

Janvier 2007

Bulletin, no: 17

LES TOXINES BACTERIENNES

Bien que découvertes il y a plus d'un siècle, en même temps que les premiers microbes pathogènes, les toxines bactériennes font encore bien des ravages.

Le danger des toxines tient à leur efficacité spectaculaire: 1 mg de toxine botulinique suffirait pour tuer 1000 tonnes de matière vivante, et 100 g pour supprimer toute vie humaine.

Cette activité foudroyante s'accompagne d'une spécificité d'action remarquable: chaque toxine n'agit que sur une ou des structures cellulaires particulières.

**Par Bernard Bizzini et André Turpin
LA RECHERCHE no 67, de mai 1996**

■ En 1872, Klebs soupçonna des produits solubles du métabolisme bactérien, qu'il appela « sepsines », d'être à l'origine des lésions dues à l'infection par les staphylocoques. Il venait de découvrir une toxine bactérienne. Mais ce n'est qu'en 1888 que Roux et Yersin employèrent le nom de « toxine » pour désigner une substance mortelle pour le cobaye, présente dans les filtrats de culture du bacille diphtérique (*Corynebacterium diphtheriae*). A la découverte de la toxine diphtérique devait bientôt s'ajouter celle de la toxine tétanique, en 1890, et celle de la toxine botulinique, en 1896. Au fur et à mesure que le nombre de toxines connues augmentait, on a ressenti le besoin d'une définition et d'une classification pour ces poisons bactériens. Dans le langage populaire, on donne le nom de « toxine » à toute substance toxique produite par des organismes vivants. Dans le langage du spécialiste, le terme de toxine a été restreint aux substances qui, en plus de leur caractère toxique intrinsèque, sont capables d'induire chez un animal receveur la formation d'anticorps spécifiques.

Endotoxines et exotoxines.

Les toxines ont tout d'abord été divisées en deux grandes catégories sur la base de leur localisation à l'extérieur ou à l'intérieur de la cellule bactérienne. Les premières, qui interviennent par exemple dans le tétanos, le botulisme et la diphtérie, sont excrétées dans le milieu de culture au cours de la croissance du micro-organisme. Elles constituent la classe des exotoxines. Les secondes, qui sont impliquées dans certaines infections comme la typhoïde, n'apparaissent pas normalement dans le milieu de culture, sauf à la faveur de la lyse bactérienne, et doivent de ce fait être extraites des bactéries. Elles sont groupées sous le nom d'endotoxines. La purification et l'analyse biochimique de ces deux classes de toxines a également montré une différence de nature chimique. Dès 1946, la nature protéique d'une exotoxine, la toxine botulinique A, était démontrée après qu'elle eut été cristallisée. La purification des autres exotoxines a confirmé leur caractère d'holoprotéines (protéines dépourvues de groupement prosthétique et donc

composées uniquement d'acides aminés. En revanche, la composition chimique des endotoxines n'est pas simple. Il s'agit de complexes lipidopolysaccharidoprotéiques. De plus, alors que les endotoxines possèdent toutes les mêmes propriétés toxicologiques, les exotoxines ont chacune une pharmacologie propre. Nous limiterons ici notre propos aux exotoxines, ou toxines protéiques.

En pathologie infectieuse, l'importance des exotoxines s'est imposée du jour où l'on a reconnu qu'un symptôme, et même le tableau clinique d'ensemble d'une infection, pouvait être reproduit par l'injection de substances uniques ou multiples élaborées par l'agent pathogène. Dans le botulisme, par exemple, la symptomatologie est due entièrement à l'ingestion de la toxine préformée, comme cela peut avoir lieu à la faveur de la consommation d'un aliment contaminé par *Clostridium botulinum*. De même, dans le tétanos, le germe n'envahit pas l'organisme, mais il reste localisé au niveau de la porte d'entrée où il produit sa toxine. La toxine ainsi produite va cheminer dans l'organisme jusqu'aux cellules sensibles (cellules cibles) et déclencher les désordres spécifiques à son action. A l'inverse, *Clostridium perfringens*, responsable en particulier de la gangrène gazeuse, est doué d'un très grand pouvoir d'invasion, et il peut pratiquement coloniser tous les organes. Le germe infectieux produit des poisons multiples qui vont chacun déterminer leurs effets caractéristiques par action enzymatique directe sur les constituants de l'organisme. Les toxines produites par *Clostridium perfringens* provoquent les lésions typiques de la gangrène gazeuse, à l'exception de l'œdème et de la production de gaz, qui sont la conséquence du métabolisme bactérien lui-même.

Cent grammes de toxine permettent de supprimer toute vie humaine.

La caractéristique la plus frappante des toxines bactériennes est leur pouvoir toxique extrêmement élevé. Ainsi les toxines botuliniques et la toxine tétanique sont des poisons si toxiques que l'on a calculé que 1 milligramme de toxine suffirait à tuer 1 000 tonnes de matière vivante. Il s'ensuit, par extrapolation à l'homme de ces valeurs de toxicité déterminées chez l'animal, que 100 grammes de toxine devraient permettre de supprimer toute vie humaine à la surface du globe. Ces toxines sont environ 15 000 fois plus actives, à poids égal,

que la substance chimique la plus toxique, l'aconitine. Une molécule de toxine est 20 millions de fois plus toxique qu'une molécule d'aconitine (tableau 1). Cette activité effarante est accompagnée d'une spécificité d'action remarquable. Chaque toxine provoque des symptômes particuliers, liés à l'affinité de la toxine pour des structures cellulaires ou des cellules particulières. Les toxines les plus toxiques, à savoir les toxines botulinique, tétanique, dysentérique, sont des neurotoxines, encore que la dernière soit plutôt un poison vasculaire. Elles agissent spécifiquement sur le système nerveux, mais leur mécanisme d'action diffère. Les toxines streptococcique et staphylococcique ont pour point d'impact les membranes cellulaires, et elles exercent principalement un effet hémolytique. Les toxines produites par *Clostridium perfringens* agissent de façon très diverse : dans leurs actions les plus marquantes, elles sont toxiques, hémolytiques, nécrotiques, myotoxiques, neurotoxiques, hépatotoxiques, etc. La toxine diphtérique exerce ses effets en bloquant la synthèse protéique dans les cellules.

Comme toutes les protéines, les exotoxines sont douées de pouvoir antigénique. De plus, par certains traitements, il est possible de leur faire perdre leur activité toxique, sans altérer leur caractère antigénique. Elles deviennent des anatoxines ou vaccins. Les anticorps — ou antitoxines — produits chez un organisme vivant en réponse à leur administration peuvent être de deux types. Si la combinaison toxine - antitoxine, qui aboutit à la formation d'un précipité (floculation), ne s'accompagne pas de la neutralisation de la toxicité, on parle d'anticorps précipitants, mais non neutralisants. Si elle aboutit à la neutralisation de la toxine, les anticorps sont dits neutralisants. La reconnaissance de l'existence de ces deux types d'anticorps revêt, en plus de l'intérêt purement pratique relatif à la composition des sérums thérapeutiques, une importance théorique pour l'étude du mécanisme de la neutralisation de l'activité toxique.

La naissance des toxines.

On ne connaît pas encore la signification de la production des toxines dans l'économie des bactéries. Cependant, l'étude des relations existant entre toxinogénèse et croissance a permis de mieux comprendre certains aspects de la physiologie de ce processus.

Pour un certain nombre de bacté-

ries, on a observé que la synthèse de la toxine exigeait la présence dans le milieu de culture de facteurs particuliers, les facteurs de toxinogénèse. En leur absence, la toxine n'apparaît pas dans le milieu de culture, ou elle n'apparaît qu'en quantité très faible. Si la nature chimique exacte de ces facteurs n'est pas encore élucidée, ils semblent toutefois appartenir à la classe des peptides. Il est légitime de penser que ces facteurs devraient normalement être présents dans l'organisme infecté pour que le germe puisse développer sa capacité à produire la toxine. L'identification complète de ces facteurs de toxinogénèse permettra, sans doute, de mieux contrôler le processus d'intoxication in vivo.

Dans le cas des toxines des clostridies, il existe une relation entre le processus de sporulation et la synthèse de la toxine, ce qui tend à indiquer qu'elles peuvent assumer un rôle physiologique dans la vie de la cellule. Le processus de la sporulation comprend plusieurs stades. Dans certaines conditions expérimentales, il est possible d'isoler des mutants de bactéries sporogènes, chez lesquels la sporulation est bloquée à un stade déterminé. C'est ainsi que Sebald et Schaeffer, à Paris, ont observé que certains de ces mutants, à sporulation incomplète, étaient de faibles producteurs de toxine, contrairement au type sauvage sporulant et toxino-gène. De plus, la réversion des mutants avec la récupération de la capacité à sporuler s'accompagne également de celle à synthétiser la toxine. L'entérotoxine de *Clostridium perfringens* représente un cas unique, car elle n'est pas formée pendant la phase végétative de croissance, mais seulement au cours de la sporulation. Dans ce cas, il a été bien établi par Duncan aux Etats-Unis que la synthèse de l'entérotoxine est sous la dépendance d'un gène spécifique de la sporulation. Il se pourrait donc que la formation de certaines toxines bactériennes soit une étape nécessaire à la sporulation. Comme la formation des spores constitue un caractère de résistance pour la bactérie, la synthèse de la toxine concourrait par ce biais à la survie de l'espèce. Cependant, il est encore difficile de décider si la toxine ne s'est pas accumulée dans le sporangium et si la libération ne coïncide pas tout simplement avec celle des spores. Une autre explication serait que la toxine constitue un produit du catabolisme du processus de sporulation. Autant de questions stimulantes pour des recherches ultérieures.

Certains phages portent le gène de la toxine diphtérique.

Un autre cas exemplaire est celui de la biosynthèse de la toxine diphtérique. Les souches non toxigènes de *Corynebacterium diphtheriae* sont converties en souches toxigènes lors de leur infection par un bactériophage (ou phage), qui est un virus doué de pouvoir infectieux pour une bactérie donnée. L'infection d'une bactérie sensible par un phage aboutit à la mort de celle-ci par lyse, à la suite de la reproduction du phage à l'intérieur de son cytoplasme. Cependant, on a observé que l'infection phagique pouvait n'entraîner la lyse que d'une fraction de la population bactérienne infectée. Les bactéries résistantes présentent donc une immunité spécifique à l'égard du phage ; on les appelle des bactéries lysogènes. La lysogénie est liée à l'incapacité de la cellule bactérienne à reproduire le phage, qui est dit alors tempéré. Le phage tempéré bêta porte le gène de structure pour la toxine diphtérique. Cependant, il semble que la relation toxinogénèse-diphtérique-phage soit plus complexe, car le taux de toxine produit dépend de l'état physiologique de la cellule, et plus particulièrement du taux de fer dans le milieu de culture. Il apparaît probable que le gène viral codant pour la toxine diphtérique est contrôlé indépendamment des autres gènes du phage bêta. Dans ce contrôle interviendrait une protéine synthétisée par la bactérie hôte elle-même. Cette protéine fixant le fer se combinerait avec la région contrôle du DNA phagique afin d'empêcher l'expression du gène codant pour la toxine diphtérique lorsque du fer est présent dans le milieu de culture. Divers auteurs, Hondo, Nishizaka, Hayaishi et Kato, Uchida, Gill, Pappenheimer, sont parvenus à isoler des mutants du phage bêta qui, après lysogénéisation du bacille diphtérique, conduisent à la formation de protéines non toxiques, mais apparentées immunologiquement à la toxine diphtérique. On a donné à ces protéines le nom de « cross-reacting materials » (CRM) : substances donnant des réactions croisées. Si de telles bactéries sont surinfectées par des phages non mutés, on observe la production concomitante de toxine et de CRM. Ces recherches ont été complétées récemment par des études très élégantes, au cours desquelles Murphy, Pappenheimer, Tayart de Borms d'une part, Lightfoot et Iglewski de l'autre, ont réussi à induire la synthèse in vitro de toxine diphtérique et de CRM dans des systèmes acellulaires de synthèse

des protéines. Ces systèmes extraits de *Escherichia coli*, germe non apparenté à *Corynebacterium diphtheriae*, ont été additionnés de DNA isolé, à partir du phage bêta ou d'un de ses mutants. D'autres expériences ont montré que l'on pouvait induire la synthèse de toxine ou de CRM dans ces mêmes systèmes par addition de RNA isolé de cellules de *Corynebacterium diphtheriae* infectées par du phage bêta ou par un de ses mutants.

Ces travaux permettent de distinguer les facteurs spécifiques à l'hôte de ceux spécifiques au phage qui sont impliqués dans le contrôle de la synthèse de la toxine.

Les cellules sensibles aux toxines possèdent des récepteurs particuliers.

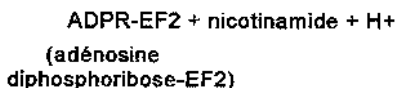
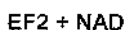
Si l'on ne connaît pas encore très bien le mode d'action des toxines, on sait qu'il met en jeu des interactions avec la cellule cible au niveau de récepteurs. Dans le cas des toxines, on peut précisément profiter de la grande spécificité de ces interactions pour les isoler et les purifier. En effet, au cours de ces dernières années, on a tiré parti de la spécificité d'action de certaines protéines (en général des enzymes) pour créer une méthode de purification : la chromatographie d'affinité. Celle-ci peut être utilisée avec les toxines puisqu'elles agissent de façon spécifique. Elle indique en particulier que l'entité moléculaire isolée est bien celle se fixant sur le récepteur. En effet, les cellules sensibles possèdent, habituellement, des récepteurs qui leur permettent de fixer une toxine particulière. Pour la toxine tétanique et la toxine cholérique, ces récepteurs sont des gangliosides. Du point de vue chimique, les gangliosides sont constitués de résidus cérébrosides (acides gras aliphatiques à longues chaînes + sphingosine + glucose), couplés à des résidus d'oligosaccharides.

Le ganglioside fixé sur un support insoluble a déjà servi à Cuatrecasas, Parikh et Hollenberg, aux Etats-Unis, à la purification élective de la toxine cholérique pour l'étude de sa structure. La toxine diphtérique, quant à elle, agit en catalysant une réaction nécessitant du NAD (nicotinamide adénosine diphosphate). Une colonne d'affinité renfermant du NAD comme groupement actif a permis à Cukor, Readie et Kuchler, aux Etats-Unis, de purifier la toxine diphtérique, et ce procédé devrait pouvoir s'appliquer à la séparation du fragment possédant l'activité enzymatique, le fragment A.

La même colonne pourrait servir, inversement, à isoler des fragments non liés à l'activité enzymatique qui ne sont pas adsorbés. De telles méthodes se prêtent également à l'exploration in vitro des interactions toxine - récepteur.

Plusieurs toxines doivent être « entaillées » pour devenir actives.

Le mode d'action des toxines est encore fort mal connu, sauf dans le cas de la toxine diphtérique. L'histoire de cette toxine est tout à fait exemplaire. Strauss et Hendee signalent, en 1959, que l'addition de toxine diphtérique à des cellules eucaryotes en culture (cellules HeLa) était bientôt suivie de l'arrêt des synthèses protéiques. Quelques années plus tard, Collier à Los Angeles reconnaissait que le NAD était nécessaire à l'action in vitro de la toxine diphtérique. Il identifiait la molécule cible dans la cellule eucaryote au facteur d'élongation 2 (EF2) ; ce facteur permet, lors de la synthèse des protéines, l'addition d'un résidu d'acide aminé à la chaîne peptidique naissante (son inhibition se traduit par l'interruption de la formation des liaisons peptidiques). Les cellules procaryotes dépourvues de EF2 sont insensibles à la toxine. Puis Honjo et ses collaborateurs, aux Etats-Unis, établissaient en 1968 que la toxine diphtérique inhibe le facteur EF2 en catalysant la réaction,



Il est probable que l'inhibition du facteur d'élongation EF2 est la cause primaire de la mort cellulaire, condui-

sant finalement à celle de l'organisme intoxiqué par la toxine diphtérique. La molécule de toxine diphtérique est excrétée dans le milieu de culture sous forme d'une chaîne polypeptidique unique de poids moléculaire 62 000 daltons. Cette molécule biologiquement inactive peut subir la rupture d'une liaison peptidique sous l'action des protéases du milieu de culture. Les deux morceaux peptidiques ainsi formés restent liés par un pont disulfure. La toxine est alors dite « entaillée » (« a nicked toxin »), et elle est toxique. Par action d'un agent réducteur, on peut libérer de la toxine entaillée les deux fragments qui la composent, à savoir les fragments A et B ; le fragment A, de poids moléculaire 24 000 daltons, exerce l'activité enzymatique de la toxine. Le fragment B, de poids moléculaire 38 000 daltons, est probablement responsable de la reconnaissance des cellules sensibles, et le mélange des fragments A et B séparés n'est pas toxique.

Le modèle structural de la toxine et son mode d'action ont été démontrés en faisant synthétiser des CRM à la bactérie, en l'infectant par des mutants du phage. L'un des CRM, le CRM 197 atoxique, présente le même poids moléculaire que la toxine intacte, mais son fragment A est dépourvu d'activité enzymatique. L'autre CRM, le CRM 45, de poids moléculaire réduit par rapport à celui de la toxine (45 000), est constitué d'un fragment A enzymatiquement actif, mais son fragment B, amputé du segment C-terminal, est incapable de reconnaître les cellules sensibles. Le CRM 45 n'est donc pas toxique. Si l'on soumet un mélange de CRM 197 et de CRM 45 à une action protéolytique ménagée en présence d'un agent réducteur et qu'on laisse ensuite les fragments libérés se réassocier

au hasard, on observe la formation à taux élevé de toxine diphtérique entaillée toxique et douée d'activité enzymatique. De plus, le CRM 197, non toxique et sans activité enzymatique, peut protéger les cellules HeLa en culture contre l'action de la toxine, probablement en occupant les sites récepteurs sur la cellule. Si l'on prépare des anticorps dirigés spécifiquement contre le fragment A, ceux-ci sont capables d'inhiber l'action enzymatique du fragment A in vitro, mais ils ne protègent pas l'animal contre l'intoxication diphtérique. En revanche, les anticorps anti-B sont protecteurs ; c'est que probablement ils empêchent l'attachement de la toxine sur ses récepteurs. Cette observation confirme que si l'attachement de la toxine sur les cellules cibles peut être sans rapport avec l'action toxique elle-même, il est cependant indispensable à sa manifestation.

La toxine cholérique a été isolée à l'état de pureté par Finkelstein et LoSpalluto à Dallas. Cette toxine de poids moléculaire 84 000 daltons a une structure oligomérique. Elle est constituée de 2 types de sous-unités, désignées par A et B, associées entre elles par des liaisons non covalentes (Lönnroth et Holmgren ; van Heyningen). On a établi que les sous-unités B sont responsables de l'attachement de la molécule sur les récepteurs, des gangliosides à la surface de la cellule. Les sous-unités A pénètrent à l'intérieur des cellules réceptrices où elles

Tableau 1. Toxicités comparées de quelques toxines.

nature de la toxine	doses minimales mortelles (DMM) par mg de protéine
botulinique	6,6-2,4.10 ⁻⁵ ug(souris)
A	3,3-2,5.10 ⁻⁵ ug (souris)
B	8,0.10 ⁻⁴ ug (souris)
E	
diphtérique	6,25.10 ⁻² ug(souris)
neurotoxine de Shigella dysenteriae	8,7.10 ⁻⁴ ug (par kg lapin)
toxine alpha de Clostridium perfringens	3,3.10 ⁻² ug (souris)
toxine staphylococcique alpha	1,0 ug (souris)
streptolysine O	0,5 ug (souris)
toxine tétanique	5,0-2,2.10 ⁻⁵ ug (souris)

activent l'adényl-cyclase cellulaire, d'où augmentation du taux d'AMP cyclique intracellulaire. C'est cette dernière qui serait à l'origine des diarrhées, symptôme gastro-intestinal majeur du choléra.

Les terminaisons nerveuses intoxiquées ne libèrent plus d'acétylcholine.

Contrairement à la toxine diphtérique, le mécanisme d'action des neurotoxines n'est pas encore élucidé. Ce n'est pas en tant que poisons cellulaires qu'elles agiraient : leur toxicité dériverait de leur capacité à interférer avec des substrats biochimiques dans la cellule nerveuse. En effet, leur toxicité ne varie pas en fonction du poids de l'organisme intoxiqué. Encore que l'on ignore leur mécanisme d'action, les symptômes qu'elles déclenchent nous renseignent sur leur point d'impact. Ainsi, la toxine botulinique provoque une paralysie flasque par atteinte du système nerveux autonome efférent, c'est-à-dire qu'elle affecte la portion du système nerveux qui stimule les muscles lisses (non volontaires) du corps, sans intervention du système nerveux central. La toxine intervient au niveau des synapses des nerfs moteurs somatiques, plus précisément au niveau de la plaque terminale, ou encore de la jonction neuromusculaire. On suppose que le ou les événements qui conduisent à la paralysie sont de nature chimique. On sait en effet que la transmission synaptique s'effectue par voie chimique. La transmission met en oeuvre d'une part le système adrénérgique, dont l'activité dépend de l'intervention d'une substance du type adrénaline appelée sympathine, et d'autre part le système cholinérgique, dont l'acétylcholine est le médiateur. L'effet de la toxine s'exerçant au niveau de la jonction neuromusculaire serait de la rendre incapable de libérer l'acétylcholine en quantités suffisantes pour que la contraction de la fibre musculaire puisse se produire. Les terminaisons nerveuses intoxiquées retiennent leur contenu d'acétylcholine. La cause de la mort résiderait dans la paralysie des muscles, d'où blocage de la respiration et asphyxie. Habermann et Heller ont indiqué que la matière grise cérébrale, mais non la matière blanche, fixait la toxine. La fixation s'accompagne d'une inactivation partielle de la toxine. La liaison de la toxine est très labile. D'autre part, les études histologiques effectuées après intoxication par la toxine n'ont pas permis de mettre en évidence des changements pathologiques à la jonction neuromusculaire. Par ailleurs, si l'on injecte de la toxine botulinique à des embryons de poulet au 7ème - 12ème jour de leur développement, les embryons présentent au 19ème jour une atrophie des muscles, dont l'image histologique est tout à fait semblable à celle que l'on observe après dénervation. Voilà une application bien inattendue d'une toxine à l'étude du développement embryonnaire.

La toxine tétanique migre le long des nerfs.

La toxine tétanique exerce son action prédominante sur le système nerveux central par des paralysies spasmodiques et des convulsions, dont l'image clinique la plus frappante est l'opisthotonos, contracture généralisée dans laquelle le corps et la tête se renversent en arrière, tandis que les membres sont en extension. Son affinité remarquable pour le système nerveux a été entrevue dès 1902 par Marie et Morax. Injectée dans le muscle de la patte d'un animal, la toxine va migrer le long des terminaisons nerveuses, puis, à travers le tronc nerveux, jusque dans la moelle épinière, où elle va s'accumuler dans les cornes antérieures. Si le chemin de migration a été établi de façon irréfutable par Kryzhanovsky à Moscou, le mécanisme par lequel la toxine chemine le long des nerfs est inconnu. Antérieurement, en 1959, Van Heyningen, d'Oxford, avait identifié le récepteur spécifique de la toxine sur la cellule nerveuse à un ganglioside. Cependant, le fait que la toxine tétanique ait une grande affinité pour le système nerveux et qu'elle se fixe de façon avide sur le ganglioside, alors que la toxine botulinique se fixe de façon labile, pourrait indiquer que la fixation sur un tissu est sans rapport direct avec l'action qu'elle y exerce. En effet, la toxine tétanique agit également en perturbant la transmission synaptique. En agissant sur l'appareil présynaptique, la toxine empêcherait la libération tant spontanée que provoquée du médiateur chimique de l'inhibition synaptique, probablement la glycine. Une observation pour le moins curieuse, c'est que les symptômes tétaniques ne surviennent que lorsque le taux de toxine fixé dans la moelle épinière a commencé à décroître, mais elle persiste à ce niveau alors même que les symptômes ont disparu. Des études au microscope électronique ont révélé l'augmentation notable du volume des vésicules synaptiques dans l'appareil présynaptique. On a postulé que ces vésicules retiendraient le médiateur inhibiteur. Mais la nature du médiateur, non plus que le mécanisme par lequel la toxine une fois fixée agit, ne sont connus.

Les anatoxines.

Le problème du mode d'expression de la toxicité peut être abordé principalement de deux façons. L'une d'elles consiste à rechercher les modifications induites dans la molécule de toxine lors de sa détoxication. La perte de la toxicité doit s'accompagner, autant que possible, de l'altération minimale de la structure globale de la molécule. La détoxication des toxines par l'action du formol, suivant la méthode de Ramon, semble remplir ces conditions, car le produit détoxiqué obtenu, l'anatoxine, conserve ses propriétés immunologiques intactes pour l'essentiel. Il apparaît donc que les modifications structurales induites sont de faible ampleur. La capacité à se fixer sur le récepteur cellulaire n'est pas non plus modifiée (toxines diphtérique et tétanique). Ces études ont été surtout développées dans le cas des toxines diphtérique et tétanique. La perte de la toxicité pourrait donc dériver de la modification préférentielle de la ou des régions intéressées dans l'expression de cette activité. Avec Blass et Raynaud, l'un d'entre nous a pu montrer qu'il y avait dans les anatoxines apparition de composés nouveaux, résultant de la liaison par des ponts méthyléniques de résidus d'acides aminés déterminés de l'enchaînement polypeptidique. Les acides aminés impliqués sont principalement les résidus lysine et tyrosine. L'un des composés a été isolé, et sa structure confirmée par synthèse. Il s'agit d'un composé dans lequel le groupement ϵ -aminé d'un résidu lysine est lié par un pont méthylénique à un résidu tyrosine en position 3 du noyau phénolique N(3-CH₂-Tyr-Lys). L'identification de deux autres composés a pu être faite par une voie indirecte, ce sont les composés (N-Lys)₂-(3, 5-CH₂-Tyr) et (N-Lys)₂ = CH₂. Pour expliquer la détoxication, on peut recourir à plusieurs hypothèses. Il se pourrait que, lors de leur formation, les ponts méthyléniques assurent un véritable verrouillage de la ou des régions d'expression de la toxicité. Il se pourrait aussi que la perte de toxicité dérive de la modification d'un ou de plusieurs résidus d'acides aminés situés dans le site toxique, ou encore que les deux processus interviennent concurremment.

Lorsqu'on a appliqué les réactions chimiques spécifiques à la modification de résidus uniques d'acides aminés (tyrosine, tryptophane, histidine, lysine), les résultats ont été variables en fonction de la toxine à l'étude. Dans le cas de la toxine tétanique, nous avons montré avec Raynaud que la modification des résidus tyrosine par nitration entraînait très tôt la perte de la toxicité, ainsi que celle de la capacité de la molécule à se fixer sur son récepteur spécifique. En augmentant le taux de nitration des résidus tyrosine, il est également possible de faire perdre à la molécule sa capacité à induire la formation d'anticorps neutralisants. On dispose

donc là d'une méthode sélective pour altérer un type donné d'activité. Ni les résidus lysine ni les résidus tryptophane ne semblent participer à la toxicité de la protéine. Les résidus histidine, par contre, comme l'ont montré Helling et Zwisler en Allemagne, interviendraient dans l'activité toxique. Les études des Belges Michel et Zanen avec la toxine diphtérique ont également établi l'implication des résidus tyrosine pour le déploiement de la toxicité, alors que celle des résidus lysine est plus hypothétique. Il est nécessaire de souligner qu'un changement d'activité après modification d'un résidu d'acide aminé peut provenir d'une altération de la conformation de la molécule dans la région intéressée. L'implication directe de ce résidu dans l'activité ne pourra être confirmée que si des changements de conformation, si petits soient-ils, peuvent être exclus.

Lorsque la modification spécifique d'un ou de plusieurs résidus d'un acide aminé se traduit par l'altération des propriétés toxiques, immunologiques, enzymatiques ou autres de la protéine, il est probable, sous les réserves faites ci-dessus, que le ou les résidus modifiés sont situés dans la région d'expression de l'activité altérée.

On dispose, dans ce cas, de la possibilité de « marquer » cette région, car l'acide aminé modifié a acquis un caractère nouveau permettant de le différencier. Ainsi, dans les hydrolysats enzymatiques de telles protéines, il sera possible de détecter les peptides renfermant le ou les résidus modifiés.

Vers une toxinothérapie du cancer ?

Mais l'étude des toxines n'intéresse pas seulement la microbiologie et les recherches sur la structure des protéines. Ainsi, l'entérotoxine cholérique a capté l'intérêt du biologiste moléculaire après avoir retenu longtemps celui du microbiologiste. En effet, Schafer, Lust, Sircar, Goldberg ont découvert que l'entérotoxine cholérique pouvait accroître par activation de l'adényl-cyclase la synthèse de l'adénosine-3', 5'-monophosphate (AMP cyclique), le médiateur de l'action de nombreuses hormones, qui semble aussi jouer un rôle central dans la régulation de la division cellulaire. En particulier, l'accroissement du taux intracellulaire de VAMP cyclique se traduit par un ralentissement de la division cellulaire. Or l'entérotoxine, qui s'est révélée capable d'activer l'adényl-cyclase dans virtuellement toutes les cellules de mammifères étudiées, non seulement devrait permettre d'étudier les interactions entre hormones et cellules, mais pourrait représenter aussi un excellent moyen pour explorer la dynamique fondamentale de la division cellulaire, ou pour étudier les aberrations de son contrôle

lors de la prolifération des cellules cancéreuses.

Indépendamment, Hollenberg, Fishman, Bennett et Cuatrecasas ont montré que les cellules qui sont les plus sensibles à la toxine cholérique sont celles qui contiennent certains gangliosides (tels que le ganglioside GM₁, spécialement : récepteur naturel de la toxine cholérique) en quantités élevées et les glucosyl-transférases nécessaires à la synthèse de ces gangliosides.

Il apparaît, par conséquent, que ces gangliosides (surtout GM₁) pourraient assumer un rôle important dans la régulation de la croissance cellulaire et dans celle des réponses dont l'AMP cyclique est le messager.

L'intérêt des toxines pour le pharmacologue n'est pas moindre, soit parce que l'élucidation de leur mécanisme d'action ouvre la voie à une thérapeutique spécifique, soit parce que les activités qu'elles déploient peuvent être mises à profit pour corriger un processus pathologique. Le premier cas est illustré dans le choléra. Les diarrhées qui le caractérisent sont dues à l'activation par l'entérotoxine d'adényl-cyclase en excès. On est donc en droit d'attendre de tout agent chimiothérapeutique capable de réduire l'activité de l'adényl-cyclase qu'il supprime les diarrhées entérottoxiques.

La seconde situation est illustrée par l'observation d'Iglewski et Rittenberg à Portland, dans l'Oregon, que l'injection de toxine diphtérique à des souris porteuses d'une tumeur (la tumeur ascitique d'Ehrlich-Létré, ou tumeur Ela) peut provoquer la régression de la tumeur. On a montré in vitro, sur des cultures cellulaires, que les cellules tumorales Ela sont environ 10 000 fois plus sensibles à l'action de la toxine que les cellules normales. On peut obtenir 80 % d'inhibition de la synthèse protéique des cellules Ela avec des doses de toxine aussi faibles que 0,003 ug. Cela signifie que l'index thérapeutique de la toxine diphtérique, tel qu'il est mesuré sur les cellules Ela, dépasse nettement celui des agents chimiothérapeutiques traditionnels. De plus, les cellules tumorales des animaux immunisés demeurent sensibles à l'action de la toxine. L'effet sélectif d'inhibition de la synthèse protéique par la toxine diphtérique ne se borne pas aux cellules Ela, puisqu'il a pu être démontré également sur des cellules de cancers de l'homme (carcinomes bronchiques, mélanomes).

Enfin, le fait que la sensibilité à la toxine diphtérique des cellules tumorales est différente de celle des cellules normales revêt une grande valeur diagnostique en cancérologie, car il devrait permettre de détecter par un essai in vitro la présence de cellules tumorales dans une biopsie. Le même essai devrait fournir le moyen de prédire les chances de succès de la toxinothérapie dans un cas précis de tumeur.

Il n'est pas douteux que l'essentiel des applications des toxines s'élargisse encore dans l'avenir.

Ce survol du domaine des toxines bactériennes, obligatoirement imprécis de par sa concision, montre combien ces protéines sont riches en potentialités pour le chercheur. Qu'il s'agisse du problème fondamental de leur signification pour la physiologie du germe producteur, ou de celui de la régulation de leur synthèse, ou encore de la structure chimique qui commande à la fois leur degré de toxicité et leur mode d'action, il est peu de domaines, y compris la pharmacologie et l'embryologie, qui ne puissent tirer profit de cet instrument puissant d'investigation que constitue ce groupe de protéines.