

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

***Adaptation de bactéries pathogènes aux conditions  
d'infection (régulation de la synthèse de facteurs de  
virulence)***

***Master 1 Ecologie Microbienne***

***Dr. R. ALATOU***

# Les toxines bactériennes membranolytiques sécrétées

## 1 Définition

Les toxines bactériennes membranolytiques sont généralement mises en évidence grâce à leur capacité à lyser les érythrocytes *in vitro*, d'où leur nom d'hémolysines, mais un grand nombre d'entre elles agissent également sur d'autres cibles cellulaires. Elles sont qualifiées de membranolytiques car elles ont pour propriété de dégrader ou de désorganiser les membranes cytoplasmiques, provoquant l'altération de l'activité physiologique cellulaire, voire la destruction de la cellule par rupture physique de la membrane, d'où leur autre nom de cytolysines. D'un point de vue cellulaire, les hémolysines peuvent être à l'origine d'effets variables : déclenchement de l'apoptose par la cellule cible, perturbation des défenses immunitaires non-spécifiques et spécifiques, ou encore la dérégulation de système physiologique (comme la transduction membranaire) (Alouf, 2000a; Titball, 1993).

Leur rôle principal serait de permettre à la bactérie d'acquérir du fer dans un microenvironnement déficient, mais certaines sont devenues des facteurs de virulence redoutables (Alouf, 2000a; Alouf, 2000b; Rowe et Welch, 1994).

**Trois classes d'hémolysines** sont actuellement répertoriées : **les toxines formant des pores au sein de la membrane de la cellule cible, les toxines à activité détersive et les toxines à activité enzymatique.**

## 2 Les hémolysines formant des pores membranaires ou pore-forming toxin (PFT)

Les PFT ont été identifiées chez de nombreux organismes comprenant les bactéries, les plantes, les champignons et les animaux et peuvent montrer, dans certains cas, des homologies de structure et/ou de fonctionnement malgré la distance évolutive (Menestrina *et al.*, 2001). Chez les bactéries, le groupe des PFT constitue le groupe majoritaire des toxines caractérisées (Alouf, 2000a). Le mécanisme global des PFT consiste en l'insertion des molécules de toxines dans la bicouche lipidique de la membrane cytoplasmique, suivie d'une oligomérisation des molécules de toxines qui entraîne la formation de canaux ou pores (Alouf, 2003; Hughson, 1997). Le pore est constitué par l'assemblage des toxines dans une structure amphiphile avec une face hydrophobe

exposée vers la membrane et une face hydrophile qui borde le canal (Alouf, 2000a).

Il existe deux « familles » de PFT (Aerolysine-like et toxine liant le cholestérol)

*P. aeruginosa* produit une cytotoxine (CTX) qui appartient à la famille des aerolysine-like (**se sont pore-forming toxin produite principalement par aeromonas hydrophila**). Le gène codant cette toxine est situé dans une région correspondant à l'intégration d'un phage tempéré. Il s'agit d'une protéine de 29 kDa synthétisée sous forme de pro-toxine de 31,7 kDa (pro-CTX) associée à la cellule (Ohnishi *et al.*, 1994). La structure primaire de la protéine présente de nombreux feuillets- $\beta$  antiparallèles et rappelle celle de l' $\alpha$ -toxine de *St. aureus*. Cependant le pore formé par CTX n'est pas un heptamère mais un pentamère de 145 kDa (Sliwinski-Korell *et al.*, 1999). CTX présente une activité létale chez la souris et une cytotoxicité importante vis-à-vis des leucocytes et différents types cellulaires (Hayashi *et al.*, 1989; Lutz *et al.*, 1993), mais ne présente pas d'activité hémolytique vis-à-vis des érythrocytes humains (Sliwinski-Korell *et al.*, 1999). Actuellement, aucune PFT n'a été identifiée chez *P. fluorescens*.

### 3 Les hémolysines à activité détersive

Les toxines à activité détersive sont des molécules amphiphiles (**ayant un groupe hydrophile et un groupe hydrophobe**). Cette propriété leur permet de solubiliser les membranes cytoplasmiques par une action détergente. L'activité détersive de la toxine dépend directement de la structure de la protéine. Il arrive parfois qu'une même toxine présente deux activités cytotoxiques distinctes, mais finalement synergiques. La bactérie pathogène de champignons *Pseudomonas tolaasii* sécrète une toxine peptidique de 1985 Da impliquée dans la maladie de la tache brune, la tolaasine (Rainey, 1991). La tolaasine est une toxine doublement efficace car sa structure présente des propriétés de surfactants (**modification de la tension superficielle entre deux surface**), et lui permet également de former des pores membranaires (Cho *et al.*, 2007). Ceci est également le cas de la surfactine de *B. subtilis*, un cyclolipopeptide anionique d'environ 1000 Da. Ce biosurfactant forme des canaux anioniques dans la bicouche membranaire. Les charges négatives portées par la molécule se lient avec des cations métalliques, ce qui provoque la micellisation (**micelle : molécules avec une tête polaire hydrophile dirigée vers le solvant et une tête hydrophobe dirigée vers l'intérieur**) de la molécule et optimise l'interaction avec la membrane des érythrocytes (Meylheuc *et al.*, 2001).

### 4 Les hémolysines à activité enzymatique

Ces hémolysines regroupent essentiellement des phospholipases. Celles-ci sont des enzymes largement répandues, à la fois chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Titball, 1993). La fonction des phospholipases est très variable, allant de la digestion de nutriments (acquisition du phosphate et source de carbone) à la formation de molécules bioactives (Istivan et Coloe, 2006). Chez les bactéries pathogènes, elles peuvent avoir un rôle central dans la mise en place de l'infection et sont généralement considérées comme facteur de virulence important (Schmiel et Miller, 1999; Songer, 1997). Elles agissent en dégradant les phospholipides membranaires, ce qui provoque une déstructuration de la membrane cytoplasmique.

- **Cytotoxicité des phospholipases**

En plus de l'effet « mécanique » opéré sur la membrane, les produits libérés après l'hydrolyse des phospholipides participent à la toxicité de l'enzyme et provoquent parfois d'importantes perturbations physiologiques. L'acide arachidonique, libéré après l'action des phospholipases, est un élément précurseur de la synthèse des eicosanoïdes, molécules à l'origine d'une modulation locale de la réponse immunitaire. Lorsque cette réaction inflammatoire devient trop importante, l'hôte peut subir un choc septique (**défaillance cellulaires aigue**). Le diglycéride (DAG) libéré par l'action de PLCs contrôle l'activation de la protéine kinase C, qui est impliquée dans un nombre important de processus cellulaires (croissance, activation des neutrophiles et des macrophages) (Schmiel et Miller, 1999; Songer, 1997).

Enfin, certaines phospholipases peuvent induire les molécules de l'immunité telles que les cytokines (IL-8, TNF- $\alpha$ , PAF), ce qui provoque une « sur-stimulation » du système immunitaire (Schmiel et Miller, 1999).

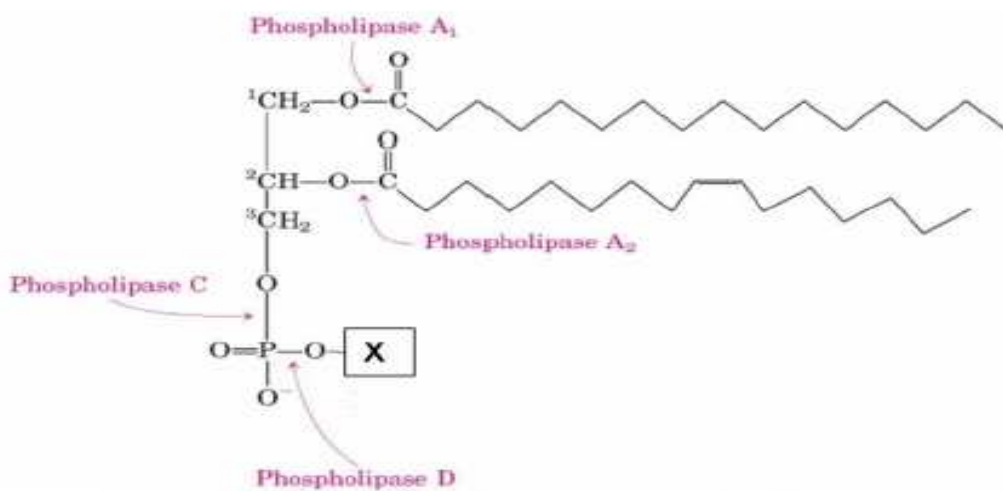
- **Implication des phospholipases dans la virulence bactérienne**

Les phospholipases participent à la virulence d'un nombre important de pathogènes. Bien que leur implication dans la pathogénie de ces bactéries ait été établie et que les enzymes soient identifiées, le rôle exact et surtout le mécanisme d'action *in vivo* ne sont pas encore clairement élucidés. Les PLD sont très rarement rencontrées chez les procaryotes mais lorsqu'elles sont présentes, elles jouent obligatoirement un rôle dans la virulence. Récemment, une PLD a été mise en évidence chez *P. aeruginosa*. Elle permettrait au pathogène de persister dans l'organisme lors d'infections pulmonaires chroniques (Wilderman *et al.*, 2001). Les phospholipases impliquées dans la

pathogénie bactérienne les plus fréquemment retrouvées sont **les phospholipases A** qui hydrolysent la fonction acide gras au niveau de la fonction alcool primaire (PLA1) ou secondaire (PLA2) du glycérol, libérant un acide gras (l'acide arachidonique) et un lysophospholipide. Les phospholipases qui possèdent les deux activités PLA1 et PLA2 sont nommées PLB. Les PLC et PLD hydrolysent le phospholipide au niveau du groupement phosphate (Figure 1). PLD lyse la fonction ester entre la fonction acide du phosphate et l'alcool, libérant un phosphatidate et un alcool tandis que les PLC hydrolysent en amont du groupement phosphate et libère un diglycérade (le DAG) et un phosphoalcool et **les phospholipases C**.

## 5 Les phospholipases C bactériennes (PLC)

Les phospholipases C (PLCs) sont certainement les phospholipases les plus étudiées. De nombreux travaux ont été entrepris principalement *in vitro* dans le but de comprendre leur mécanisme d'action *in vivo*. Les comparaisons de séquences, de spécificité de substrats, de cibles cellulaires permettent d'établir une relation structure-fonction de ces enzymes. Actuellement, au moins trois classes de PLCs sont répertoriées. Les phospholipases C hydrolysant le phosphatidylinositol (les PIPLC) représentent un groupe à part de PLCs (Figure 1) (Griffith et Ryan, 1999).



**Schéma des différents sites de clivage des phospholipides par les phospholipases. X : groupement polaire. Les flèches indiquent les sites de clivage des différentes enzymes.**