

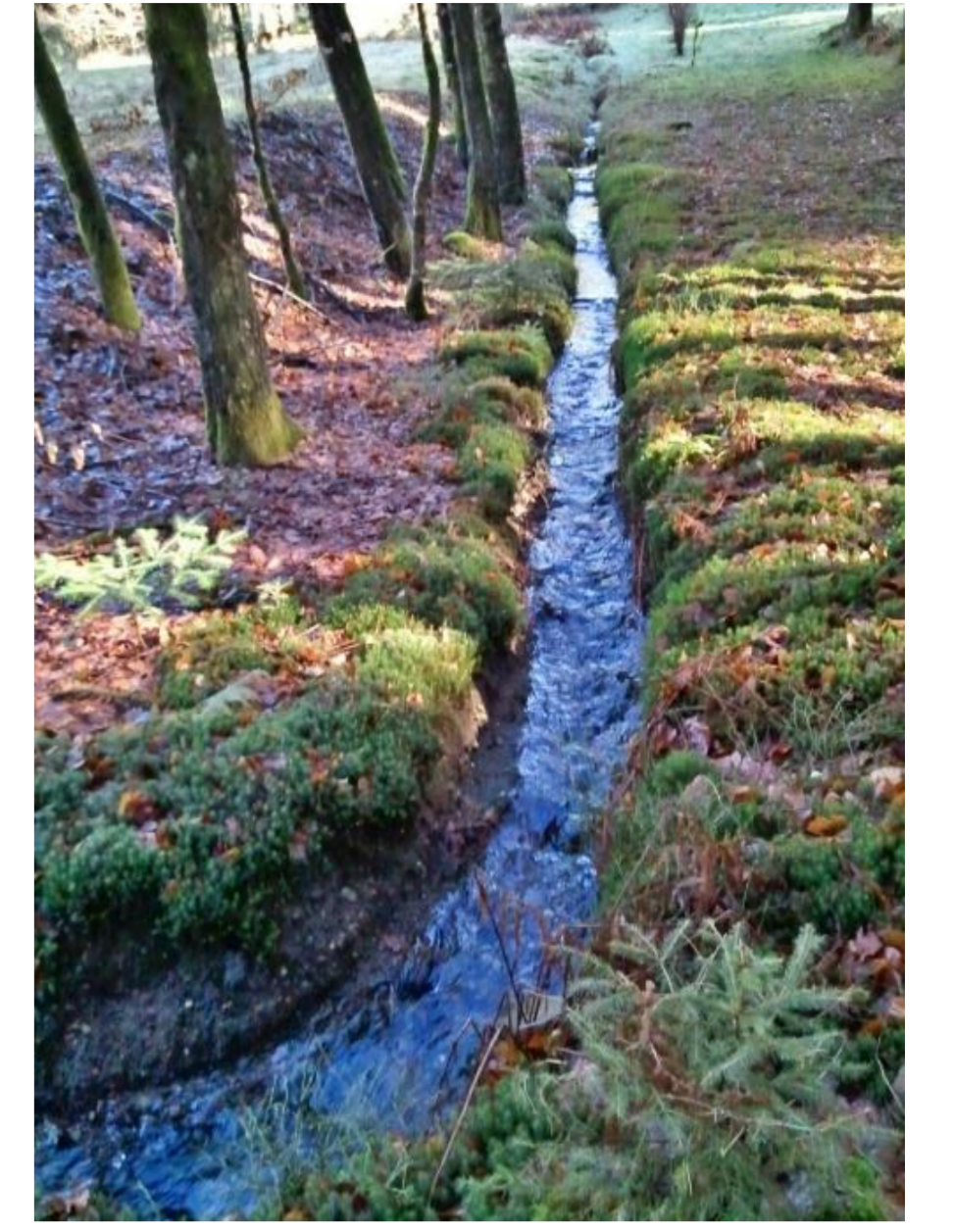
Delftia acidovorans, une bactérie qui rend l'eau antioxydante : des propriétés bénéfiques pour notre santé ?

Résumé

Après avoir mis en évidence le pouvoir antioxydant d'une eau de source de montagne, en sont isolées des bactéries responsables d'une activité anti-radical anion superoxyde. Une souche de *Delftia acidovorans* est identifiée. Essentielle pour la dégradation de la lignine, elle fait partie des populations bactériennes trouvées dans des eaux de boisson, par exemple minérales embouteillées. Son intérêt vient de ses propriétés symbiotiques envers les plantes et de ses capacités à détoxifier des sites pollués par des composés chimiques complexes qui vont des acides carboxyliques insaturés, aux acides aromatiques, stéroïdes et polluants comme le tributylphosphate... Nous montrons ici le remarquable pouvoir antioxydant des métabolites qu'elle rejette dans l'eau, surtout visible envers peroxyde d'hydrogène et radical hydroxyle.

L'extrait bactérien « E » est constitué du surnageant obtenu par centrifugation pendant 1 h à 20000 x g d'une suspension en eau distillée de cette souche pure, préalablement agitée pendant 20 h à 4°C. Des dénombrements bactériens sont effectués, avant et après les 20 h d'extraction. Des modèles *in vitro* acellulaires permettent de produire et doser O₂⁻, H₂O₂ et HO[•] par spectrophotométrie, face à des concentrations croissantes de E. Après dosage des protéines de E, 500 µg sont dessalés pour une séparation en gels bidimensionnels natifs. Après leur coloration, les données des gels sont acquises par densitométrie, montrant des spots protéiques d'intérêt.

Les dénombrements prouvent la viabilité de la bactérie durant l'extraction en eau distillée. Une inhibition des 3 espèces réactives de l'oxygène est observée en fonction de la concentration en extrait bactérien. Elle est majeure sur H₂O₂ avec une concentration inhibitrice à 50% (CI₅₀) de 46 µL d'extrait/mL et sur HO[•] (CI₅₀ de 87 µL d'extrait/mL). Nous observons au sein des gels des spots intenses qui donneront lieu à une identification protéique ultérieure, à la recherche d'enzymes ou protéines de stress. Conclusion : La bactérie rejette directement dans l'eau distillée des éléments antioxydants, comme elle le fait sûrement naturellement dans son environnement et pourrait présenter un intérêt dans la modulation du stress oxydant chez l'Homme.



Introduction & objectifs

Delftia acidovorans a déjà été remarquée pour son rôle essentiel dans la dégradation du tributylphosphate d'après Ahire *et al.* (2012) et aussi pour sa sécrétion de delftibactine capable en quelques secondes de précipiter les ions d'or dans l'eau pour donner des structures solides complexes, similaires à celles trouvées dans les pépites d'or (Johnston *et al.*, 2013). Nous recherchons ici à prouver les capacités antioxydantes des métabolites secondaires rejetés dans de l'eau distillée par une souche de cette espèce, isolée d'une eau de source ayant au préalable montré une inhibition de l'anion superoxyde et provenant d'un endroit montagneux extrêmement préservé sur le plan de la biodiversité. Les effets antioxydants d'un extrait aqueux « E » de cette souche sont testés en modèles acellulaires vis-à-vis des trois premières espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites habituellement par les phagocytes stimulés : radical anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène et radical hydroxyle. Notre but vise aussi à mettre en évidence et à séparer des protéines d'intérêt de E, susceptibles d'être impliquées dans les effets antioxydants observés. Les protéines de spots d'intérêt visualisés dans les gels de séparation seront ultérieurement identifiées par spectrométrie de masse.

Matériels & méthodes



Figure 1 : Représentation schématique des principales étapes de culture et d'extraction de *D. acidovorans*

Légende : A. Culture de *D. acidovorans* en milieu liquide (5 j). B. Centrifugations et lavages. C. Récupération des culots puis extraction en eau distillée

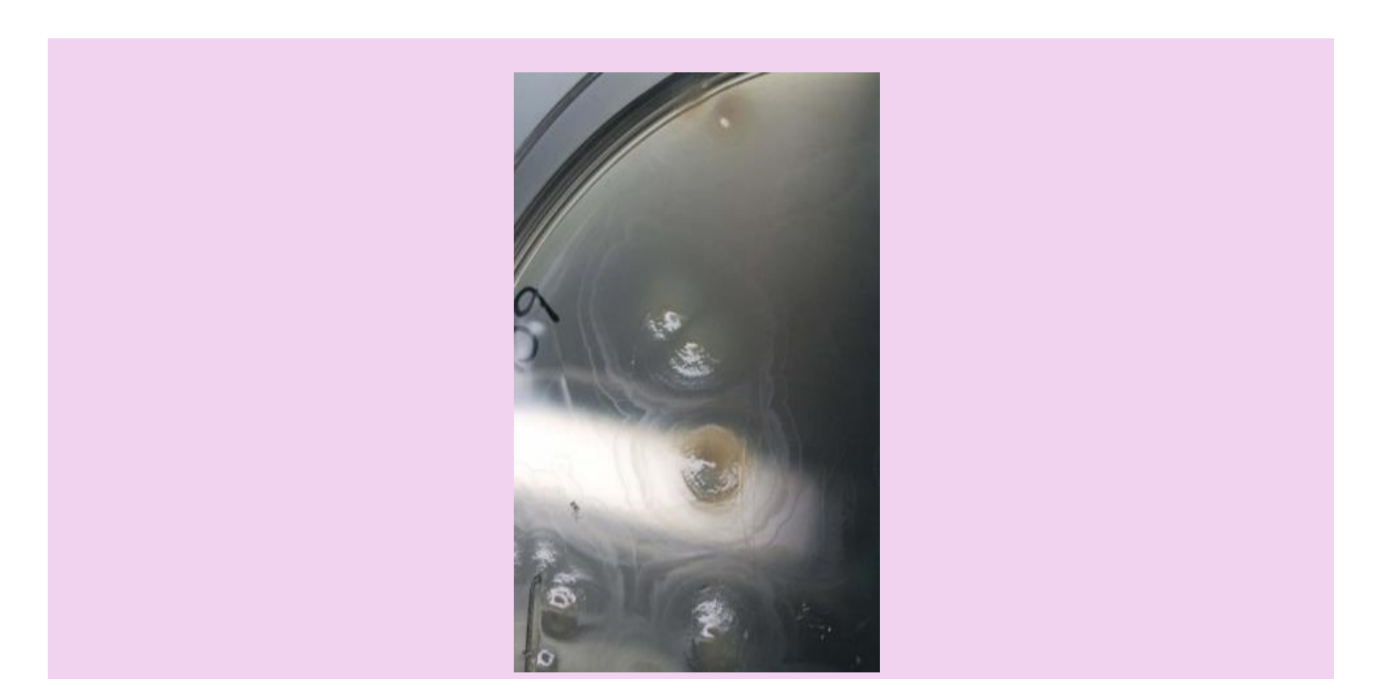


Figure 2 : Dénombrements aux temps t0 et t20 ext en surface de gélose PCA

Delftia acidovorans est cultivée dans un bouillon minimaliste (2,5g de tryptone/L, 1,25g d'extrait de levure/L) pendant environ 5 jours (Fig. 1A). S'ensuivent des étapes de centrifugations et lavages visant à récupérer les micro-organismes (Fig. 1B et 1C). Ceux-ci sont placés en présence d'eau distillée stérile pendant une durée de 20 h, sous agitation et en bain glacé. Des dénombrements des micro-organismes (Fig. 2) sont effectués juste avant (t0 ext) et à la fin de ce processus d'extraction (t20 ext) par la technique d'ensemencement en surface de gélose PCA (plate count agar). Après vérification de la normalité de la population et des homogénéités de variances (Test de Levene, $p=0,05$, Anastat), les données sont traitées statistiquement par ANOVA (test global de Fisher, $p=0,05$ suivi du test a posteriori PLSD de Fisher, $p=0,05$; Super ANOVA, Abacus Concept®, Berkeley, CA, USA) et les résultats, sont présentés en boîtes à moustaches (Statview 4.5., Abacus, Concept®).

Les tests d'inhibition des ERO précitées sont effectués sur E en modèles acellulaires (6 essais indépendants). L'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle sont dosés par méthodes spectrophotométriques en présence de volumes croissants de E (allant de 0 à 100 µL dans un volume final de 1 mL). Afin d'évaluer l'inhibition d'O₂⁻ par E, l'extrait à concentrations croissantes est placé en contact avec le couple xanthine/xanthine oxydase (selon Aruoma *et al.*, 1989). L'effet direct de E sur une quantité définie d'H₂O₂ est observé après leur mise en contact, suivie d'un ajout de sels ferreux en milieu acide et de thiocyanate de potassium. La concentration en peroxyde d'hydrogène peut alors être mesurée grâce à la formation d'un complexe de couleur rouge selon une méthode adaptée (Hochart-Behra *et al.*, 2014) de celle de Thurman *et al.* (1972). L'effet de E à concentrations croissantes sur le radical hydroxyle généré par la réaction de Fenton est apprécié après ajout de déoxyribose et dégradation de ce sucre en présence d'HO[•] résiduel (non inhibé par E) par la mesure de MDA (malondialdéhyde) selon Halliwell B *et al.* (1987).

Après vérification de la normalité de la population et des homogénéités de variances (Test de Levene, $p=0,05$, Anastat), les données sont traitées statistiquement par ANOVA (test global de Fisher, $p=0,05$ suivi du test a posteriori PLSD de Fisher, $p=0,05$; Super ANOVA, Abacus Concept®, Berkeley, CA, USA) et les résultats, sont présentés en boîtes à moustaches (Statview 4.5., Abacus, Concept®).

Après dessalage de 500 µg de protéines de E, celles-ci sont lyophilisées. Leur isoélectrofocalisation (IEF) (ReadyStrip® gradient 3-10, BioRad) suivie d'une SDS-PAGE (sodium dodécyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) en gradient d'acrylamide 4-20% permettent de les séparer en gels natifs en 2 dimensions dont les données sont acquises après coloration au bleu de Coomassie colloïdal (Sigma) grâce au logiciel PDquest® et au densitomètre GS800 (BioRad).

Résultats & discussion

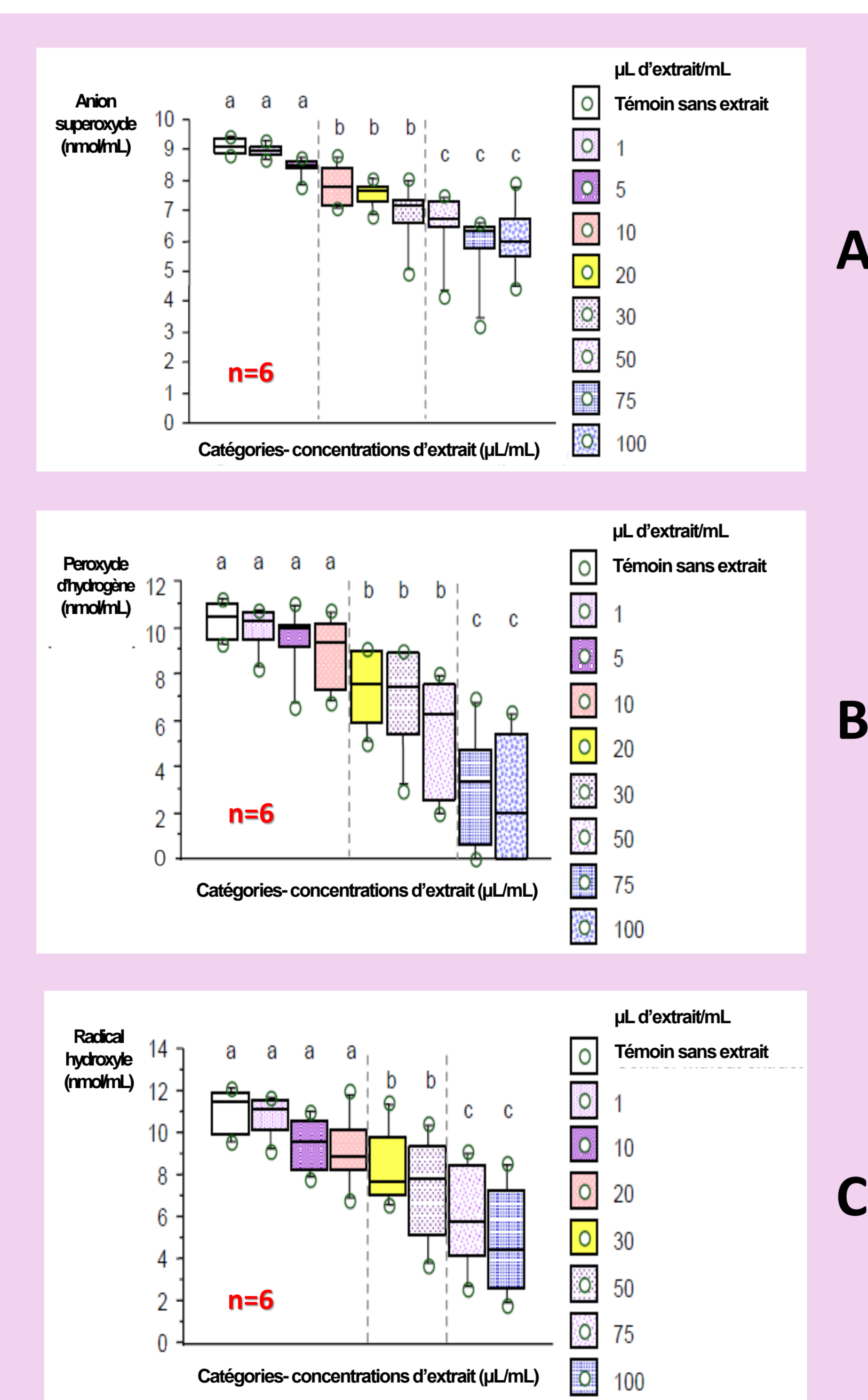


Figure 3 : Représentations graphiques de l'effet de « E » sur les ERO en modèles acellulaires

Légende : A. Effet sur O₂⁻. B. Effet sur H₂O₂. C. Effet sur HO[•]. Les concentrations de chaque espèce réactive de l'oxygène sont représentées en boîtes à moustaches (nmol/mL) en fonction des volumes d'extrait/mL réactionnel. Les barres horizontales représentent, pour chaque boîte, de l'intérieur vers l'extérieur : la médiane, les 25^{ème}, 75^{ème} percentiles, les 10^{ème} et 90^{ème} percentiles et les ronds, les valeurs extrêmes. Une différence significative est constatée entre les moyennes obtenues pour chaque catégorie comparées deux à deux (PLSD de Fisher, $p=0,05$, $n=6$ expériences indépendantes). L'appartenance aux groupes de moyennes homogènes distincts, déterminés par ANOVA, est ici signalée par les lettres a, b et c.

Les dénombrements bactériens prouvent la viabilité bactérienne durant l'extraction. L'anion superoxyde est inhibé par paliers de façon statistiquement significative ($p=0,05$) en fonction des concentrations croissantes de l'extrait (Fig. 3A). L'effet sur O₂⁻ est visible dès 10, puis 50 µL de E/mL jusqu'à atteindre une inhibition maximale moyenne d'environ 30% à la concentration de 100 µL de E/mL réactionnel. Cette inhibition montre l'efficacité de notre extrait sur la première ERO produite en début de cascade oxydative phagocytaire. Toutefois, lorsque cette ERO est dismutée en H₂O₂ par catalase de la superoxyde dismutase, ce peroxyde d'hydrogène nécessitera à son tour une détoxification sans quoi il aboutira, par la réaction de Fenton, au radical hydroxyle très délétère pour nos tissus.

La Figure 3B montre de façon très marquée et de manière significative ($p=0,05$) l'inhibition directe d'H₂O₂ par l'extrait E, toujours par paliers, dès 20, puis 75 µL de E/mL réactionnel. Une inhibition maximale d'une valeur moyenne de 80% est atteinte pour la plus forte concentration testée de 100 µL de E/mL réactionnel. La détermination de la concentration inhibitrice à 50% (CI₅₀) donne une valeur de 46 µL de E/mL. Elle fait preuve d'une belle efficacité de E sur H₂O₂. A ce stade, il est grandement probable que les métabolites secondaires rejetés par *D. acidovorans* dans E éteignent complètement la flambée respiratoire phagocytaire avant le stade de production d'HO[•], voire d'acide hypochloreux.

De façon assez surprenante, l'efficacité de E est aussi constatée sur HO[•] qui, pourtant, est une ERO extrêmement réactive (Fig. 3C). En effet, E inhibe le radical hydroxyle de façon significative ($p=0,05$), ici encore par paliers, dès 30, puis 75 µL de E/mL réactionnel, jusqu'à atteindre une inhibition maximale moyenne de 60% à la concentration de 100 µL de E/mL réactionnel. Le calcul de la CI₅₀ est ici encore possible et indique 87 µL de E/mL réactionnel. L'inhibition de ce radical libre montre un pouvoir antioxydant remarquable de E qui interroge sur le potentiel bénéfique des éléments rejetés par l'espèce bactérienne *D. acidovorans* dans son milieu naturel aqueux souvent très acide.

L'électrophorèse bidimensionnelle des protéines de E permet, comme nous l'attendions, de visualiser sur les gels, après coloration et densitométrie, des spots protéiques d'intensités variables. Des successions de taches sont remarquables, par exemple dans la figure 4 aux voisinages de 40, 50, 60 et 75 kDa, montrant pour un même poids moléculaire, des pHi différents laissant supposer une ou plusieurs modification(s) post-traductionnelle(s) en séries des protéines bactériennes de E, à type de phosphorylations successives pouvant témoigner de phénomènes de régulation gouvernant peut-être l'export de protéines ciblées. Ce phénomène avait déjà été mis en évidence par notre équipe pour une bactérie anaérobie en situation de stress, qui exportait de nombreuses protéines chaperonnes et des enzymes antioxydantes, thiorédoxines et flavodoxines. Nous avons, à cette occasion, pu mettre en évidence une production intense de vésicules en surface bactérienne par microscopie électronique (ME). Des tests pharmacologiques acellulaires avaient montré que l'anaérobiose était capable de rejeter des protéines antioxydantes fonctionnelles dans leur milieu environnant (Hochart-Behra *et al.*, 2014). Il serait intéressant d'identifier les protéines déversées dans E par *D. acidovorans* et d'observer sa structure par ME.



Figure 4 : Image d'un gel de séparation protéique réalisé en deux dimensions à partir de l'extrait

Légende : Les données numériques des gels sont obtenues par densitométrie (GS 800) grâce au logiciel PDquest® (BioRad) et permettent de matérialiser la réalité des trois dimensions attachées à chaque spot protéique d'intérêt (densité relative, pHi et masse moléculaire). Gel construit en gradients d'acrylamide de 4 à 20% et de pHi linéaire de 3 à 10. MM. Masses moléculaires étalons allant de 10 à 250 kDa. Sont encadrés en rouge des exemples de motifs protéiques laissant suggérer des régulations par phosphorylations successives.

Conclusion & perspectives

D'après nos résultats, *Delftia acidovorans* isolée de l'eau possède des propriétés antioxydantes remarquables permettant d'inhiber les ERO de la cascade oxydative des phagocytes, ce qui laisse entrevoir des perspectives intéressantes concernant les métabolites déversés directement dans l'eau par cette bactérie, en matière de modulation du stress oxydant et d'aide au traitement des maladies inflammatoires. Il paraît donc essentiel de poursuivre nos investigations sur cette souche qui est, certes connue pour son effet symbiotique avec les végétaux ainsi que pour sa capacité à détoxifier les sites pollués, mais pourrait bien également apporter des bénéfices en santé humaine. Une identification des protéines de E par la technique des cartes peptidiques massives sera nécessaire pour affirmer la présence de protéines antioxydantes. Des essais en modèles pharmacologiques cellulaires permettront en outre de vérifier l'effet antioxydant/anti-inflammatoire de E sur des cellules phagocytaires avant d'envisager des tests sur l'animal. L'observation de la bactérie par microscopie électronique nous renseignera sur son mode d'export protéique.

Références

- Ahire KC, Kapadnis BP, Kulkarni GJ, Shouche YS, Deopurkar RL, Biodegradation of tributyl phosphate by novel bacteria isolated from enrichment cultures, *Biodegradation* (2012) 23 : 165–176.
Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J, The antioxidant action of N-acetylcysteine : its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid, *Free Radic Biol Med* (1989) 6 : 593-597.
Halliwell B, Gutteridge J.M.C et Aruoma O.I. The deoxyribose method : a simple « test-tube » assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radical, *Anal Chem* (1987) 165 : 215-219.
Hochart-Behra A-C, Drobecq H, Tourret M, Dubreuil L, Behra-Miellet J. 2014. Anti-stress proteins produced by *Bacteroides thetaiotaomicron* after nutrient starvation, *Anaerobe* 28: 18-23.
Johnston CW, Wyatt MA, Li X, Ibrahim A, Shuster J, Southam G, Magarvey NA, Gold biomineralization by a metallophore from a gold-associated microbe, *Nat Chem Biol* (2013) 9: 241-243.
Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem* (1951) 193 : 265-275.
Thurman RG, Ley H, Scholz R, Hepatic microsomal ethanol oxidation. Hydrogen peroxide formation and the rôle of catalase, *Eur J Biochem* (1972) 25 : 420-430.