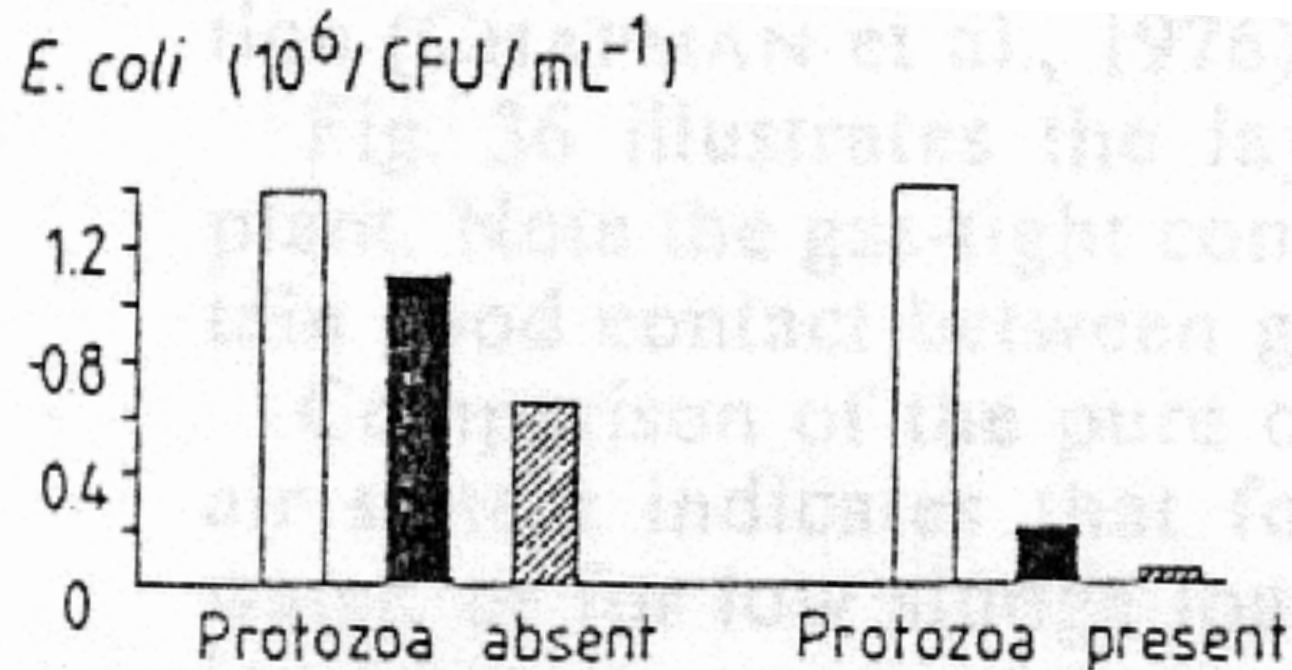
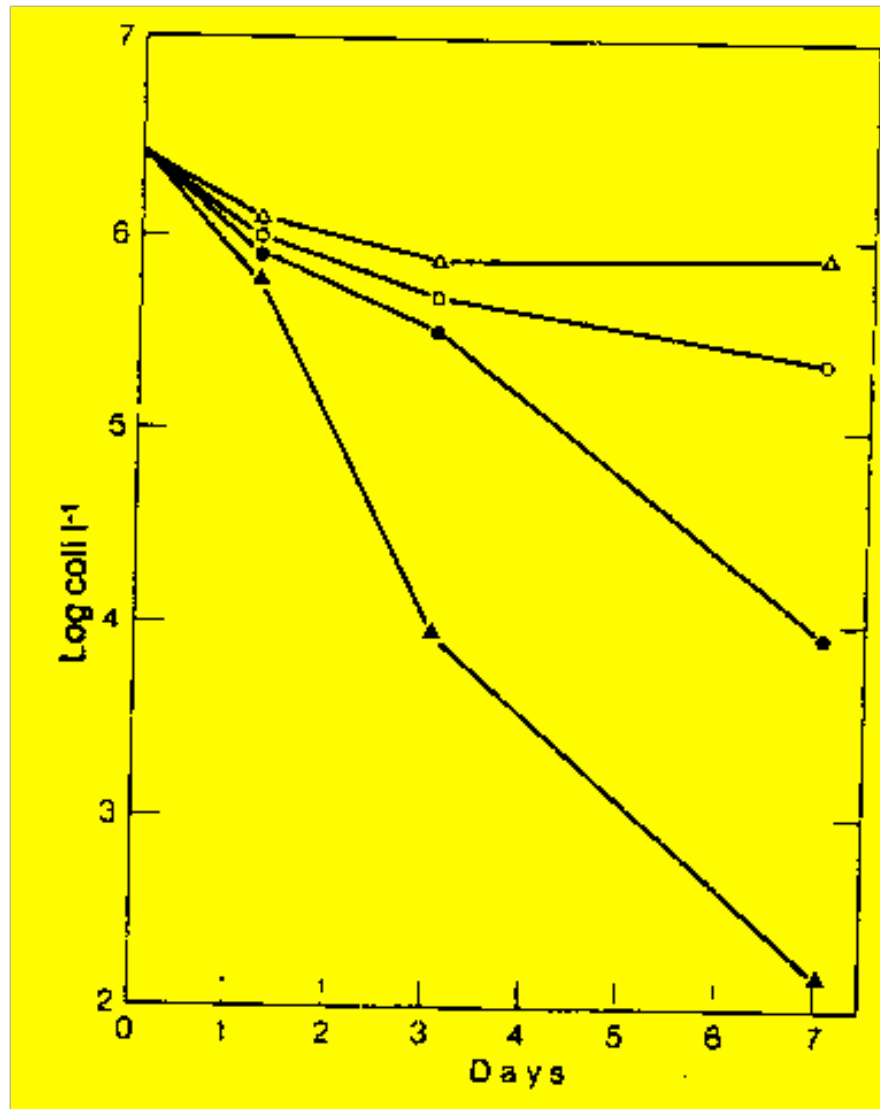


Figure 35. Histogram illustrating the fate of *Escherichia coli* in experimental activated sludge plants operating in absence and presence of ciliated protozoa (after CURDS, 1975). □ sewage, ■ mixed liquor, ▨ effluent.

Protozoaires = prédateurs de bactéries



*Augmentation
de la proportion de bactéries
autochtones*

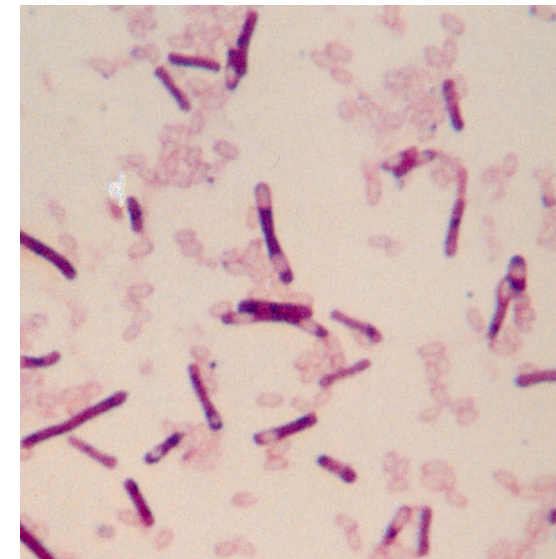
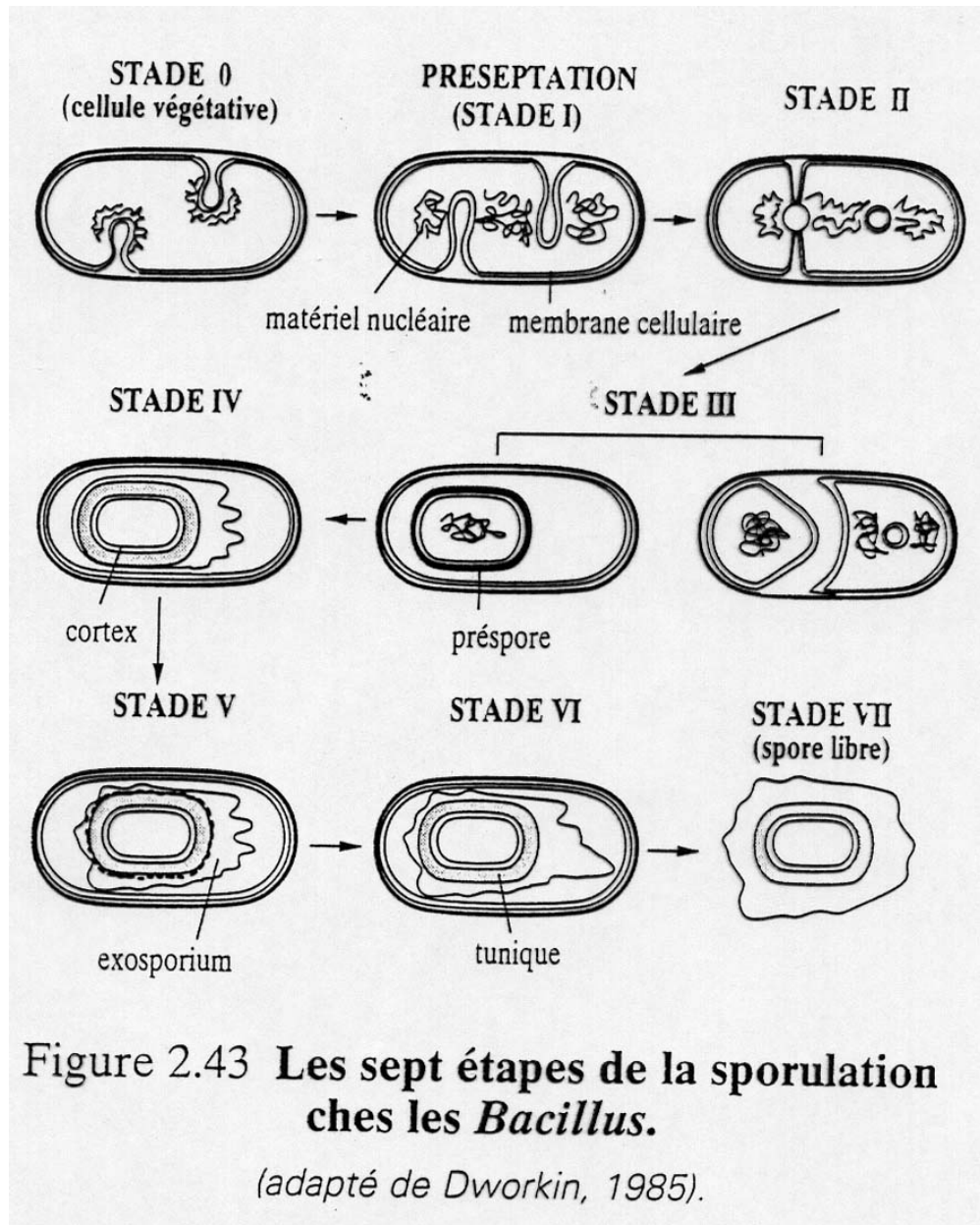
Figure 12.2. Survival times of *Escherichia coli* in autoclaved seawater after addition of varying amounts of marine bacteria. Autoclaved seawater alone, Δ ; + 10, $\circ$; + 1000, $\bullet$; + 100 000, $\blacktriangle$; marine bacteria ml^{-1}

Un mécanisme de survie relativement bien décrit :
la sporulation.

- —> un des rares exemple de différenciation cellulaire bactérienne.
- spore (ou endospore) = cellule bactérienne ayant évolué vers une forme de résistance suite à des conditions externes difficiles (température, carence nutritive,...).
- Résistance extrême à de nombreux facteurs de l'environnement
- Viabilité se compte en milliers d'années
- —> en quelques heures, si les conditions de croissance redeviennent favorables et après activation par la chaleur, la spore redonne une cellule active.

La sporogénèse

Un processus faisant intervenir près de 80 gènes, dont l'expression se fait à travers une succession d'étapes parfaitement coordonnées.



Clostridium difficile
(spore subterminale)

Propriétés des spores

- Thermorésistance : variable selon les espèces.
 - 8h, 100°C ; 5 min. 120°C. pour stériliser on doit tenir compte de ces valeurs extrêmes de résistance.
 - Calcium (10-15% poids sec) et faible teneur en eau sont impliquées.
- **Dessiccation:** teneur en eau très faible = 15% !
- **Résistance aux agents physiques et chimiques.**
 - rayons UV, X.(forme de vie la plus résistante dans ce domaine).
 - désinfectants chimiques, oxydants, antibiotiques.
- **Antibiotiques**
 - sécrétés en grande quantité au moment de l'entrée irréversible dans la sporulation (bacitracine, polymixine)
 - fixés aux parois de la spore.

Un exemple de réponse bactérienne face à un stress environnemental : la survie bactérienne en conditions de stress nutritif (bactéries non sporulantes)

*Mise en place de mécanismes de survie au cours
de la phase stationnaire de croissance*

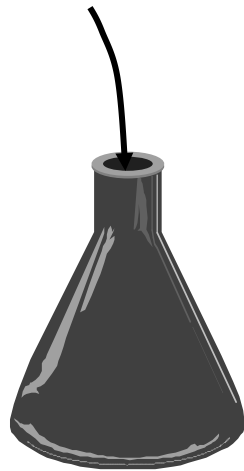
Le stress nutritif, un événement récurrent pour les bactéries ?

- Les microorganismes commensales et pathogènes excrétés dans l'environnement se trouvent en présence d'une charge en nutriments largement inférieure à celle de leur habitat (g/ L) :
 - océans : COD = 0,3 - 1,2 mg / L
 - eaux douces : COD = 1 - 10 mg / L
 - sols : COD = 10 - 30 mg / L
- L'étude des cellules en phase stationnaire de croissance est une approche intéressante pour apprécier les conséquences d'un stress nutritif sur les cellules et leur adaptabilité.

COD = carbone organique dissous

Croissance microbienne

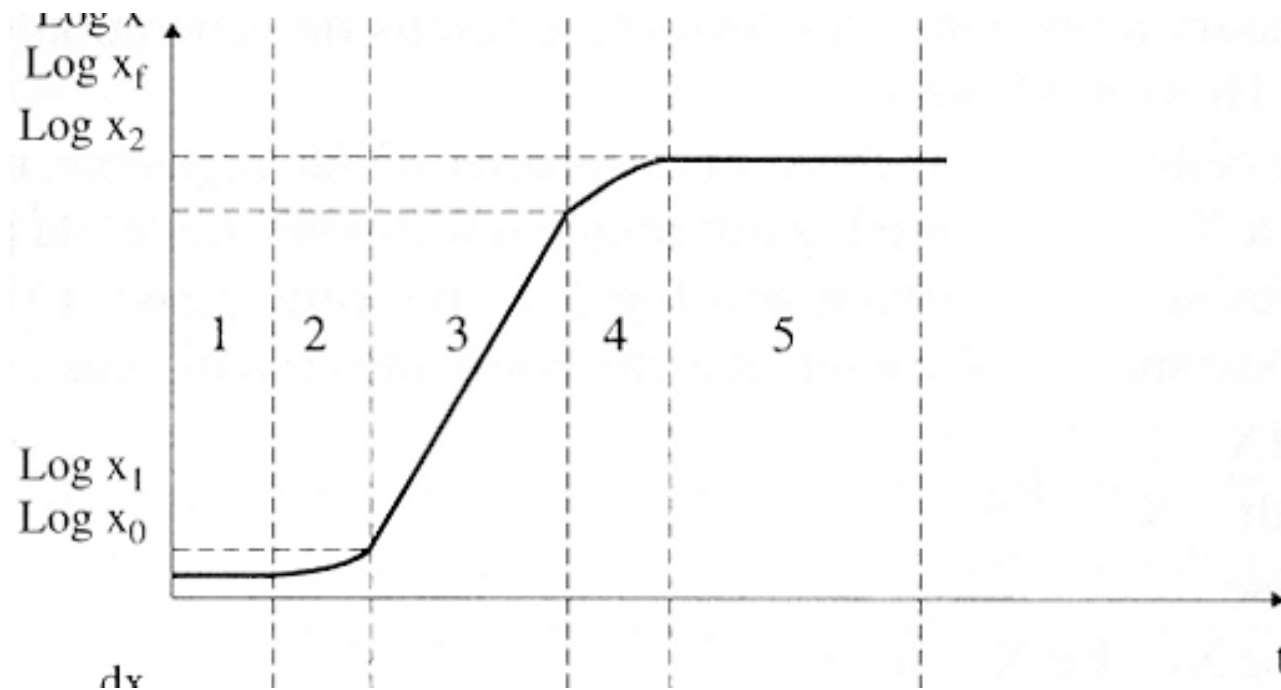
+ cellules (inoculum)



Milieu nutritif stérile

→ Suivi de la croissance (mesure de la densité optique, masse sèche, nombre de cellules,...)

Courbe de croissance microbienne



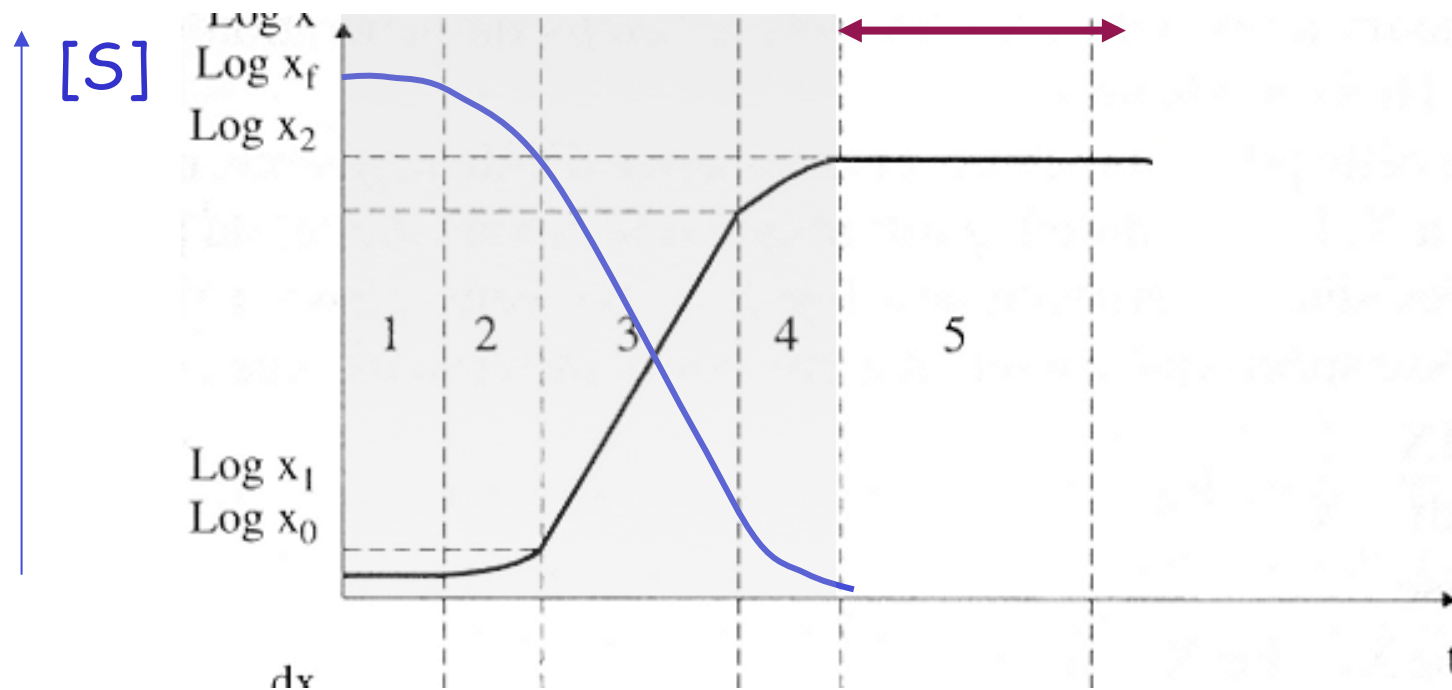
Un milieu de culture estensemencé par une suspension microbienne, la variation de la biomasse (X) est suivie en fonction du temps.

La phase stationnaire de croissance

- Après une phase active de croissance cellulaire (division des cellules), la vitesse de croissance des cellules en réacteur fermé chute rapidement et devient nulle, suite, en général, à l'épuisement du milieu nutritif.
- La « phase stationnaire de croissance » traduit simplement l'absence d'augmentation nette du nombre de cellules.
- La biomasse produite, est maximale. La concentration cellulaire n'augmente plus, mais **les cellules conservent néanmoins une activité métabolique, leur structure biochimique subit des modifications.**
- L'entrée en phase stationnaire ne doit pas être assimilée à une absence d'activité cellulaire !

La phase stationnaire

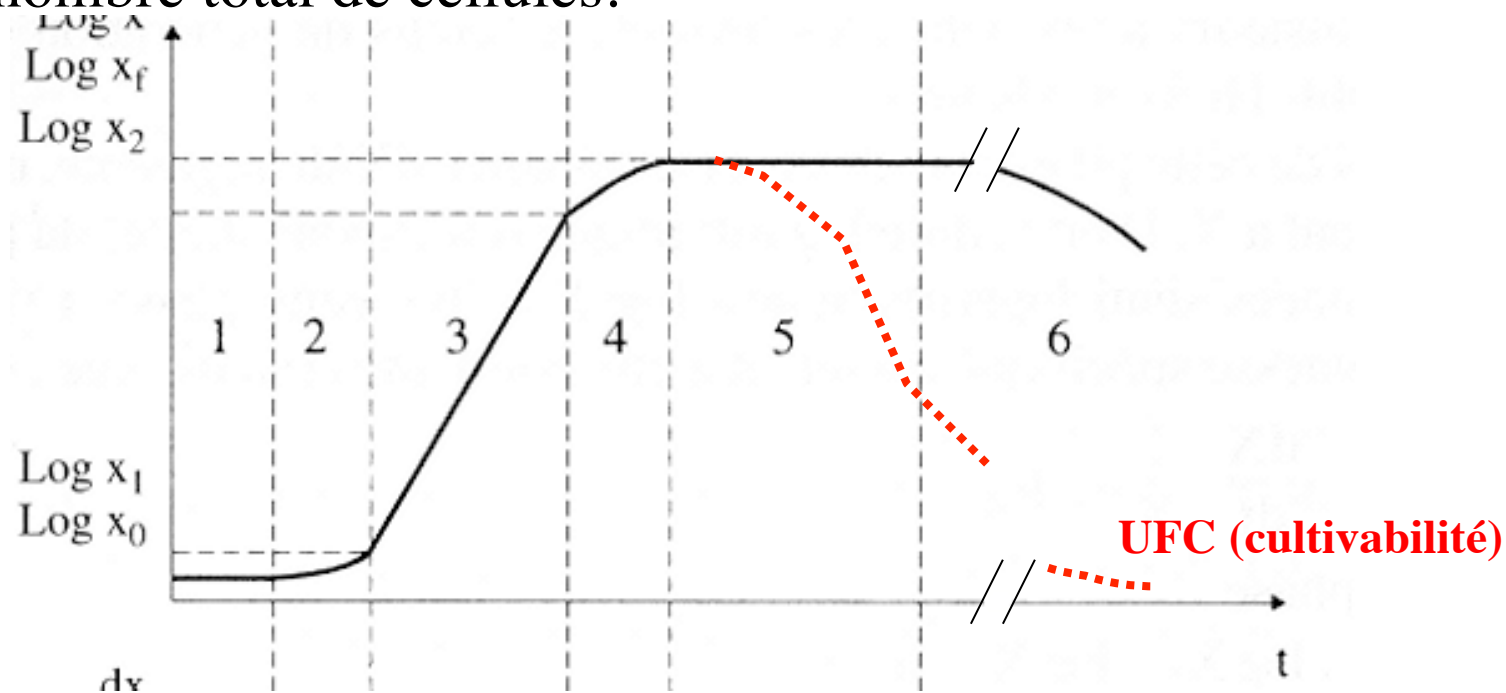
Etat physiologique des cellules ?



Au cours de la phase stationnaire, les cellules doivent s'adapter à de nouvelles conditions environnementales, et c'est au cours de cette phase qu'elles développent de nombreuses résistances.

S = substrat nutritif

- 6, **phase de déclin**, le nombre de cellules décline du fait de la mortalité des cellules suite, dans certains cas, à l'autolyse sous l'action de leurs enzymes. Très variable selon les souches et les conditions.
- **La cultivabilité** chute généralement plus rapidement que le nombre total de cellules.

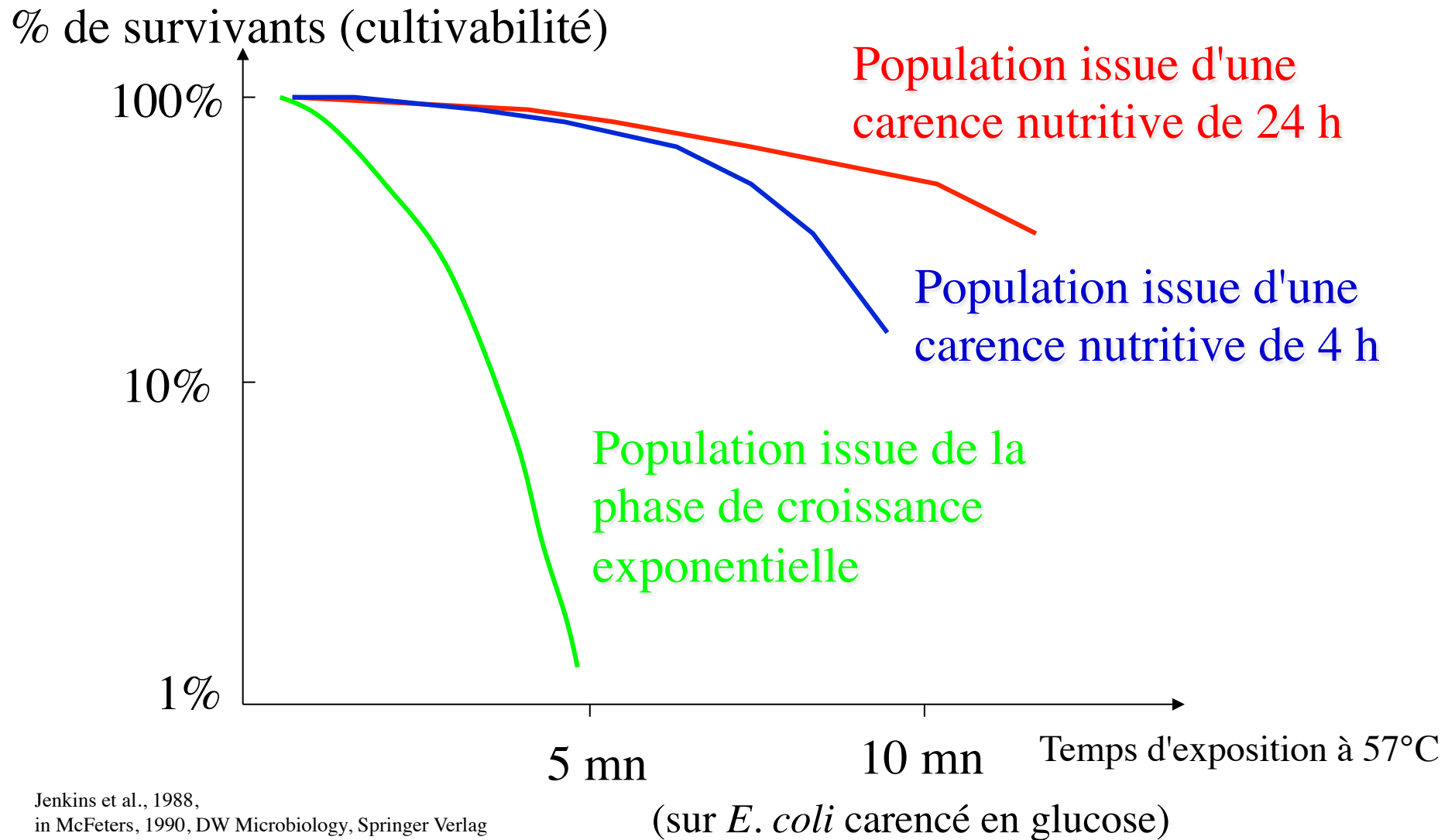


UFC = unité formant colonie

Développement de résistances en phase stationnaire

- En phase stationnaire, la génération d'énergie est limitée, en conséquence, les réponses inductibles seront moins rapides et moins efficaces.
- Dès l'entrée en phase stationnaire les cellules semblent alors se préparer à faire face aux stress environnementaux.
- Intérêt : éviter de synthétiser de nouvelles protéines alors que les conditions nutritives sont limitées.

Résistance bactérienne après stress nutritif



Le stress induit des résistances multiples

- Différents types de stress (tp élevée, anaérobie, oxydants,, toxiques,...) induisent des résistances croisées, i.e. à un autre type de stress (Amy, 1997):
 - des bactéries gram - « affamées » sont plus résistantes au traitement H_2O_2 ou thermique que des cellules en croissance (Nystrom et al., 1992, Rockabrand, 1995...)
 - des bactéries gram + (*Micrococcus luteus*) deviennent plus résistantes à la lyse mécanique ou enzymatique après un choc thermique.

(Amy, 1997), *Life Sci. Microbiol. Environ. Sci.*, The microbiology of the terrestrial deep subsurface, Amy & Haldeman, Eds, chap. 11, pp.185-203).

Modifications suite à une carence nutritive (*E. coli*, *Salmonella enterica* ser. Typhimurium)

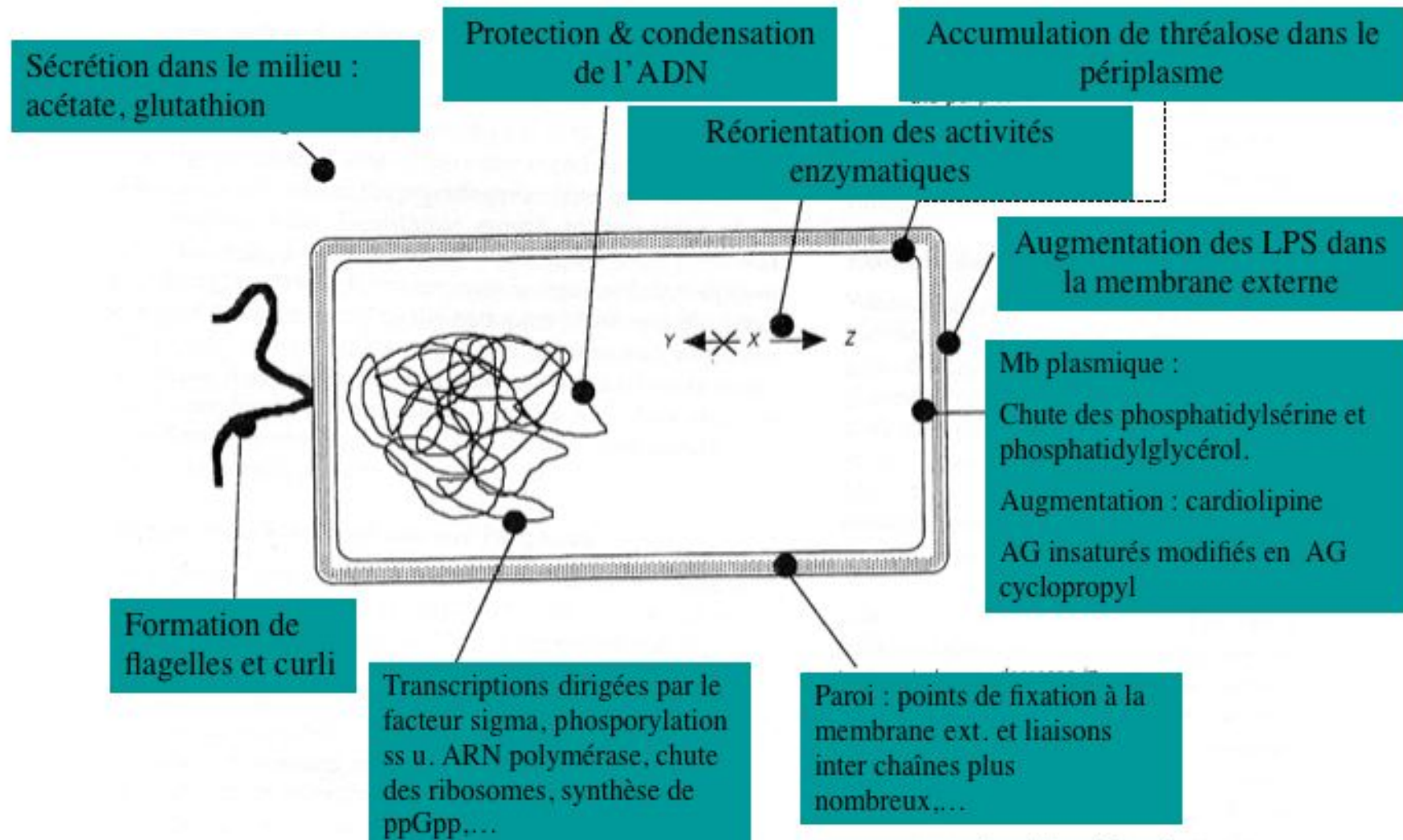


FIGURE 1 Summary of phenotypic changes in stationary-phase *E. coli* and *S. typhimurium*.

Huisman et al. 1996 ASM press.

1. Quelques changements remarquables observés
durant la phase stationnaire ou au-delà

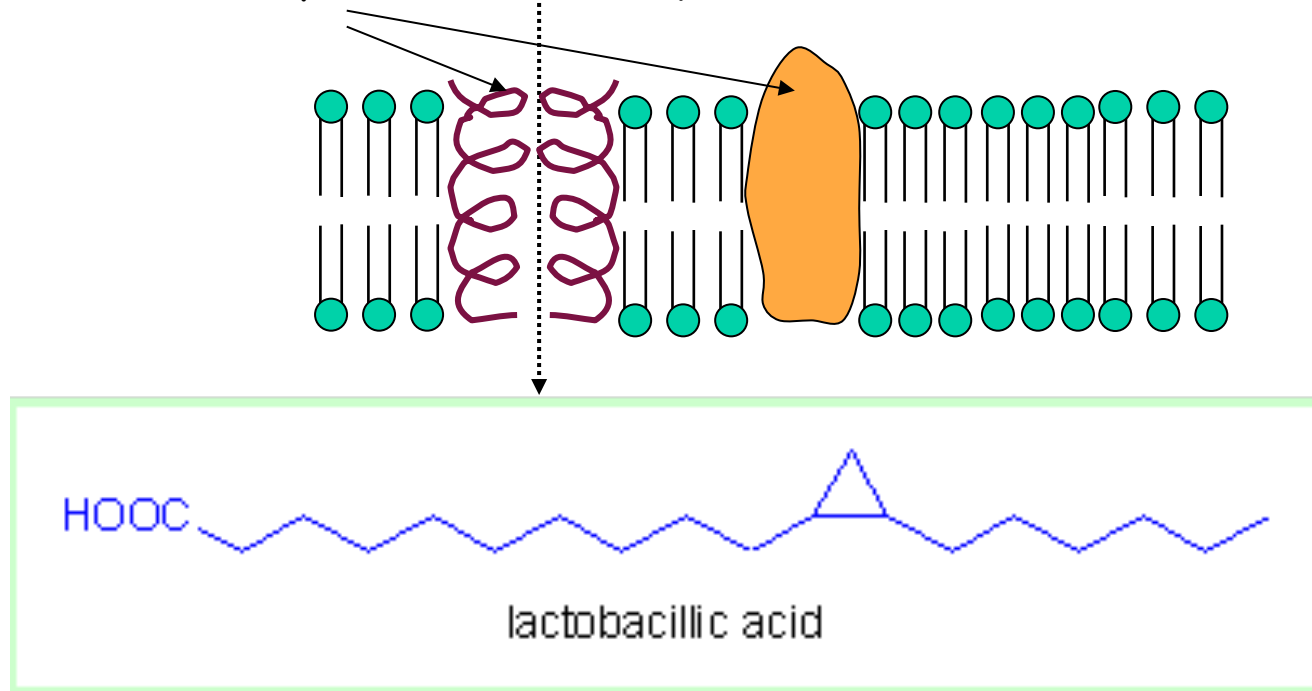
- *Modifications des enveloppes
(dont membranes et parois)*

- Membrane cytoplasmique

Composition en acides gras : conversion des AG mono-insaturés (ac. palmitoléique et oléique diminue (1 log) en leurs dérivés cyclopropane et en AG polyinsaturés (ac. linoléique).

Conséquences : la membrane deviendrait plus rigide et plus ordonnée, ce qui augmenterait sa résistance mécanique.

Protéines de transport et métaboliques



(Christie, 2003)

- Parois

Membrane et paroi b. Gram -

- LPS : augmentation de la quantité de LPS exposés.
- Protéines : en diminution nette mais aussi nouvelles synthèses.
 - flagelle : synthèse transitoire car trop consommateur d'énergie (début phase stationnaire).
 - protéines d'adhésion (pili et curli)
- Renforcement de l'attachement au peptidoglycane par les lipoprotéines de Braun (LPB).

- Peptidoglycane (PG):
 - augmentation de l'épaisseur (de 2 à 3 couches, le PG passe de 4 à 5 couches en phase stationnaire).
 - La longueur des chaînes glycane diminue
 - Le nombre de liaisons peptidiques augmente.
- Périplasme :
 - synthèse des protéines impliquées dans l'entretien du peptidoglycane.
 - accumulation dans le périplasme d'oligosaccharides membranaires et de tréhalose : jouerait le rôle d'osmoprotectants.

■ *Environnement extracellulaire*

- En début de phase stationnaire s'accumulent :
 - glutathion et d'autres thiols,
 - acétate (si croissance sur glucose), puis qui est rapidement consommé.
 - dérivés d'homosérine lactone (*Vibrio* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Erwinia carotovora*,...).
 - polymères extracellulaires (*e.g.* : consortia bactériens de boues activées).
 - fixer, retenir les nutriments
 - s'organiser en communautés (biofilms, agrégats bactériens,...)

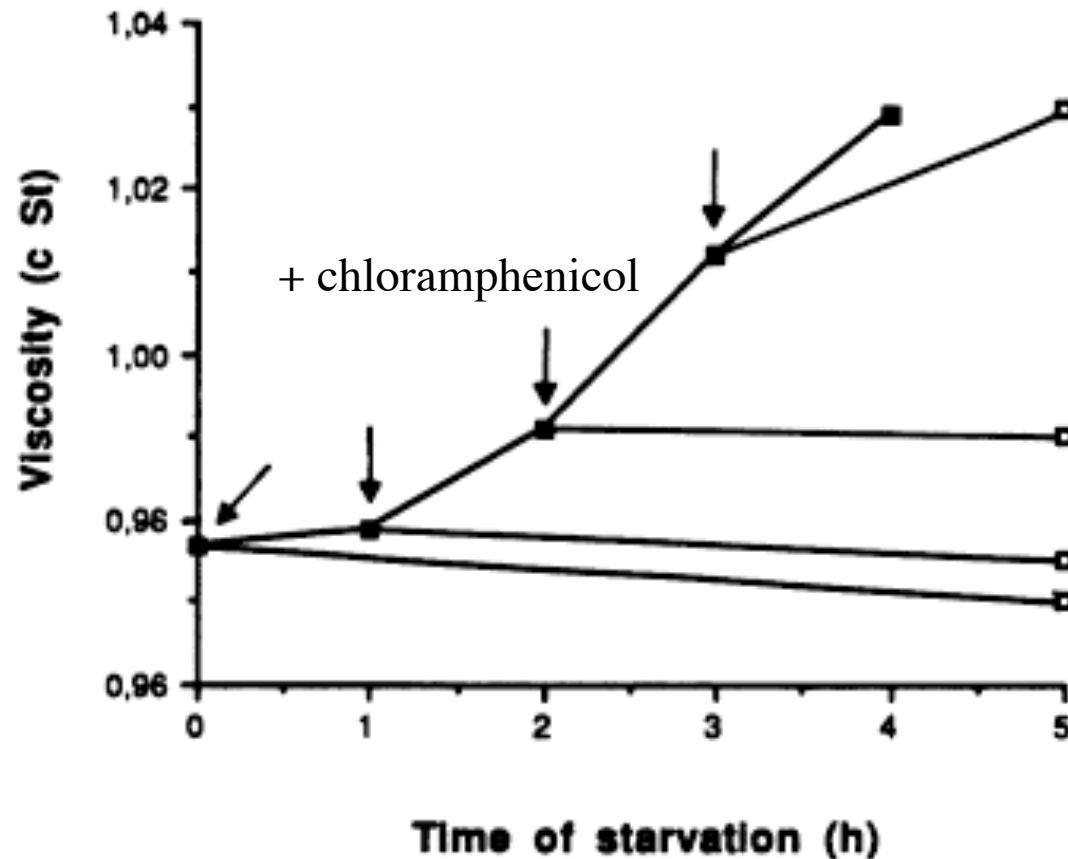
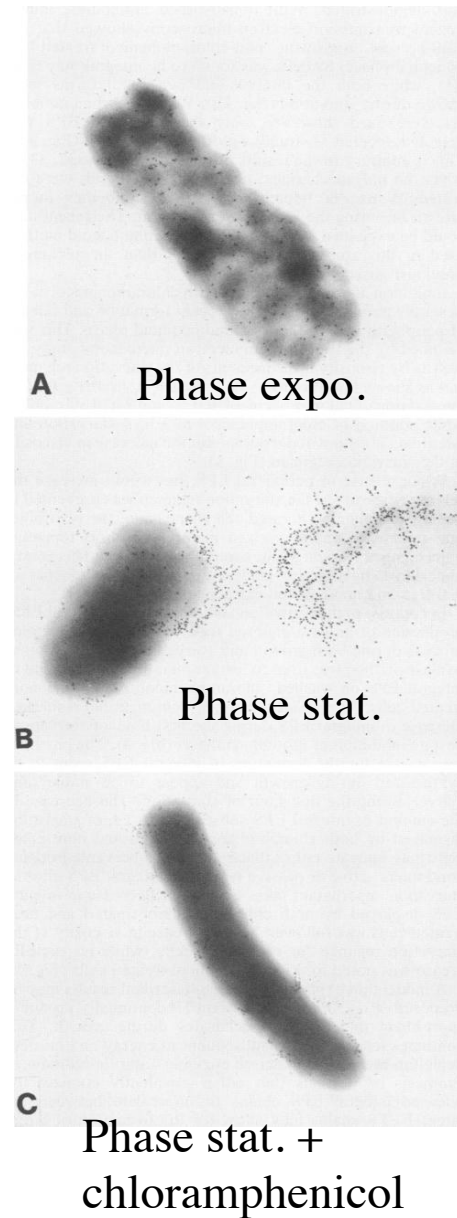
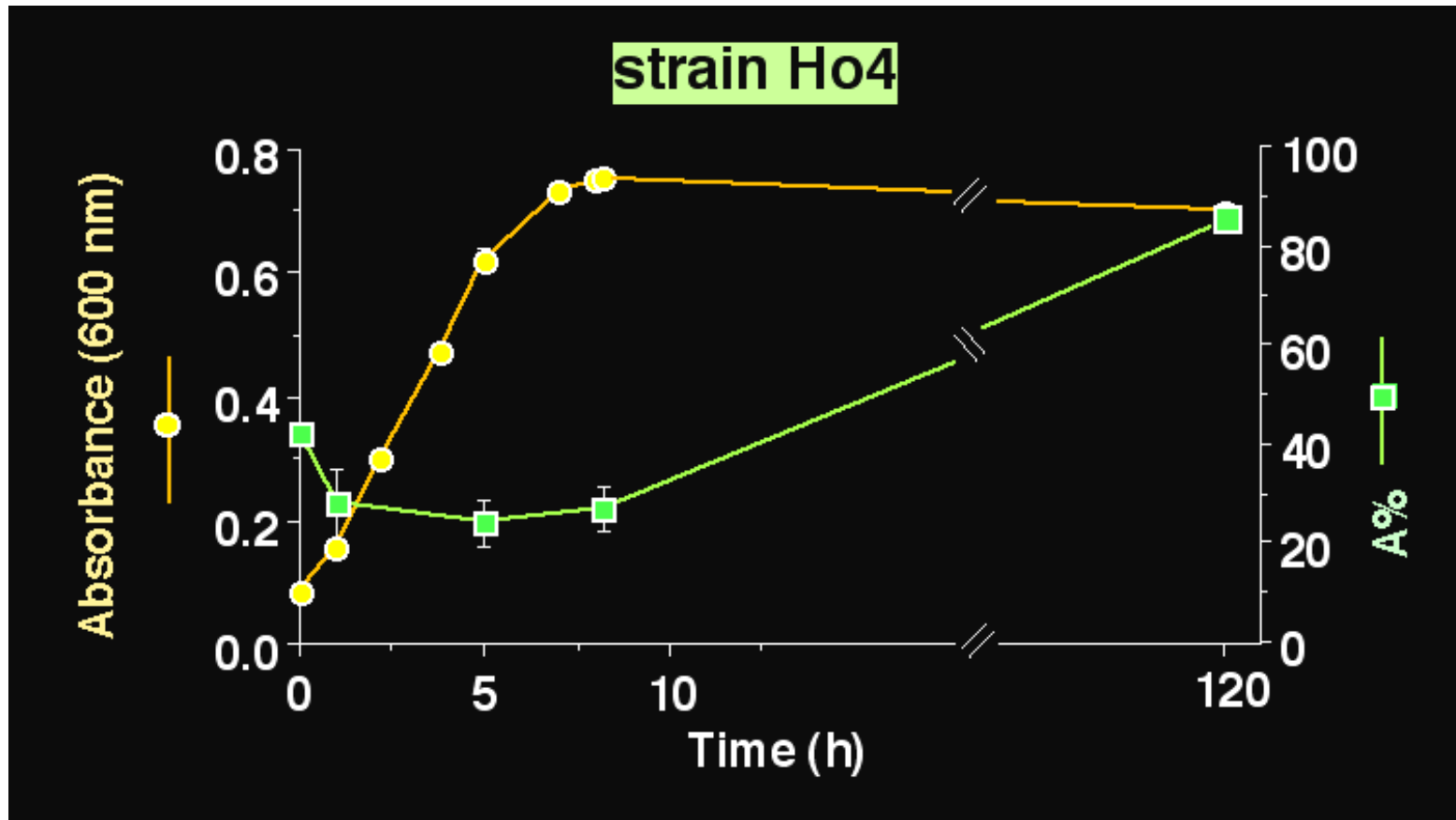


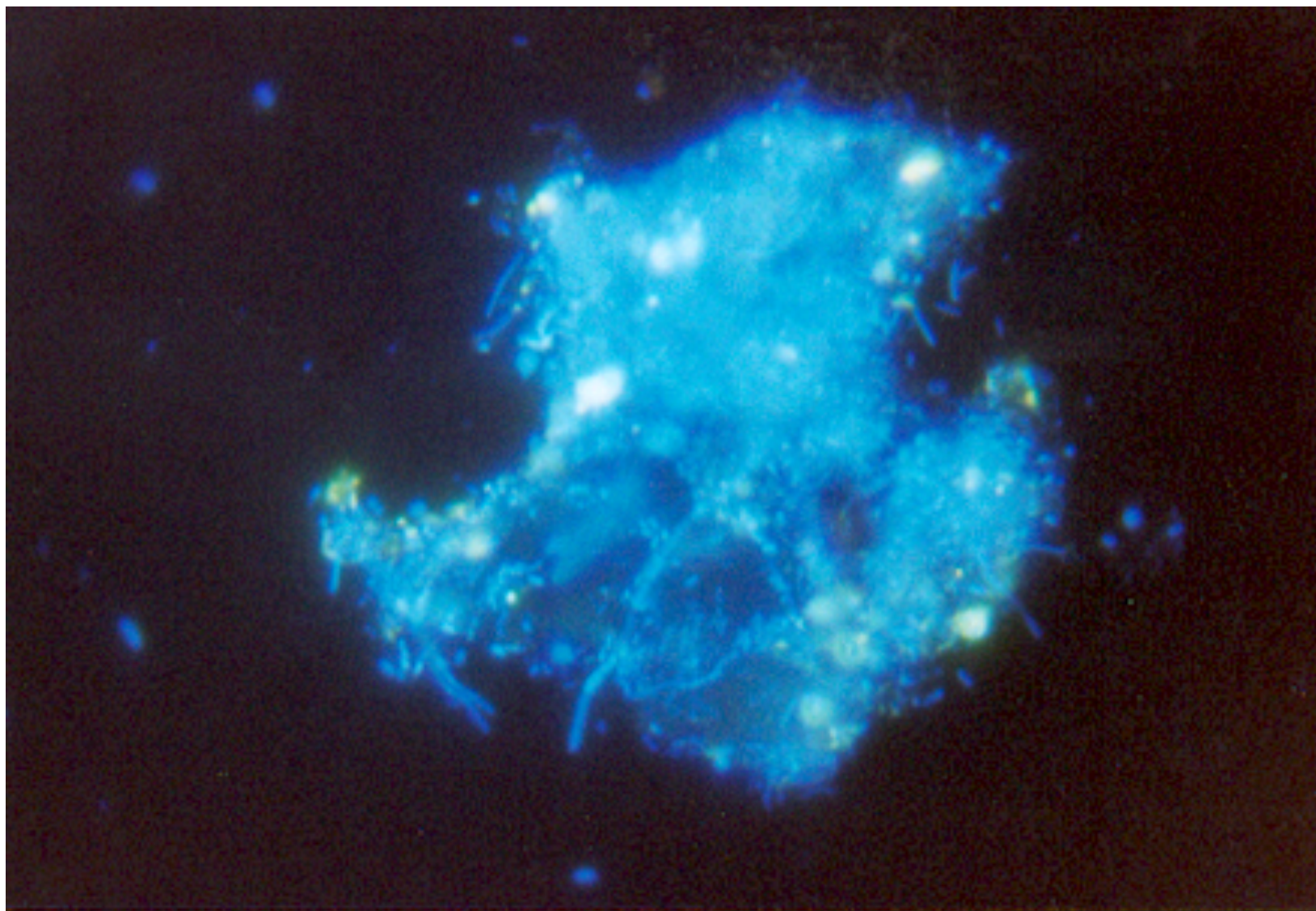
FIG. 1. Detection of released peripheral EPS as increased viscosity ($\text{c St} = \text{mm}^2 \times \text{s}^{-1}$) of starvation regimen containing chloramphenicol-treated or nontreated *Pseudomonas* sp. strain S9 cells. Measurements of the starvation suspension were performed at 0, 1, 2, 3, and 4 h for nontreated cells (■) and at 5 h of starvation subsequent to addition of chloramphenicol to the starvation regimen at 0, 1, 2, and 3 h (□). The arrows denote addition of chloramphenicol at different times of starvation. Data from a typical experiment are presented.



(Wrangstadh et al. 1990, AEM, 56:2065)

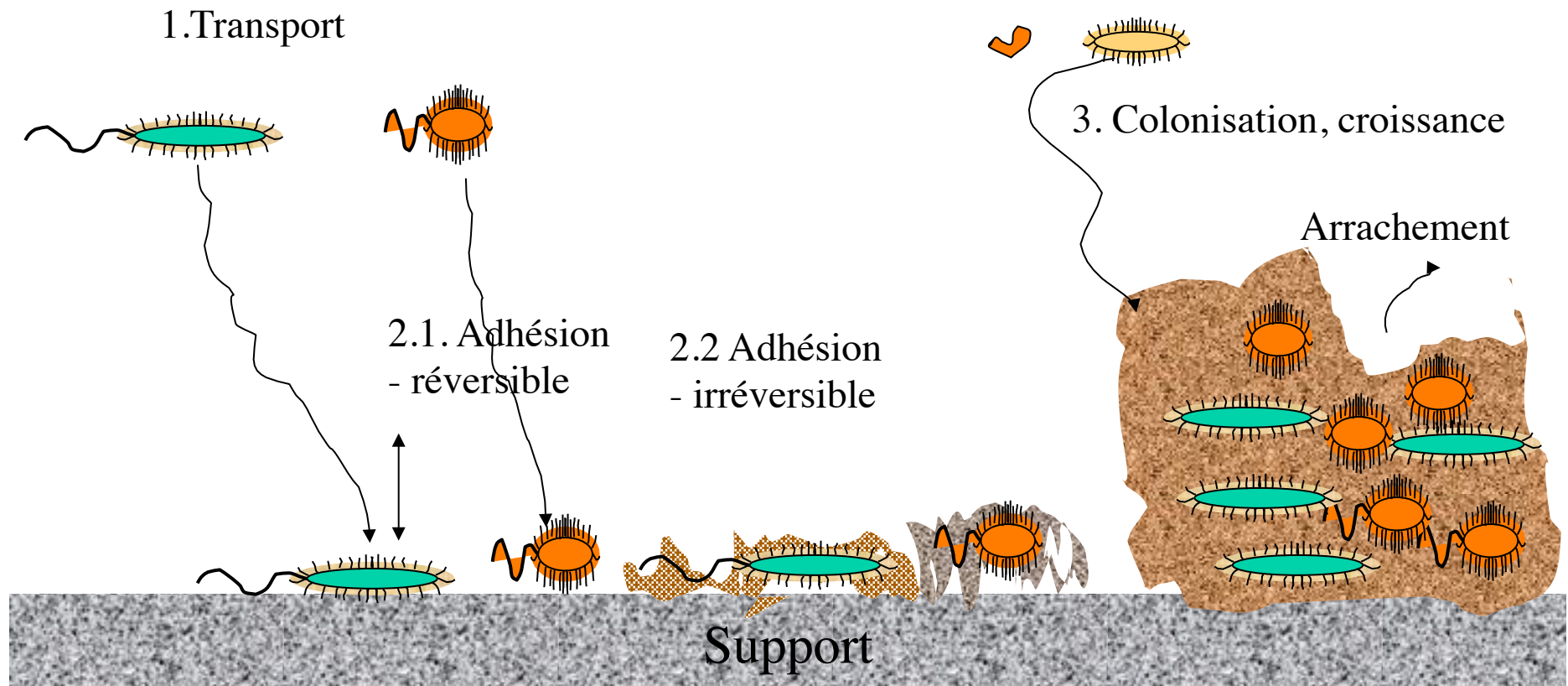
Augmentation de l'hydrophobicité de surface ($\approx$ capacité d'adhésion, A%) au cours de la croissance en batch (absorbance)





Floc de boues activées, coloration DAPI.

Les étapes de formation du biofilm



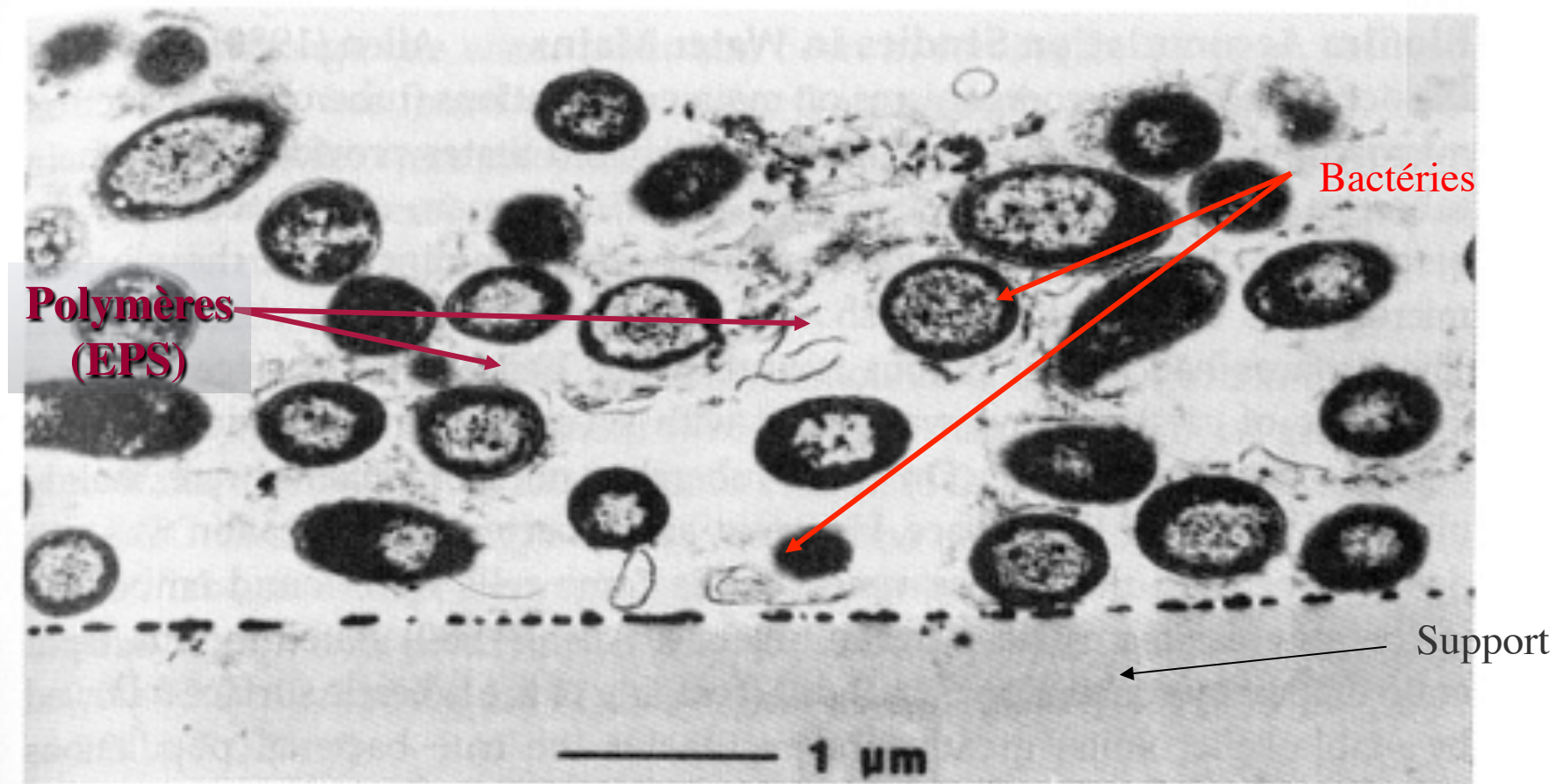


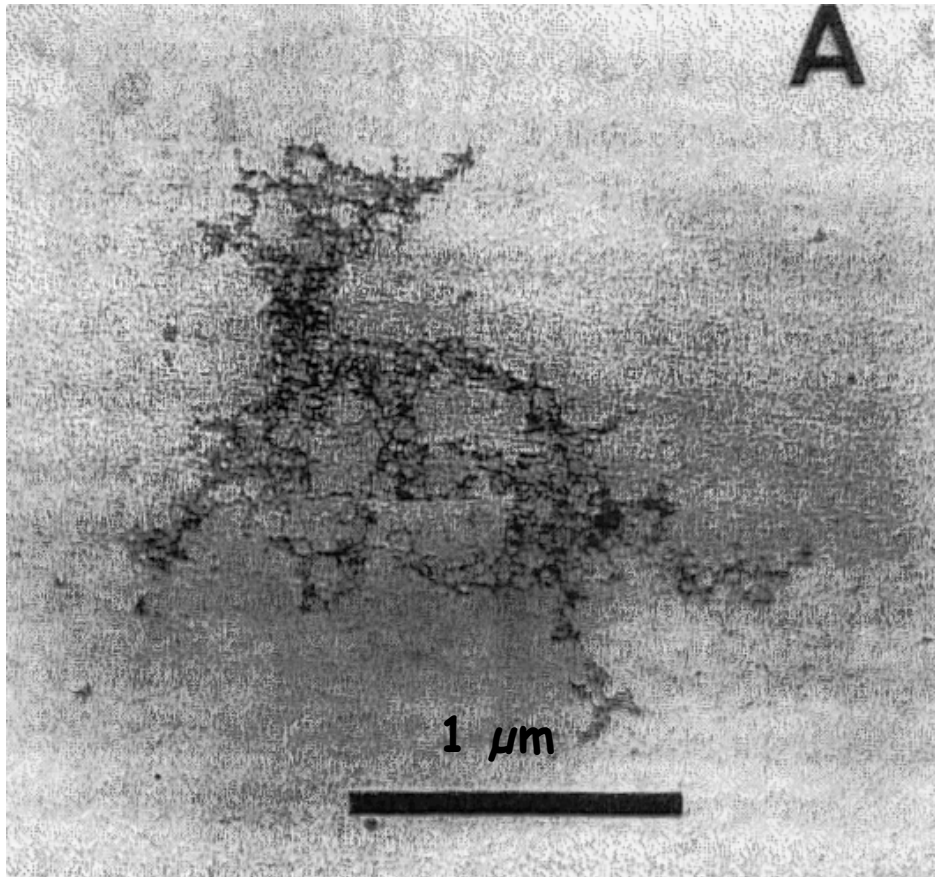
Figure 12.1 Transmission Electron Microscopy (TEM) picture of a cross section of a very thin biofilm.

Un biofilm est une couche de microorganismes, dans un environnement aqueux, liés les uns aux autres par une matrice polymérique et fixés à un substrat.

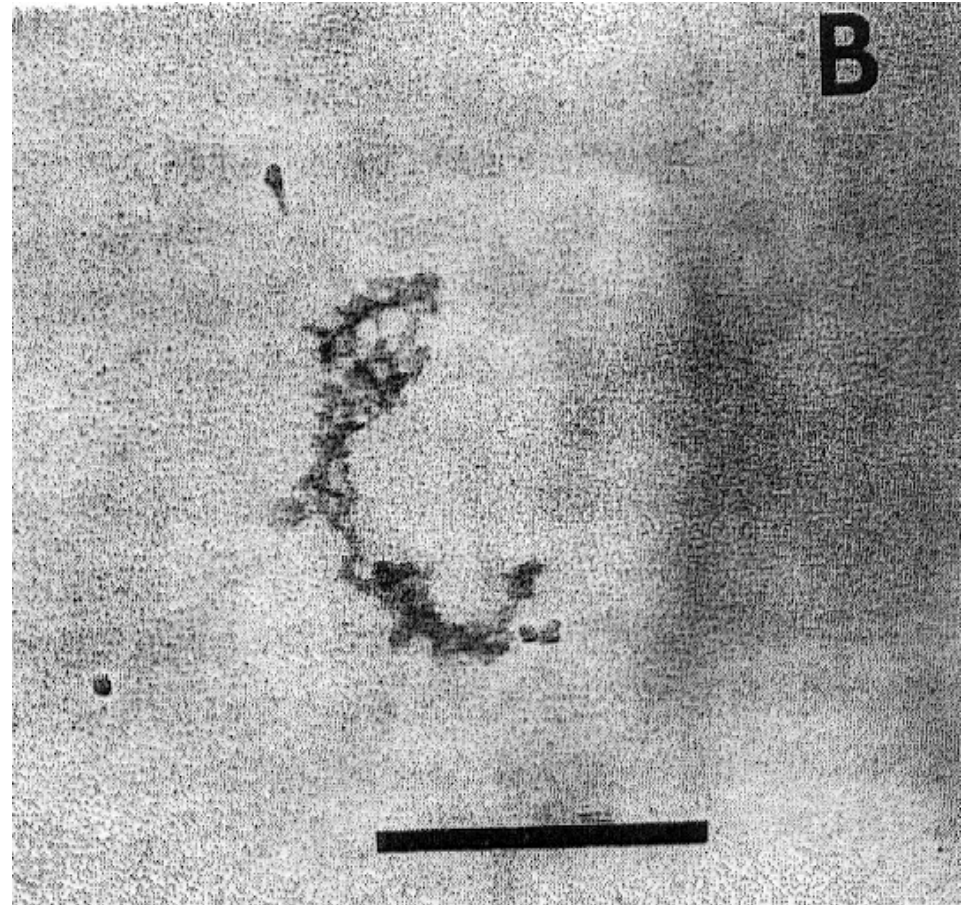
■ *Cytoplasme : acides nucléiques et synthèses des protéines*

- Plusieurs *DNA binding proteins*, impliquées dans la régulation de l'expression des gènes, la compaction et la protection (agents physiques et chimiques) de l'ADN, sont régulées par la phase de croissance et augmentent en phase stationnaire.
 - exemple : la protéine Dps est fortement exprimée après plusieurs jours de phase stationnaire, elle joue un rôle dans la protection de l'ADN contre les oxydants.
 - Le nombre de gènes exprimés chute en phase stationnaire.
- ☞ l'activité générale de la cellule est ralentie

Condensation de l'ADN chromosomique



ADN phase logarithmique de croissance



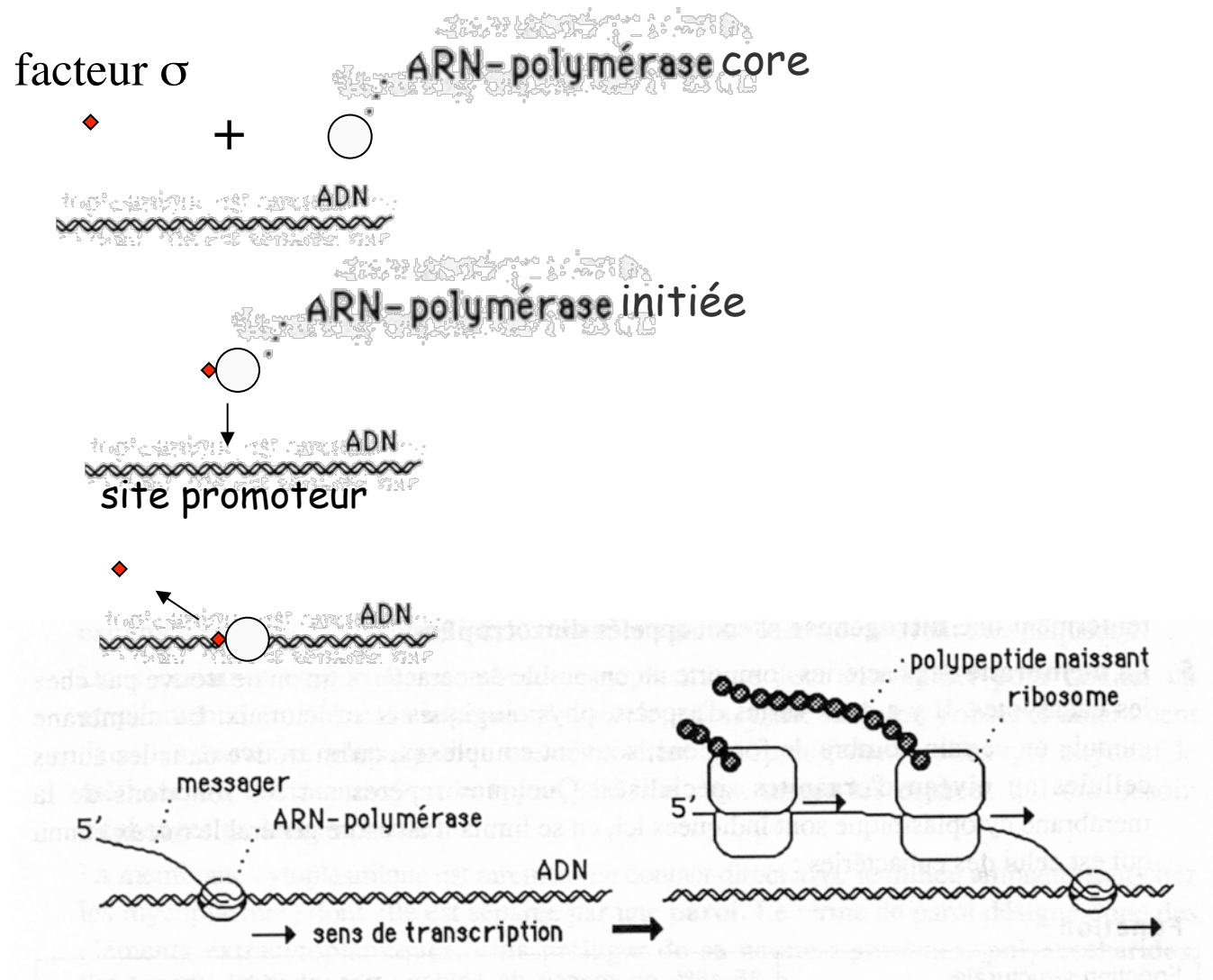
ADN cellule carencée

(Moyer & Morita, 1989, AEM, 55:2710)

■ *Synthèse des protéines*

- Apparition du facteur sigma σ^s : induit par l'augmentation du niveau de ppGpp (nucléotide effecteur agissant sur *rpoS* : *RNA polymerase factor*) et de l'homosérine lactone.
- —> induction de la réponse « stringente » (ou réponse extrême) : les bactéries économisent leurs ressources en engageant le minimum d'activité et font du recyclage :
 - synthèse de nouvelles molécules spécifiques du type de carence ou communes à différentes conditions:
 - 26 protéines en carence carbonée
 - 32 en carence phosphorée
 - 26 en carence azotée
 - *e. g.* : protéases, ARNase (dégradation des ribosomes), protéines de transport à haute affinité,...
- En fait, la plupart des gènes exprimés en conditions de carences sont sous le contrôle du facteur σ^s .

Facteur sigma et expression des gènes



Quelques facteurs sigma chez *E. coli*

Tableau 9.4 Lewin B. (1988), *Genes*.

Les facteurs sigma d'*E. coli* reconnaissent des promoteurs avec des séquences consensus différentes.

Facteur	Gène	Rôle	Séquence-35	Séparation	Séquence-10
σ^{70}	<i>rpoD</i>	général	TTGACA	16-18 pb	TATAAT
σ^{32}	<i>rpoH</i>	choc thermique	CNCTTGAA	13-15 pb	CCCCATNT
σ^{60}	<i>rpoN</i>	azote	CTGGNA	6 pb	TTGCA

Les gènes codant pour les facteurs sigma ont la désignation *rpo* pour la sous-unité de l'ARN polymérase, suivie d'une lettre pour identifier le gène lui-même [D pour le facteur sigma original, H pour « heat shock » (choc thermique), N pour privation d'azote].

σ^s	<i>rpoS</i>	stress général			
σ^E (ou σ^{24})	<i>rpoE</i>	choc thermique extrême	GAACCTT	16pb	TCTGA

Yura et al. (2000) review

■ *Voies métaboliques*

→ Au début de la phase stationnaire, la cellule réoriente sa physiologie pour mieux survivre:

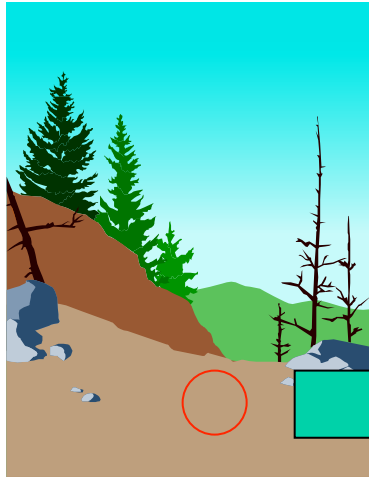
- Vitesse de génération d'énergie (force proton motrice) est réduite ; en aérobie d'autres cytochromes oxydase (cytochromes *d* et *x* au lieu de cytochrome *o*) sont exprimés.
- Mise en place des voies métaboliques permettant l'assimilation de l'acétate (shunt du glyoxylate - cycle de Krebs - qui permet en outre de limiter la perte de carbone sous forme de CO₂).
- Mise en place de systèmes de réserve : polyphosphates, glycogène.
- Optimisation de la recherche de nutriments
 - synthèse de protéines de transport à hte affinité,
 - Expression de systèmes d'assimilation de sucres divers (maltose, maltodextrines, arabinose, galactose,...sous contrôle de l'AMPc).
- Synthèse de protéines et molécules antioxydantes (catalases,...).
- Protéolyse sélective des protéines (*e.g.* : les protéines liées à la synthèse des AG, *acyl carrier protein*, sont protégées par le glutathion).

3. Changements morphologiques durant la phase stationnaire (et au-delà)

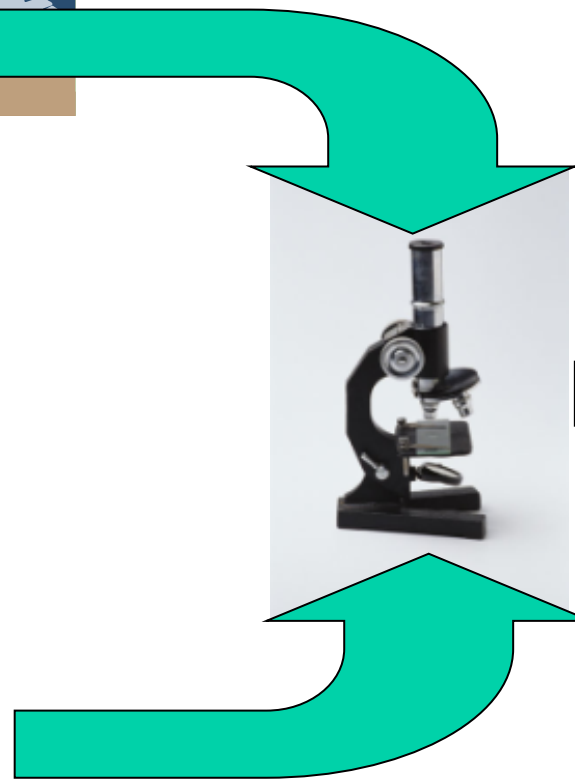
Modifications d'ordre morphologique

- En dehors de la synthèse de pili (*fimbriae* fins de l'agrégation) et de flagelles, de la condensation de l'ADN visible en microscopie électronique, la diminution de la taille des cellules est souvent observée après des temps de carence très longs (plusieurs semaines ou mois, voire années).
- Cette diminution de la taille peut dans certains cas s'accompagner d'une stabilisation de la masse totale de la biomasse alors que le nombre de cellules augmente (division ultime).
- La taille de ces cellules peut atteindre le dixième de μm (« cellules filtrables », « microcells »...). S'observe chez les cellules de l'environnement naturel.
- Les cellules deviennent plus sphériques.

Taille des bactéries de l'environnement naturel



Les bactéries « bactéries miniatures », un état dit « normal » des bactéries de l'environnement ?



agrégats

bactéries
« naines »

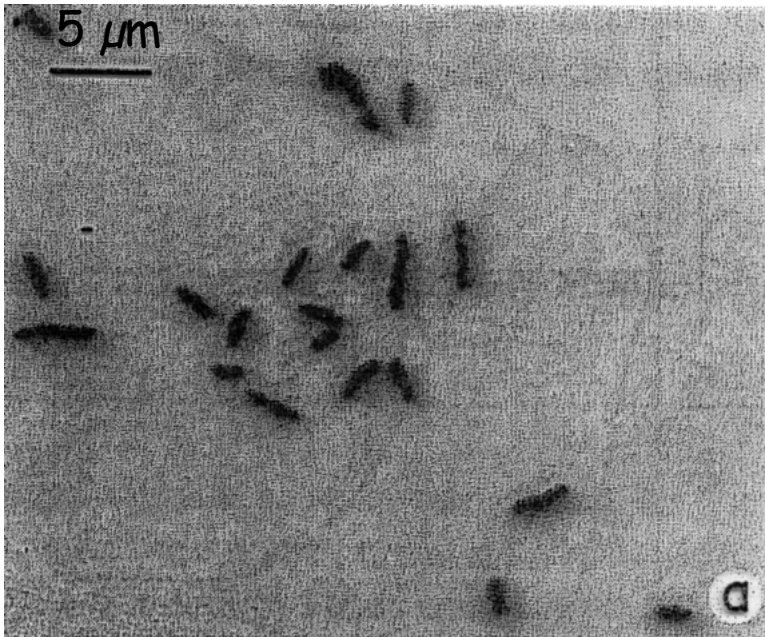
10 μm

mise en culture

Après croissance en milieu riche :

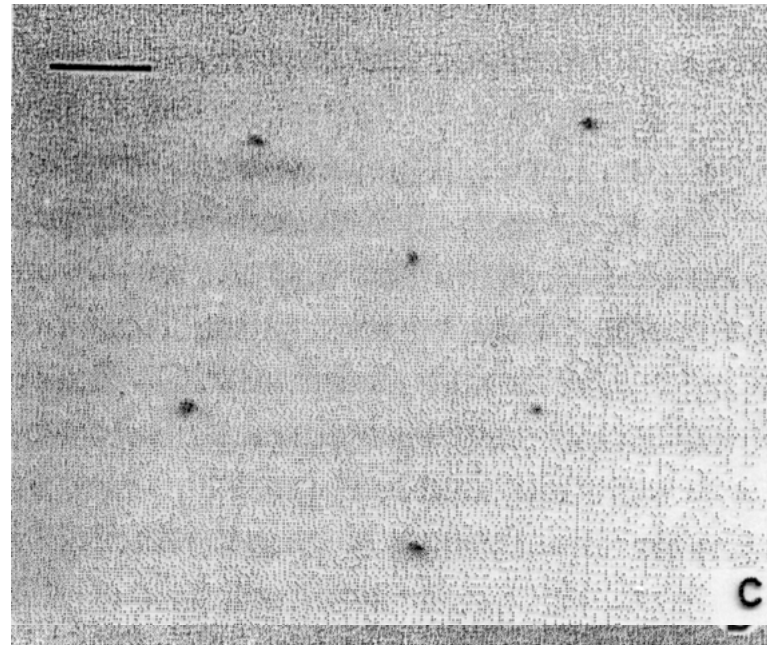


Miniaturisation des cellules

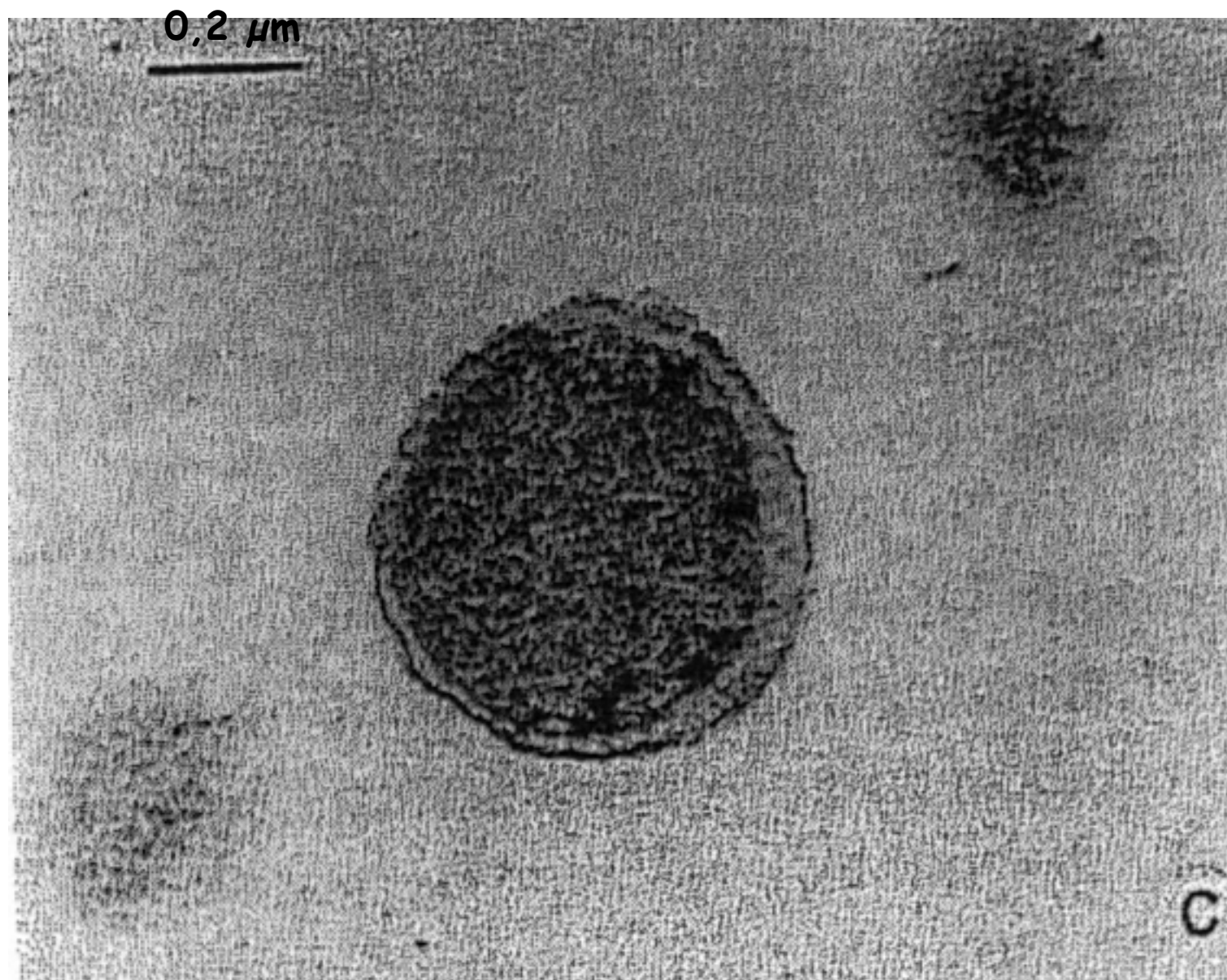


Cellules (Ant-300) en fin de phase exponentielle de croissance (bactérie marine)

(Novitsky & Morita, 1976, A.E.M., 32:619)



Après 6 semaines de carence carbonée
Après 70 semaines, le nombre de cellules cultivables est 15 fois plus élevé qu'à T_0 !



Changements morphologiques chez les bactéries pathogènes, opportunistes, et ubiquistes.

- Chez *E. coli* et *Salmonella*, la diminution de taille et l'arrondissement est sous le contrôle de σ^S agissant sur le morphogène *bolA* (protéine impliquée dans la formation de la paroi) et *ftsQAZ* (septation).
 - *E. coli* KN126 passe en 21 jours d'une forme bacille de 1,35 μm de long à une forme coque de 0,73 μm (Signoretto et al., 2002)
- *Shewanella alga* (bactérie ubiquiste, pathogène opportuniste):

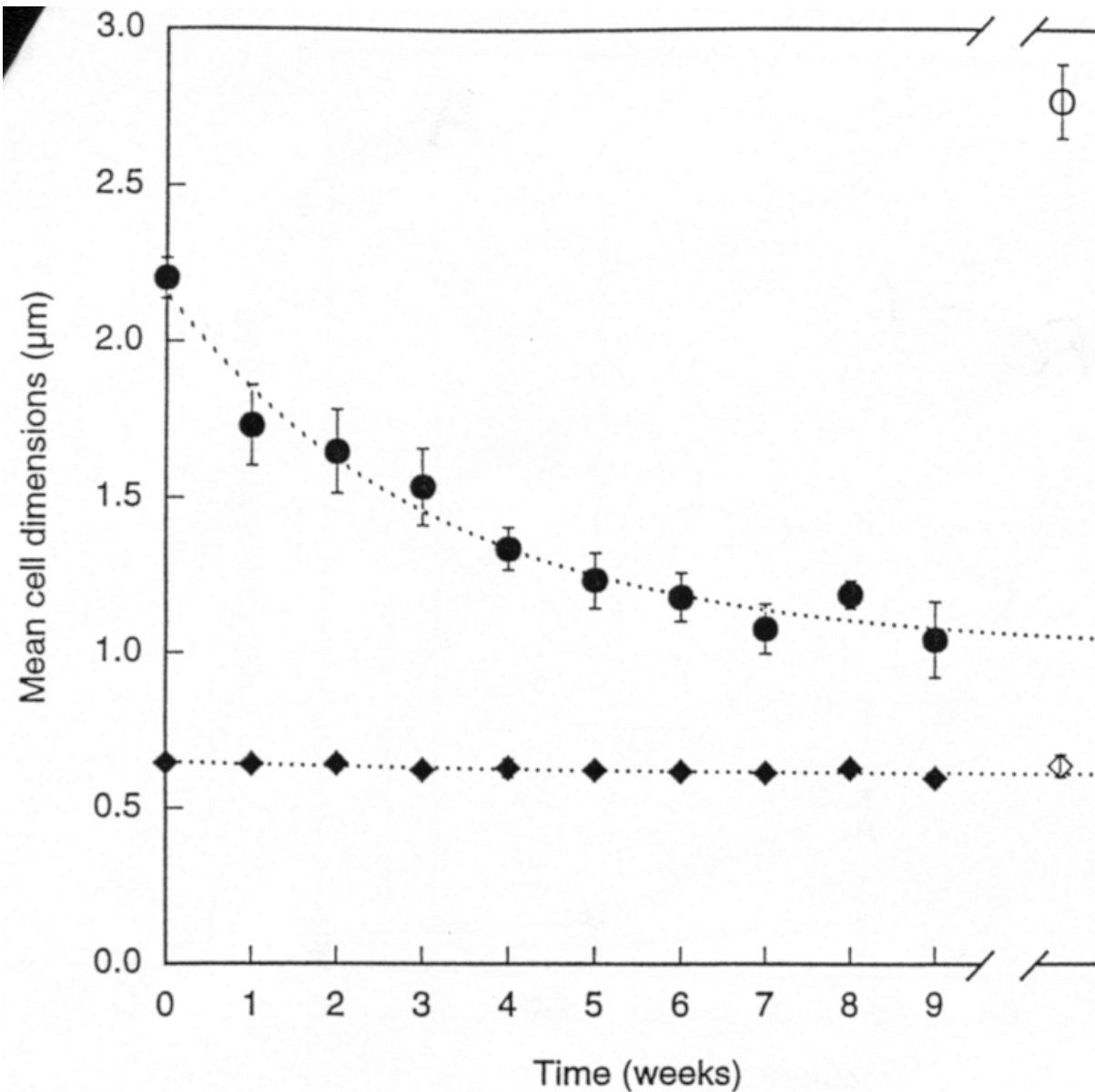


FIG. 1. Mean cell length (●) and mean cell width (◆) of starved *S. alga* BrY cells and mean cell length (○) and mean cell width (◇) of resuscitated *S. alga* BrY cells after 30 h of aerobic growth. Correlation coefficients for the shown curves were 0.74 and 0.97, respectively (see text). Error bars for figures represent the 95% confidence intervals. Caccavo et al. (1996) AEM 62:4678

Avantages d'une diminution de taille ?

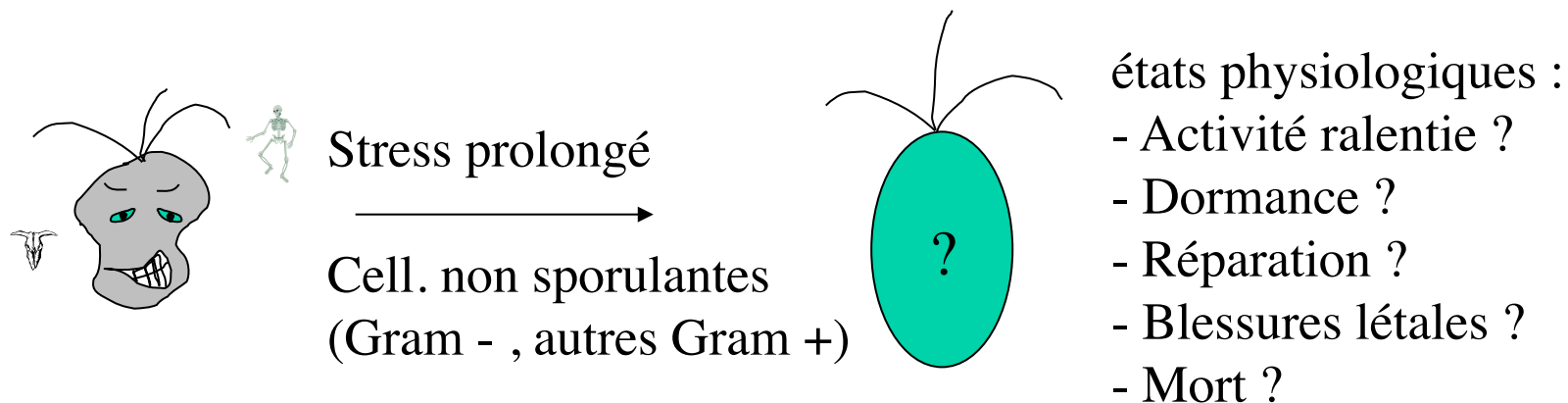
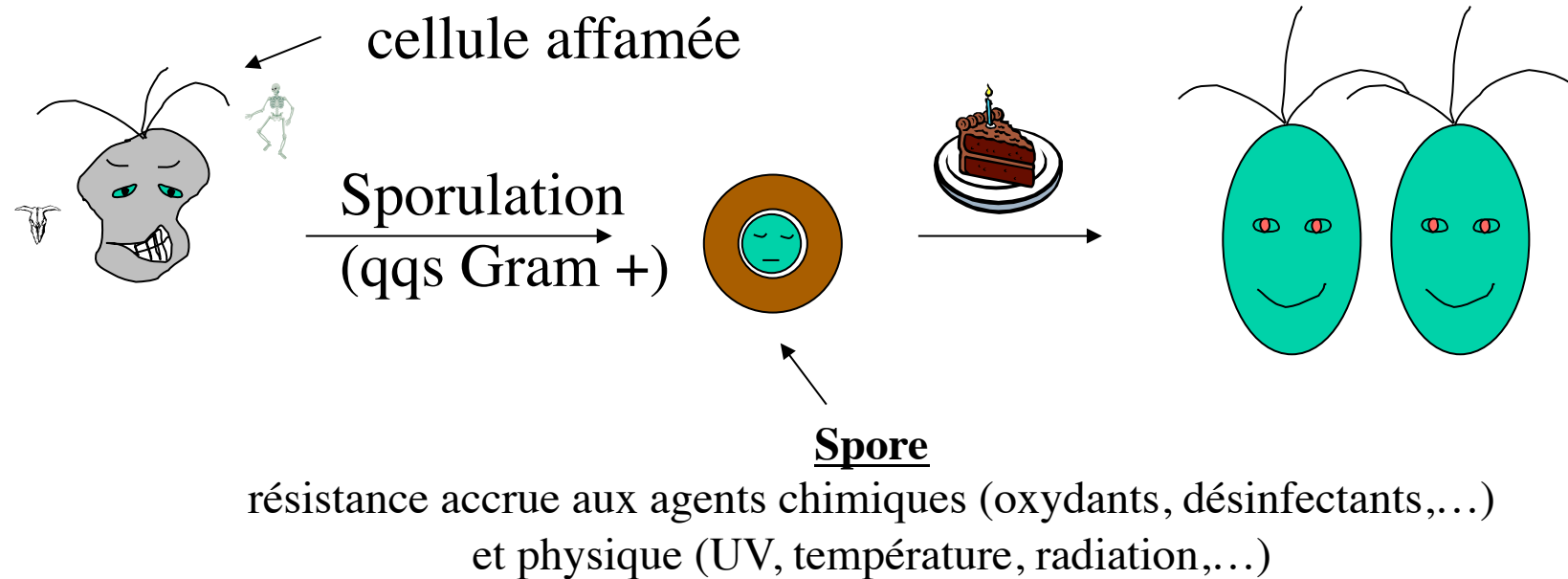
- *NB : événement sous contrôle génétique.*

4. Survie et cultivabilité

- Très souvent en phase de carence, ou de survie suite à un stress, une population de bactéries non cultivables mais semblant vivantes augmente.
- Par exemple après 14 et 21 jours de carence on trouve pour *E. coli* 82 % et 76 % de cellules actives (s'allongent en réponse à une source de nutriments) alors qu'aucune n'est cultivable ($T_0 = 10^7$ UFC mL⁻¹) (Signoretto et al., 2002).
- Dans quel état sont les bactéries alors ? vivantes ou mortes ?
 - état physiologique qui se développe en réponse à des conditions stressantes (= Viable but non culturable = VNBC)

ou

- un état de la vie bactérienne précédant la mort cellulaire ?



- Comment peut-on vérifier la viabilité des bactéries ?

➡ mise en culture (= procédure normalisée des contrôles microbiologiques sanitaires)

5. Hétérogénéité de la population en phase stationnaire

- Changements génotypiques
 - Une courbe de croissance standard montre après la phase stationnaire une chute du nombre de cellules viables puis parfois une rupture dans cette chute. La fraction des cellules survivantes est alors capable de former des colonies après des mois voire des années.
 - il y aurait apparition de mutations permettant à quelques cellules de survivre alors que la majorité de la population meurt. = mutant GASP (*growth advantage in stationary phase*) phénotype (Zambrano et al. 1993, *Science*, **259**:1757).
- Mort programmée (Hengge-Aronis, 2000)
 - une part de la population bactérienne serait entraînée dans une phase de mort programmée, elle servirait de ressources nutritive aux cellules survivantes (croissance cryptique) (Zambrano et Kolter, 1996, *Cell*, **86**:181).
 - implique un système antidote/toxine (entericidine)

6. Conclusions phase stationnaire

- L'étude de la phase stationnaire met en évidence une stratégie d'adaptation spécifique de la bactérie aux conditions de carence nutritive. La cellule est programmée génétiquement pour faire face à l'absence de nutriments.
- Une multitude de gènes est exprimée dès l'entrée de cette phase.
- Régulateur majeur = **facteur σ^S** qui permet à l'ARN polymérase de transcrire les gènes liés à la survie en milieu carencé mais aussi de gènes non spécifiques de la carence nutritive. *e.g.* catalase (réponse au stress oxydant).
- La mise en place de l'ensemble de ces protéines nouvelles peut être considérée comme une « prévoyance » de la cellule pour faire face à des agressions potentielles qu'elle aurait à subir alors qu'elle se trouve dans un état énergétiquement dépendant (temps de réponse plus long, ...).
- Le **facteur σ^S** est en fait exprimé suite à la plupart des stress que peut rencontrer la cellule.

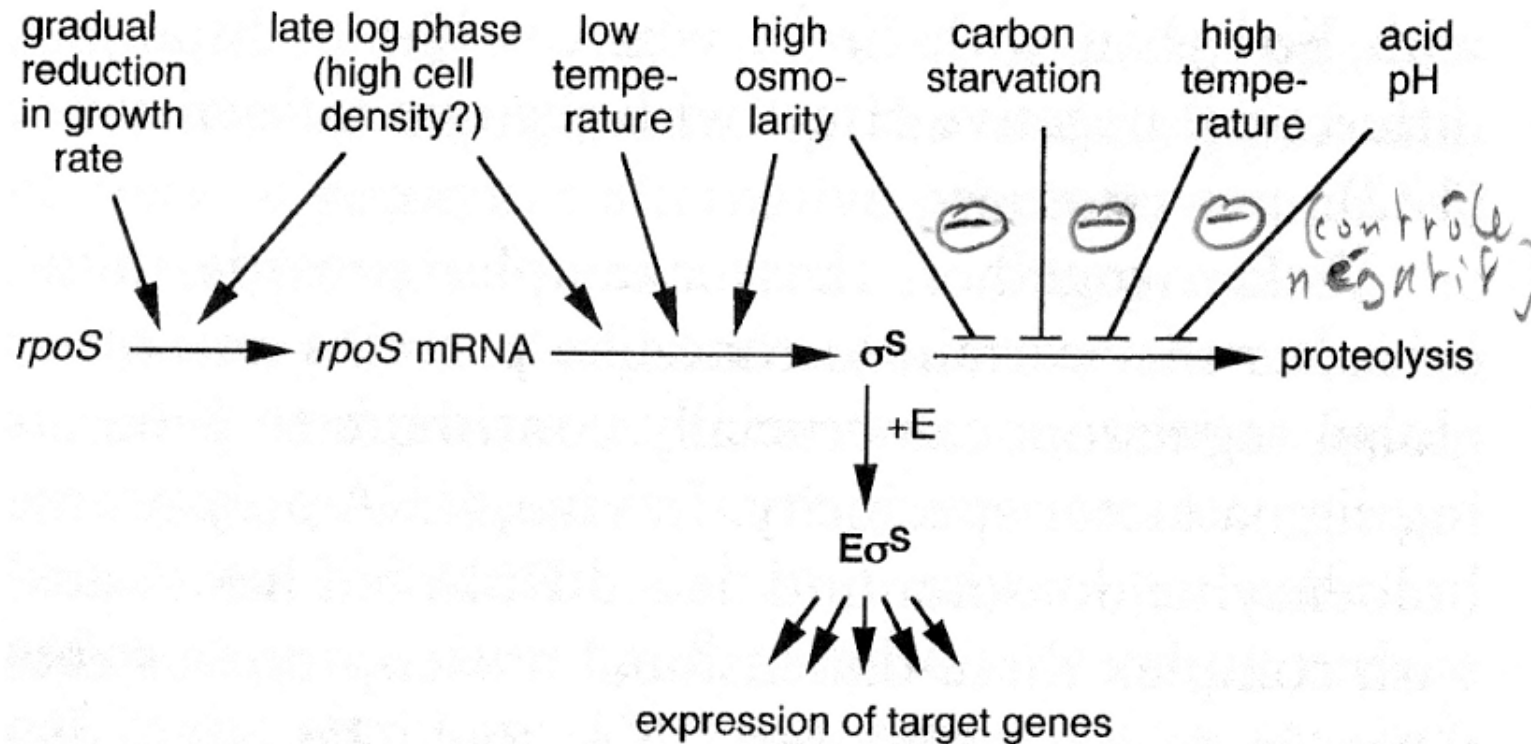


Figure 1. Different stresses activate the general stress response by affecting either transcription, translation, or proteolysis of the master regulator σ^S . (This figure is a modified version of an already published figure [74].)