

## Dévoiler l'arsenal des bactéries de la menace

**Résumé** La protéogénomique est une science qui regroupe les approches omiques telles que la génomique, la transcriptomique et la protéomique et qui a pour objectif d'améliorer la compréhension des systèmes biologiques complexes. Cet article montre comment l'étude des marqueurs de virulence et d'antibiorésistance chez les bactéries pathogènes peut être améliorée par de telles approches intégratives, en se basant sur *Burkholderia pseudomallei* comme exemple. En effet, le génome bactérien (génomique), sa régulation transcriptionnelle (transcriptomique) et le phénotype résultant des protéines clés (protéomique) peuvent être aujourd'hui établis pour plusieurs souches, mais toutes ces données complémentaires peuvent surtout être mieux exploitées en synergie pour comprendre la spécificité de chacune de ces souches. De nouveaux biomarqueurs bactériens spécifiques liés aux caractéristiques de résistance aux antibiotiques ou de niveau de virulence envers leurs hôtes peuvent être définis. De tels biomarqueurs peuvent faciliter un diagnostic plus précoce, et donc une réponse thérapeutique plus adaptée et rapide afin de contrer ces pathogènes.

**Mots-clés** Protéogénomique, génomique, transcriptomique, protéomique, *Burkholderia pseudomallei*, résistance, antibiotiques, virulence, biomarqueurs, souches.

**Abstract** Unveiling the arsenal of dangerous bacteria

Proteogenomics is the integration of multi-omics approaches including genomics, transcriptomics and proteomics which as a whole improves our understanding of complex biological systems. This article shows how the study of virulence factors and antibiotic resistance markers of pathogenic bacteria can be fostered by such state-of-the-art integrative approach, taking *Burkholderia pseudomallei* as example. Indeed, the bacterial genome (genomics), its transcriptional regulation (transcriptomics) and the key protein phenotype (proteomics) can be today established for various strains, but more importantly these merged complementary data bring synergy into our knowledge of the specificities of each strain. New specific bacterial biomarkers related to antibiotic resistance characteristics or virulence towards their hosts can be defined. Such biomarkers may facilitate earlier diagnostics and consequently earlier therapeutic response to face these pathogens.

**Keywords** Proteogenomics, genomics, transcriptomics, proteomics, *Burkholderia pseudomallei*, resistance, antibiotics, virulence, biomarkers, strains.

### Les approches multi-omiques

Un des problèmes de santé publique, en France et dans le monde, est l'émergence, le développement et la dissémination de bactéries multirésistantes aux antibiotiques. En Europe 33 000 décès par an sont directement imputables à des infections dues à ces bactéries multirésistantes, responsables de nombreux échecs thérapeutiques. Il est estimé qu'en 2050, dans le monde, dix millions de personnes par an pourraient décéder d'une infection causée par une bactérie multirésistante aux antibiotiques [1]. Ce phénomène de multirésistance, préoccupant en santé publique, pourrait l'être tout autant pour les bactéries dites de la menace. Responsables de la maladie du charbon (*Bacillus anthracis*) [2], de la peste (*Yersinia pestis*) [3], de la tularémie (*Francisella tularensis*) [4], de la mélioïdose\* (*Burkholderia pseudomallei*) [5] et de la morve (*Burkholderia mallei*) [6], ces bactéries pourraient être utilisées de manière intentionnelle comme armes bactériologiques. Mieux comprendre les mécanismes de résistance aux antibiotiques mais aussi ceux impliqués dans la virulence bactérienne est essentiel afin de développer des contre-mesures médicales efficaces contre ces pathogènes bactériens.

Le développement des nouvelles technologies dites « omiques », telles que le séquençage complet de l'ADN (génomique\*), l'étude de l'expression des gènes ou régulation transcriptionnelle\* (transcriptomique\*) et l'identification de l'ensemble des protéines (protéomique\*), expliquant le phénotype qui caractérise les données observables d'un système

### Glossaire

Les termes suivis par un astérisque\* dans le texte sont définis ci-dessous.

**Génome** : ensemble du patrimoine génétique d'un organisme vivant codé sur la double hélice d'ADN. Son séquençage a pour objectif de connaître les gènes qui y sont codés.

**Mélioïdose** : maladie endémique en zone subtropicale due à la bactérie *Burkholderia pseudomallei*, encore appelé bacille de Withmore. L'homme peut s'infecter par voie cutanée, inhalation ou ingestion. La maladie peut se présenter sous forme aiguë, subaiguë ou chronique et conduit à des infections pulmonaires, cutanées ou à des septicémies foudroyantes. *B. pseudomallei* est classée dans les risques NRBC en tant qu'agent potentiel du bioterrorisme.

**Protéome** : ensemble des protéines produites par un organisme et présentes à un moment donné dans un échantillon.

**Régulation transcriptionnelle** : système qui contrôle et régule l'expression des gènes d'un organisme.

**Transcriptome** : ensemble des ARN transcrits correspondant aux messages des gènes utilisés par l'organisme à un moment donné.

biologique comme sa forme, sa couleur, révolutionne les recherches sur les agents pathogènes. En effet, ces dernières années, des progrès techniques spectaculaires ont été effectués en matière de séquençage des acides nucléiques. La technologie miniaturisée « MinION » de Oxford Nanopore Technologies (figure 1) permet désormais, avec un séquenceur de la taille d'une clé USB, d'obtenir à partir d'une seule molécule



Figure 1 - Nouveaux outils pour le séquençage des acides nucléiques et l'identification des protéines. En haut : séquenceur nanopore type MinION de la société Oxford Nanopore Technologies ; en bas : spectromètre de masse à haute résolution de la société Thermo incorporant un analyseur orbitrap couplé à une chaîne de chromatographie liquide à très faible débit.

trou nanométrique et de permettre au passage de chacun des quatre possibles nucléotides leur détection grâce à un signal électrique. Concernant la protéomique, les nouveaux spectromètres de masse à très haute résolution, comme le Q-Exactive (figure 1), permettent de mesurer la masse des protéines sous une forme ionisée et d'obtenir des signaux sur des dizaines de milliers de peptides en quelques heures. Il est donc ainsi possible d'explorer le protéome global d'une bactérie dans différentes conditions physiologiques (différents milieux de culture, différentes températures, présence ou absence d'antibiotiques, etc.). L'étude du protéome d'un nouvel isolat microbien consiste à extraire les protéines et à les découper en petits peptides qui sont de petits fragments de protéines constitués d'un assemblage d'acides aminés. Des enzymes, plus précisément des protéases telles que la trypsine, sont utilisées pour fragmenter les protéines et les petits peptides ainsi obtenus sont alors identifiés par spectrométrie de masse. La protéogénomique regroupe l'ensemble des données obtenues par ces différentes approches afin de mieux comprendre le système biologique à étudier. Les informations sur les protéines détectées par spectrométrie de masse en tandem à haute résolution peuvent être utilisées afin d'améliorer l'annotation d'un génome en repérant les véritables démarrages de traduction, en découvrant de nouveaux gènes, ou à l'inverse en infirmant des données prédictives d'annotation [7-8]. Comme décrit dans la figure 2, le génome d'un nouvel isolat microbien peut être séquencé et annoté automatiquement par des logiciels (étape 1). Des informations supplémentaires peuvent être incorporées dans l'analyse telles que par exemple les données sur les peptides observés par spectrométrie de masse (étape 2). Certains peptides confirment que des gènes codent bien pour de réelles protéines, mais d'autres révèlent la présence de nouveaux gènes codants des polypeptides ou corrigent certaines structures (étape 3). Il est même possible que l'analyse des peptides montre que certains gènes doivent être lus sur l'autre brin complémentaire du génome. En effet l'ADN est constitué de deux brins : le brin

la séquence complète d'un génome bactérien en vingt minutes. Le principe de ce séquenceur est de forcer de manière séquentielle le passage du fragment d'ADN dans un

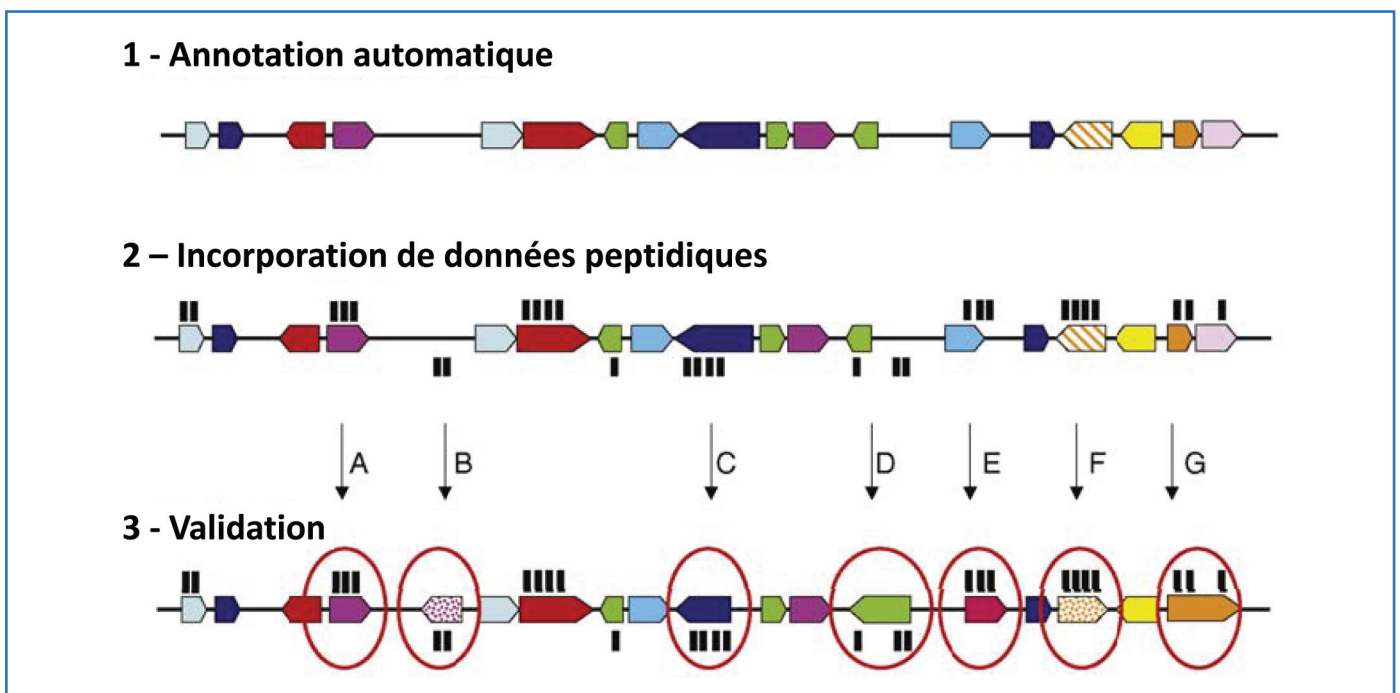


Figure 2 - Annotation des génomes améliorée par l'incorporation de données protéomiques (d'après [7]). Les trois étapes comprennent un assemblage des données de séquençage des génomes et une annotation automatique par des logiciels (étape 1), un appariement sur la séquence nucléotidique des séquences de peptides déterminés par spectrométrie de masse (étape 2), et enfin une validation par le contexte biologique (étape 3).

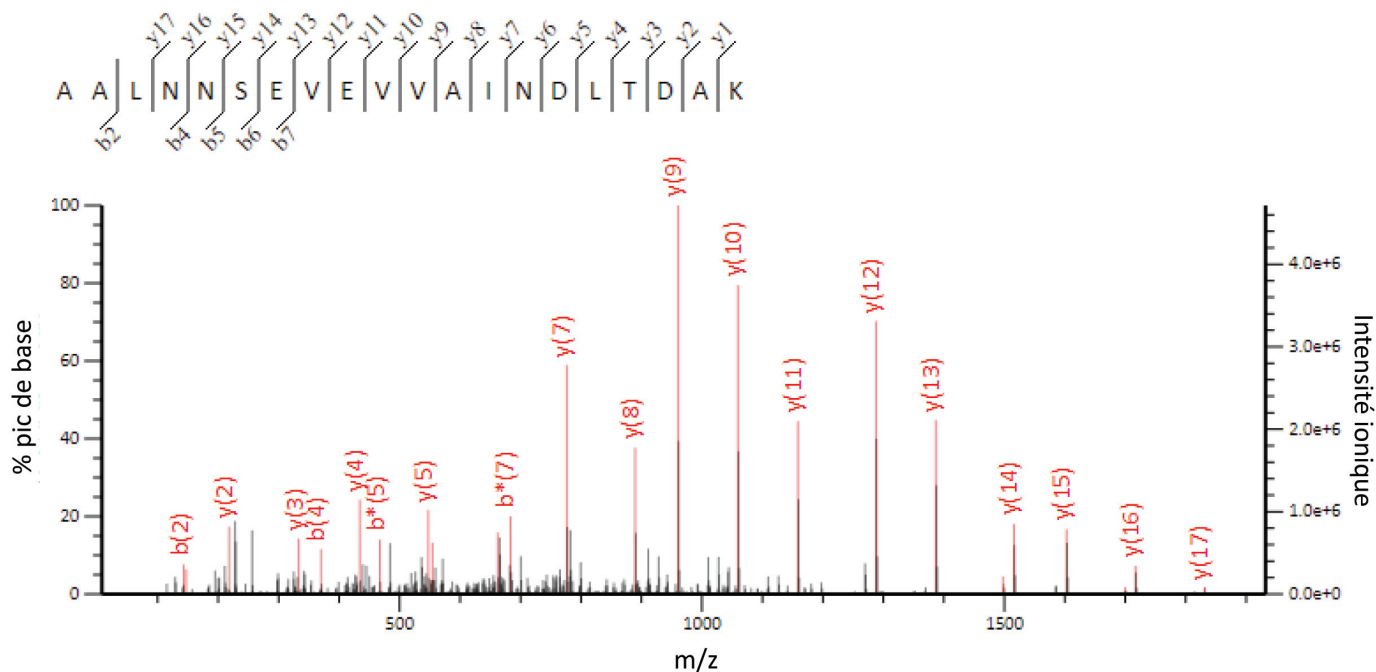


Figure 3 - Spectre MS/MS d'un peptide correspondant à la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase de *Bacillus cereus* (souche ATCC 14579). Le graphe présente les intensités d'ions en ordonnée en fonction des rapports masse sur charge de ces ions ( $m/z$ ) en abscisse. La séquence du peptide, en haut à gauche, est déduite des différents ions de fragmentation mesurés qui sont indiqués sur le spectre. De plus, la masse mesurée pour ce peptide correspond à celle calculée théoriquement (2085,0589 Da).

sens et le brin complémentaire, et des gènes peuvent être présents sur ces deux brins.

De plus, les analyses des protéines sécrétées par la bactérie et qui se retrouvent dans le milieu extérieur renseignent sur les facteurs de virulence [9], mais leur identification n'est possible qu'après avoir séquencé le génome de la souche étudiée.

Ainsi, ces approches globales permettent de mieux caractériser l'arsenal offensif et les systèmes de défense de nombreuses souches, et d'en évaluer les spécificités en termes de protéines ou de régulation de leur synthèse.

Des études de protéomique, avec une stratégie sans *a priori*, conduites sur la bactérie *Bacillus cereus*, bacille de l'environnement, proche cousin de *B. anthracis*, ont permis d'explorer son protéome dans des conditions expérimentales simulant celles rencontrées lors de son transit dans le tube digestif de l'homme [10-13], de lister de nouveaux facteurs de virulence et de montrer l'importance de nouveaux régulateurs pour leur production [10, 14]. Nous avons découvert que le stress oxydant intracellulaire résultant des conditions métaboliques de ces bactéries peut avoir un rôle dans la virulence de celles-ci [13, 15]. Cette dernière expérience repose sur l'analyse d'un jeu de données de 200 746 spectres MS/MS acquis à haute résolution par spectrométrie de masse et assignés à des séquences de peptides. Cette assignation est réalisée sur la base de la masse globale du peptide et des masses de ces fragments qui dépendent de sa composition en acides aminés et de leur enchaînement. À titre illustratif, la *figure 3* présente l'un de ces très nombreux spectres ainsi que la séquence peptidique correspondante. Ce jeu de données impressionnant est disponible pour d'autres chercheurs pour d'éventuelles analyses comparatives [16].

### Développement de contre-mesures

Mieux caractériser les facteurs de virulence et les mécanismes de résistance aux antibiotiques chez plusieurs souches des agents de la menace est d'intérêt primordial pour mieux les

combattre. Un travail collaboratif entrepris par le CEA (Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives) et l'IRBA (Institut de recherche biomédicale des armées) porte sur l'identification de ces facteurs et la définition de biomarqueurs d'intérêt pour le diagnostic chez *Burkholderia pseudomallei*. Cette bactérie est responsable de la mélioïdose, maladie endémique dans la zone subéquatoriale infectant 165 000 personnes par an et causant 89 000 décès par an [17] (*figure 4*). De nombreuses régions sont touchées et le réchauffement climatique global pourrait contribuer à son expansion. En France, des cas ont été déclarés dans les Antilles et à La Réunion, et depuis quelques années, de plus en plus de cas d'importation de la mélioïdose par des ressortissants revenant de zone d'endémie sont recensés. L'homme peut s'infecter directement au contact de diverses sources environnementales contaminées, par le biais de lésions cutanées, ou indirectement par ingestion d'aliments contaminés ou inhalation d'aérosols infectés. En raison de son fort pouvoir infectieux, de sa grande persistance, de sa capacité à survivre dans l'environnement, des différentes voies possibles d'infection, du faible nombre d'antibiotiques actifs du fait de sa multirésistance naturelle [18-19] et en l'absence de vaccins, *B. pseudomallei* est considérée comme agent de la classe B de la menace biologique par les CDC (Centers for Diseases Control and Prevention). En France, l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé) a classé *B. pseudomallei* comme agent « MOT ». Ces agents sont des micro-organismes et toxines hautement pathogènes soumis à un régime d'autorisation pour toute opération de production, fabrication, transport, importation, exportation, détention, offre, cession, acquisition et emploi.

Dans le but de développer des contre-mesures médicales vis-à-vis de la mélioïdose et de lister de nouvelles cibles moléculaires pour le développement de nouvelles thérapies, il est indispensable de comprendre ses mécanismes de résistance et de virulence, et en premier lieu d'identifier précisément les acteurs moléculaires impliqués. Dans ce but, nous avons dans

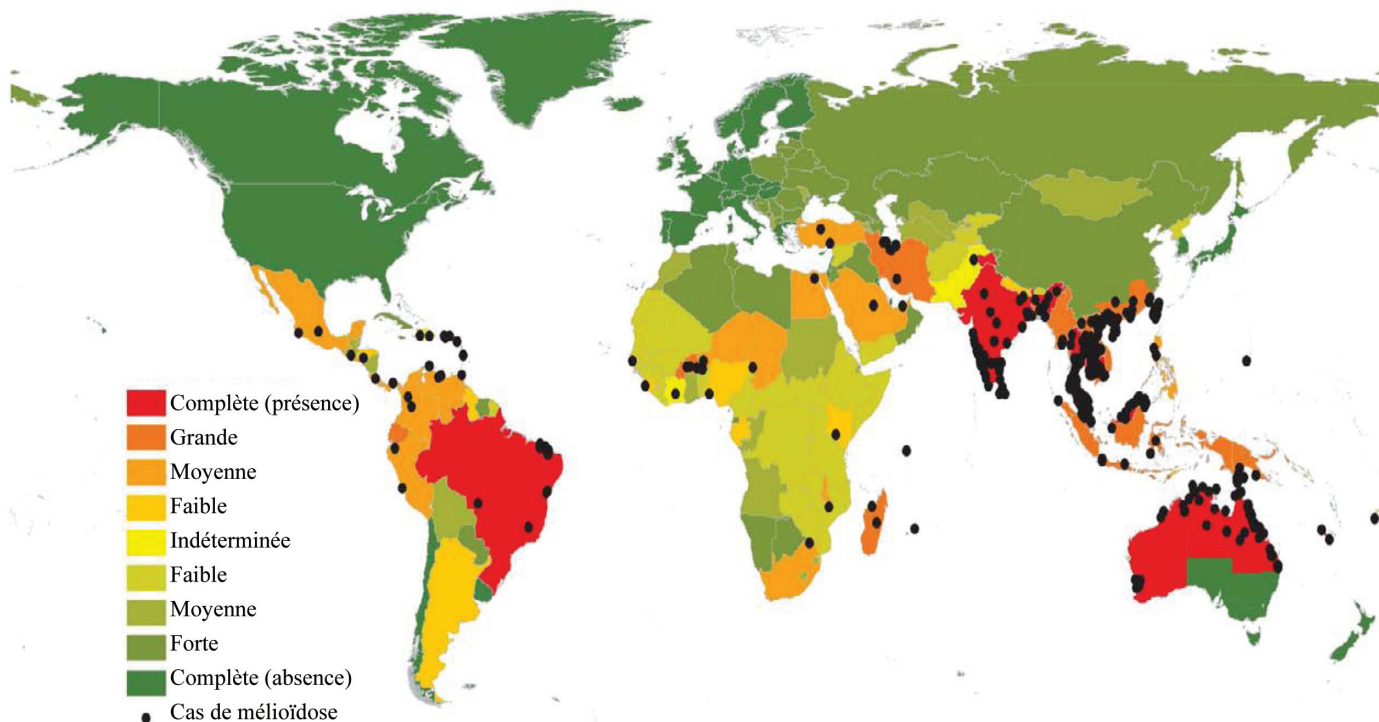


Figure 4 - Localisation géographique et occurrence des cas de mélioiïdose entre 1910 et 2014 (d'après [17]). En vert : régions sans mélioiïdose ; en rouge : présence de mélioiïdose. Les points noirs représentent les cas identifiés de mélioiïdose.

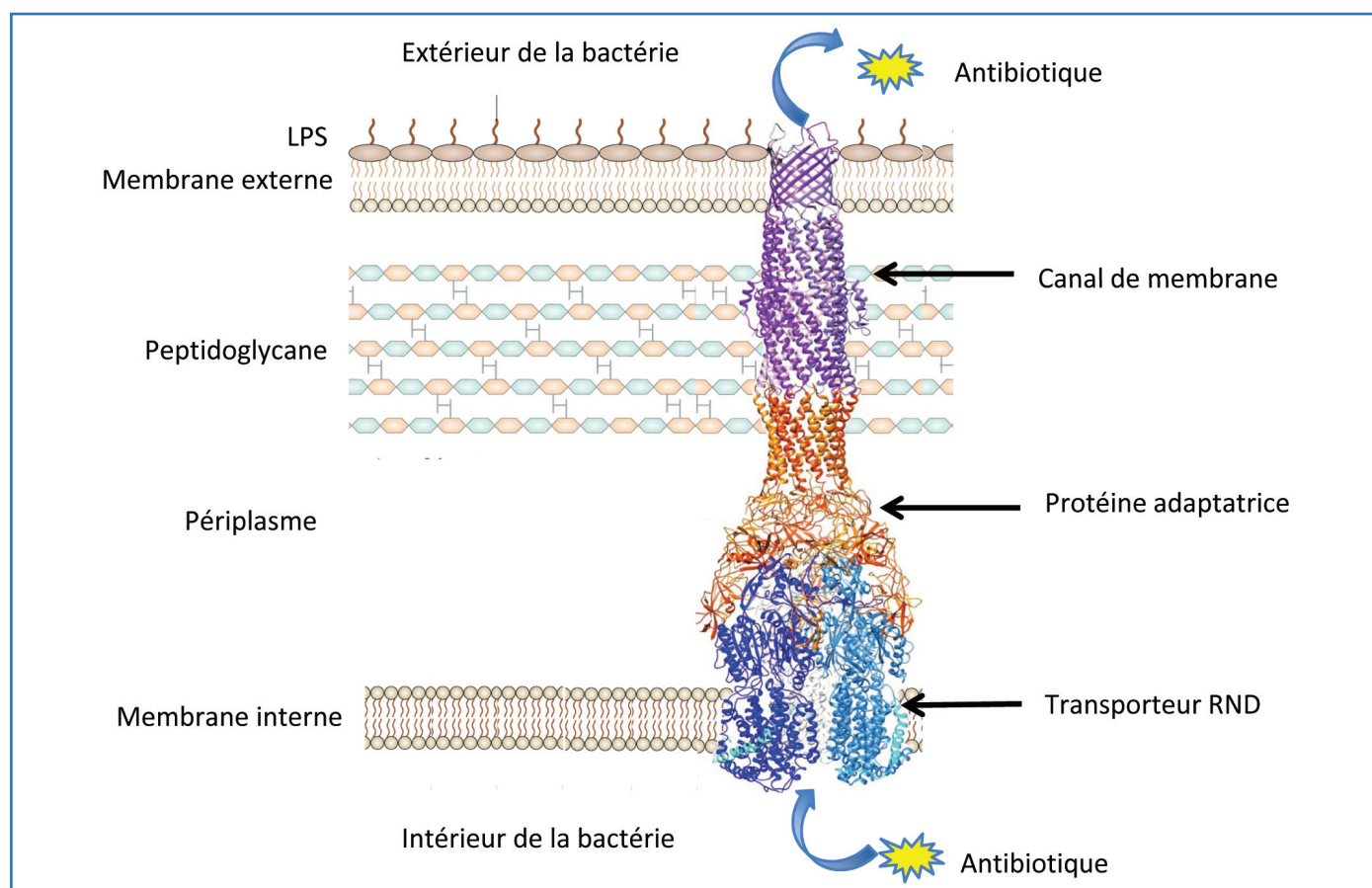


Figure 5 - Pompe d'efflux : protéine membranaire tripartite qui utilise la force proton motrice ( $H^+$ ) pour fonctionner. L'antibiotique qui se trouve dans la bactérie est « capté » par le transporteur RND, puis relargué dans le milieu extérieur (d'après [20]).

un premier temps, par des analyses génomiques et transcriptomiques, pu montrer pour des souches cliniques que la multi-résistance à certains antibiotiques de *B. pseudomallei* pouvait être transitoire et médiée par la régulation de protéines membranaires : les pompes d'efflux (figure 5). Ces pompes d'efflux

sont des protéines formées de trois parties : un canal membranaire, un transporteur et une protéine adaptatrice qui se trouve dans l'espace périplasmique. Pour fonctionner, elles utilisent la force proton motrice, c'est-à-dire l'énergie fournie par gradient de proton ( $H^+$ ) qui se trouve dans la bactérie.

Elles sont spécifiques à une ou plusieurs classes d'antibiotiques et expulsent les antibiotiques qui se trouvaient dans la bactérie vers le milieu extérieur. La protéogénomique nous permettra de confirmer ce système de régulation spécifique des pompes d'efflux, mais également de voir s'il existe une régulation plus globale impliquant d'autres gènes dans ces mécanismes de résistance bactérienne. Dans un futur proche, lorsque les mécanismes moléculaires seront bien identifiés et leurs rôles bien définis, une des stratégies de lutte contre la multirésistance serait de développer de nouvelles molécules « potentialisatrices » d'antibiotiques. Ces molécules sont administrées en même temps que les antibiotiques afin d'augmenter leur efficacité. Elles peuvent par exemple bloquer l'activité des pompes d'efflux chez les bactéries, diminuant ainsi ce mécanisme de résistance.

### La course contre la montre

De plus, une fois identifiés et caractérisés, tous ces acteurs moléculaires impliqués dans la résistance aux antibiotiques et la virulence pourront être spécifiquement utilisés comme biomarqueurs pour établir pour chaque nouvelle souche un diagnostic précoce en termes taxonomique, ainsi qu'une caractérisation précise de son niveau de résistance aux antibiotiques, de son agressivité en termes de facteurs de virulence et de son pouvoir pathogène. Ce diagnostic approfondi permettra de mettre en place, le plus rapidement possible, un traitement adapté et à façon contre la mélioiïdose, et assurera ainsi une meilleure prise en charge thérapeutique des patients.

- [1] de Kraker M.E.A., Stewardson A.J., Harbarth S., Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050?, *PLoS Med.*, **2016**, 13(11): e1002184.
- [2] Moayeri M., Leppla S.H., Vrentas C., Pomerantsev A.P., Liu S., Anthrax pathogenesis, *Annu. Rev. Microbiol.*, **2015**, 69, p. 185.
- [3] Stenseth N.C. et al., Plague: past, present, and future, *PLoS Med.*, **2008**, 5(1): e3.
- [4] Ellis J., Oyston P.C., Green M., Titball R.W., Tularemia, *Clin. Microbiol. Rev.*, **2002**, 15, p. 631.
- [5] Wiersinga W.J. et al., Melioidosis, *Nat. Rev. Dis. Primers*, **2018**, 4, p. 17107.
- [6] Jones B.V., Glanders and history, *Vet. Rec.*, **2016**, 178, p. 664.
- [7] Armengaud J., A perfect genome annotation is within reach with the proteomics and genomics alliance, *Curr. Opin. Microbiol.*, **2009**, 12, p. 292.
- [8] Reeves G.A., Talavera D., Thornton J.M., Genome and proteome annotation: organization, interpretation and integration, *J. R. Soc. Interface*, **2009**, 6, p. 129.
- [9] Armengaud J., Dupont C., Exoproteomics of pathogens: analysis of toxins and other virulence factors by proteomics, *Methods Enzymol.*, **2017**, 586, p. 211.
- [10] Clair G., Lorphelin A., Armengaud J., Dupont C., OhrRA functions as a redox-responsive system controlling toxinogenesis in *Bacillus cereus*, *J. Proteomics*, **2013**, 94, p. 527.
- [11] Clair G., Roussi S., Armengaud J., Dupont C., Expanding the known repertoire of virulence factors produced by *Bacillus cereus* through early secretome profiling in three redox conditions, *Mol. Cell. Proteomics*, **2010**, 9, p. 1486.
- [12] Laouami S., Clair G., Armengaud J., Dupont C., Proteomic evidences for rex regulation of metabolism in toxin-producing *Bacillus cereus* ATCC 14579, *PLoS One*, **2014**, 9(9): e107354.
- [13] Madeira J.P., Alpha-Bazin B., Armengaud J., Dupont C., Time dynamics of the *Bacillus cereus* exoproteome are shaped by cellular oxidation, *Front. Microbiol.*, **2015**, 6, p. 342.
- [14] Omer H., Alpha-Bazin B., Brunet J.L., Armengaud J., Dupont C., Proteomics identifies *Bacillus cereus* EntD as a pivotal protein for the production of numerous virulence factors, *Front. Microbiol.*, **2015**, 6, p. 1004.
- [15] Madeira J.P., Alpha-Bazin B.M., Armengaud J., Dupont C., Methionine residues in exoproteins and their recycling by methionine sulfoxide reductase AB serve as an antioxidant strategy in *Bacillus cereus*, *Front. Microbiol.*, **2017**, 8, p. 1342.

**Chimie & Terroir**  
Osez l'expérience !  
23-25 mai 2019  
Espace Glenmor  
Carhaix  
Ateliers  
Animations  
Rencontres  
Entrée libre et gratuite  
www.chimieetsociete.org

- [16] Madeira J.P., Alpha-Bazin B., Armengaud J., Dupont C., Time-course proteomics dataset to monitor protein-bound methionine oxidation in *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Data Brief.*, **2018**, 18, p. 394.
- [17] Limmathurotsakul D. et al., Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis, *Nat. Microbiol.*, **2016**, 1(1): 15008.
- [18] Jenney A.W., Lum G., Fisher D.A., Currie B.J., Antibiotic susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* from tropical northern Australia and implications for therapy of melioidosis, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2001**, 17, p. 109.
- [19] Thibault F.M., Hernandez E., Girardet M., Cavallo J.D., Antibiotic susceptibility of 65 isolates of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* to 35 antimicrobial agents, *J. Antimicrob. Chemother.*, **2004**, 54, p. 1134.
- [20] Du D., Wang-Kan X., Neuberger A., van Veen H.W., Pos K.M., Piddock L.J.V., Luisi B.F., Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation, *Nat. Rev. Microbiol.*, **2018**, 16, p. 523.

**Fabienne NEULAT-RIPOLL\***,  
chercheuse, cheffe de projet, Institut de recherche biomédicale des armées (IRBA).  
**Jean ARMENGAUD**,  
directeur de recherche, Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA).

\* fabienne.ripoll@def.gouv.fr