médecine/sciences 2021 ; 37 : 283-97

Partenariat *médecine/sciences* – Écoles doctorales – Masters (35)

L'actualité scientifique vue par les étudiants du Master 2 de microbiologie d'Aix-Marseille Université (AMU), Parcours Microbiologie intégrative et fondamentale (MIF), Unité d'Enseignement « Rédiger en sciences »

> Dans le cadre de l'unité d'enseignement « Rédiger en sciences » proposée par Aix-Marseille Université, les étudiants du master 2 microbiologie – en partenariat avec l'Institut de Microbiologie, bioénergies et biotechnologie – ont été confrontés aux exigences de l'écriture scientifique. Trois thématiques leur ont été proposées : la résistance aux antibiotiques, les chaperons moléculaires et la polymérase des coronavirus. Les étudiants ont rédigé une Nouvelle soulignant les résultats majeurs et l'originalité des articles étudiés. Complété par un entretien avec leurs auteurs, l'ensemble offre un éclairage original sur la compréhension du vivant dans le domaine de la microbiologie et de la santé. <

Responsable de l'Unité d'Enseignement
Laurent Aussel

Équipe pédagogique
Amel Latifi – Professeur, Aix-Marseille Université – latifi@imm.cnrs.fr
Laurent Aussel – Maître de conférences, Aix-Marseille Université – aussel@imm.cnrs.fr

Site web https://bio-sciences.univ-amu.fr/master-microbio

Série coordonnée par Sophie Sibéril.

NOUVELLE

Adjuvants : un second souffle pour les antibiotiques

Samuel Carien[1*], Maverick Hannoun[1*], Delphine Lefebvre[1*], Audrey Tempier[1*], Laurent Aussel[2]

[1]Master 2 Microbiologie intégrative et fondamentale, Aix Marseille Université, Marseille, France.
[2]Aix Marseille Université, CNRS, LCB UMR 7283, IMM, Marseille, France.
samuel.carien@etu.univ-amu.fr
maverick.hannoun@etu.univ-amu.fr
delphine.lefebvre@etu.univ-amu.fr
audrey.tempier@etu.univ-amu.fr
aussel@imm.cnrs.fr

> L'utilisation abusive et inadaptée d'antibiotiques (AB) dans le traitement de maladies bactériennes a engendré la sélection de bactéries multirésistantes. Il s'agit d'un problème de santé publique à l'échelle mondiale qui ne cesse de s'intensifier. Le rapport O'Neill a ainsi estimé qu'à partir de 2050, 10 millions de décès par an pourraient être liés aux bactéries antibiorésistantes [1]. Ce phénomène implique notamment des bactéries Gram négatives dites d'urgence critique, comme *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ou encore certaines entérobactéries [2]. Leurs deux membranes, ainsi que leur capacité d'adaptation, peuvent être une contrainte à l'entrée des antibiotiques dans ces bactéries. À ces obstacles s'ajoutent le problème du nombre d'antibiotiques contre les bactéries Gram négatives nettement inférieur à celui destiné aux bactéries Gram positives, ainsi que la difficulté de découvrir de nouveaux antibiotiques. Le développement de stratégies alternatives est donc une priorité. Ces vingt dernières années, une piste prometteuse est apparue : la combinaison d'antibiotiques avec des adjuvants, des composés chimiques améliorant l'efficacité des antibiotiques devenus inefficaces. Mais comment découvrir et identifier un nouvel adjuvant ? Comment caractériser son mode d'action sur les membranes des bactéries Gram négatives ?

*Ces quatre auteurs ont participé de façon égale au travail

L'histoire d'une découverte : les dérivés de polyamino-isoprényle

P. aeruginosa, une bactérie responsable d'infections pulmonaires et cutanées, est particulièrement difficile à traiter, notamment en raison de sa résistance naturelle à plusieurs familles d'anti-

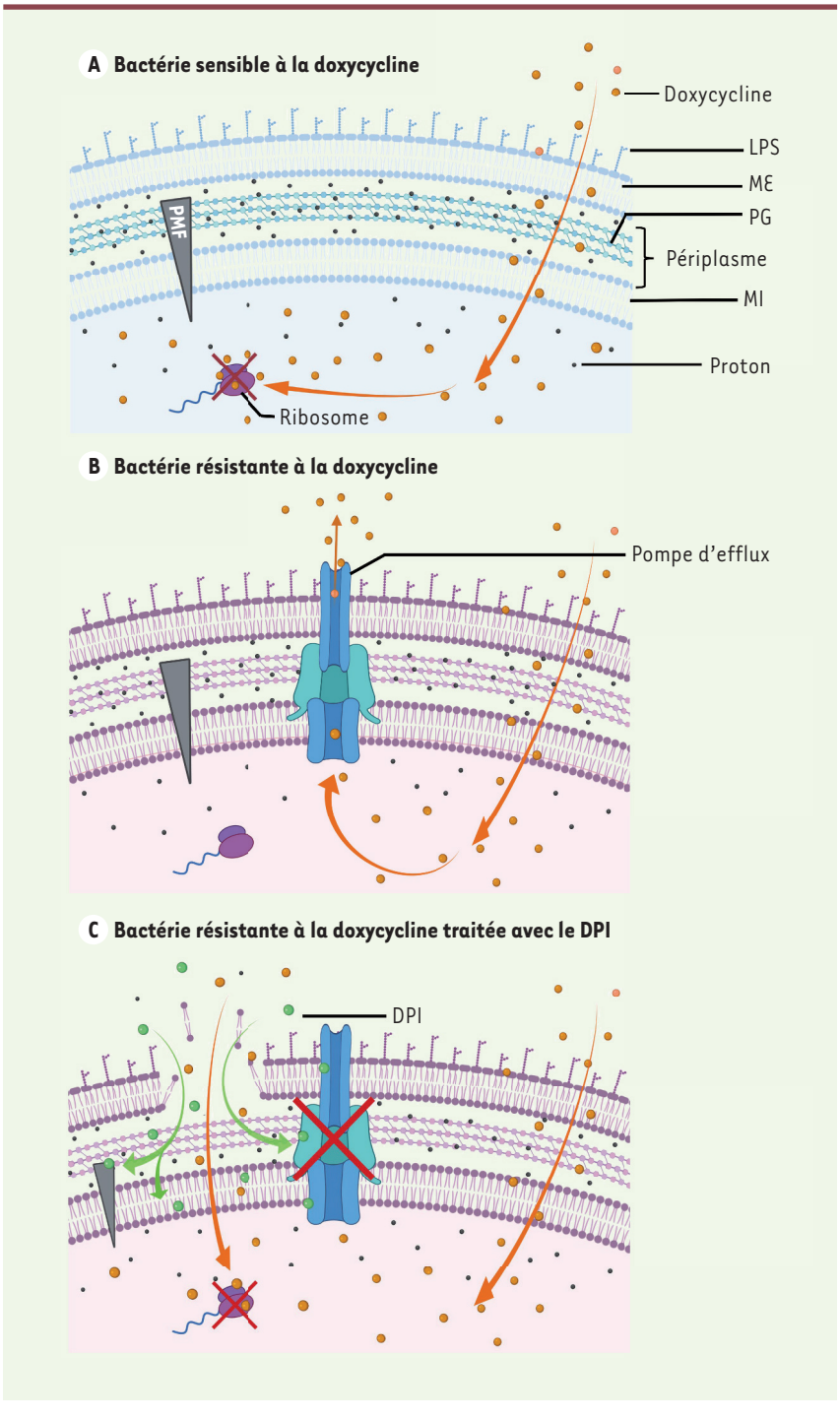


Figure 1. ***L'effet antibactérien de la doxycycline est obtenu grâce à l'action des adjuvants dérivés de polyamino-isoprényle (DPI).*** ***A.*** Effet de la doxycycline sur une bactérie Gram négative sensible. L'antibiotique diffuse à travers les deux membranes, se lie au ribosome et entraîne un arrêt de la synthèse protéique. ***B.*** Effet de la doxycycline sur une bactérie Gram négative résistante. Les pompes d'efflux transportent l'antibiotique hors de la cellule, ce qui limite son effet sur le ribosome. Ce phénomène est accru lorsque les pompes d'efflux sont surproduites (résistance acquise). ***C.*** Effet de la combinaison DPI-doxycycline sur une bactérie Gram négative résistante. Le DPI pourrait perméabiliser la membrane, réduire la force proton-motrice et inactiver les pompes d'efflux. Ainsi, l'antibiotique rentrerait plus facilement et s'accumulerait dans la bactérie. Son effet antibactérien s'en retrouverait potentialisé, rendant la bactérie sensible à l'antibiotique. MI : membrane interne ; PG : peptidoglycane ; ME : membrane externe ; LPS : lipopolysaccharide ; PMF : force proton-motrice (figure réalisée grâce à *BioRender*).

biotiques. Cette résistance est liée à la présence d'enzymes capables d'inactiver ces derniers, ainsi qu'à une paroi peu perméable et dotée de pompes d'efflux, constituées de protéines membranaires et expulsant les AB. Ces pompes sont à l'origine de la résistance de *P. aeruginosa* aux cyclines et au chloramphénicol, des AB ciblant la synthèse protéique, ainsi qu'aux quinolones et fluoroquinolones qui ciblent la réplication de l'ADN. Ainsi, les AB peuvent se retrouver expulsés, ce qui limite leur action *(Figure 1A, B)*. Cependant, l'association d'une huile essentielle et du chloramphénicol a rendu plus sensible à cet AB une souche de *P. aeruginosa* communément utilisée en laboratoire [3]. L'amplification de l'effet (potentialisation) de l'AB était due à un alcool isoprénique présent dans cette huile essentielle, le géraniol. Afin de faciliter l'étude de cette molécule, des analogues plus solubles ont été générés chimiquement : les dérivés de polyamino-isoprényle (DPI). En 2016, l'effet de ces DPI a été testé en association avec la doxycycline, une cycline normalement inefficace contre *P. aeruginosa* [4]. Comme pour le chloramphénicol, l'utilisation des DPI a entraîné une sensibilité accrue à la doxycycline chez *P. aeruginosa*. En effet, certaines combinaisons DPI-doxycycline ont fortement abaissé la concentration d'AB la plus faible permettant d'inhiber la croissance bactérienne (la concentration minimale inhibitrice ou CMI). Les mesures de CMI ont également révélé que l'activité antibactérienne observée provenait de l'AB et non des

DPI eux-mêmes, ce qui est caractéristique des adjuvants. De plus, en 2020, il a été montré que l'effet des DPI associés à l'AB dépendait de leurs doses [5], ce qui est crucial en thérapeutique pour anticiper l'efficacité d'une dose donnée. En vue d'une utilisation clinique, l'effet bactéricide des DPI avec différents AB a été testé sur des souches de *P. aeruginosa* résistantes provenant de patients infectés [4]. À cette fin, la CMI de la doxycycline avec le DPI le moins toxique pour les cellules eucaryotes, a été mesurée sur ces isolats cliniques. Elle a montré que la combinaison était efficace sur les souches cliniques. L'association DPI-doxycycline s'est avérée être tout aussi efficace sur des souches surproduisant des pompes d'efflux (résistance acquise), ce qui est donc très prometteur. Le même effet a été obtenu avec d'autres types d'AB : le chloramphénicol et les β-lactames. Ces derniers inhibent la synthèse de la paroi des bactéries, responsable de leur forme et de leur protection.

Un test de l'échiquier a ensuite été réalisé afin d'évaluer l'efficacité des molécules combinées (DPI et doxycycline), par rapport à leur efficacité individuelle. Ce test consiste à appliquer sur des cultures en microplaque deux gradients inversés : un de doxycycline et un autre de DPI. Il a montré que la hausse de la bactéricidie était due à une forte relation synergique entre l'adjuvant et son AB [4]. En effet, pour inhiber la croissance bactérienne, il a été possible d'utiliser trois fois moins de DPI que de PAβN (phénylalanine-arginine β-naphthylamide), un adjuvant étudié chez *P. aeruginosa* et connu pour son efficacité synergique élevée [6]. Malgré ces résultats très encourageants, une question reste en suspens : comment le DPI potentialise-t-il aussi efficacement l'effet de la doxycycline sur *P. aeruginosa* ?

Les cibles cellulaires des DPI

La similitude de l'effet des DPI et du PAβN sur la diminution de la résistance des bactéries aux AB, suggère que les DPI ont les mêmes cibles que le PAβN (en particulier les pompes d'efflux). Pour le savoir, la croissance de deux souches de *P. aeruginosa* a été testée en présence du couple DPI-AB ou de l'AB seul : une souche naturellement résistante, dotée de quelques pompes d'efflux (résistance naturelle), et une souche surproduisant des pompes (résistance acquise) [4]. Pour les deux souches, la croissance était significativement inhibée en présence du couple DPI-doxycycline tandis qu'elle ne l'était pas sans l'adjuvant. Ainsi, les résistances (naturelle et acquise) issues des pompes d'efflux seraient bloquées par le DPI. Cet effet provient d'une inhibition de l'efflux actif par l'adjuvant *(Figure 1C)*, révélée indirectement par un test d'efflux en temps réel [4]. Cette technique est fondée sur le transport d'un substrat fluorescent par les pompes d'efflux. Tout d'abord, un état d'épuisement énergétique est instauré chez les bactéries résistantes, surproductrices de pompes d'efflux, afin de limiter l'efflux dépendant de la force proton-motrice (PMF). Le colorant fluorescent est ensuite importé et accumulé dans les bactéries avant l'ajout de glucose qui permet la restauration de la PMF, et donc le déclenchement de l'efflux actif. L'inhibition de cet efflux est suivie *via* la fluorescence intracellulaire. Des concentrations croissantes de DPI ont entraîné une inhibition dose-dépendante de l'efflux actif supérieure à celle obtenue avec le PAβN, l'inhibiteur d'efflux contrôle.

Par ailleurs, il est connu que le PAβN déstabilise aussi la membrane bactérienne [7]. Les DPI agissent-ils de manière similaire ? Afin d'étudier la perméabilité de la membrane externe, le taux d'hydrolyse d'un substrat chromogène de la β-lactamase, une enzyme périplasmique dégradant les β-lactames, a été mesuré [4]. Il a été observé que le DPI perméabilisait la membrane externe plus efficacement que le PAβN. Cette perméabilité entraînerait la fuite des protons du périplasme vers le milieu extérieur *(Figure 1C)*. Par conséquent, cette dissipation du gradient de protons pourrait induire une dépolarisation de la membrane interne. Celle-ci a été testée par la détection de fluorochromes relargués lorsque la membrane est dépolarisée. Une activité dépolarisante du DPI sur la membrane interne a bien été observée.

Cette altération de la PMF impacte-elle la motilité flagellaire qui en dépend ? La motilité est un facteur important dans la colonisation, notamment chez *Bordetella bronchiseptica*, une bactérie dont certaines souches antibiorésistantes infectent les voies respiratoires des mammifères. Elle possède deux types de déplacement flagellaire PMF-dépendants : une motilité individuelle, en milieu liquide (*swimming*), une autre de groupe et coordonnée, sur surface solide (*swarming*). Ainsi, cette bactérie permet d'étudier l'impact indirect d'un DPI sur sa motilité en mesurant ces deux déplacements sur des géloses, avec ou sans adjuvant [8]. Le test a été réalisé avec un DPI qui potentialise l'activité du florfénicol (AB dérivé du chloramphénicol), notamment par une dépolarisation de la membrane interne. Dans cette étude, une inhibition significative du *swimming* et du *swarming* de *B. bronchiseptica* par le DPI a été observée.

DPI : l'avenir des antibiotiques ?

Les DPI possèdent une forte capacité à potentialiser l'effet d'antibiotiques. Toutefois, la compréhension exacte de leurs mécanismes d'action reste incomplète : les DPI agissent-ils en premier lieu sur l'efflux, la stabilité ou la polarisation membranaire ? Actuellement, des recherches sur ce sujet sont en cours.

En parallèle, avant toute application thérapeutique, la toxicité potentielle des DPI sur les cellules eucaryotes doit être analysée. Bien que ces DPI soient toxiques [4], une nouvelle génération de DPI modifiés chimiquement a montré une meilleure tolérance chez la souris [9]. Un effet sur le microbiote intestinal est aussi à prendre en compte dans le cas d'un traitement combinatoire DPI-AB.

Entretien avec Jean-Michel Bolla

Jean-Michel Bolla est directeur de recherche et dirige le laboratoire *Membrane et cibles thérapeutiques* à Marseille, une unité mixte de recherche de l'Inserm, du Service de Santé des Armées et d'Aix-Marseille Université. Après un post-doctorat à l'Hôpital Necker-Enfants malades (Paris), il a travaillé en tant que chargé de recherche au laboratoire *Transporteurs membranaires, chimiorésistance et drug-design* (Marseille). Actuellement, il s'intéresse au transport membranaire chez des bactéries résistantes aux antibiotiques. Son équipe, à l'interface entre chimie et microbiologie, a pour objectif de lutter contre l'antibiorésistance en identifiant et développant des molécules thérapeutiques.

Que pensez-vous de la tendance de l'antibiorésistance d'ici 2050 ?
Les prévisions sont alarmistes, mais c'est en train de changer. Il y a une série de mesures qui sont prises pour sensibiliser la population et les prescripteurs. Il y a une vraie volonté de changer les choses. Je ne pense pas qu'en 2050, nous serons dans l'état qu'a annoncé le rapport de Jim O'Neill de 2016, même s'il était très pertinent et intéressant. D'ailleurs, nous nous en servons tous, il a fait du bien, il fallait le faire.

Pourquoi cette pénurie de découvertes d'antibiotiques ?
Il y a trois raisons. La première est économique. Soigner le diabète ou le cancer est plus rémunérateur que de soigner une infection. Il a fallu qu'on démontre que ces infections coûtent de l'argent pour inverser la balance et pour qu'il y ait des investissements, de l'État français notamment. La deuxième raison vient d'une erreur stratégique des laboratoires pharmaceutiques dans la découverte d'antibiotiques. Pour éviter des effets secondaires, ils ont voulu identifier des cibles présentes uniquement chez les bactéries. À partir de la structure prédite de ces cibles, ils ont testé des milliers d'inhibiteurs. Tout cela a été fait avec de gros investissements par l'industrie pharmaceutique, mais la recherche d'antibiotiques n'a pas abouti car les molécules ne pouvaient pas entrer dans les bactéries. C'est pourquoi, dans notre laboratoire, nous faisons l'inverse : on voit si une molécule fonctionne et nous cherchons ensuite la cible. La troisième raison est que nous avons sous-estimé l'importance de la résistance des bactéries aux antibiotiques depuis leur découverte dans les années 1940.

Que pensez-vous des nouvelles alternatives étudiées comme la phagothérapie ou l'utilisation de peptides antimicrobiens ?
Pour la phagothérapie, l'administration topique (directement au contact de la peau ou des voies respiratoires) me paraît intéressante. À mon avis, cela pourrait être la solution pour traiter les infections opportunistes, notamment à *P. aeruginosa* chez les grands brûlés. L'ingestion de bactériophages me semble encore un peu risquée. Il y a encore des réticences politico-commerciales pour la mise sur le marché des phages, mais je pense qu'on y arrivera quand même.
Quant aux peptides antimicrobiens, je suis un peu sceptique. Certains sont utilisés dans l'alimentaire comme la nisine, mais en termes de thérapie, les recherches ne sont pas assez avancées. Beaucoup d'entre eux font un trou dans la membrane et agissent comme des harpons, donc cela fait encore peur. Ensuite, c'est compliqué de convaincre la médecine de ville d'utiliser ce type de molécule et de convaincre les laboratoires pharmaceutiques de les mettre sur le marché. Je suis moins sceptique quant aux peptides actuellement développés qui n'agissent pas sur la membrane mais inhibent la traduction des protéines.

Comment avez-vous eu l'idée de chercher un adjuvant dans une huile essentielle puis d'étudier les dérivés de polyamino-isoprényle ?
Il y a une histoire de « corsitude » ! J'ai été professeur contractuel à l'Université de Corse et pendant cette période, nous avons monté un projet sur *Campylobacter*, une bactérie pathogène à l'origine d'infections alimentaires. Comme en Corse, il y a une grande production d'huiles essentielles, nous les avons testées et nous avons trouvé qu'il y avait une huile active sur *Campylobacter*, ce qui a fait l'objet d'une thèse. Entre-temps, une collègue de Corse m'a proposé d'encadrer une post-doctorante financée par la collectivité de Corse. Plutôt que de rechercher des activités antibiotiques dans les huiles essentielles, j'ai proposé de rechercher des activités anti-efflux dans les huiles essentielles, et c'est ce qui a été financé. Quand nous avons commencé les essais, nous nous sommes rendus compte qu'il y avait effectivement une huile essentielle qui montrait une activité anti-efflux. Des fractionnements effectués à Corte ont permis d'identifier une fraction particulièrement active qui contenait des alcools. Le géraniol s'est avéré être la molécule active dans notre système d'essai. Le problème était que le géraniol est peu miscible dans l'eau, donc très difficile à manipuler, mais mon collègue chimiste Jean-Michel Brunel, à qui j'ai raconté mon histoire, m'a dit « essaie la géranylamine, si ça marche on pourra faire d'autres choses ». Et la géranylamine a marché ! La suite, vous la connaissez.

Votre équipe a mis au point un système par nébulisation pour traiter les infections pulmonaires par P. aeruginosa. *Pouvez-vous nous en dire plus ?*
Avant d'en arriver à ce projet, nous voulions traiter, avec nos molécules par voie orale, des poulets touchés par une pathologie générée par *Escherichia coli*. Nous avions un adjuvant (DPI) actif sur les entérobactéries résistantes comme *E. coli*, mais arrivé aux derniers tests, celui-là ne passait pas la barrière intestinale. Notre molécule ne se retrouvait donc pas dans le sang pour parvenir sur le lieu de l'infection. On était alors dans une impasse pour ce projet, mais je me suis dit : « si l'adjuvant ne passe pas la barrière intestinale, est-ce que ce serait aussi le cas pour la barrière pulmonaire ? ». Cela pourrait être un avantage pour traiter les infections directement dans les poumons sans que la molécule ne diffuse dans le sang. On pourrait ainsi soigner les infections pulmonaires par *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose. Nous avons pensé à un aérosol pour délivrer et répartir correctement dans les poumons des quantités raisonnables d'adjuvant combiné à un antibiotique. Jean-Michel Brunel, mon collègue chimiste, a donc développé un aérosol classique qui envoie des microgouttes dans les voies pulmonaires. La taille des microgouttes est un élément déterminant pour qu'elles restent dans les voies respiratoires inférieures. Il a donc travaillé jusqu'à trouver une parfaite compatibilité. Ensuite,

nous sommes passés à l'expérimentation animale et nous attendons les résultats. En parallèle, Jean-Michel Brunel a travaillé sur un moyen de faciliter la prise de traitement. L'idée est de faire de la poudre avec les deux composés (adjuvant et antibiotique) et de voir si ça se répand correctement dans le poumon, comme pour la Ventoline, un aérosol traitant l'asthme. Si les essais s'avèrent concluants, on passera aux infections.

Le mécanisme d'action de l'adjuvant n'est pas encore bien défini, mais quel est votre avis sur les cibles précises de l'adjuvant ?
Nous avons essayé d'obtenir des bactéries résistantes aux DPI afin de déterminer plus précisément les cibles des adjuvants, et donc le mécanisme d'action des composés. Pour le moment, nous n'y sommes pas parvenus, mais nous avons émis deux hypothèses concernant les mécanismes. La première hypothèse est dérivée de notre démonstration que de faibles concentrations d'adjuvants mènent à la dissipation du gradient de protons et donc à l'inhibition des pompes d'efflux, mais ne tuent pas les bactéries. Or l'ATP synthase, une machinerie essentielle à leur survie, est également alimentée par ce gradient. La première hypothèse que nous avons donc formulée est que les bactéries survivent car l'ATP synthase continue de fonctionner malgré la dissipation du gradient : cette enzyme nécessiterait un gradient de protons inférieur à celui des pompes d'efflux. La deuxième hypothèse que nous avons émise est que les groupements polyamines des DPI pourraient interagir avec des acides aminés des pompes d'efflux, essentiels pour le fonctionnement de celles-ci.

Que diriez-vous à un jeune qui souhaite devenir chercheur ?
Je commencerais par lui dire que la pyramide des âges fait qu'il va y avoir un renouvellement, donc ça vaut peut-être le coup ! Ensuite, je lui dirais ce qu'un immense microbiologiste a dit : « si vous faites de la science, expliquez bien à votre conjoint, que vous avez une maîtresse ou un amant : c'est la science ! ». Ça vous prend la tête tout le temps, mais c'est normal ! Ensuite, je lui dirais qu'il faut être très bon en anglais, c'est indispensable. Il faut aussi avoir une bonne plume. Aujourd'hui, il faut apprendre à écrire des projets, des articles ou des rapports. C'est très important. Une notion capitale est aussi de se créer un réseau, de connaître des gens, d'avoir des projets avec plusieurs personnes. Il faut aussi savoir travailler en équipe. Pour moi, il faut inciter les jeunes à faire de la recherche. Bien sûr qu'il faut être bon, qu'il faut se battre, mais on n'a pas besoin d'être un génie pour faire de la bonne recherche et pour faire carrière dans la recherche. Je ne suis pas excellent, je ne l'ai jamais été. Bien sûr qu'il y a de la frustration et des découragements, mais l'important est qu'il faut être motivé et que ça plaise. La recherche est très satisfaisante, très intéressante. On y rencontre des gens formidables et on est dans un milieu privilégié, multilingue et multiculturel.

Une administration topique ou pulmonaire pourrait contourner ce problème comme l'a montré une modélisation de thérapie DPI-AB par aérosol contre *P. aeruginosa* [10]. Enfin, la synergie du couple DPI-AB pourrait être optimisée en rendant la structure des DPI plus affine pour les membranes bactériennes.

L'utilisation thérapeutique des DPI constituerait un grand progrès dans la lutte contre l'antibiorésistance. Tout d'abord, elle restaurerait l'effet antibactérien d'AB inefficaces ou devenus inefficaces. Ces derniers étant déjà utilisés, le traitement DPI-AB serait plus rapidement mis sur le marché et son usage serait plus sûr par rapport à de nouveaux antibiotiques. De plus, l'utilisation des DPI permettrait de diminuer les doses d'AB nécessaires pour avoir une efficacité thérapeutique, et donc de limiter le rejet de molécules dans l'environnement et la recrudescence de bactéries résistantes. Ainsi, grâce aux DPI, un même arsenal thérapeutique aurait un éventail d'utilisation décuplé. La combinaison DPI-AB pourrait donc être l'une des clés pour lever les verrous de l'antibiorésistance. ◊

Adjuvants: A second wind for antibiotics

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

RÉFÉRENCES

1. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations: the review on antimicrobial resistance. 2016. https://amr-review. org
2. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2018 ; 18 : 318-27.
3. Lorenzi V, Muselli A, Bernardini AF, *et al.* Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from gram-negative species. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 ; 53 : 2209-11.
4. Borselli D, Lieutaud A, Thefenne H, *et al.* Polyamino-Isoprenic Derivatives block intrinsic resistance of P. aeruginosa to doxycycline and chloramphenicol in vitro. *PLoS One* 2016 ; 11 : e0154490.
5. Troudi A, Douafer H, Bolla JM, *et al.* Antibiotic adjuvants to rescue Pseudomonas aeruginosa from tetracycline antibiotics resistance. *Anti-Infect Agents* 2020 ; 18 : 1.
6. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, *et al.* Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 ; 45 : 105-16.
7. Lamers RP, Cavallari JF, Burrows LL. The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PAβN) permeabilizes the outer membrane of Gram-negative bacteria. *PLoS One* 2013 ; 8 : e60666.
8. Borselli D, Brunel JM, Gorgé O, *et al.* polyamino-isoprenyl derivatives as antibiotic adjuvants and motility inhibitors for Bordetella bronchiseptica porcine pulmonary infection treatment. *Front Microbiol* 2019 ; 10 : 1771.
9. Lieutaud A, Pieri C, Bolla JM, *et al.* New polyaminoisoprenyl antibiotics enhancers against two multidrug-resistant Gram-negative bacteria from Enterobacter and Salmonella Species. *J Med Chem* 2020 ; 63 : 10496-508.
10. Douafer H, Andrieu V, Wafo E, *et al.* Characterization of a new aerosol antibiotic/adjuvant combination for the treatment of P. aeruginosa lung infections. *Int J Pharm* 2020 ; 586 : 119548.

Retrouvez toutes les Actualités de la Myologie sur les sites de :

la **Société Française de Myologie**
www.sfmyologie.org

la filière de santé neuromusculaire **FILNEMUS**
www.filnemus.fr

L'ARN polymérase COVID-19

Le talon d'Achille du SARS-CoV-2

Marie Corteggiani[1]*, Lucas Gombert[1]*, Callypso Pellegri[1]*, Laurent Aussel[2]

[1]Master 2 Microbiologie intégrative et fondamentale, Aix Marseille Université, Marseille, France.
[2]Aix Marseille Université, CNRS, LCB UMR 7283, IMM, Marseille, France.
marie.corteggiani@etu.univ-amu.fr
lucas.gombert@etu.univ-amu.fr
callypso.pellegri@etu.univ-amu.fr
aussel@imm.cnrs.fr

> Au cours des vingt dernières années, les coronavirus ont été à l'origine de trois épidémies qui ont causé plus de 2,5 millions de morts à travers le monde. Ces agents pathogènes font partie d'une vaste famille de virus et sont généralement la cause de symptômes bénins tels que le rhume. Ils peuvent cependant engendrer différentes maladies, allant jusqu'au syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS). En 2003, le SARS-CoV a été à l'origine du syndrome respiratoire aigu sévère en Chine. Puis en 2012, le MERS-CoV a été la cause du syndrome respiratoire du Moyen-Orient [1]. Aujourd'hui, une nouvelle épidémie sévit dans le monde, et l'agent responsable est à nouveau un coronavirus affectant les voies respiratoires et responsable d'un SRAS : le SARS-CoV-2. Ce virus, qui s'est propagé dans le monde, pose actuellement un immense problème de santé publique puisque plus d'un an après son apparition, aucun traitement antiviral spécifique n'a été découvert [2].

Les coronavirus sont des virus à ARN simple-brin positif, possédant une coiffe en 5' et polyadénylés en 3'. La taille de leur génome peut atteindre 32 000 bases. Leur traduction permet la synthèse de polyprotéines qui sont clivées en 16 « *non-structural proteins* » (nsp) pour former un complexe de réplication. Ce complexe permet ensuite la synthèse de nouveaux ARN génomiques, mais également d'ARN subgénomiques[1] codant les protéines de structure essentielles à la multiplication du virus [3,4]. L'assemblage des protéines de structure ainsi que la synthèse d'ARN génomique mènent ainsi à la création de nouvelles particules virales.

L'une des caractéristiques des virus à ARN est leur grande variabilité génétique au sein d'une même espèce. En effet, la faible fidélité de réplication des virus à ARN engendre un taux de mutation élevé, leur permettant une évolution rapide. Le génome des coronavirus fait partie des plus grands parmi les virus à ARN. Or, un génome si grand nécessite une réplication fidèle et rapide afin d'empêcher un taux d'erreur trop important, qui pourrait à terme s'avérer fatal pour le virus [3].

Face à ces différentes contraintes, la machinerie de réplication des coronavirus a évolué vers un ensemble de 16 sous-unités, chacune apportant une fonction spécifique et permettant une réplication efficace [4]. Connaissant sa structure et son implication dans la prolifération virale, cette machinerie pourrait constituer une cible thérapeutique contre le SARS-CoV-2.

La diversité fonctionnelle du complexe ARN polymérase du SARS-CoV

En 2005, Cheng *et al.* ont décrit nsp12 comme la sous-unité centrale du complexe réplicatif du SARS-CoV, responsable de l'activité ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) [5]. Longtemps, les chercheurs se sont heurtés à une énigme : l'enzyme nsp12 purifiée était non-processive (la processivité, facteur critique de l'efficacité de la réplication virale, correspond au nombre de nucléotides polymérisés au cours d'une seule rencontre avec la matrice), avec une faible activité polymérase alors que les études *in vivo* démontraient le contraire. L'explication la plus rationnelle était que nsp12 nécessitait un ou plusieurs partenaires protéiques afin d'augmenter son activité polymérase et sa processivité. En 2008, l'équipe de Bruno Canard a identifié l'un de ces partenaires : nsp8, qui interagit avec nsp7 et également avec nsp12 [6]. Mais ces interactions sont-elles responsables des différences observées entre l'activité de nsp12 *in vitro* et *in vivo* ? Ce n'est qu'au cours de l'année 2014 que cette même équipe a évalué l'activité de nsp12 seule, puis en présence de nsp7 et nsp8 avec l'ajout d'une amorce afin d'initier la synthèse d'ARN [7]. La vitesse d'incorporation de nucléotides a pu être calculée et la processivité a également été évaluée. Les résultats ont démontré que nsp7 et nsp8 étaient requises pour l'activité polymérase de nsp12 et pour la liaison du complexe nsp7/8/12 à l'ARN. Ceci indique que l'interaction du complexe nsp7/8 avec nsp12 lui confère une processivité élevée.

Il a également été observé que des mutations de nsp8 peuvent être responsables de la perte d'interaction entre nsp8 et nsp12, ce qui engendre une perte de l'activité polymérase de nsp12. Cette observation a renforcé les résultats obtenus précédemment et confirme que l'interaction entre nsp8 et nsp12 est requise pour l'activité RdRp de nsp12 [3]. Cependant le complexe polymérase nsp7/8/12 du SARS-CoV, bien que

*Ces trois auteurs ont participé de façon égale au travail.
[1] Les ARN subgénomiques sont des ARN issus de la transcription indirecte de l'ARN génomique : l'ARN génomique (+) est répliqué en ARN (-), qui sera à son tour transcrit de manière discontinue en brins de différentes tailles et de polarité identique à l'ARN génomique.

https://doi.org/10.1051/medsci/2021019

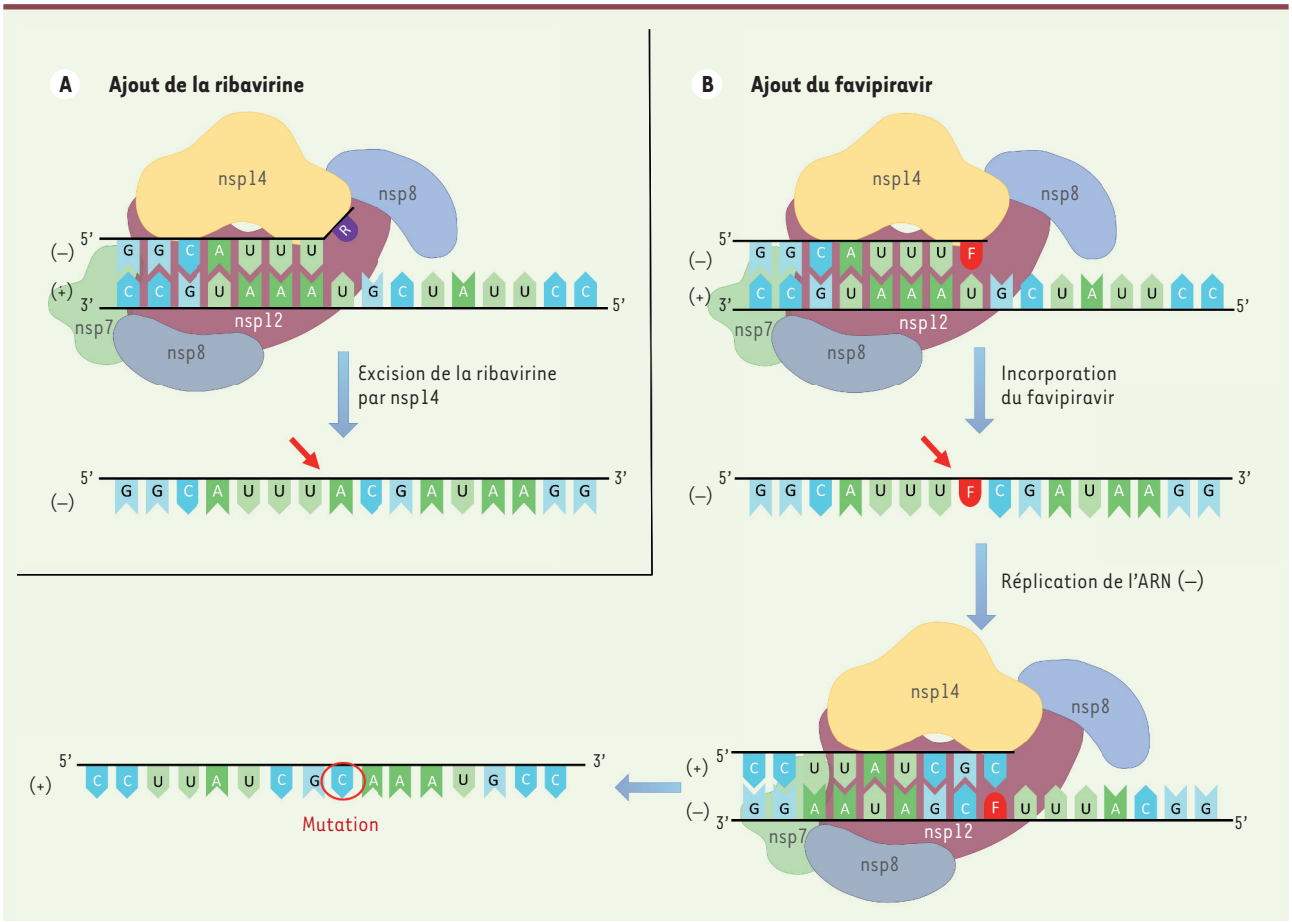


Figure 1. ***Incorporation de molécules analogues des bases par la machinerie de réplication chez les coronavirus.*** Représentation schématique des sous-unités (SU) nsp12, nsp7, nsp8, nsp14 et nsp10 de la machinerie de réplication des coronavirus. Nsp12 est la SU centrale permettant la polymérisation de l'ARN grâce au brin matrice. Nsp7 et nsp8 sont des partenaires protéiques de nsp12 améliorant sa fixation à l'ARN et sa processivité. Nsp14 et nsp10 sont des partenaires protéiques de nsp12 permettant de corriger les erreurs d'incorporation. Au cours de la transcription du brin d'ARN néosynthétisé (-), les molécules analogues des bases, ribavirine (R) et favipiravir (F), peuvent être incorporées. ***A.*** La ribavirine est incorporée puis excisée par le complexe de réplication : l'erreur d'incorporation est corrigée. ***B.*** Le favipiravir est parfois reconnu comme un A et incorporé. Il est conservé sur le brin néo-synthétisé (-). Lorsque le brin (-) sert à son tour de matrice, le favipiravir étant en majorité des cas un analogue de G, il est donc reconnu comme tel par la polymérase, ce qui fixe une mutation sur le brin (+) néo-synthétisé. On observe *in fine* une mutation de U vers C sur le génome.

capable d'incorporer des nucléotides à une vitesse élevée, n'est pas fidèle. En effet, lors de la polymérisation, celui-ci fait de nombreuses erreurs d'incorporation, contrairement aux polymérases d'autres virus. Il a ainsi été découvert que la sous-unité nsp14 était elle aussi capable d'interagir avec nsp12. Nsp14 possède deux activités : une activité N7-guanine méthyltransférase (N7-MTase), impliquée dans la méthylation de la coiffe, et une activité exonucléase 3'-5', permettant l'excision de nucléotides. Cette association pourrait permettre de corriger les erreurs d'incorporation commises par nsp12. L'activité exonucléase du complexe nsp7/8/12/14 a ainsi été mesurée et celle-ci s'est révélée très faible. Cependant, l'ajout de la sous-unité nsp10 connue pour être un cofacteur de nsp14 a permis d'augmenter considérablement son activité exonucléase, et donc la fidélité de la réplication. L'ajout de nsp14 et nsp10 au complexe de réplication fait de lui le seul à réunir une activité N7-MTase, exonucléase et RdRp chez les coronavirus, le définissant comme un complexe unique [8]. Ainsi, l'association de nsp7/8 à nsp12 améliore l'activité RdRp et la processivité du complexe de réplication d'une part, et l'association de nsp10/14 améliore sa fidélité de réplication d'autre part.

Le complexe de réplication comme cible thérapeutique

La machinerie de réplication est une cible intéressante dans le traitement des virus à ARN. Étant donné que la fidélité est essentielle à la survie des virus, l'altérer serait un moyen de stopper la répli-

Entretien avec Bruno Canard

Bruno Canard est directeur de recherche au CNRS et responsable de l'équipe « Réplicases virales : structure, mécanisme et drug-design » dans le laboratoire « Architecture et fonction des macromolécules biologiques » (AFMB) à Marseille. Il est spécialiste des coronavirus. Après un doctorat de microbiologie et biochimie obtenu à l'Institut Pasteur à Paris et un post-doctorat à la Harvard Medical School de Boston, il s'intéresse désormais à la structure et à la fonction des enzymes impliquées dans la réplication virale et le coiffage de l'ARN, ainsi qu'à leur utilisation dans la conception de médicaments antiviraux.

Comment en êtes-vous venu à travailler sur la réplication des coronavirus ?

Je me suis tout d'abord installé à Luminy en 1998 pour travailler sur les enzymes de la réplication, en particulier chez le virus de la dengue. Avec ma première étudiante qui effectuait une thèse de doctorat, nous avions déterminé la structure cristallographique d'une méthyltransférase, qui est une protéine associée à la polymérase de la dengue. Ces travaux de recherche m'ont valu d'être invité à un congrès sur les coronavirus en Hollande, dont l'organisateur était Eric Snijder. Il pensait à l'époque que les coronavirus étaient susceptibles de posséder cette méthyltransférase, ce qui s'est avéré vrai par la suite. Ce congrès a eu lieu début 2003, pendant l'épidémie de SRAS, ce qui m'a permis de prendre contact avec des virologistes spécialistes des coronavirus. C'est à ce moment-là que je me suis rendu compte que c'était une famille de virus intéressante étant donné la complexité et la diversité des enzymes que ces virus possèdent. Je me suis dit que les étudier allait me donner beaucoup de travail et pendant très longtemps car, à l'époque, les coronavirus étaient encore très peu étudiés. C'est donc en 2003 que j'ai pu commencer à travailler sur les coronavirus en participant à un projet européen car l'épidémie de SRAS avait contribué à donner un peu d'intérêt à l'étude de ces virus. Par la suite, je me suis passionné pour l'étude de l'ARN polymérase des coronavirus. Je suis biochimiste et j'aime les enzymes qui font des choses complexes. La polymérase est une enzyme qui doit contrôler plein de paramètres et qui possède des performances enzymatiques extraordinaires. Le fait qu'elle puisse catalyser 500 à 600 réactions par seconde avec une spécificité incroyable m'a fasciné, et j'ai donc décidé de consacrer une partie de ma vie à étudier son fonctionnement.

Dans votre article traitant de la RdRp, vous avez décrit la sous-unité nsp14 comme ayant une activité N7-MTase en plus de son activité d'exonucléase. À ce jour, toutes les guanine N7-MTase qui permettent la méthylation de la coiffe de l'ARN font partie de la famille des « Rossman fold », caractérisée par un motif particulier de repliement. Comment expliquez-vous que la sous-unité nsp14 n'en fasse pas partie ?

C'est une excellente question ; je pense que nous avons 20 à 30 ans de recherche devant nous pour y répondre. Le repliement de type « Rossman fold » est un repliement très ancien, présent chez les méthyltransférases, qui leur permet d'interagir avec un cofacteur appelé S adénosine méhionine (SAM) afin de méthyler la coiffe de l'ARN en cours de synthèse. Ce type de repliement primitif, apparu aux origines de la synthèse d'ARN, a été très conservé au cours de l'évolution grâce à sa stabilité et ses propriétés physico-chimiques qui permettent aux méthyltransférases d'être très spécifiques de SAM. La découverte d'une méthyltransférase chez les coronavirus ne possédant pas de repliement de type « Rossman fold » est absolument incroyable et totalement inexpliquée. On ne comprend pas pourquoi ce repliement présent chez la méthyltransférase des coronavirus n'a pas été remplacé par le « Rossman fold » au cours de l'évolution. On peut supposer que ce repliement différent a probablement émergé au même moment que le « Rossman fold » et qu'il a été conservé car il aurait conféré des propriétés différentes aux méthyltransférases. Toute la question est de savoir quelles pourraient être ces différences entre méthyltransférases.

À ce jour, quels sont vos objectifs en termes de recherche pour l'avenir ? Quelles sont les pistes que vous aimeriez explorer ?

Premièrement, le SARS-CoV-2. C'est un sujet d'actualité pour lequel il y a une urgence et qui est bien financé. Ce qui m'intéresse à ce jour, c'est de mieux comprendre les mécanismes de réplication pour pouvoir faire du design de médicament dans le but de contrôler l'épidémie. C'est une chance dans le sens où c'est un virus qui est extrêmement intéressant. Au-delà du fait de trouver rapidement un traitement, il reste encore quelques mécanismes à comprendre, notamment la manière dont la polymérase démarre la synthèse de l'ARN, ainsi que le coiffage des ARN par la guanylyltransférase. La compréhension de ces mécanismes au niveau moléculaire est importante pour aider à développer des antiviraux.

Deuxièmement, ce qui m'intéresse particulièrement chez ces virus, c'est qu'ils ont un génome très grand constitué d'un ARN très long. Il existe certainement une raison pour laquelle ce virus a un génome aussi grand et pour que cette longueur ait été maintenue au cours de l'évolution, contrairement à d'autres virus. Une longue molécule d'ARN est moins stable, elle peut être la cible de nucléases issues de l'immunité innée de l'hôte. Le virus a dû acquérir de nouvelles enzymes pour lui permettre de conserver ce long génome. Comprendre les mécanismes impliqués dans la stabilité de ce génome, très anciens dans l'histoire de l'évolution, permettrait la mise au point de nouveaux antiviraux. Le défi, c'est d'arriver à faire financer des recherches sur des virus qui ont un grand génome constitué d'un long ARN mais qui n'ont aucune importance d'un point de vue médical. La communauté scientifique n'est pas prête actuellement à laisser les chercheurs explorer des pistes un peu extravagantes, peu connectées avec la réalité des gens (le confinement, le coronavirus, etc.). Ce type de recherche est extrêmement créatif et excitant, et pourrait être très fertile pour aboutir à de nombreuses découvertes très variées, y compris sur les coronavirus. Il est compliqué de faire financer la recherche sur des virus qui n'ont pas d'intérêt immédiat, mais qui en réalité sont importants pour la compréhension de mécanismes moléculaires.

Qu'est-ce que vous proposeriez pour empêcher de nouvelles crises comme celle de la pandémie actuelle et pour qu'à l'avenir, il n'y ait plus ce genre de problèmes ?

Une recherche fondamentale comme la nôtre conduit à proposer une voie d'action différente de la vaccination dans la mesure où, si nous sommes confrontés à un virus inconnu, quand on obtient la séquence de son génome, on remarque la plupart du temps que finalement,

il ressemble à quelque chose de connu. À ce moment-là, on peut retrouver les protéines et les enzymes qui sont les plus conservées dans cette famille. Et si on a un médicament qui a été conçu auparavant pour agir contre les protéines de cette famille – en particulier les polymérases – mais aussi les protéases ou d'autres enzymes qui sont connues pour être des cibles thérapeutiques, alors on disposera à l'avance de cet antiviral sur notre étagère.

La voie du traitement antiviral est une approche beaucoup plus large et anticipatrice que celle consistant à préparer des vaccins qu'on va devoir adapter à chaque nouvel isolat qui va apparaître lors de l'épidémie. Les vaccins sont faits contre les protéines d'enveloppe du virus, qui sont soumises à une pression sélective extrême et qui varient beaucoup, même au sein d'une même famille. Cela pose problème pour la vaccination. Mais dès que les vaccins seront disponibles*, et nous l'espérons tous, les traitements antiviraux devraient aussi prendre leur place dans la stratégie de contrôle de la maladie.

Est-ce que vous pensez que la pandémie actuelle a permis de valoriser la recherche fondamentale ?

Ça s'est effectivement traduit par une valorisation par des mots. Si on écoute les ministres et les politiques, ils font reposer beaucoup d'espoirs sur les chercheurs et en pensent beaucoup de bien. L'avis selon lequel, sans recherche efficace et contrôlée, on ne va nulle part, est partagé. Cependant, dans les faits, on n'en est pas encore là. Par exemple, les chercheurs n'ont pas été beaucoup consultés dans les laboratoires concernant la Loi de Programmation de la Recherche (LPR), et je dirais même que la loi vient de passer contre l'avis de l'immense majorité des chercheurs.

La mise en œuvre de soutiens efficaces à la recherche laisse beaucoup à désirer ; c'est dommage, car dans la crise actuelle, qui devient une crise économique et financière, on voit mal comment on arrivera à trouver de l'argent et à le mettre ensuite dans la recherche, alors que la société va en avoir besoin pour relancer l'économie. Cela a commencé il y a une dizaine d'années avec la perte de la considération de la recherche par les hommes politiques. Et pour le moment, rien n'a été fait pour remettre la France à niveau par rapport à l'Allemagne, la Chine (ndlr, la République populaire de Chine, RPC) ou les États-Unis.

Vous avez vivement critiqué le financement de la recherche publique en France, est-ce que vous auriez une solution à proposer pour l'améliorer ?

Selon moi, ce qui a le plus péché ces dernières années dans le financement de la recherche en France et qu'il faudrait changer, c'est le manque de soutien de base aux équipes. Dans mon domaine, ça s'est traduit par un manque total de préparations et d'équipements, en particulier en biologie structurale. La France est complètement sous-équipée en cryo-microscopes. Il y en a 3 en France, alors qu'il y en a 25 en Allemagne, plus de 20 en Angleterre, et des quantités industrielles en Chine. Même l'objectif de doubler la quantité de cryo-microscopes n'a pas été atteint en 5 ans. Cela signifie qu'on a été lâchés, abandonnés, et maintenant, on nous demande de faire l'impossible pour le lendemain en étant complètement démunis. C'est comme si on vous demandait de rapporter le trophée en vous donnant un Solex pour aller courir contre les voitures de formule 1. C'est ce qu'on nous demande à l'heure actuelle, et la nouvelle loi n'a rien envisagé là-dessus.

* Entretien réalisé en novembre 2020.

cation virale, et ainsi la prolifération du virus. Les analogues des bases nucléotidiques sont déjà utilisés contre certains virus à ARN. Leur fonctionnement est simple : ils sont incorporés par la polymérase à la place des bases A, U, C ou G, et peuvent induire des mutations lors de la réplication du brin complémentaire. La structure de la polymérase du SARS-CoV et celle du SARS-CoV-2 sont très conservées [9] : ainsi les études menées précédemment sur la polymérase du SARS-CoV peuvent servir de support pour étudier la polymérase du SARS-CoV-2.

La ribavirine est un analogue de la guanosine utilisé pour traiter un grand nombre d'infections virales. Elle semblait être un bon candidat contre le SARS-CoV, mais il a été démontré que cette molécule était inefficace. L'équipe de Bruno Canard a en effet observé que la machinerie de réplication du SARS-CoV était capable d'exciser l'analogue, grâce à son activité exonucléase portée par nsp14 *(Figure 1A)* [8]. Un autre analogue de nucléotide a été testé très récemment par la même équipe sur le SARS-CoV-2. Le favipiravir est, comme la ribavirine, un analogue ambigu de la guanosine. S'il est incorporé à la place d'un A à cause de son ambiguïté, il sera reconnu comme un G lors du cycle de réplication suivant et engendrera une mutation. Le problème qu'aurait pu rencontrer une telle molécule est, comme pour la ribavirine, l'excision par nsp14. Il a cependant été démontré que le traitement au favipiravir de cellules épithéliales infectées par le SARS-CoV-2 entraînait une inhibition de la réplication virale, et ainsi une diminution de l'effet cytopathique [9]. Ces effets sont liés à une augmentation du taux de mutation du SARS-CoV-2. Il a également été démontré que le favipiravir était très fréquemment incorporé par erreur par la polymérase *(Figure 1B)*, en comparaison avec les mésappariements qui surviennent naturellement, peu fréquents. Les auteurs ont émis l'hypothèse qu'un tel niveau d'incorporations incorrectes, couplé à la rapidité de la polymérase, pouvait surpasser son activité de correction, induisant ainsi des mutations, souvent létales, dans le génome du SARS-CoV-2. Ces résultats montrent que le favipiravir a une action assez efficace sur les cellules infectées par le SARS-CoV-2 pour être testé comme traitement [9]. Afin de multiplier les chances de trouver un traitement, d'autres molécules analogues des bases sont actuellement testées. Le remdésivir, analogue de l'adénosine, a été démontré comme efficace contre le SARS-CoV-2 sur des cellules *ex vivo* [10], mais son intérêt clinique chez les patients est controversé eu égard de résultats d'essais cliniques contradictoires. De même, certains analogues tels que le galidésivir ou encore le sofosbuvir, capables d'interagir avec la RdRp *in silico*, pourraient également être testés *ex vivo* [10].

La machinerie de réplication des coronavirus semble donc représenter une cible d'intérêt pour le développement de traitements thérapeutiques, avec la possible utilisation d'analogues de nucléotides pouvant induire des mutations, le but étant d'engendrer des modifications létales pour le virus. Mais n'ayant aucun contrôle sur la nature des mutations qui auront lieu, ce type de traitement pourrait engendrer des mutations bénéfiques pour le virus, lui permettant alors une prolifération plus efficace ou une virulence accrue. C'est pourquoi il est important que les molécules testées soient capables d'engendrer un taux élevé de mutations, résultant en une perte rapide de la viabilité du virus. De plus, le développement d'un potentiel traitement nécessite de nombreuses études, notamment la détermination de la sélectivité, qui assure que la molécule testée s'attaque uniquement à la réplication du virus et n'impacte pas les processus cellulaires vitaux de son hôte. Le développement d'un tel traitement nécessitera encore de longs travaux. ◊

RNA polymerase: The Achilles heel of SARS-CoV-2

LIENS D'INTÉRÊT

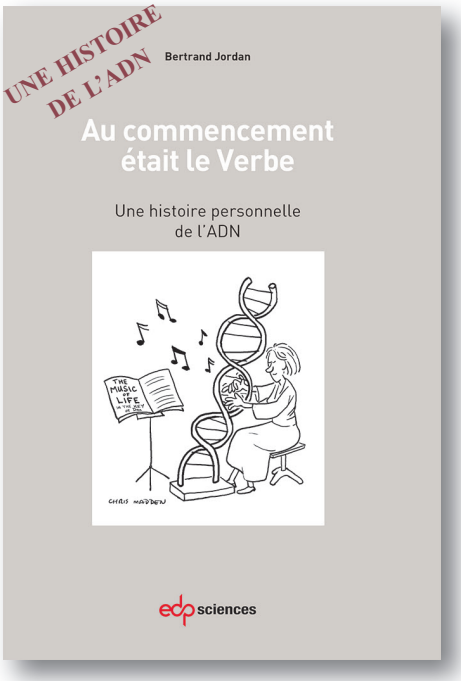
Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Bonilla-Aldana DK, Quintero-Rada K, Montoya-Posada JP, *et al.* SARS-CoV, MERS-CoV and now the 2019-novel CoV: have we investigated enough about coronaviruses? A bibliometric analysis. *Travel Med Infect Dis* 2020 ; 33 : 101566.
2. Tu YF, Chien CS, Yarmishyn AA, *et al.* A review of SARS-CoV-2 and the ongoing clinical trials. *Int J Mol Sci* 2020 ; 21 : 2657.
3. Subissi L, Posthuma CC, Collet A, *et al.* One severe acute respiratory syndrome coronavirus protein complex integrates processive RNA polymerase and exonuclease activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014 ; 111 : E3900-9.
4. Snijder EJ, Bredenbeek PJ, Dobbe JC, *et al.* Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J Mol Biol* 2003 ; 331 : 991-1004.
5. Cheng A, Zhang W, Xie Y, *et al.* Expression, purification, and characterization of SARS coronavirus RNA polymerase. *Virology* 2005 ; 335 : 165-76.
6. Imbert I, Snijder EJ, Dimitrova M, *et al.* The SARS-coronavirus PLnc domain of nsp3 as a replication/transcription scaffolding protein. *Virus Res* 2008 ; 133 : 136-48.
7. Velthuis AJW te, Arnold JJ, Cameron CE, *et al.* The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent. *Nucleic Acids Res* 2010 ; 38 : 203-14.
8. Ferron F, Subissi L, Silveira De Morais AT, *et al.* Structural and molecular basis of mismatch correction and ribavirin excision from coronavirus RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018 ; 115 : E162-71.
9. Shannon A, Selisko B, Le N-T-T, *et al.* Rapid incorporation of Favipiravir by the fast and permissive viral RNA polymerase complex results in SARS-CoV-2 lethal mutagenesis. *Nat Commun* 2020 ; 11 : 4682.
10. Wang Y, Anirudhan V, Du R, *et al.* RNA-dependent RNA polymerase of SARS-CoV-2 as a therapeutic target. *J Med Virol* 2020. doi: 10.1002/jmv.26264.

Bertrand Jordan a participé à l'extraordinaire aventure de la biologie moléculaire, encore balbutiante dans les années 1960, mais qui a complètement révolutionné les sciences du vivant au cours des décennies suivantes.

L'ADN, quasiment inaccessible au début de cette période, intervient maintenant dans d'innombrables recherches, de l'écologie à l'anthropologie, sans oublier bien sûr la médecine dont il fait désormais partie intégrante. Nous pouvons aujourd'hui lire intégralement l'ADN d'une personne en quelques heures, et en tirer de précieuses informations pour la prévention et le traitement de nombreuses maladies – et nous n'en sommes qu'au début de cette nouvelle médecine !



Acteur mais aussi témoin de ces avancées, Bertrand Jordan fait ici un récit très personnel et sans langue de bois de sa vie avec l'ADN. Ce livre ne prétend pas être une histoire complète de la biologie moléculaire, mais il illustre son développement, révélant parfois le « dessous des cartes » grâce aux expériences vécues par son auteur.

ISBN : 978-2-7598-1710-8 110 pages **20 €**

BON DE COMMANDE

À retourner à EDP Sciences, 17 avenue Hoggar, 91944 Les Ulis
Tél. : 01 49 85 60 69 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : francois.flori@edpsciences.org

NOM : ..... Prénom : .....

Adresse : .....

Code postal : ..... Ville : .....

Pays : .....

Fonction : .....

Je souhaite recevoir
Au commencement était le Verbe : 20 € + 3 € de port = 23 € TTC

en ..... exemplaire, soit un total de ..... €

❒ Par chèque, à l'ordre de EDP Sciences
❒ Par carte bancaire : ❒ Visa ❒ Eurocard/Mastercard

Carte n° |_|_|_|_| |_|_|_|_| |_|_|_|_| |_|_|_|_|

Date d'expiration : |_|_| |_|_| N° de contrôle au dos de la carte : |_|_| |_|_| Signature :

Le rôle des protéines chaperons dans les mécanismes d'adaptation bactériens

Moly Ba[1*], Maëlle Paillat[1*], Nolan Tronche[1*], Amélie Vigneron-Bouquet[1*], Amel Latifi[2]

[1]Master 2 Microbiologie intégrative et fondamentale, Aix Marseille Université, Marseille, France.
[2]Aix Marseille Université, CNRS, LCB UMR 7283, IMM, Marseille, France.
moly.ba@imm.cnrs.fr
maelle.paillat@etu.univ-amu.fr
nolan.tronche@etu.univ-amu.fr
amelie.vigneron-bouquet@etu.univ-amu.fr
latifi@imm.cnrs.fr

› Les protéines sont des macromolécules indispensables au bon fonctionnement de toutes les cellules vivantes. Elles adoptent une structure tridimensionnelle qui est nécessaire à leur fonction biologique et donc à la viabilité cellulaire. Le repliement des protéines a longtemps été considéré comme un processus spontané, mais de nombreuses études dans ce domaine ont mis en évidence le fait que la grande majorité des protéines nécessitent l'action d'autres facteurs, appelés chaperons, pour acquérir leur structure définitive. Le rôle des protéines chaperons ne se limite pas à assister le repliement des protéines puisqu'elles jouent également un rôle important dans la protection des protéines contre l'agrégation et la dégradation ainsi que dans leur adressage à leur site d'action [1] *(Figure 1)*. Selon l'action qu'ils assurent, les chaperons sont classés en deux grands groupes : les « foldases », qui assurent le bon repliement des protéines et ont pour la plupart besoin d'ATP pour fonctionner, et les « holdases », qui préservent leurs protéines-substrats de l'agrégation ou de la dégradation et ne nécessitent généralement pas d'ATP [2]. Le maintien de la protéostasie est essentiel tout au long de la vie des organismes et devient, dans le cas des bactéries, encore plus crucial lors de l'adaptation à des stress environnementaux tels que des fluctuations de température, de pH ou encore des expositions à des agents oxydants. Les chaperons Hsp (*Heat shock protein*), identifiés pour la première fois comme étant synthétisés en réponse à un choc de température, sont nécessaires à l'adaptation des protéines à plusieurs stress environnementaux et sont hautement conservés dans le monde vivant. Nous illustrerons le rôle de trois Hsp dans les mécanismes d'adaptation bactériens chez deux modèles évoluant dans différents environnements : *Escherichia coli*, une bactérie intestinale des mammifères, et *Shewanella oneidensis*, une protéobactérie marine.

Hsp90 et DnaK, deux foldases essentielles à l'adaptation au stress thermique chez *S. oneidensis*

Hsp90 est une foldase très étudiée chez les eucaryotes mais dont le rôle est peu connu chez les bactéries. *S. oneidensis* est une bactérie aquatique possédant une grande capacité à s'adapter à des stress environnementaux, comme des changements de température. En 2017, une approche génétique a permis de comprendre le rôle de Hsp90 chez *S. oneidensis*. Le gène codant ce chaperon a été supprimé et l'impact de son absence sur la viabilité dans différentes conditions de croissance a été évalué. La viabilité de ce mutant a été fortement affectée à 35 °C (température induisant un stress chaud), indiquant que Hsp90 est essentiel à la survie bactérienne dans cette condition. Pour identifier les substrats potentiels de ce chaperon, un crible génétique a été alors effectué. Dans cette technique, des fragments issus d'une banque d'ADN génomique de *S. oneidensis* ont été surexprimés individuellement dans des bactéries dépourvues du gène *hsp90*. Les fragments d'ADN isolés chez les souches dont la croissance a pu être restaurée à haute température ont été alors séquencés. Ce séquençage a permis d'identifier le gène *tilS* dont le produit, l'enzyme essentielle TilS, est responsable de la production de l'ARNt^{Ile}. Sans cette protéine, les codons AUA ne peuvent pas être traduits, impactant fortement la synthèse protéique. Des expériences d'interactions protéine-protéine ont démontré que TilS interagissait avec Hsp90. L'étude de l'agrégation de TilS *in vitro* a montré que Hsp90 protège TilS à haute température. Lors d'un choc thermique, il a été établi *in vivo* que la quantité de TilS diminuait en absence d'Hsp90 [1]. Par la suite, il a été prouvé que la protéase HslVU était responsable de la dégradation de la protéine TilS [3]. Ainsi, Hsp90 et HslVU peuvent réguler finement la quantité de la protéine TilS dans la cellule. Ces résultats suggèrent que Hsp90 protège TilS à la fois de l'agrégation et de la dégradation protéolytique en la maintenant repliée à haute température [1] *(Figure 2A)*. La même équipe a aussi étudié l'implication des protéines à domaines J (PDJ) dans les mécanismes d'action de DnaK (Hsp70) en cas de stress froid [4]. DnaK est un chaperon ATP-dépendant impliqué dans des fonctions cellulaires importantes. Les PDJ stimulent l'hydrolyse de l'ATP indispensable au fonctionnement des foldases. Elles sont classées en plusieurs catégories structurales (A, B ou C) et possèdent des motifs et domaines très conservés [5]. Chez *S. oneidensis*, plusieurs PDJs sont caractérisées dont DnaJ, connue pour agir avec DnaK. D'autres PDJ ont été identifiées sans que leur fonction ne

*Ces quatre auteurs ont participé de façon égale au travail.

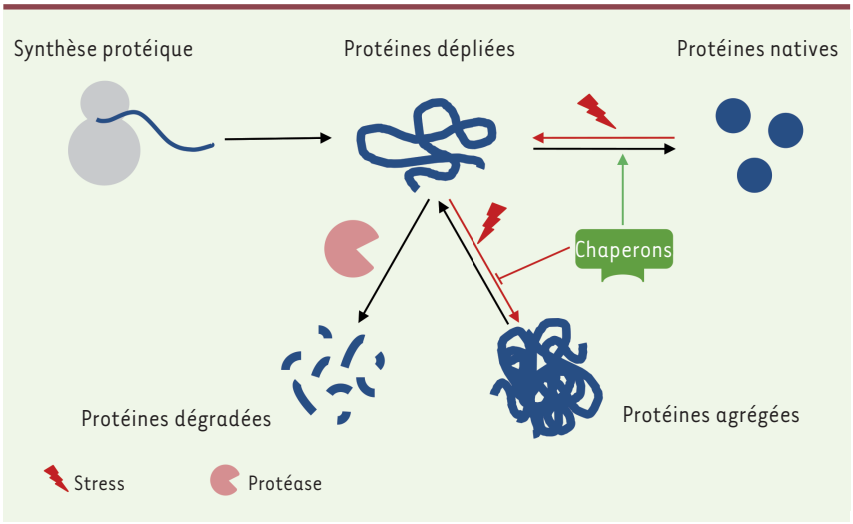


Figure 1. ***Régulation de la protéostasie cellulaire par les protéines chaperons.*** Au cours de la vie bactérienne, les protéines sont exposées à de nombreux stimulus extérieurs impactant leur stabilité. Les chaperons moléculaires confèrent aux protéines leur structure native et assurent également leur protection en situation de stress. Un équilibre doit être préservé entre les différents états protéiques pour assurer les fonctions cellulaires essentielles. Cet équilibre est appelé protéostasie et les chaperons moléculaires en sont les principaux garants.

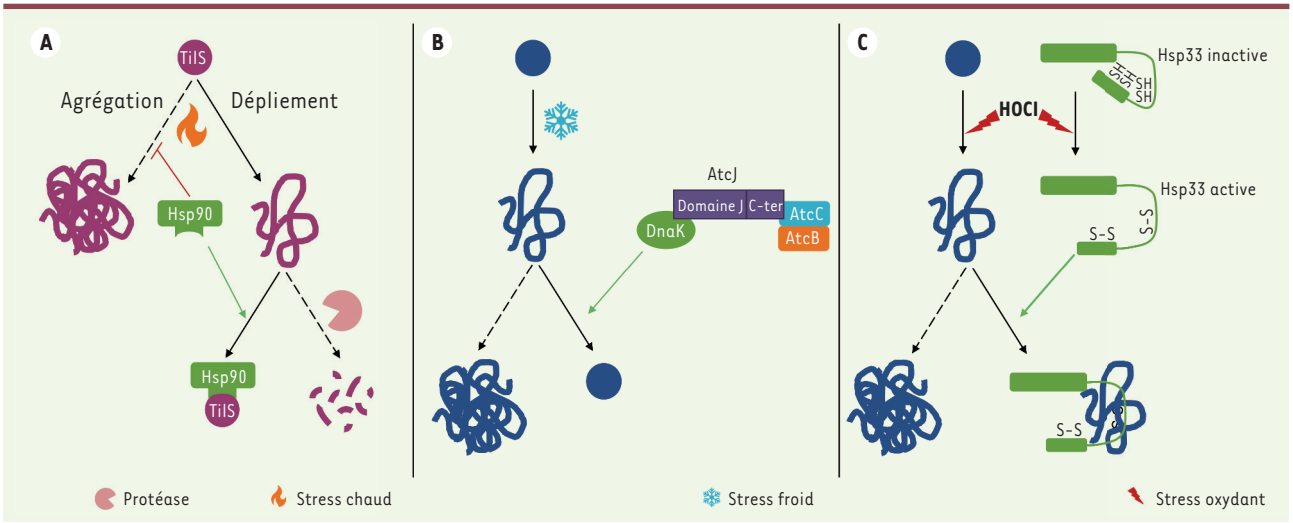


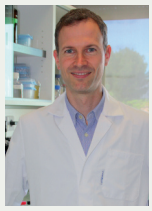
Figure 2. ***Implication des chaperons moléculaires dans les mécanismes d'adaptation aux stress chez S. oneidensis et E. coli. A.*** Chez *S. oneindensis*, la protéine essentielle TilS est sensible au stress thermique. TilS interagit avec le chaperon Hsp90 qui la protège contre l'agrégation et la dégradation protéolytique. ***B.*** La protéine à domaine J, AtcJ, est un partenaire de la foldase DnaK chez *S. oneidensis*. En condition de stress froid, AtcJ est impliquée dans la stimulation de l'activité ATPasique de DnaK, assurant le maintien de ses substrats sous forme native. Les protéines AtcCB pourraient influencer la localisation intracellulaire du complexe AtcJ-DnaK. ***C.*** Chez *E. coli,* le chaperon moléculaire Hsp33 est activé par l'agent oxydant HOCl. Ce dernier provoque un déplement et une oxydation des quatre cystéines, exposant ainsi la zone d'interaction aux substrats. Une fois activé, Hsp33 empêche l'agrégation des protéines déstructurées par HOCl (en bleu). SH : groupement thiol réduit ; S-S : pont disulfure des quatre cystéines.

soit connue ; c'est le cas notamment de AtcJ. Le gène *atcJ* fait partie de l'opéron *atc,* codant également les protéines de fonction inconnue AtcA, AtcB et AtcC. Une diminution de la viabilité a été observée chez un mutant dépourvu des gènes *atc* en condition de stress froid. Des techniques analysant les interactions protéines-protéines ont permis d'identifier un réseau entre les différentes protéines Atc et DnaK. AtcJ est capable d'interagir avec DnaK, *via* son domaine J, et avec le complexe AtcCB *via* son extrémité C-terminale *(Figure 2B)*. Le rôle d'AtcCB n'est pas encore totalement compris, une des hypothèses étant qu'il pourrait influencer la localisation intracellulaire du complexe AtcJCB-DnaK [4]. Ces résultats constituent une première avancée dans la compréhension de l'implication des PDJs dans le mécanisme adaptatif de *S. oneidensis* dans cette condition.

Hsp33, une holdase spécifique de la réponse au stress oxydant chez *E. coli*

E. coli doit, comme tous les êtres vivants, résister au stress oxydant rencontré dans sa niche écologique. L'accumulation d'agents oxydants, tel que l'acide hypochloreux (HOCl), est à l'origine d'un déséquilibre de la balance oxydant/anti-oxydant et de l'altération des macromolécules sensibles à l'oxydation. Le stress oxydant est responsable d'une

Entretien avec Marianne Ilbert et Olivier Genest



Marianne Ilbert et Olivier Genest sont chargés de recherche au laboratoire « Bioénergétique et ingénierie des protéines » (BIP) de Marseille. Ils se sont spécialisés dans l'étude de l'adaptation des bactéries aux stress environnementaux grâce aux protéines chaperons. Marianne Ilbert a reçu le prix Jacques Monod en 2007. Olivier Genest a obtenu la médaille de bronze du CNRS en 2019.

Qu'est-ce qui vous a conduits à travailler sur les protéines chaperons ?

Olivier Genest : Je cherchais un stage de master et le sujet proposé sur un chaperon spécifique par Chantal Iobbi-Nivol, qui était la directrice de thèse de Marianne à ce moment-là, m'intéressait beaucoup. J'ai fait ma thèse dans cette équipe et j'ai pris la suite des travaux de Marianne. Par la suite, j'ai travaillé sur des chaperons généraux, car je trouvais ces protéines réellement fabuleuses au vu de leur importance dans les cellules. Elles sont généralement conservées des bactéries à l'Homme et souvent les mêmes mécanismes d'action sont retrouvés.

Marianne Ilbert : Je ne me rappelle pas avoir eu d'enseignement sur la thématique des protéines chaperons. Je suis tombée un peu par hasard avec mon sujet de recherche de master sur une protéine chaperon. Je pensais à ce moment-là que les chaperons étaient des protéines accessoires. Je me suis rendue compte que ces protéines jouent en réalité un rôle central dans toutes les cellules vivantes et c'est ce qui rend leur étude fascinante.

Vous avez tous les deux effectué un post-doctorat aux États-Unis, avez-vous envisagé d'y rester ?

OG : J'ai fait mon post-doctorat aux *National Institutes of Health* (NIH) aux États-Unis dans l'équipe de Sue Wickner. Cette expérience était vraiment exceptionnelle ! C'est un moment de notre carrière de chercheur en devenir où on a la possibilité de travailler exclusivement sur nos sujets de recherche. Dans mon cas, il n'y avait pas de tâches administratives à mener ou de cours à donner. C'était pour moi des conditions de travail optimales et le laboratoire avait énormément de moyens. J'ai passé cinq ans dans ce laboratoire et comme c'était très intéressant côté recherche, évidemment, ça donne très envie d'y rester. Mais j'avais quand même la volonté de rentrer en France et je suis très satisfait d'être de retour au CNRS.

MI : Je voulais d'abord faire mon post-doctorat en Europe et je suis finalement partie aux États-Unis. Je n'étais initialement pas attirée par ce pays et finalement je ne voulais plus en repartir ! C'est une chance énorme de pouvoir partir pendant quelques années dans un laboratoire étranger. Ça m'a ouvert les yeux, j'ai une vision du monde complètement différente depuis que je suis partie. Au niveau scientifique, j'étais à l'université du Michigan et c'est vrai que d'être dans un laboratoire avec de gros financements permet de ne pas être limité dans nos recherches. C'est un des meilleurs moments d'une carrière de chercheur, même s'il existe quand même une pression liée à la publication de nos travaux. Mais je voulais rentrer d'une part pour des raisons personnelles, et, d'autre part, car notre système de recherche français est unique : nous pouvons mener librement nos recherches, nous avons la chance d'avoir des postes permanents relativement tôt dans nos carrières et nous avons une recherche de haut niveau.

Pouvez-vous nous donner les avantages et inconvénients d'être chercheur aux États-Unis et en France ?

OG : Je trouve qu'un des gros avantages de la recherche au CNRS est la liberté du sujet. Il faut bien évidemment que nos recherches s'inscrivent dans le cadre des thématiques d'une section de recherche ou d'un laboratoire, mais on reste quand même très libre d'étudier les mécanismes que l'on souhaite. Je trouve que c'est un côté très positif. Un autre aspect très intéressant est qu'en France, en tout cas à Marseille, les chercheurs s'intéressant à des thématiques communes peuvent être regroupés. Par exemple, l'Institut de Microbiologie de la Méditerranée (IMM) dans lequel nous travaillons rassemble un très grand nombre de scientifiques travaillant sur divers aspects de la microbiologie, ce qui nous permet d'avoir de très nombreux échanges avec nos collègues pour pouvoir s'apporter des connaissances que nous ne possédons pas. Dans mon laboratoire de post-doc aux États-Unis, nous étions beaucoup moins regroupés par thématique.

MI : En France, il y a aussi beaucoup de chercheurs permanents, c'est différent du système américain où il y a en général un chercheur permanent et les membres du laboratoire changent énormément. Cette stabilité nous permet de créer des collaborations pérennes. En France, nous sommes organisés sous forme d'équipes avec plusieurs chercheurs permanents, ce qui nous permet de nous soutenir. Dans les laboratoires américains, les chercheurs peuvent obtenir d'énormes financements mais si, pendant quelques années, ils ne décrochent pas de nouveaux financements, leur laboratoire peut fermer définitivement. Nous avons ce gros avantage, je pense, d'être plusieurs chercheurs permanents sur une thématique et du coup d'avoir une force de frappe différente et fonctionnelle, surtout sur le long terme.

Le métier de chercheur est-il compatible avec une vie familiale et sociale ?

OG : C'est un métier qui demande beaucoup de travail, ça c'est sûr, mais il existe quand même une certaine flexibilité qui peut permettre d'allier très bien sa vie de chercheur et sa vie familiale. Il est vrai qu'après une journée de travail où on participe à l'encadrement des étudiants et aux manipulations, il est assez fréquent de travailler le soir chez soi pour rédiger des articles ou des demandes de financement. Si on comptait nos heures, on s'apercevrait qu'on travaille bien plus que si on faisait des horaires classiques de bureau, mais au final nous avons une certaine souplesse qui permet de concilier le travail et le reste. Mais il est clair que nos recherches nous trottent toujours dans la tête !

MI : C'est vrai que c'est un métier qui requiert de la passion, on peut vite se retrouver dans un engrenage où certains se retrouvent à ne faire plus que ça. Mais il faut savoir faire la part des choses. Si vous travaillez tout le temps, vous ne prenez jamais de recul. Et quelque part, faire un *break*, prendre des vacances, c'est néces-

saire et bénéfique pour votre bien-être et pour l'avancée de vos recherches. Il ne faut par contre pas espérer que ça soit un métier avec des journées de 8 h à 17 h et puis on passe à autre chose, ce n'est pas vrai. Mais on peut avoir une vie personnelle et sociale, tout en ayant une vie professionnelle épanouie.

Pour vous, le métier de chercheur est plus un travail individuel ou collectif ?

OG : Je pense qu'il faut absolument l'individuel et le collectif. Il y a un gros investissement personnel car il faut à la fois lire les publications de la communauté scientifique, avoir des idées originales, mener des expériences... Mais tout seul on ne peut pas y arriver. Si je devais choisir entre les deux, je dirais donc que le métier de chercheur est un travail d'équipe. Nous travaillons directement avec des étudiants en thèse ou avec nos collègues de l'équipe, nous développons des collaborations avec d'autres chercheurs sur des thématiques qui apportent un plus à nos recherches comme par exemple sur des aspects interdisciplinaires.

MI : Je suis d'accord avec Olivier, seul ce n'est juste pas possible de mener à bien un sujet de recherche. Les étudiants, ingénieurs et autres collègues sont indispensables pour avancer sur un projet. De plus, on ne maîtrise pas tout, il faut donc savoir aussi se dire « sur cette thématique, je ne suis pas compétent » et aller discuter avec des collègues. C'est mon cas actuellement, une partie de mon projet s'oriente sur la chimie du cuivre où je manque de compétences, donc je travaille en étroite collaboration avec des chimistes. Les collaborations sont indispensables : il faut savoir accepter que l'on ne puisse pas tout comprendre, tout savoir.

Comment envisagez-vous votre plan de carrière dans dix ou vingt ans ?

OG : Ce que je souhaite dans dix ou vingt ans, c'est surtout continuer à me régaler dans la recherche et avoir toujours envie de découvrir des choses nouvelles. Continuer à travailler sur les chaperons, pourquoi pas, puisque c'est pour le moment ce que je fais et ça se passe plutôt bien. Par exemple, je voudrais trouver toutes les protéines clientes avec qui le chaperon Hsp90 interagit, et trouver leurs fonctions pour bien comprendre ce que fait Hsp90 chez les bactéries. Ce qu'on aimerait faire également c'est étudier les chaperons chez d'autres modèles bactériens. On pense en effet que chez certaines bactéries pathogènes, Hsp90 joue un rôle très important dans la virulence, donc pourquoi pas essayer de trouver des inhibiteurs d'Hsp90 qui permettent de bloquer ou de limiter la virulence chez ces bactéries. Et il y a pleins d'autres chaperons à explorer !

MI : Je voudrais continuer à développer les projets qui me plaisent. Il y a deux/trois ans, j'ai fait un choix de carrière, j'ai dévié mon sujet de recherche dans le but de retravailler sur la thématique des chaperons et d'étudier leur rôle lors de l'adaptation des bactéries face aux stress induit par les métaux. Ce sont les recherches que je veux mener dans l'avenir, je pense que c'est un des meilleurs choix que j'ai fait dans ma carrière scientifique. Moralité, il faut toujours faire quelque chose qui vous plaît, aller vers les thématiques qui vous passionnent. Je vais donc continuer sur ce sujet, il y a des tonnes de choses que j'ai envie de faire, plein d'idées qui viennent, d'expériences qu'on veut mener, et clairement pour les dix ans à venir j'ai de quoi faire dans la recherche.

diminution du niveau d'ATP cellulaire, entraînant l'inactivation des foldases [6]. Dans cette condition, le maintien de la protéostasie repose alors sur l'action des holdases comme Hsp33. Hsp33 agit sur des substrats de DnaK en évitant leur agrégation lorsque cette dernière n'est pas fonctionnelle [2]. Le rôle de Hsp33 lors d'un stress oxydant induit par HOCl a été étudié chez *E. coli* en 2008 [7]. Il a été démontré par une technique d'analyse protéique qu'une faible concentration de HOCl est suffisante pour induire le dépliement de protéines modèles. Afin de déterminer si Hsp33 était capable de protéger ces protéines lors d'un stress induit par HOCl, un mutant dépourvu du gène *hsp33* a été obtenu. L'exposition de ce mutant à de faibles concentrations de HOCl (6 µM) impacte fortement sa viabilité. La souche mutante présente également un niveau d'agrégation des protéines plus important que la souche sauvage après incubation avec l'agent oxydant. Ces données suggèrent que Hsp33 est actif lors d'un stress induit par HOCl. Pour confirmer cette hypothèse, le rôle de l'agent oxydant dans le mécanisme d'activation de Hsp33 a été étudié. Il est connu que ce chaperon existe sous deux conformations. Sous sa forme inactive, Hsp33 est replié et les groupements thiols (-SH) de ses cystéines Cys^{232}, Cys^{234}, Cys^{265} et Cys^{268} sont réduits. Dans sa forme active, le chaperon se trouve dans un état partiellement déplié et les quatre cystéines sont alors oxydées (S-S). En suivant l'état d'oxydation des cystéines, il a été démontré que HOCl était responsable de l'oxydation de leurs groupements thiols (-SH). La présence de HOCl est aussi responsable de réarrangements structuraux rendant accessibles les sites d'interaction de Hsp33 avec ses protéines substrats. Remarquablement, ces données suggèrent que l'oxydation de Hsp33 induite par HOCl active sa fonction chaperon, permettant une adaptation spécifique à cet oxydant *(Figure 2C)*.

Les Hsp, des chaperons essentiels à l'adaptation au stress chez les bactéries

S. oneidensis et *E. coli* sont deux modèles bactériens connus pour leur capacité à croître dans des écosystèmes où les stress thermiques et oxydants sont souvent rencontrés. Les travaux ci-dessus montrent l'importance de deux classes de chaperons dans les mécanismes d'adaptation bactériens. Hsp90 et DnaK sont deux foldases essentielles à la survie bactérienne en condition de stress thermiques chez *S. oneidensis* [1,4]. Chez *E. coli,* Hsp90 et le système DnaK fonctionnent de manière indépendante. Dans certains cas, Hsp90 agit en synergie avec le système DnaK pour compléter le repliement [8]. La holdase Hsp33 intervient à la suite de l'inactivation des foldases par un stress oxydant chez

E. coli. Comme nous l'avons rappelé, une étude a de plus prouvé que Hsp33 est activée par HOCl, un oxydant responsable du dépliement des protéines [7]. *In fine*, ces différentes études ont montré le rôle essentiel des chaperons dans l'adaptation lors de conditions de stress entraînant la déstructuration des protéines. Les chaperons étant des protéines aussi retrouvées chez les eucaryotes, leur étude chez les bactéries est pertinente et utile pour mieux comprendre leur implication chez l'Homme. En effet, chez l'Homme, les protéines chaperons sont connues pour être impliquées dans différents processus pathologiques. Un mauvais repliement des protéines est à l'origine des agrégats responsables de pathologies neurodégénératives dont les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Les chaperons Hsp90 et Hsp70 ont été identifiés comme jouant un rôle majeur dans le développement de ces maladies. L'augmentation de la quantité de Hsp70 couplée à la diminution de celle de Hsp90 pourrait réduire l'agrégation des protéines et diminuer leur neurotoxicité [9]. Ces données semblent prometteuses en vue de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. ◊

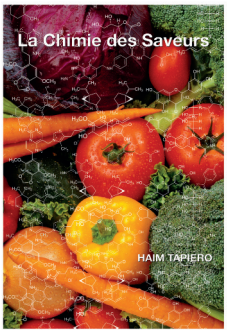
Role of chaperons in bacterial adaptive mechanisms

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Honoré FA, Méjean V, Genest O. Hsp90 is essential under heat stress in the bacterium Shewanella oneidensis. *Cell Reports* 2017 ; 19 : 680-7.
2. Reichmann D, Xu Y, Cremers CM, *et al.* Order out of disorder: working cycle of an intrinsically unfolded chaperone. *Cell* 2012 ; 148 : 947-57.
3. Honoré FA, Maillot NJ, Méjean V, *et al.* Interplay between the Hsp90 chaperone and the hslvu protease to regulate the level of an essential protein in Shewanella oneidensis. *mBio* 2019 ; 10. 10.1128/mBio.00269-19.
4. Maillot NJ, Honoré FA, Byrne D, *et al.* Cold adaptation in the environmental bacterium Shewanella oneidensis is controlled by a J-domain co-chaperone protein network. *Commun Biol* 2019 ; 2 : 323.
5. Greene MK, Maskos K, Landry SJ. Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 6108-13.
6. Winter J, Linke K, Jatzek A, *et al.* Severe oxidative stress causes inactivation of dnak and activation of the redox-regulated chaperone Hsp33. *Mol Cell* 2005 ; 17 : 381-92.
7. Winter J, Ilbert M, Graf PCF, *et al.* Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding. *Cell* 2008 ; 135 : 691-701.
8. Genest O, Wickner S, Doyle SM. Hsp90 and Hsp70 chaperones: collaborators in protein remodeling. *J Biol Chem* 2019 ; 294 : 2109-20.
9. Lackie RE, Maciejewski A, Ostapchenko VG, *et al.* The Hsp70/Hsp90 chaperone machinery in neurodegenerative diseases. *Front Neurosci* 2017 ; 11 : 254.



La cuisine est une science. Il existe une relation étroite entre élaborer une recette et entreprendre une recherche scientifique. Quelle que soit l'origine d'une recette, d'un livre ou inventée, il faudra faire le choix des ingrédients, les mélanger et les cuire de manière appropriée afin de ne pas altérer les substances actives qui composent les ingrédients.

Une fois la cuisson terminée, il faudra analyser le goût et si nécessaire prévoir son amélioration. Améliorer une recette nécessite de connaître le ou les processus qui interviennent dans le développement des arômes, des saveurs et de la texture. Cette approche est similaire à celle développée par le scientifique.

La relation entre l'élaboration des recettes, les substances nutritives qui composent les ingrédients et la santé de l'homme est issue de plusieurs disciplines de la recherche fondamentale et clinique. Au cours des dernières années, de nombreux travaux scientifiques ont été publiés sur le rôle de la nutrition et la réduction des risques dans les pathologies comme les maladies cardio-vasculaires ou les cancers.

Le but principal de cet ouvrage a été d'identifier la structure chimique des composants actifs des ingrédients utilisés en cuisine (légumes, herbes aromatiques, épices) et qui entrent dans la préparation des recettes pour « végétariens » et « omnivores ».

ISBN : 978-2-7598-1137-3 180 pages

BON DE COMMANDE

À retourner à EDP Sciences, 17 avenue du Hoggar, 91944 Les Ulis Cedex A - E-mail : francois.flori@edpsciences.org

NOM : ..... Prénom : .....

Adresse : .....

Code postal : ..... Ville : .....

Pays : .....

Fonction : .....

Je souhaite recevoir l'ouvrage **La chimie des Saveurs :** 20 € + 3 € de port = **23 € TTC**

en ..... exemplaire, soit un total de ..... €

❒ Par chèque, à l'ordre de **EDP Sciences**

❒ Par carte bancaire : ❒ Visa ❒ Eurocard/Mastercard

Carte n° |_|_|_|_| |_|_|_|_| |_|_|_|_| |_|_|_|_| Signature :

Date d'expiration : |_|_| |_|_|

N° de contrôle au dos de la carte : |_|_|_|