

Diagnostic ultra précoce de l'infection par le bacille du charbon

Résumé *Bacillus anthracis*, l'agent de la maladie du charbon, peut être responsable d'infections fulgurantes associées à une mortalité très élevée. La bactérie produit la toxine œdémateuse et la toxine létale qui présentent respectivement une activité adénylate cyclase et une activité métalloprotéasique. Les deux toxines agissent durant la phase précoce de la maladie et au stade tardif où apparaît une défaillance multiviscérale. Plusieurs équipes, en France et aux États-Unis, ont mis en place des méthodes de détection sensibles, spécifiques et rapides ciblant l'activité enzymatique des toxines, palliant ainsi certaines difficultés associées au diagnostic actuel. Appliquées chez l'homme, ces méthodes permettent de suivre l'efficacité du traitement administré. Dans des modèles animaux, elles ont mis en évidence une production et une diffusion très rapides des toxines, le niveau de ces toxines étant prédictif de la survie des animaux. La détection de l'activité enzymatique des toxines a donc toute sa place dans le diagnostic précoce de la maladie pour une prise en charge rapide.

Mots-clés *Bacillus anthracis*, toxines, activité enzymatique, production et diffusion ultra précoce.

Abstract **Ultra-early diagnosis of infection with anthrax**

Bacillus anthracis, the agent of anthrax, is responsible of fulminant infections associated with a very high mortality. The bacterium produces the edema toxin and the lethal toxin which are respectively an adenylyl cyclase and a metalloproteinase. Both toxins act at an early time during infection and during the late stage when functional failure of vital organs occurs. Several teams, in France and in the United States, have developed rapid, sensitive and specific detection methods targeting the enzymatic activity of toxins, avoiding some difficulties associated with the current diagnosis. In humans, these methods allowed to monitor the efficacy of the administered treatment. In animal models, they highlighted a very rapid production and diffusion of toxins, the level of toxins being predictive of the survival of animals. Thus, the detection of the enzymatic activity of toxins is a very interesting alternative for an ultra-precocious diagnosis, and consequently for an early treatment of the disease.

Keywords *Bacillus anthracis*, toxins, enzymatic activity, ultra-early production and diffusion.

Le bacille du charbon, *Bacillus anthracis*, est une bactérie sporulante (figure 1) responsable de zoonoses endémiques affectant bétail et faune sauvage, contre lesquelles Louis Pasteur lutta en développant un vaccin (figure 2), et plus rarement d'infections chez l'homme [1], hôte accidentel suite au contact avec un animal contaminé, ou victime d'attaques comme cela a été le cas avec les enveloppes piégées aux États-Unis en 2001 qui ont remis en lumière le potentiel de *B. anthracis* comme arme biologique. Bien que rares, ces infections peuvent présenter un taux de mortalité élevé. Ainsi, le charbon pulmonaire, dont la progression est fulgurante, est associé à une mortalité de plus de 90 % lorsque la prise en charge est trop tardive.

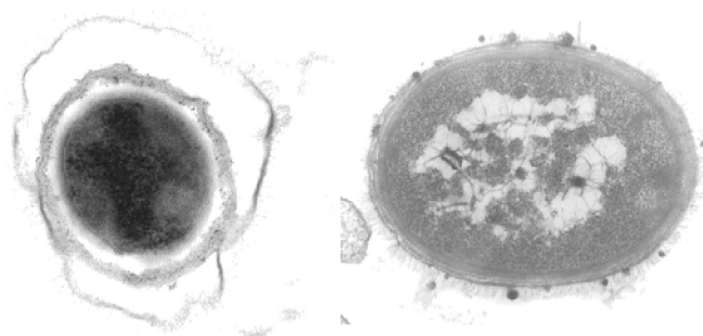


Figure 1 - Photos d'une spore de *Bacillus anthracis* (gauche) et d'une spore en cours de germination (droite).

Glossaire

Les termes suivis d'un astérisque* dans le texte sont définis ci-dessous.

AMPc : adénosine monophosphate cyclique.

ELISA : de l'anglais « enzyme-linked immunosorbent assay », méthode de dosage immuno-enzymatique.

EF : facteur œdémateux.

ET : toxine œdémateuse.

LF : facteur létal.

LT : toxine létale.

MAPKK : « mitogen activated protein kinase kinases ».

Médiastin : région du thorax située entre les deux poumons.

PA : antigène protecteur.

Pathognomonique : qui caractérise spécifiquement une maladie unique, permettant donc d'en établir le diagnostic certain.

qPCR : « quantitative polymerase chain reaction ».

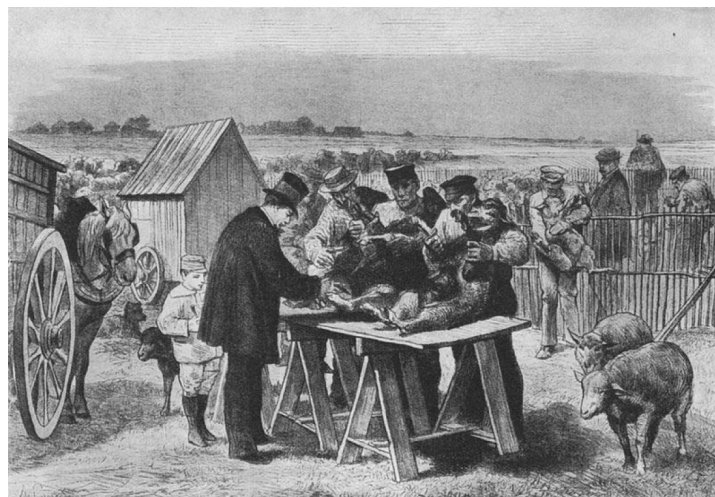


Figure 2 - Illustration de Louis Pasteur vaccinant des moutons contre le charbon à Pouilly-le-Fort.



Figure 3 - Lésion caractéristique de la forme cutanée de la maladie du charbon, au niveau du cou.

Sous forme de bacille qui est la forme « virulente », la bactérie produit deux toxines : la toxine œdémateuse (ET) formée par l'association du facteur œdémateux (EF) avec l'antigène protecteur (PA), et la toxine létale (LT), formée par l'association du facteur létal (LF) avec l'antigène protecteur (PA). Le facteur œdémateux est une adénylate cyclase, responsable de l'augmentation du taux de AMPc* intracellulaire et la toxine létale est une métalloprotéase qui clive notamment les MAPKK (« mitogen activated protein kinase kinases »), conduisant à des dysfonctionnements cellulaires. *Via* leur activité enzymatique, les deux toxines agissent aussi bien durant la phase précoce de la maladie, en paralysant le système immunitaire, qu'au stade tardif, où elles sont responsables de défaillances multiviscérales [2-3].

Le charbon a un tableau clinique peu caractéristique, à l'exception de la forme cutanée de la maladie (figure 3). Le charbon d'inhalation est une maladie au diagnostic clinique très difficile, car il se présente sous la forme d'un tableau de syndrome pseudo-grippal. Pour mémoire, lors de l'épidémie de 2001, plusieurs patients qui avaient consulté aux urgences avaient été renvoyés chez eux avec un diagnostic erroné [4]. Le seul élément pathognomonique* est l'élargissement du médiastin* à la radiographie pulmonaire, mais toutes les suspicions de grippe simple lors des épidémies saisonnières ne bénéficient pas d'une radiographie. Il est donc absolument nécessaire d'améliorer notre arsenal diagnostique. Par ailleurs, le diagnostic bactériologique de la maladie du charbon peut s'avérer compliqué, du fait d'une antibiothérapie préalable aux prélèvements et de la grande sensibilité de la majorité des souches aux antibiotiques.

Le diagnostic repose actuellement sur l'identification bactériologique et la détection de marqueurs moléculaires spécifiques de *B. anthracis*. Ainsi, en France, le Centre national de référence-laboratoire expert (CNR-LE) charbon – dont le mandat a été confié à l'Institut de recherche biomédicale des armées (IRBA) depuis 2012 – utilise principalement des méthodes de diagnostic moléculaire en temps réel basées sur la détection de matériel génétique et des méthodes classiques de culture de l'agent : recherche par qPCR* de *pagA* codant le facteur PA, isolement et identification de *B. anthracis* à partir de prélèvements cliniques. Aux États-Unis, le CDC (Centers for Disease Control and Prevention) mesure également les taux d'anticorps ou de toxines dans le sang. La détection

des toxines pour diagnostiquer la maladie du charbon a été décrite depuis leur identification dans les années 1950 [5]. Le diagnostic peut être indirect en recherchant les anticorps dirigés contre les toxines de *B. anthracis* ou contre les immunoglobulines G anti-PA par tests d'hémagglutination indirecte ou par ELISA*. Ces méthodes historiques et peu sensibles ne sont pas utilisées en biologie courante, ni dans les laboratoires de référence.

Mieux détecter pour un meilleur diagnostic

Dans ces conditions, des méthodes de détection alternatives rapides et sensibles sont nécessaires pour améliorer le diagnostic et la prise en charge précoce d'une maladie au tableau clinique très trompeur. Pour pallier le potentiel problème de clairance bactérienne thérapeutique (souvent l'antibiothérapie précoce négative les méthodes de diagnostic) ou immunologique, la faible sensibilité et spécificité de certains tests, les temps de diagnostic relativement longs, des méthodes de détection basées sur la détection des produits de l'activité enzymatique de LF et EF ont été mises au point depuis une dizaine d'années.

Ainsi, le CDC a développé et intégré dans son plan de réponse à une urgence « charbon » une méthode sensible et spécifique basée sur la spectrométrie de masse [6], permettant de détecter LF dans le sérum (figure 4), avec un seuil de détection de 0,01 ng/mL pour un temps de détection de 4 h [7]. LF est concentré par immunocapture puis mis en présence d'un peptide de synthèse mimant les MAPKK. Ce peptide est clivé spécifiquement par LF en deux peptides qui sont détectés par spectrométrie de masse. Cette technique a également été mise au point pour EF et PA [8-10]. Les études effectuées chez les primates non humains infectés par voie inhalatoire montrent que EF et LF sont détectés rapidement, dès 18 heures post-infection, PA étant détecté plus tardivement, et que les niveaux de toxines sont prédictifs de l'efficacité du traitement

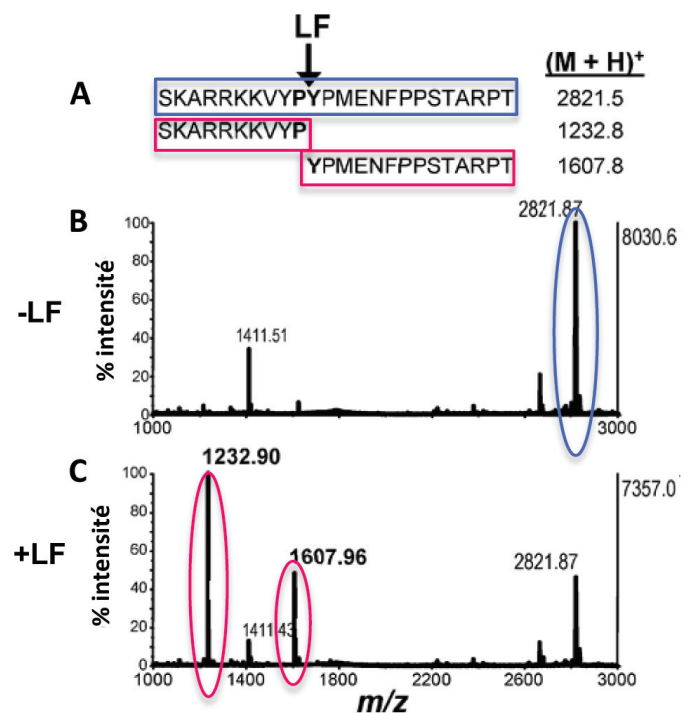


Figure 4 - Spectres de masse du peptide substrat clivé par la toxine létale (LF) : (A) peptide substrat cible de LF et produits de clivage de ce peptide par LF ; (B) spectre de masse du peptide entier ; (C) spectre de masse des peptides issus du clivage du peptide substrat.

et par conséquent, de la survie de l'animal [7, 9-10]. Dans des études prospectives d'infections humaines cutanée, pulmonaire et gastro-intestinale [11-14], le suivi du niveau de LF a permis d'évaluer l'efficacité du traitement.

Le CEA et l'Institut Pasteur associés à l'IRBA ont mis au point des méthodes de détection très sensibles de l'activité enzymatique de EF et LF, basées respectivement sur un dosage ELISA et sur la spectrométrie de masse, directement dans l'échantillon prélevé, avec des seuils de détection allant de 2,5 pg/mL pour EF à 0,4 ng/mL pour LF dans le plasma de souris [15-16]. L'essai enzymatique permettant de détecter EF est basé sur le suivi de la production de AMPc par l'activité adénylate cyclase de EF [15]. Ces techniques ont permis d'étudier la dynamique de EF et LF dans un modèle murin d'infection cutanée par le bacille du charbon [16], montrant pour la première fois une détection ultra précoce des deux facteurs, dans les trois premières heures de l'infection, aussi bien au site d'infection que dans la circulation sanguine malgré l'absence de bactériémie. Aux temps précoces, le niveau moyen de LF dans le sang est de 1,7 ng/mL, alors que celui de EF est de 4,6 pg/mL. Le profil des quantités de toxines observé dans le sang est triphasique, avec une augmentation initiale suivie d'un plateau, voire d'une diminution puis une augmentation rapide et élevée du taux de toxines. Ce profil est similaire à celui observé lors du charbon pulmonaire [7, 9-10].

Ces méthodes nouvelles permettront dans le futur, dans une application à un format diagnostique, une meilleure détection de l'infection par le bacille du charbon, et donc une meilleure prise en charge thérapeutique des patients.

- [1] D'Amelio E., Gentile B., Lista F., D'Amelio R., Historical evolution of human anthrax from occupational disease to potentially global threat as bioweapon, *Environ. Int.*, **2015**, 85, p. 133.
- [2] Tournier J.N. *et al.*, Anthrax toxins: a weapon to systematically dismantle the host immune defenses, *Mol. Aspects Med.*, **2009**, 30, p. 456.
- [3] Liu S., Moayeri M., Leppla S.H., Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis, *Trends Microbiol.*, **2014**, 22, p. 317.
- [4] Jernigan J.A. *et al.*, Bioterrorism-related inhalational anthrax: the first 10 cases reported in the United States, *Emerg. Infect. Dis.*, **2001**, 7, p. 933.
- [5] Smith H., Keppie J., Observations on experimental anthrax: demonstration of a specific lethal factor produced *in vivo* by *Bacillus anthracis*, *Nature*, **1954**, 173, p. 869.

- [6] Boyer A.E. *et al.*, Detection and quantification of anthrax lethal factor in serum by mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **2007**, 79, p. 8463.
- [7] Gallegos-Candela M. *et al.*, Validated MALDI-TOF-MS method for anthrax lethal factor provides early diagnosis and evaluation of therapeutics, *Anal. Biochem.*, **2018**, 543, p. 97.
- [8] Boyer A.E. *et al.*, Quantitative mass spectrometry for bacterial protein toxins: a sensitive, specific, high-throughput tool for detection and diagnosis, *Molecules*, **2011**, 16, p. 2391.
- [9] Woolfitt A. *et al.*, Development of *Anthrax toxemia* in New Zealand white rabbits developing systemic anthrax after exposure to low-dose ames spores, International conference on *Bacillus anthracis*, *B. cereus* and *B. thuringiensis*, **2017**.
- [10] Boyer A.E. *et al.*, Toxin levels predict survival with antimicrobial treatment in nonhuman primate models of inhalation anthrax, International conference on *Bacillus anthracis*, *B. cereus* and *B. thuringiensis*, **2017**.
- [11] Boyer A.E. *et al.*, Lethal factor toxemia and anti-protective antigen antibody activity in naturally acquired cutaneous anthrax, *J. Infect. Dis.*, **2011**, 204, p. 1321.
- [12] Walsh J.J. *et al.*, A case of naturally acquired inhalation anthrax: clinical care and analyses of anti-protective antigen immunoglobulin G and lethal factor, *Clin. Infect. Dis.*, **2007**, 44, p. 968.
- [13] Sprengle M.D. *et al.*, Lethal factor and anti-protective antigen IgG levels associated with inhalation anthrax, Minnesota, USA, *Emerg. Infect. Dis.*, **2014**, 20, p. 310.
- [14] Stoddard R.A. *et al.*, Detection of anthrax protective antigen (PA) using europium labeled anti-PA monoclonal antibody and time-resolved fluorescence, *J. Immunol. Methods*, **2014**, 408, p. 78.
- [15] Duriez E. *et al.*, Femtomolar detection of the anthrax edema factor in human and animal plasma, *Anal. Chem.*, **2009**, 81, p. 5935.
- [16] Rougeaux C. *et al.*, *In vivo* dynamics of active edema and lethal factors during anthrax, *Sci. Rep.*, **2016**, 6, p. 23346.

Clémence ROUGEAUX*,
chercheuse, unité Biothérapies anti-infectieuses et immunité,
Institut de recherche biomédicale des armées (IRBA).

François BECHER,
ingénieur-chercheur, Commissariat à l'énergie atomique et
aux énergies alternatives (CEA).

Pierre GOOSSENS,
directeur de laboratoire, Institut Pasteur, Paris.

Jean-Nicolas TOURNIER,
chef du département Microbiologie et maladies infectieuses,
IRBA, Institut Pasteur, École du Val-de-Grâce, Centre national
de référence charbon.

* clemence.rougeaux2@gmail.com

CHIMIE ET...

Une collection intelligente à vocation pédagogique à mettre en toutes les mains !!



Commandez en ligne sur laboutique.edpsciences.fr

edp sciences