L'eau de javel et les bactéries

Identification d'une nouvelle cible thérapeutique potentielle

Benjamin Ezraty, Frédéric Barras

Aix-Marseille Université, CNRS, Laboratoire de Chimie Bactérienne, UMR 7283, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, 31, chemin Joseph Aiguier, 13009 Marseille, France.

barras@imm.cnrs.fr

► L'oxygène, sous sa forme dioxygène (O_2), représente 20 % des composants de l'atmosphère. Tous les organismes aérobies l'utilisent pour respirer. Bien que l' O_2 soit très stable et possède une faible réactivité, des dérivés (appelés *reactive oxygen species* [ROS] en anglais) peuvent survenir comme produits dérivés du métabolisme. Parmi ces dérivés on trouve notamment l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($HO^\bullet$). Les ROS peuvent être produits par des rayonnements, *via* la radiolyse de l'eau par exemple, ou par des composés chimiques tels que l'eau de javel ($HOCl$). De par leur réactivité, les ROS peuvent altérer les macromolécules de la vie (ADN, protéines, lipides) et, par conséquent, le fonctionnement des systèmes cellulaires [1] (→).

(→) Voir la Synthèse de C. Migdal et M. Serres, *m/s* n° 4, avril 2011, page 405

C'est pourquoi l'ensemble des organismes vivants se sont dotés de systèmes anti-oxydants, incluant des composés chimiques simples (glutathion, ascorbate, etc.) mais aussi des enzymes (catalases, superoxyde dismutases, peroxydases, etc.) dont l'action vise à piéger ou éliminer les ROS. Un autre type de protection consiste en la réparation des dommages causés par les ROS [2].

La méthionine (Met), soit en tant qu'acide aminé à l'état libre, soit comme résidu d'une chaîne polypeptidique, est une cible privilégiée des ROS qui la convertissent en méthionine sulfoxyde (Met-SO). Les conséquences d'une telle oxydation sont évidemment variables et dépendent du rôle joué par le(s) résidu(s) Met dans la structure ou l'activité de la protéine ciblée. Plusieurs

cas d'inactivation de protéines, soit par déstructuration soit par inhibition de leur activité, ont été rapportés. C'est le cas par exemple de la chaperonne¹ bactérienne GroEL² (*growth*), de la protéine appelée Ffh (*fifty-four homolog*) impliquée dans la translocation des protéines chez les bactéries, ou encore de la calmoduline, protéine centrale dans la régulation du calcium chez les eucaryotes [3]. Au contraire, on peut observer des cas dans lesquels l'action des ROS est bénéfique : par exemple, pour le régulateur HypT (*hypochlorous transcription*), l'oxydation de résidus Met permet de déclencher une voie de régulation permettant de lutter contre ce stress toxique [4]. Il existe un troisième cas de figure correspondant à l'exploitation de l'oxydation des résidus pour absorber les ROS et protéger ainsi l'environnement proche de leurs dégâts. La théorie d'une action des Met comme « éponge » contre le stress oxydant a été proposée par Earl Stadtman dans le cas des protéines, postulant que les résidus Met, à l'intérieur d'un polypeptide, protégeraient les acides aminés voisins [5]. Cette théorie peut également être invoquée pour la Met à l'état libre puisque plusieurs rapports ont fait état du rôle bénéfique de l'ajout de l'acide aminé Met pour l'homéostasie cellulaire [6]. En résumé, l'oxydation des Met peut être neutre, délétère dans le cas de résidus Met fonctionnellement importants, ou bénéfique dans leur rôle d'éponge anti-ROS.

Un niveau de sophistication supplémentaire a émergé au cours de l'évolution : il

existe, dans la quasi-totalité des organismes vivants, un système enzymatique qui rend l'oxydation des Met en Met-SO réversible. Ainsi, les dommages potentiels, dus à la présence de Met-SO délétère, peuvent être prévenus par réduction des Met-SO en Met. Dans le cadre de l'hypothèse de Stadtman citée ci-dessus, la réduction des Met-SO permettrait de réinitialiser le processus, en d'autres termes d'essorer l'éponge.

Une première enzyme permettant la réduction des Met-SO, appelée méthionine sulfoxyde réductase (MsrA), a été découverte au début des années 1980 [7]. Ce système ne conduit cependant qu'à une réparation partielle des protéines oxydées. C'est au début des années 2000 que nous avons identifié une deuxième enzyme, MsrB. Nous avons en effet montré que l'action conjuguée de MsrA et MsrB était nécessaire pour une réparation totale des protéines oxydées [8]. Le fondement de la coopération entre MsrA et MsrB se trouve dans la chimie de l'oxydation de leurs substrats, Met. Le soufre de la chaîne latérale de Met est un atome asymétrique pouvant s'oxyder sous deux formes (R et S)³ donnant ainsi deux formes distinctes : la Met-S-SO et la Met-R-SO. Or, MsrA et MsrB sont chacune dia-stéréo-spécifiques, c'est-à-dire qu'elles ne réduisent efficacement, respectivement, que les formes -S et -R. L'oxydation des résidus Met en -S-SO ou en -R-SO étant *a priori* stochastique, chaque chaîne polypeptidique possèdera autant de chacune des deux formes. Ces études ont conduit au concept de système MsrAB.

¹ Une chaperone permet le repliement des protéines.

² La mutation *gro* a été isolée dans l'étude du cycle lytique du phage lambda.

³ Formant ainsi deux diastéréoisomères dénommés R et S (de *Rectus* et *Sinister*, droit et gauche en latin).

Figure 1. Isolement de révertants phénotypiques Met-SO⁺ par mutations suppressives. Des souches d'*E. coli* (*met msrA msrB msrC bisC*) sont ensemencées sur des boîtes de Petri contenant un milieu de culture en présence de Met ou Met-SO. La souche Met⁻ (auxotrophe pour la méthionine) pousse dans les deux conditions. La souche Met⁻ et MSR⁻ (incapable de transformer la Met-SO en Met) ne pousse qu'en présence de Met. Deux jours après incubation à 37°C, des colonies révertantes capables d'utiliser la Met-SO comme source de Met apparaissent : leur analyse génétique montre qu'elles contiennent une insertion dans un gène régulateur qui permet de réverser le phénotype Met-SO⁻ vers le phénotype sauvage. Met : méthionine ; Met-SO : méthionine sulfoxyde ; MSR : méthionine sulfoxyde réductase.

Il s'agit d'un système ubiquitaire retrouvé des bactéries à l'homme, dont l'importance fonctionnelle a été soulignée tant dans le cadre de l'adaptation des bactéries au stress, de la virulence des bactéries pathogènes, de certaines maladies neuro-dégénératives que dans le vieillissement cellulaire. Le système MsrAB est cytoplasmique chez les bactéries, excepté chez *Neisseria* (bactérie qui regroupe gonocoque et méningocoque). Chez les eucaryotes, plusieurs paralogues⁴ existent et des représentants sont trouvés dans différents compartiments : cytoplasme, chloroplaste, mitochondrie ou lumière du réticulum endoplasmique [9].

Les bactéries sont entourées d'une enveloppe cellulaire dans laquelle, chez les Gram-négatifs, existe un espace intermembranaire appelé périplasme. L'enveloppe a évidemment un rôle de protection mais elle est aussi un lieu d'échange et de structuration de la cellule. C'est aussi un des sites les plus exposés aux toxiques environnementaux, y compris les ROS produits par les autres habitants du même biotope, hôte infecté ou autres bactéries. Dans ce contexte, il était tout à fait surprenant qu'aucun système MsrAB n'ait été

identifié dans ce compartiment dont les protéines sont particulièrement exposées à l'oxydation. C'est en utilisant le modèle *Escherichia coli* et une approche génétique dite de recherche de mutations suppressives « gain de fonction », que nous avons identifié un nouveau système de type Msr ayant des propriétés génétiques et enzymologiques totalement nouvelles et localisé dans le périplasme des bactéries à Gram-négatif [10].

La réduction des Met-SO libres en Met par le système MsrAB permet de compenser une éventuelle carence en Met. C'est sur cette propriété que nous avons basé notre sélection génétique. Une souche auxotrophe⁵ de *E. coli* ne pouvant pas synthétiser la Met, et ne possédant plus les activités MsrAB, a été ensemencée sur un milieu de croissance contenant un mélange des 2 diastéréoisomères Met-S-SO et Met-R-SO. Quelques jours après incubation à 37°C, quelques rares colonies sont apparues, semblant donc avoir regagné la capacité à utiliser le Met-SO (Figure 1). Par cartographie, nous avons alors localisé la mutation conférant cet avantage sélectif. Il s'agit de

l'insertion d'un élément mobile dans un gène régulateur (*yedV*), dont l'inactivation conduit à l'expression d'un opéron⁶ (*yedYZ*) situé immédiatement à côté. Bien qu'ils aient été l'objet de plusieurs études biochimiques et structurales, YedY et YedZ n'avaient, jusqu'alors, aucune fonction physiologique attribuée. Nous avons renommé YedY et YedZ, respectivement MsrP et MsrQ.

Le système MsrPQ présente plusieurs différences avec le système MsrAB. Ce système (1) est constitué de protéines à cofacteurs, molybdène⁷ dans le cas de MsrP, et hème⁸ dans le cas de MsrQ ; (2) est connecté à la chaîne respiratoire dont il détourne les électrons pour accomplir son cycle catalytique ; (3) a la capacité de réduire efficacement les 2 formes diastéréoisomériques -R-SO et -S-SO ; et enfin (4) est localisé dans le périplasme (Figure 2). Par une approche protéomique, nous avons identifié plus de 20 protéines candidates qui pourraient être sous la surveillance de MsrPQ. En prenant comme modèle SurA (*survival*), une protéine chaperonne dont le rôle est crucial dans le maintien de l'intégrité de l'enveloppe cellulaire bactérienne, nous avons montré que cette protéine peut être inactivée par oxydation de ses résidus Met, que cela conduit à une hyper-susceptibilité des bactéries à des ROS mais aussi aux radicaux chlorines contenus dans l'eau de javel, et que l'intervention de MsrPQ était nécessaire pour réparer les dommages.

MsrPQ est ainsi un nouveau système de réparation des dommages causés par divers stress radicalaires qui est situé dans l'enveloppe cellulaire bactérienne et qui présente des propriétés totalement différentes du système orthodoxe MsrAB. De fait, une précédente étude réalisée chez la bactérie pathogène *Campylobacter* avait identifié le gène codant le

⁶ Ensemble de gènes, sous contrôle d'un même promoteur, concourant à la réalisation d'une même fonction. YedV serait un régulateur de la réponse histidine kinase.

⁷ Élément chimique, de symbole Mo et de numéro atomique 42.

⁸ L'hème est un cofacteur formé par une structure aromatique, ou porphyrine, et un atome de métal, permettant de fixer un gaz diatomique. L'hémoglobine, par exemple, contient un hème b permettant de fixer le dioxygène.

⁵ À laquelle il faut fournir un facteur qu'elle ne peut synthétiser, ici Met.

⁴ Produits de gènes homologues issus d'un même gène ancestral.

Figure 2. Modèle d'action du système MsrPQ. L'enveloppe cellulaire d'une bactérie à Gram négatif, comprenant la membrane externe, l'espace intermembranaire (périplasma) et la membrane interne, est représentée. À gauche, la présence de radicaux libres induit un stress oxydatif qui endommage les protéines de l'enveloppe et, en particulier, les résidus méthionine qui sont transformés en méthionine sulfoxyde (représentés sous forme d'écrou rouge). Le système MsrPQ, ancré à la membrane interne et alimenté par les électrons de la chaîne respiratoire, réduit les méthionines sulfoxyde et répare ainsi les protéines (à droite).

système MsrPQ comme un facteur de virulence important mais de fonction inconnue [11]. Notre étude a donc clarifié cette fonction inconnue et ce système étant spécifique aux bactéries, fait émerger MsrPQ comme une potentielle nouvelle cible anti-bactérienne. ♦

How bacteria resist to bleach: a new way of repairing oxidized proteins

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Migdal C, Serres M. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 405-12.
2. Imlay JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem* 2008 ; 77 : 755-6.
3. Drazic A, Winter J. The physiological role of reversible methionine oxidation. *Biochim Biophys Acta* 2014 ; 1844 : 1367-82.
4. Drazic A, Miura H, Peschek J, et al. Methionine oxidation activates a transcription factor in response to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013 ; 110 : 9493-8.
5. Levine RL, Mosoni L, Berlett BS, Stadtman ER. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 15036-40.
6. Ezraty B, Aussel L, Barras F. Methionine sulfoxide reductases in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta* 2005 ; 1703 : 221-9.
7. Brot N, Weissbach L, Werth J, Weissbach H. Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981 ; 78 : 2155-8.
8. Grimaud R, Ezraty B, Mitchell JK, et al. Repair of oxidized proteins: identification of a new methionine sulfoxide reductase. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 48915-20.
9. Lee BC, Dikiy A, Kim HY, Gladyshev VN. Functions and evolution of selenoprotein methionine sulfoxide reductases. *Biochim Biophys Acta* 2009 ; 1790 : 1471-7.
10. Gennaris A, Ezraty B, Henry C, et al. Repairing oxidized proteins in the bacterial envelope using respiratory chain electrons. *Nature* 2015 ; 528 : 409-12.
11. Hitchcock A, Hall SJ, Myers JD, et al. Roles of the twin-arginine translocase and associated chaperones in the biogenesis of the electron transport chains of the human pathogen *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* 2010 ; 156 : 2994-3010.

NOUVELLE

Vers un nouveau paradigme en kinésithérapie ?

Bruno Bonnechère^{1,3}, Bart Jansen^{2,3}, Serge Van Sint Jan¹

¹ Laboratoire d'anatomie, de biomécanique et d'organogénèse (LABO), université libre de Bruxelles, CP 619, route de Lennik 808, 1070 Bruxelles, Belgique ;

² Department of electronics and informatics - ETRO, Vrije Universiteit Brussel, Pleinlaan 2, B-1050 Bruxelles, Belgique ;

³ iMinds, department of medical information technologies (MIT), Gaston Crommenlaan 8 (box 102), B-9050 Ghent, Belgique.
bbonnech@ulb.ac.be

► L'une des caractéristiques de la kinésithérapie et de la révalidation¹ physique est qu'elle implique une participation active des patients, d'une part lors des séances avec le kinésithérapeute, mais aussi et surtout lors de la réalisation d'exercices qu'ils doivent effectuer à domicile. En effet, pour assurer une bonne évolution clinique, la prescription d'exercices à effectuer à domicile en complément des exercices effectués lors de la thérapie en cabinet

est indiquée² pour la prise en charge de la grande majorité des pathologies [1]. Ces recommandations sont relativement bien suivies par les kinésithérapeutes puisqu'on estime que 86 % des patients reçoivent des exercices à effectuer chez eux. Par contre, seulement 48 % des patients effectuent réellement ces exercices, et encore pas totalement puisque le taux moyen d'exercices réellement effectués est de 33 %

par rapport à la prescription [2]. Ce faible taux de participation n'est malheureusement pas le seul problème des exercices à domicile. Un autre problème est qu'ils se font sans surveillance. Cette absence de contrôle peut même mener à un effet pervers si les patients n'effectuent pas correctement les mouvements en induisant des postures vicieuses ou des mouvements parasites. Des solutions doivent donc être développées afin d'augmenter le taux de participation des patients tout en leur permettant un contrôle des exercices afin d'en

¹ Réadaptation.

² *Vade-mecum* de kinésithérapie et de rééducation fonctionnelle.