

Les mutants de la toxine du charbon : une nouvelle approche thérapeutique ?

La sécrétion de protéines toxiques joue un rôle important dans la symptomatologie de nombreuses infections bactériennes. C'est le cas de *Bacillus anthracis*, responsable du charbon, une zoonose bactérienne touchant les herbivores et transmissible à l'homme, ce qui lui a valu pendant longtemps le nom de maladie des cardeurs de laine. Chez l'homme, l'infection peut être locale (en particulier cutanée) ou systémique. La forme la plus grave est due à l'inhalation de spores et conduit à une septicémie d'évolution presque toujours mortelle. Son origine accidentelle rend difficile la définition de populations à risque et aléatoires les possibilités de traitement. D'où l'intérêt d'un abord thérapeutique suggéré par des chercheurs du département de microbiologie de Harvard (Boston, MA, USA) qui ont identifié un mutant dominant négatif de la toxine, susceptible d'en inhiber la pénétration dans les cellules [1, 2]. La toxine des bacilles de l'anthrax (Atx) est un collectif de trois protéines, un antigène protecteur (PA), le facteur léthal (LF), et le facteur d'œdème (EF). Aucune n'est toxique individuellement, mais leur combinaison, binaire ou trinaire, entraîne un état de choc, puis la mort, PA assurant la translocation à travers les membranes cellulaires vers le cytosol des deux autres facteurs. LF est une métalloprotéase à Zn^{2+} qui clive de nombreuses isoformes de MAPKKK (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*) (*m/s* 1999, n° 10, p. 1155), et détruit les macrophages. EF une adénylate cyclase activée par la calmoduline, responsable d'œdème. Les deux facteurs interfèrent avec la capacité des macrophages et des neutrophiles

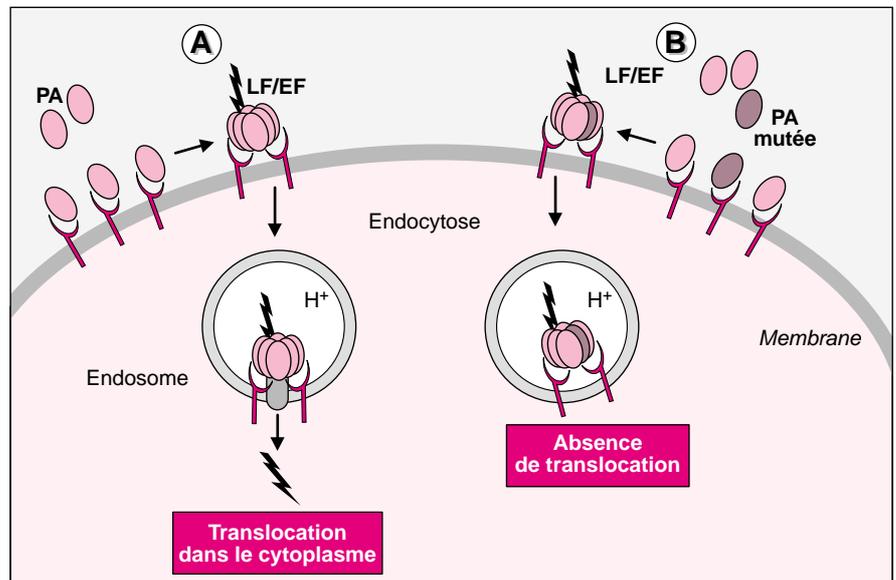


Figure 1. **Mode d'action de la toxine de *Bacillus anthracis*.** La toxine de *Bacillus anthracis* est formée de trois sous-unités, un antigène protecteur (PA), le facteur léthal (LF) et le facteur d'œdème EF, qui circulent dans le sang de l'hôte infecté. **A.** Les monomères PA se lient à leur récepteur à la surface de la cellule hôte, puis forment un heptamère en anneau qui constitue un « pré-pore ». À ce pré-pore se lient les facteurs LF et EF. Le complexe ternaire subit alors un processus d'endocytose. Le pH acide des endosomes induit une modification de la conformation de l'heptamère qui forme un véritable pore à travers la membrane de l'endosome par lequel les facteurs toxiques LF et EF sont largués vers le cytosol. **B.** L'introduction dans l'heptamère d'une seule sous-unité à caractère dominant négatif ne modifie ni la fixation à la membrane ni l'étape de polymérisation. Elle interfère en revanche avec la transition de conformation et la formation du pore, empêchant ainsi la pénétration de LF et EF dans la cellule.

à lutter contre l'infection bactérienne, permettant ainsi au bacille de se multiplier rapidement dans le sang. Les trois protéines sécrétées par *B. anthracis* sont des monomères qui s'assemblent spontanément à la surface de la cellule hôte, PA se liant

à son récepteur et étant activée par une protéase de type furine. Sa forme activée PA_{63} forme spontanément des heptamères $(PA_{63})_7$ qui se disposent en anneaux, et c'est à ces anneaux que se lient par une liaison de forte affinité LF et EF. La translo-

cation du complexe se fait alors par un processus d'endocytose. Le pH acide des endosomes entraîne une modification de la conformation du complexe heptamérique qui s'arrime à la membrane endosomique et forme un pore perméable permettant la translocation vers le cytosol de LF et EF (figure 1A).

Un travail précédent, de la même équipe de R.J. Collier avait étudié la structure de ce complexe protéique et mis en évidence l'existence de mutations de PA, toutes situées dans le même domaine de la molécule, s'opposant spécifiquement à la modification de conformation et à la formation des pores, sans cependant entraver les autres étapes du processus, activation de PA et formation d'heptamères [3]. L'hypothèse était que certains de ces mutants, incapables à opérer la translocation, pourraient former des hétéroheptamères avec le PA sauvage et, dans ce cas, s'ils s'avéraient dominants négatifs, inhiber la translocation. Pour tester cette hypothèse, les auteurs ont d'abord effectué des mélanges en proportions variables de chacun des mutants PA et de la forme native, et ont mesuré en culture le potentiel de chaque mélange à libérer dans le cytosol un ligand cytotoxique. Ce ligand était une protéine de fusion entre le domaine de liaison au PA de LF et le domaine catalytique de la toxine diphtérique (dont l'action est d'inhiber la synthèse protéique). Quatre sur six de ces mutants diminuaient de façon importante l'action cytotoxique du ligand, deux mutations ponctuelles, un double mutant, et une délétion de la même région. Des résultats similaires ont été obtenus avec des homo- et hétéro-heptamères de protéines PA natives et mutantes et les résultats expérimentaux suggéraient qu'une seule molécule PA mutante introduite dans l'heptamère avait un effet dominant négatif et était suffisante pour l'inactiver et inhiber la translocation. L'étape ultérieure a été un essai *in vivo*, chez le rat, d'inhibition de la toxine. Après avoir déterminé la dose létale en environ 90 minutes de l'injection d'Atx, les auteurs ont montré que l'addition au mélange d'un mutant dominant négatif de PA (jusqu'à une

stoechiométrie de 0,25 pour 1) permettait une survie sans aucun symptôme. Il restera à montrer pendant combien de temps après l'injection de *B. anthracis*, celle d'un mutant peut encore être efficace.

Ainsi, l'introduction d'une mutation connue dans quelques sous-unités PA de cette toxine oligomérique est capable d'inhiber son action, sans empêcher l'oligomérisation, ni la fixation à la membrane, mais en bloquant la transition de conformation indispensable à la formation de pore et à la translocation vers le cytosol des facteurs toxiques (figure 1B). Dans le cas de *Bacillus anthracis*, dont la toxine est libérée dans le sang, on pourrait envisager que l'administration de PA mutantes puissent protéger le patient atteint, même quand l'infection est déjà à un stade avancé. D'autant plus que l'on sait déjà que la protéine PA n'est en soit pas toxique et est produite pour fabriquer le vaccin. Enfin, un tel mécanisme dépasse évidemment le problème de l'anthrax, et pourrait s'appliquer à d'autres toxines bactériennes qui s'assemblent, comme Atx, à la surface de la cellule hôte et contre lesquelles on peut imaginer une protection du même type : différents *Clostridium*, mais aussi *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Helicobacter pylori*... Une relève pour la résistance croissante aux antibiotiques ?

1. Sellman BR, Mourez M, Collier RJ. Dominant-negative mutants of a toxin subunit : an approach to therapy of anthrax. *Science* 2001 ; 292 : 695-7.
2. Plsnes S, Wesche J. Fighting anthrax with a mutant toxin. *Science* 2001 ; 292 : 647-8.
3. Sellman BR, Nassi S, Collier RJ. Point mutations in anthrax protective antigen that block translocation. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 8371-6.

Dominique Labie

Inserm U. 129, CHU Cochin, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75674 Paris Cedex 14, France.