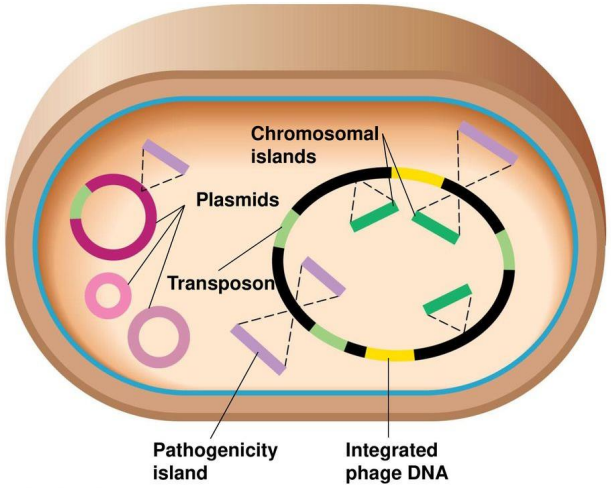
Nantes Université

Pôle Santé
UFR des Sciences pharmaceutiques et biologiques

BASES GÉNÉTIQUES DE LA VIRULENCE BACTÉRIENNE

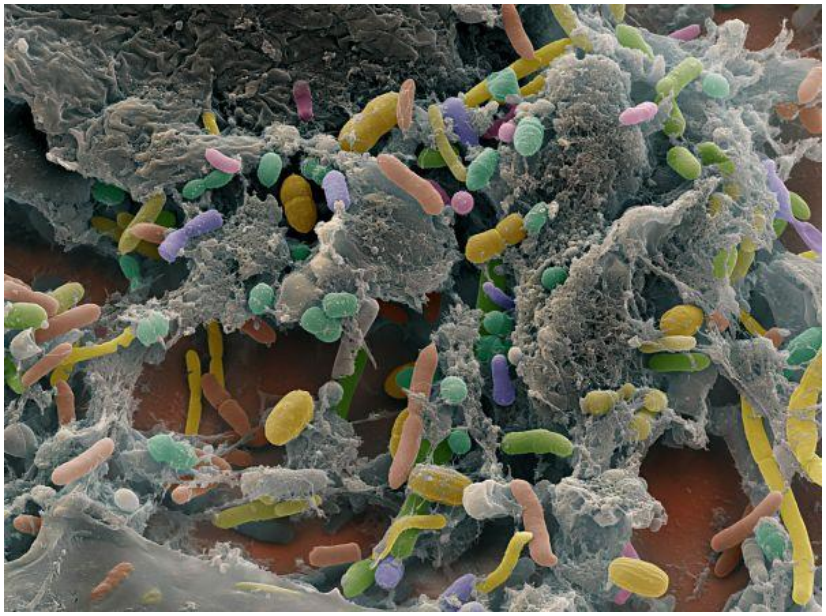
2024-2025



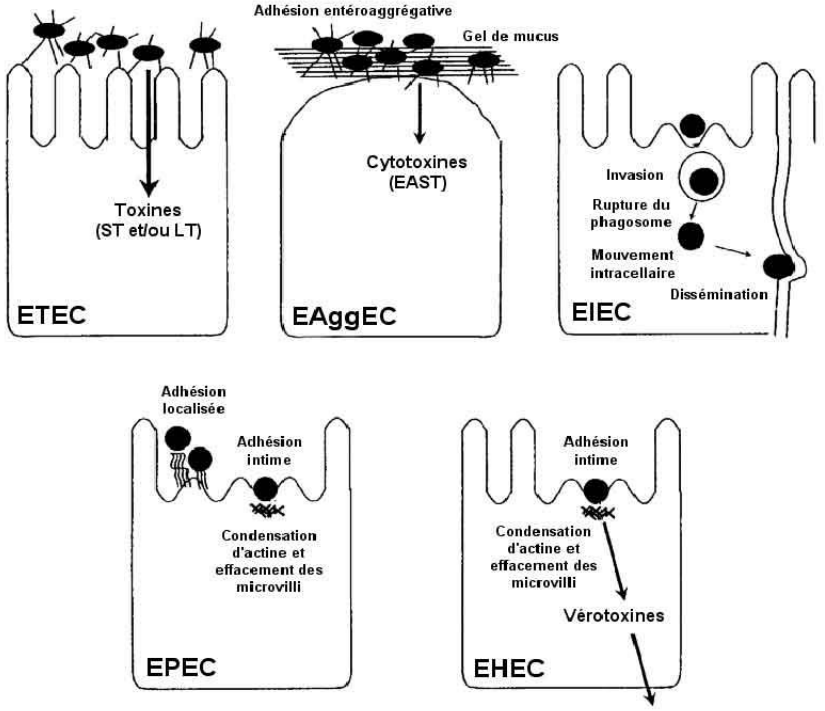
Dr Fabien LAMRET - MCU
Faculté de Pharmacie de Nantes
CR2TI Équipe 6, IRS2 Nantes Biotech
fabien.lamret@univ-nantes.fr

E. coli : une bactérie commensale & pathogène

- ***E. coli*** **commensal de l'intestin :**



- ***E. coli*** **responsables de diarrhées :**

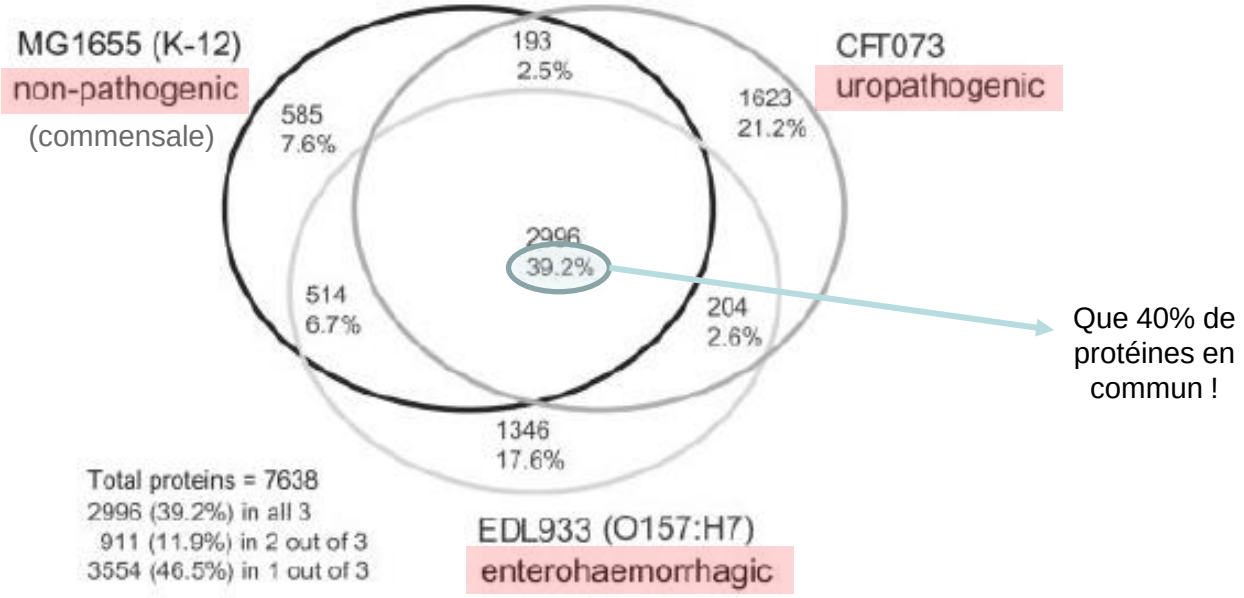


- ***E. coli*** **responsables d'infections extra-intestinales :**

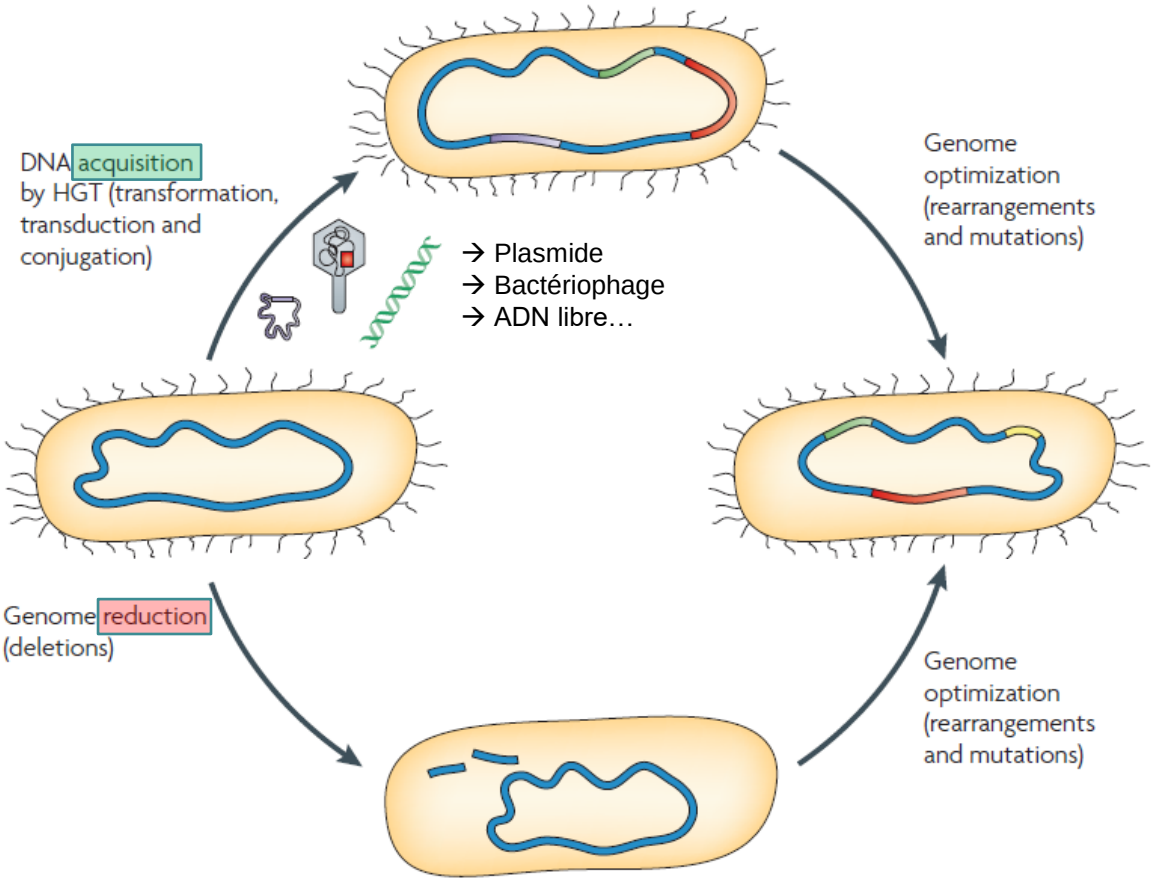
Infections urinaires, bactériémies, péritonites, pneumonies nosocomiales, méningites, …

Plasticité du génome et pathogénicité

- Plasticité = capacité d'un génome à subir des réarrangements
- Une **souche pathogène** de *E. coli* possède environ 20% d'information génétique supplémentaire par rapport à une **souche commensale**
- Un répertoire spécifique de gènes de virulence = une pathologie particulière



Le génome est une structure très dynamique dans laquelle il y a un flux constant d'insertions et de délétions

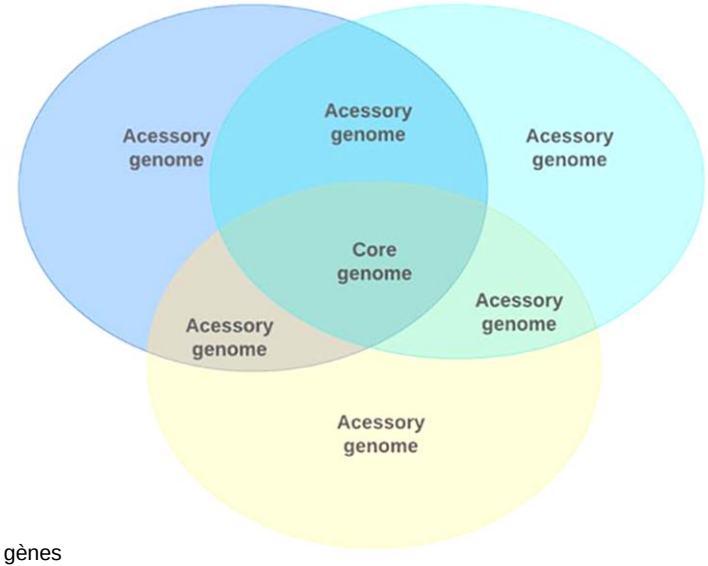


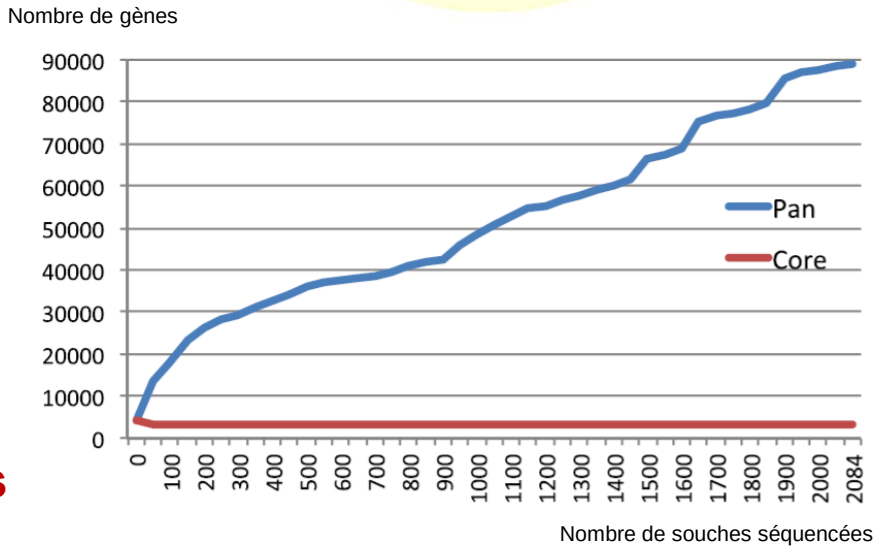
1 million de pb supplémentaires dans le génome d'un *E. coli* pathogène par rapport à une souche de *E. coli* commensale

Figure 1 | **Mechanisms that contribute to bacterial genome evolution.** Genome plasticity results from DNA acquisition by horizontal gene transfer (HGT; for example, through the uptake of plasmids, phages and naked DNA) and genome reduction by DNA deletions, rearrangements and point mutations. The concerted action of DNA acquisition and gene loss results in a genome-optimization process that frequently occurs in response to certain growth conditions, including host infection or colonization.

Le génome bactérien

- **Core génome :**
  - Ensemble de gènes partagés et conservés
  - Fonctions essentielles, métabolisme
- **Gènes accessoires :**
  - Fonctions non indispensables mais favorables à la survie en milieu hostile
- **Pangénome :**
  - Tous les gènes de toutes les souches d'une espèce





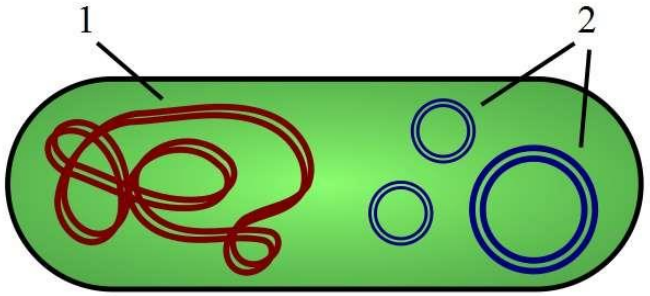
> Core génome de *E. coli* ≈ 3 100 gènes

> Pangénome de *E. coli* ≈ 89 000 gènes

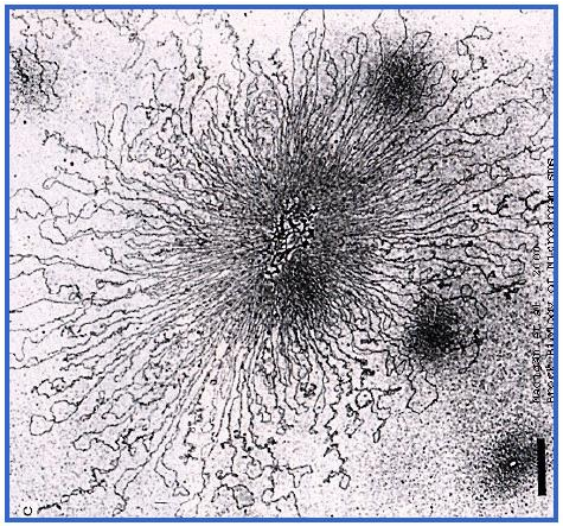
Supports génétiques de la virulence

- Les bactéries sont des **organismes procaryotes unicellulaires** :
  - absence d'organites délimités par une membrane (mitochondries, golgi, RE…)
  - nucléoïde bactérien non délimité par une membrane : **PAS DE NOYAU**

- Matériel génétique (ADN) :
  - chromosome ou nucléoïde (1)
  - plasmides (2)



Le nucléoïde : Composition



- **Composition de l'appareil nucléaire :**

  - **ADN (60%) :** taille variable

  - **ARN (30%) :** produits de transcription + ARN polymérase

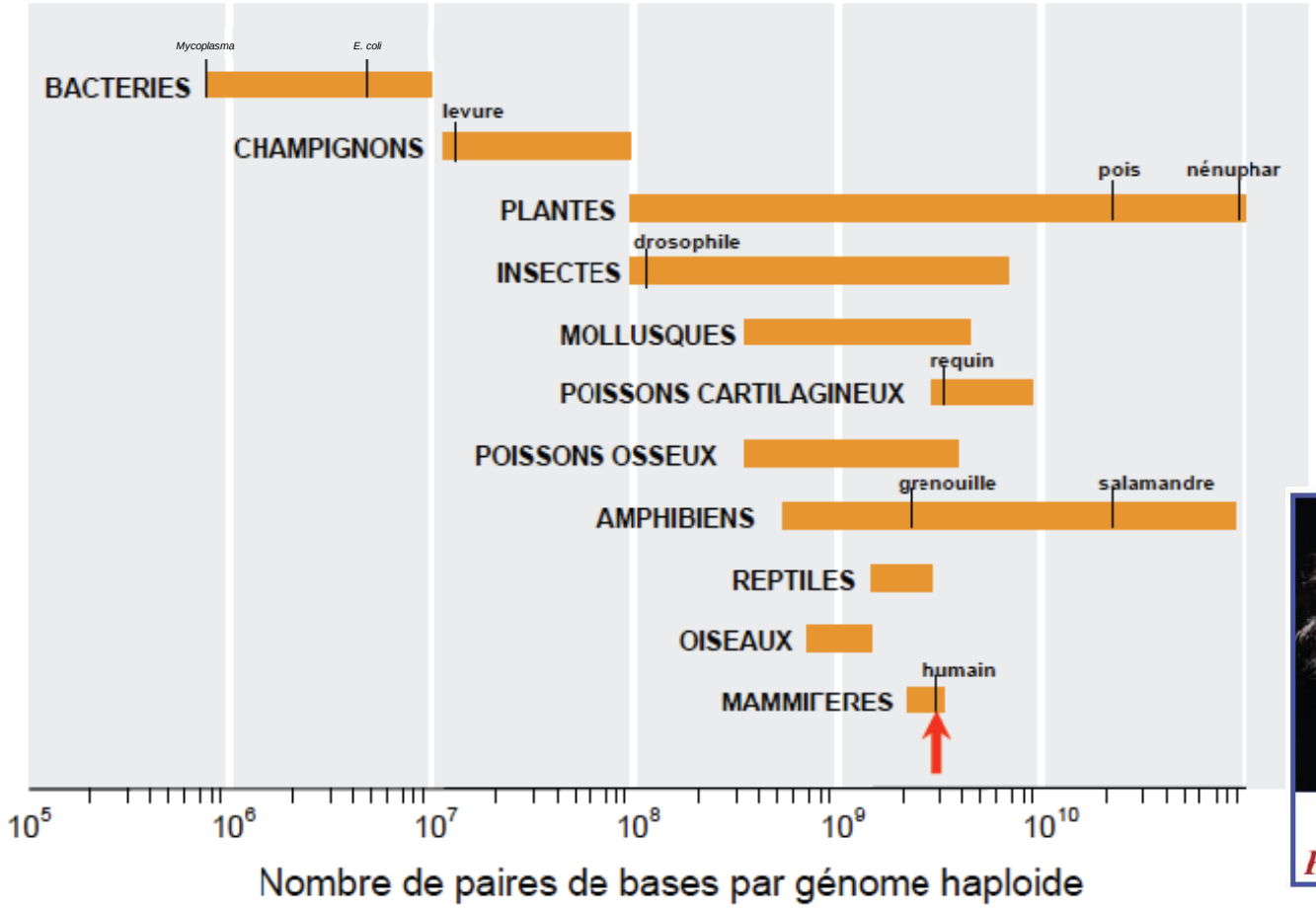
  - **Protéines (10%) :**

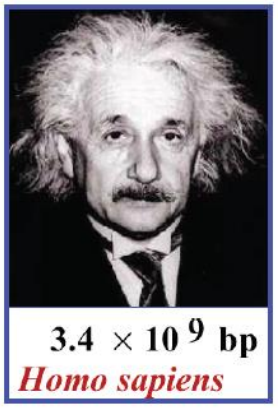
    ✓ Rôle dans la structure, lors de la réplication, dans l'expression génétique

    ✓ Chez *E. coli*, une douzaine de protéines sont impliquées dans la compaction du génome (Fis, IHF, H-NS,…)

Le nucléoïde : nombre, structure, taille

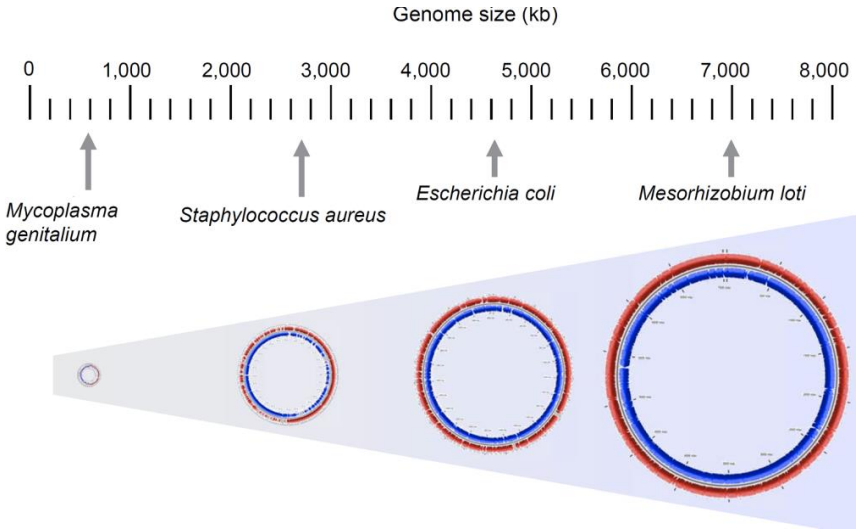
- Ordre du million de paires de bases (pb) :





Le nucléoïde : nombre, structure, taille

- Taille variable selon les espèces
- ADN près de 1000 fois plus long que la bactérie
- Filament continu d'une double chaîne d'ADN pelotonnée



	Nombre de paires de Bases	Nombre de protéines
Mycoplasma genitalium	580073	467
Treponema pallidum	1 138 011	1031
Haemophilus influenzae	1 830 138	1709
Neisseria meningitidis MC58	2 272 325	2025
Vibrio cholerae	4 033 464	3827
Mycobacterium tuberculosis	4 411 529	3918
Pseudomonas aeruginosa	6 264 403	5565

1995 : Publication de la 1ère séquence complète du génome d'un organisme vivant : *Haemophilus influenzae*

Le nucléoïde : nombre, structure, taille

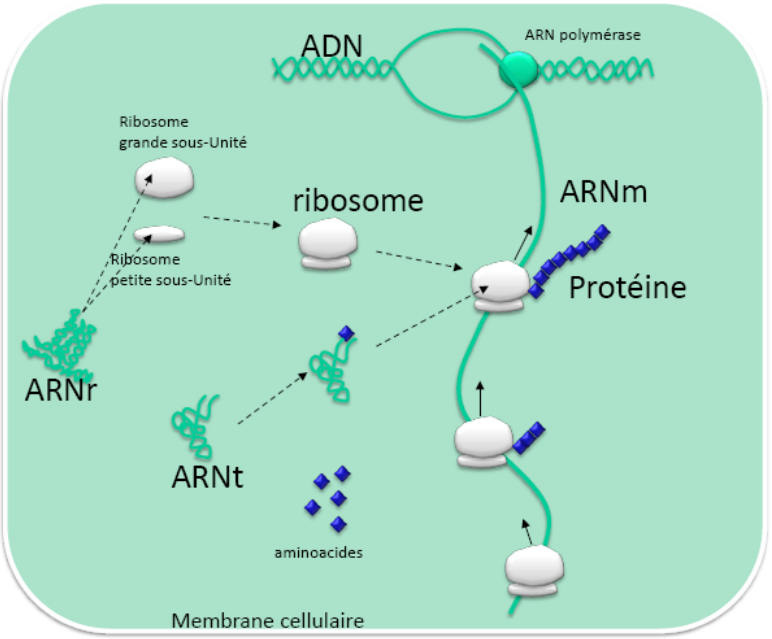
- Presque toujours **chromosome unique et circulaire**

	Chromosome (Nombre, forme, taille)
E. coli	1 circulaire (4,6 Mb)
P. aeruginosa	1 circulaire (6,3 Mb)
Vibrio cholerae	2 circulaires (2,9 & 1,1 Mb)
Brucella suis 1	2 circulaires (2 & 1 Mb)
Brucella suis 3	1 circulaire (3,1 Mb)
A. tumefaciens	1 circulaire (3 Mb) 1 linéaire (2,1 Mb)
Borrelia	1 linéaire (0,9 Mb)

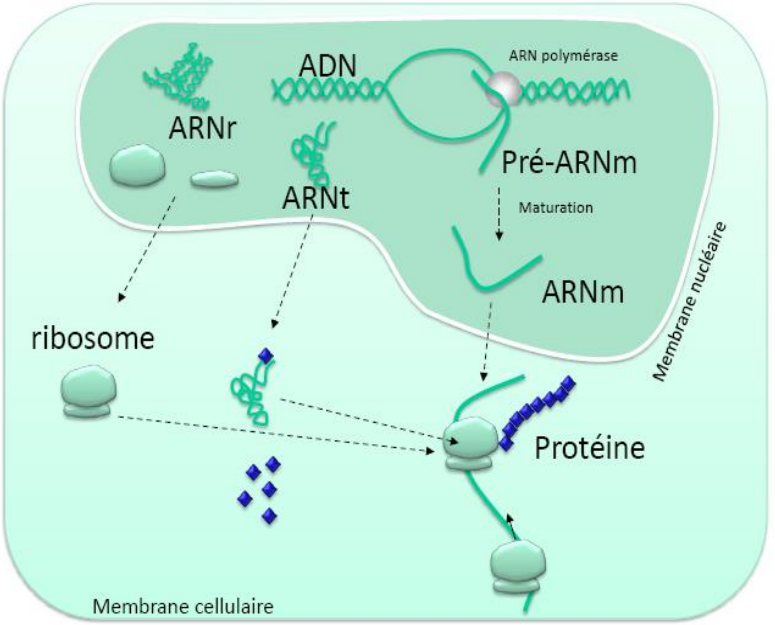
La transcription chez les bactéries

La transcription chez les bactéries

- Pas de **modification post-transcriptionelle** des ARNm
- **Transcription** et **traduction** ont lieu simultanément dans le cytoplasme
- **Demi-vie très courte** des ARNm



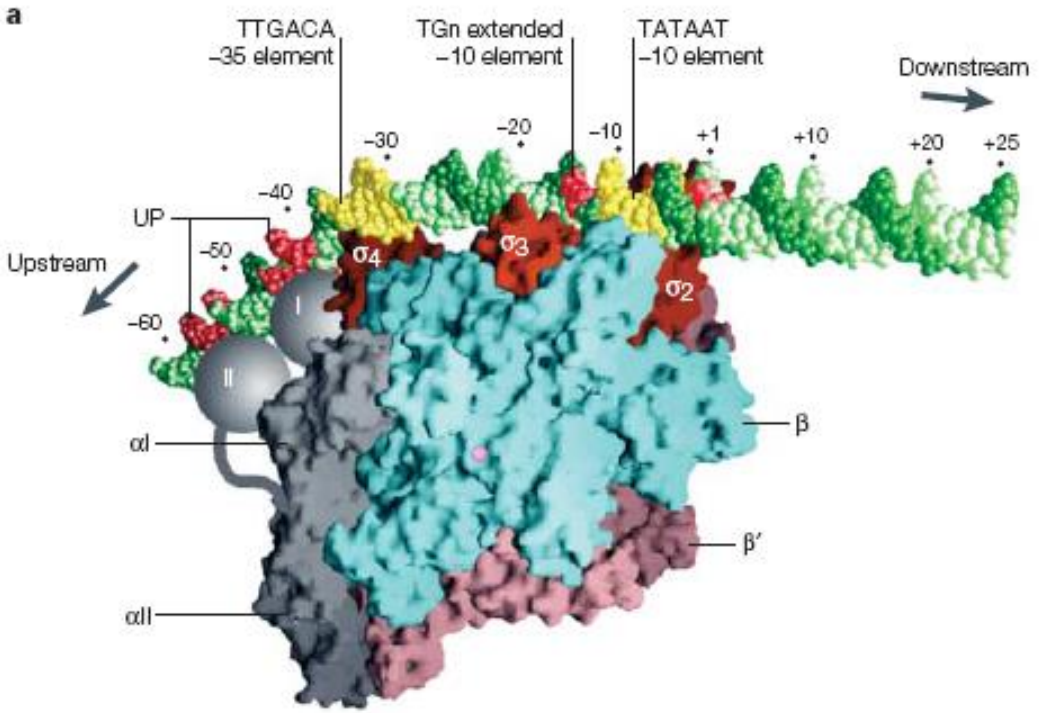
Cellule procaryote



Cellule eucaryote

La transcription chez les bactéries

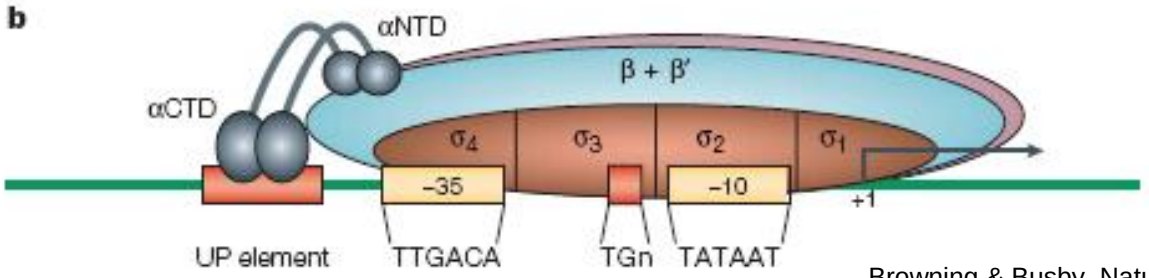
- Assurée par une **ARN polymérase** constituée de 5 sous-unités **:**
  - **2α, β et β'** : affinité très élevée pour l'ADN, sans spécificité
  - **facteur σ** : reconnait une séquence consensus sur le promoteur des gènes



L'ARN polymérase bactérienne

- <u>Fixation optimale nécessite</u> :
  - présence de séquences consensus en position -10 (boite TATA) et -35 (boite Pridnow)
  - espacement de 16 à 19 bases entre ces séquences

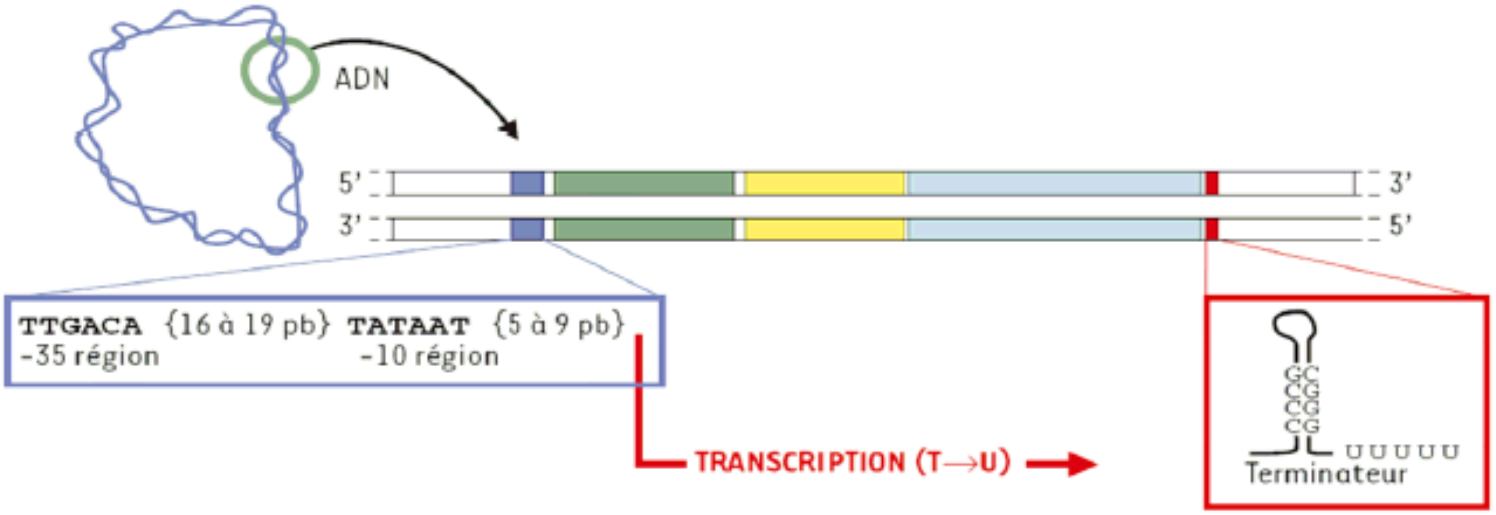
- <u>Etroitement régulée</u> :
  - facteurs de transcription
  - protéines régulatrices (répresseur, atténuateur…)
  - type de facteur σ fixé



Browning & Busby, Nature 2004 2 : 1-9

La transcription chez les bactéries

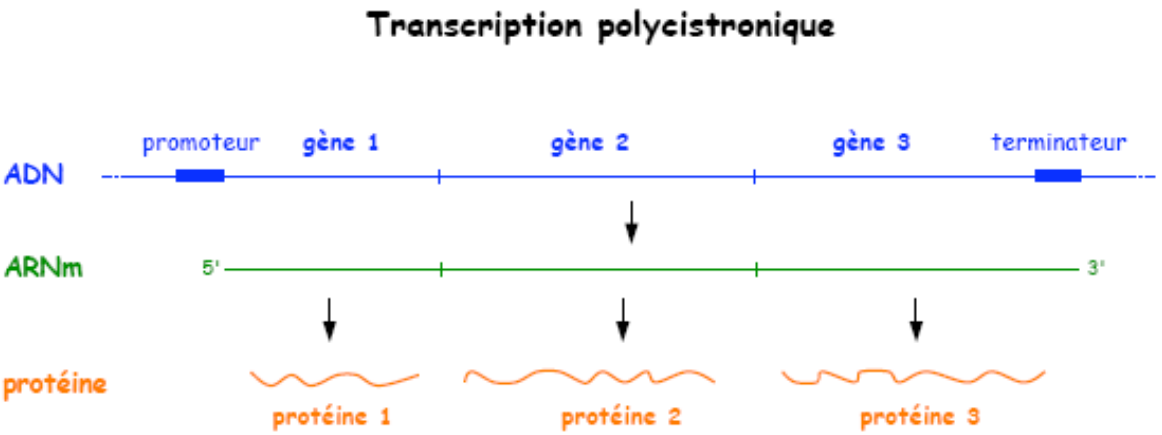
- Formation d'un complexe ouvert = l'ADN est dénaturé
- Sigma est chassé de l'ADN et la polymérase peut alors se déplacer sur l'ADN
- **L'élongation** se poursuit jusqu'à ce que l'ARN forme une boucle complémentaire qui déstabilise la polymérase (site de terminaison)
- L'ARNm est relâché et la polymérase est récupérée pour un nouveau cycle transcriptionnel

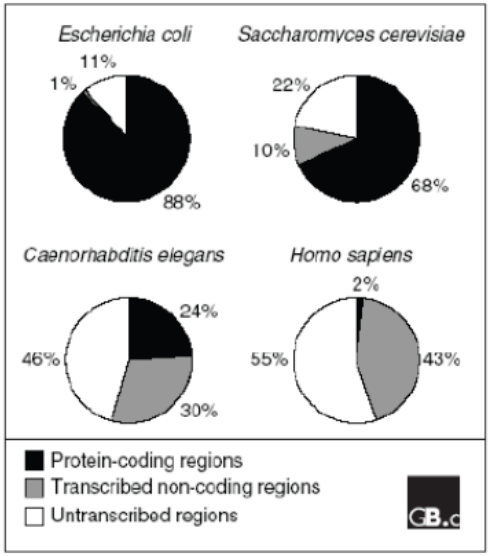


La transcription chez les bactéries

- La plus grande partie du génome des bactéries est composé de séquences codantes (≠ avec eucaryotes)

- Les gènes bactériens peuvent être organisés en **opérons** : ensemble de gènes sous la dépendance d'un promoteur unique et transcrits sous la forme d'un seul **ARNm polycistronique**





Gènes organisés en opérons

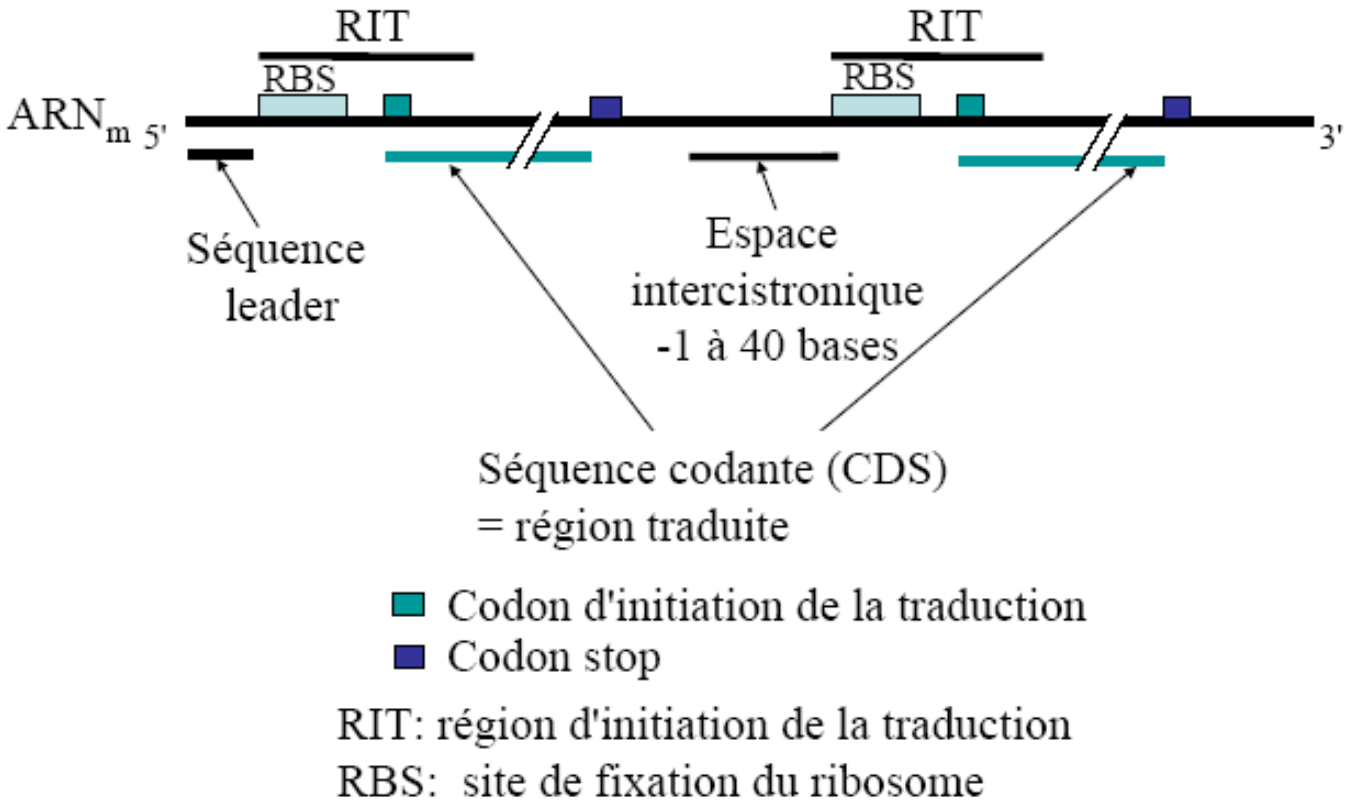
- En général, les gènes d'un même opéron codent pour des protéines d'une **même voie métabolique** (ex : opéron lactose, opéron tryptophane)

Exemple : opéron lactose d' *E. coli* (gènes *lacZ, lacY* et *lacA*)

≠ enzymes impliquées dans le catabolisme et le transport du lactose

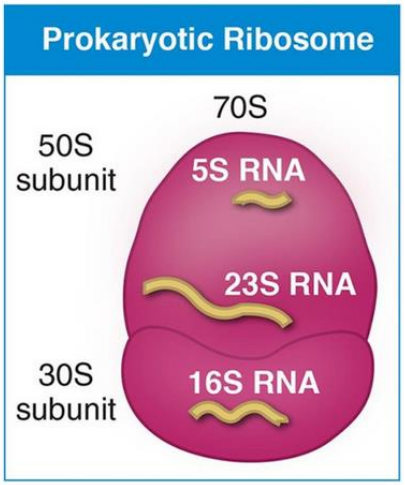
Gènes organisés en opérons

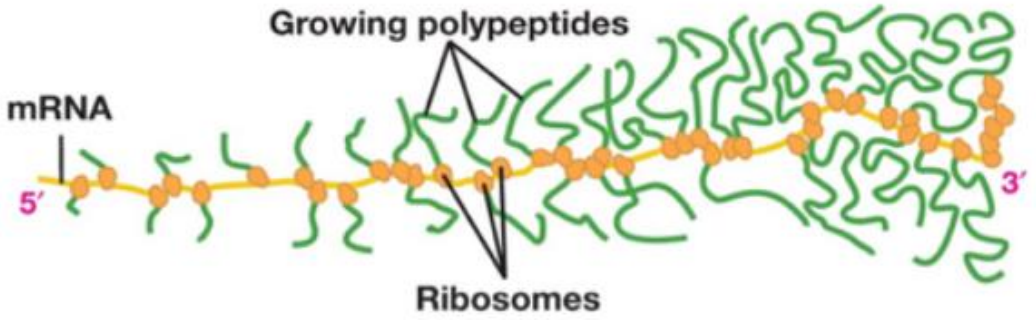
- Un site de fixation pour les ribosomes (= séquence de Shine-Dalgarno) est présent dans l'ARNm près du **site de début de la traduction** de chaque région codant une protéine



La traduction chez les bactéries

La traduction chez les bactéries



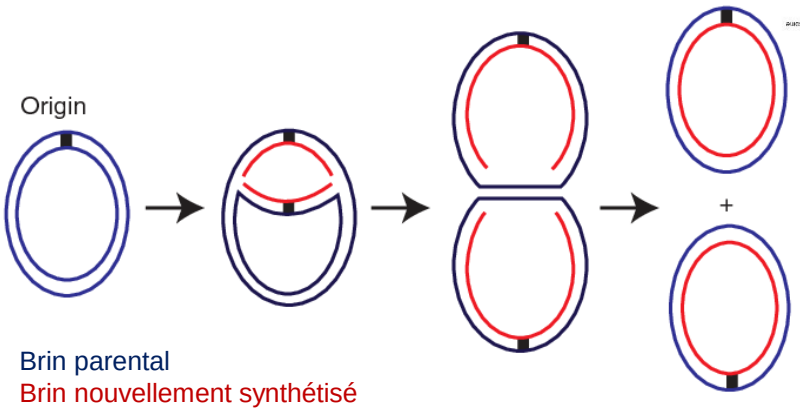


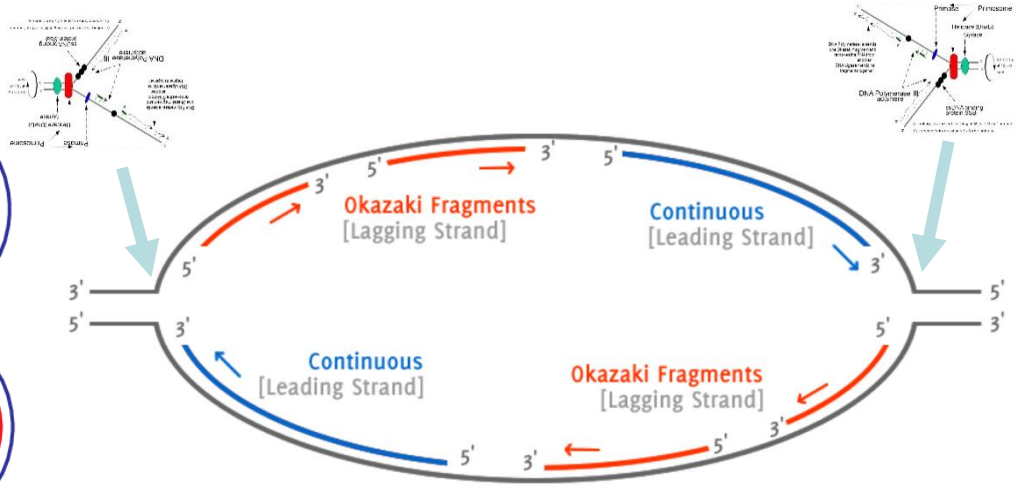
- **Initiation :** liaison sous-unité 30S - séquence de Shine-Dalgarno (ARNm), appariement d'un fMet-ARNt puis fixation de la sous-unité 50S
- **Elongation :** déplacement du ribosome le long de l'ARNm et accrochage séquentiel des acides aminés
- **Terminaison :** lecture d'un codon STOP, relargage de la protéine synthétisée et séparation des 2 sous-unités.

La réplication chez les bactéries

La réplication chez les bactéries

- Permet la duplication de l'ADN pour être transmis aux générations suivantes
- Rapide chez les bactéries (1000 nucléotides/s chez *E. coli*)
- Débute en un site appelé **origine de réplication** (***ori*C**)
- Séparation du double brin d'ADN et formation de 2 fourches de réplication
- Synthèse des nouveaux brins de façon continue ou non (**fragments d'Okasaki**)





La réplication chez les bactéries

- Action coordonnée de plusieurs enzymes = **le réplisome**

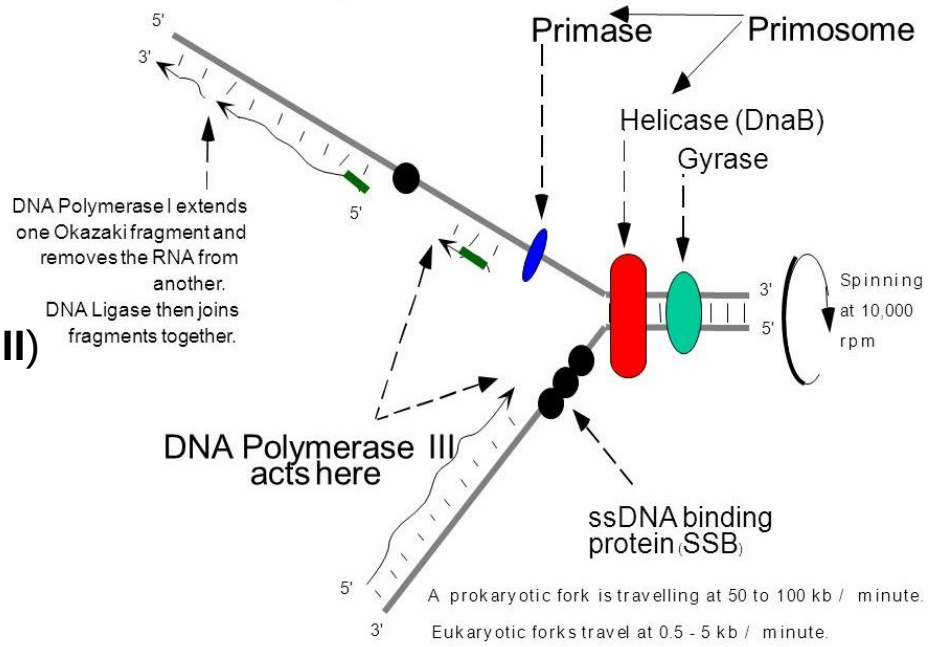
– déroulement de l'ADN (**hélicase**, **gyrase**…)

– synthèse d'amorces d'ARN (**primase**)

– synthèse du nouvel ADN (**ADN polymérase III**)

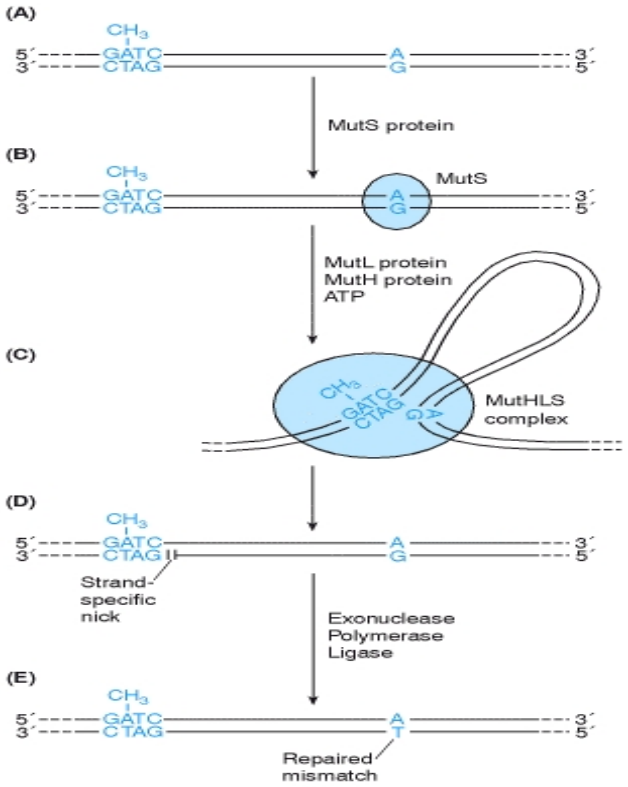
– ligation des nouveaux brins (**ligase**)

– méthylation des nouveaux brins (**méthylase**)

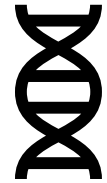


La réplication chez les bactéries

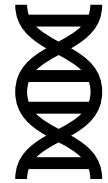
- Taux d'erreurs de réplication extrêmement faible (< $1/10^9$ pb)
- Propriétés de relecture et de réparation des ADN polymérases
- Correction des mésappariements par les protéines MutS/MutH/MutL



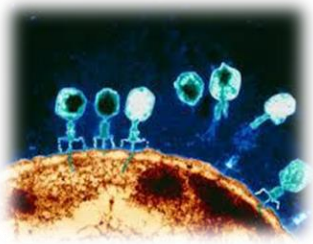
Les échanges génétiques chez les bactéries



Transformation



Transduction

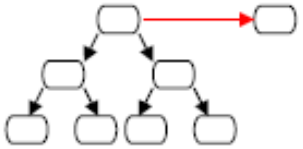


Conjugaison

Les échanges génétiques chez les bactéries

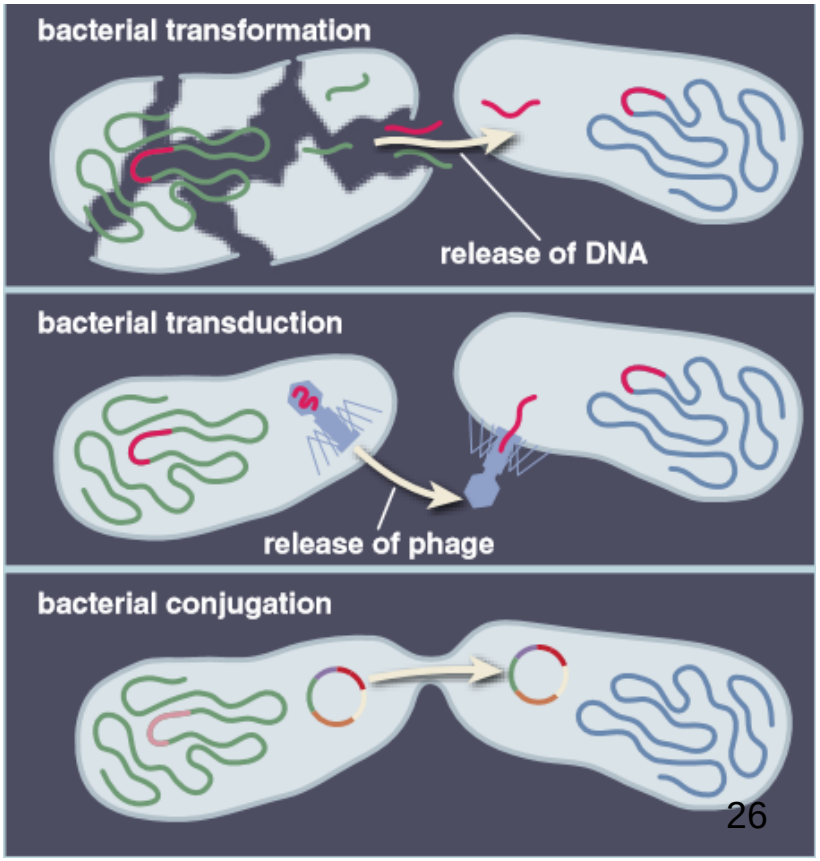
- **Échanges génétiques horizontaux :**

  Permettent la dissémination rapide d'informations génétiques entre différentes espèces bactériennes



3 mécanismes :

- **Transformation** : intégration d'ADN libre par une bactérie
- **Transduction** : ADN transféré par un (bactério)phage
- **Conjugaison** : ADN transféré sous forme de plasmide *(plasmides conjugatifs)*



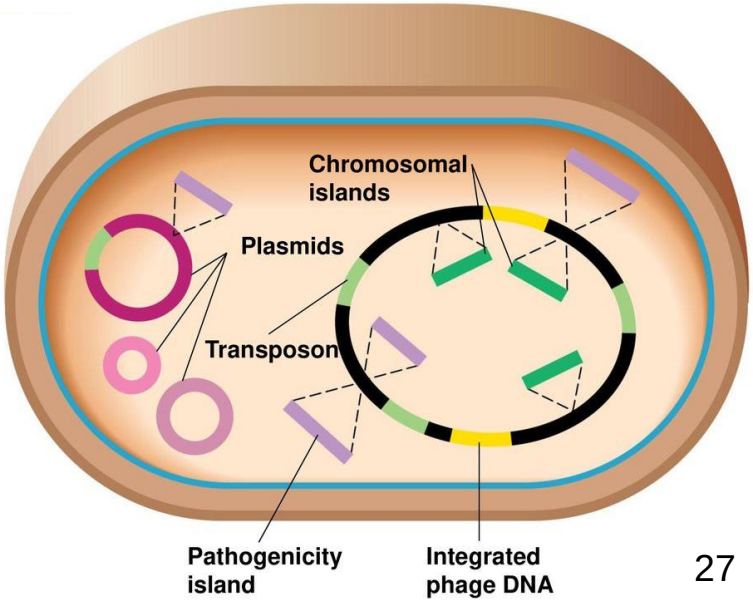
Les échanges génétiques chez les bactéries

- **Eléments génétiques mobiles :**

  Morceaux d'ADN échangés entre bactéries (génome accessoire)

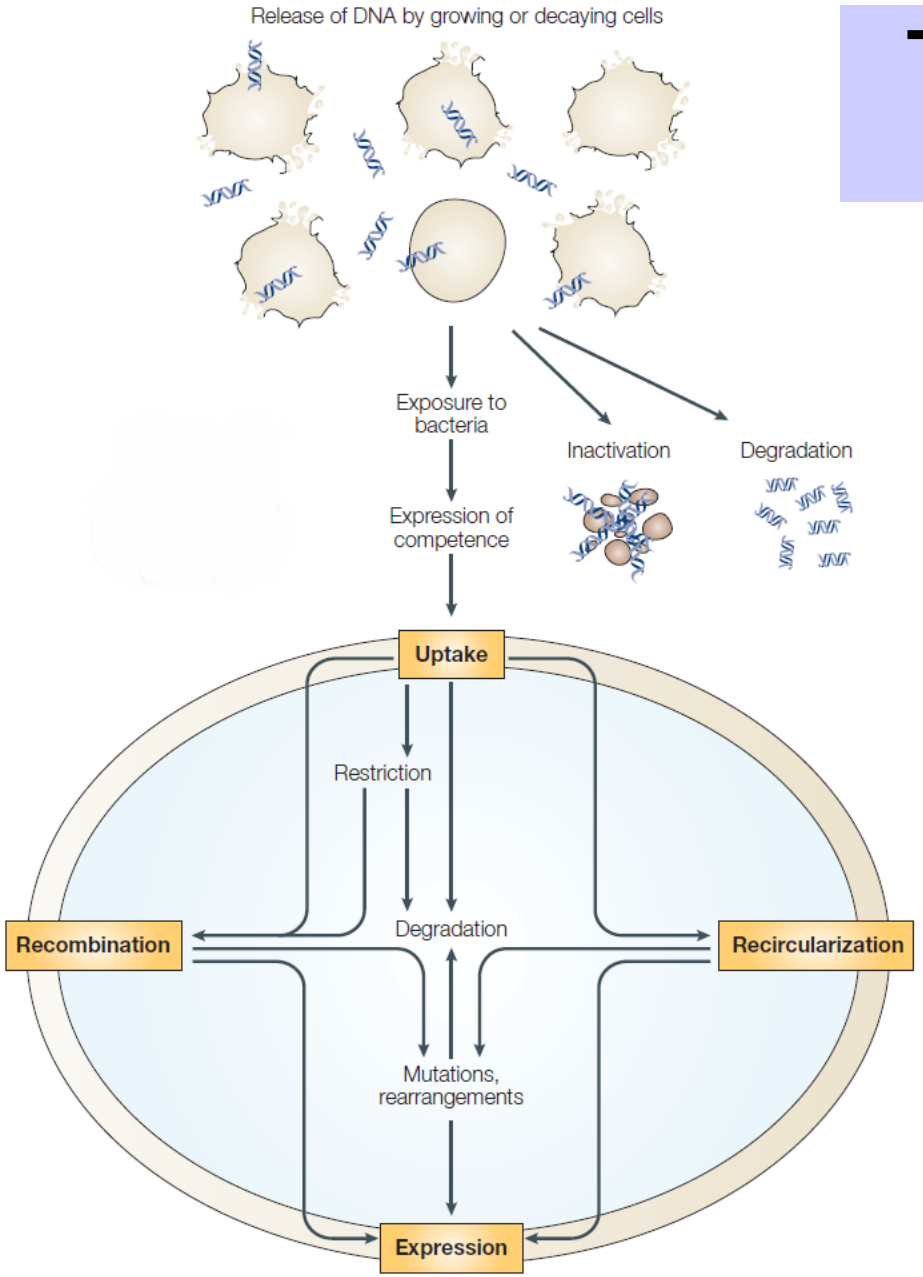
  - **plasmides**
  - **éléments transposables** (séquences d'insertion, transposons)
  - **ilots de pathogénicité**
  - **prophages**

Fonctions non indispensables mais utiles pour occuper une niche écologique donnée



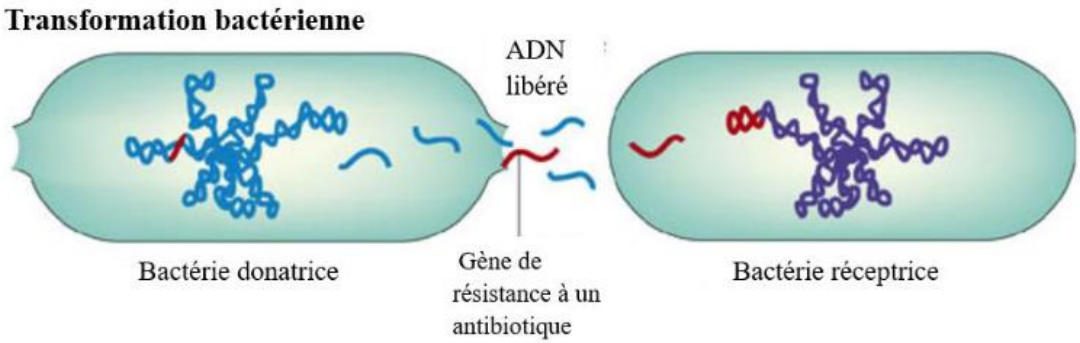
Transfert d’ADN par transformation

Transfert d'ADN par transformation



- 1er mécanisme découvert de transfert horizontal d'ADN
- Transfert d'**ADN nu** entre bactéries très proches
- Entrée de fragments d'ADN dans des **bactéries** dites **compétentes** puis **recombinaison** pour integration au génome

Transfert d'ADN par transformation



- Bactéries naturellement **transformables**
- Certaines ne le sont qu'à des moments particuliers de leur croissance

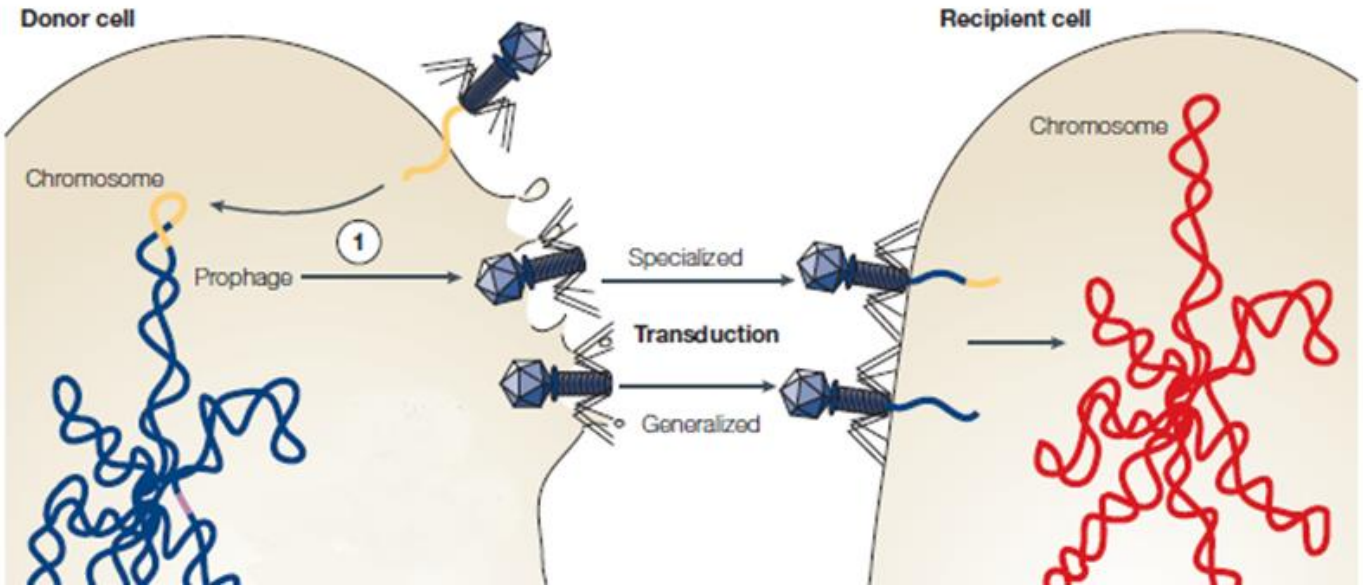
- **Compétence naturelle :**
  - *Haemophilus, Neisseria, Streptococcus*
  - Fin de phase exponentielle de croissance

- **Compétence artificielle :**
  - Traitement au $CaCl_2$ et choc thermique, electroporation…
  - Introduire de l'ADN recombinant chez les bactéries

Transfert d’ADN par transduction

Transfert d'ADN par transduction

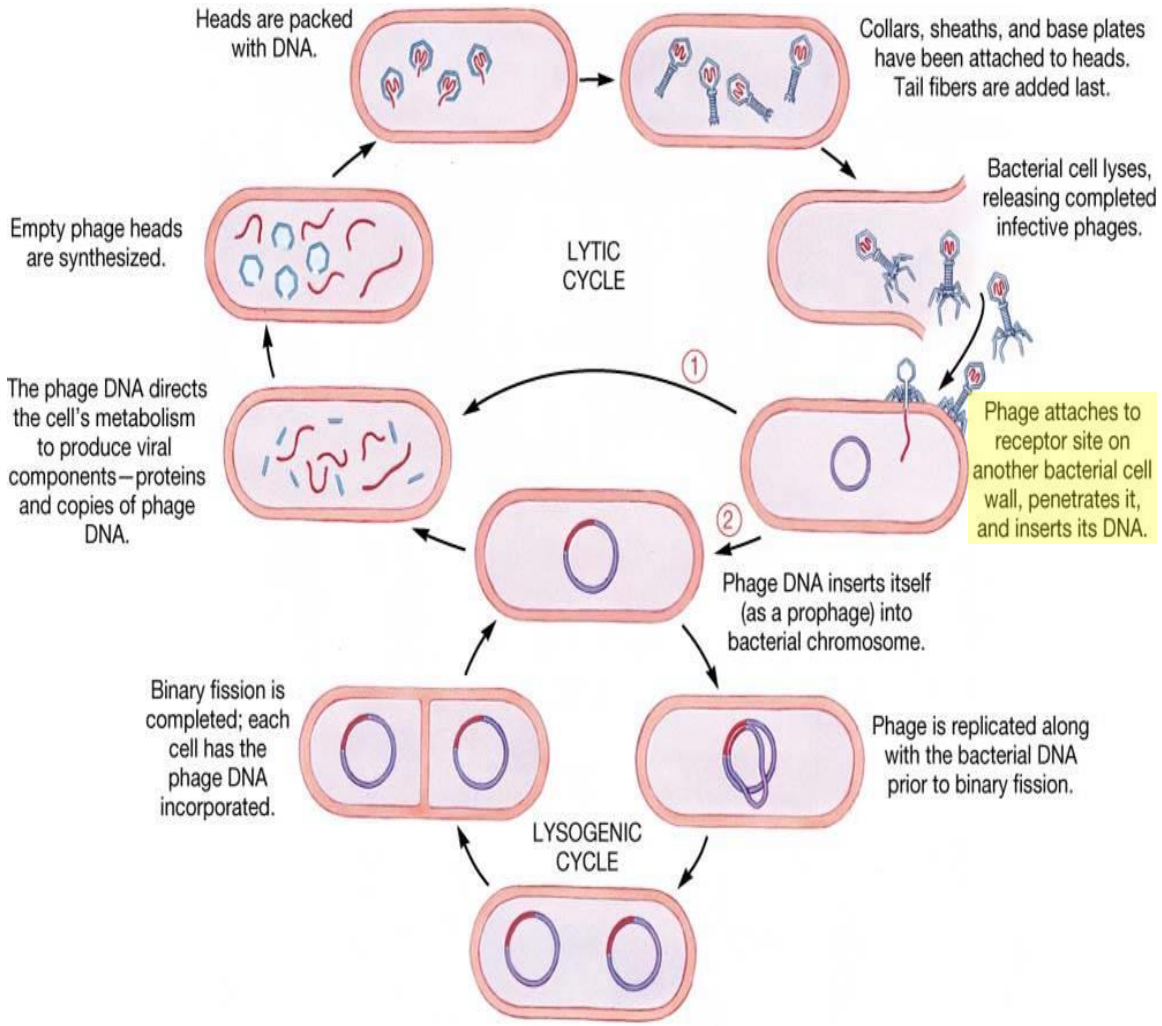
- Transfert de gènes par l'intermédiaire de **bactériophages** (virus de bactéries)



- **Phages virulents ou lytiques :**
  Les bactéries explosent en multiples phages

- **Phages tempérés :**
  S'intègrent dans chromosome bactérien (**prophages**)

Transfert d'ADN par transduction



Transduction généralisée :

Phages virulents entrainant une lyse bactérienne

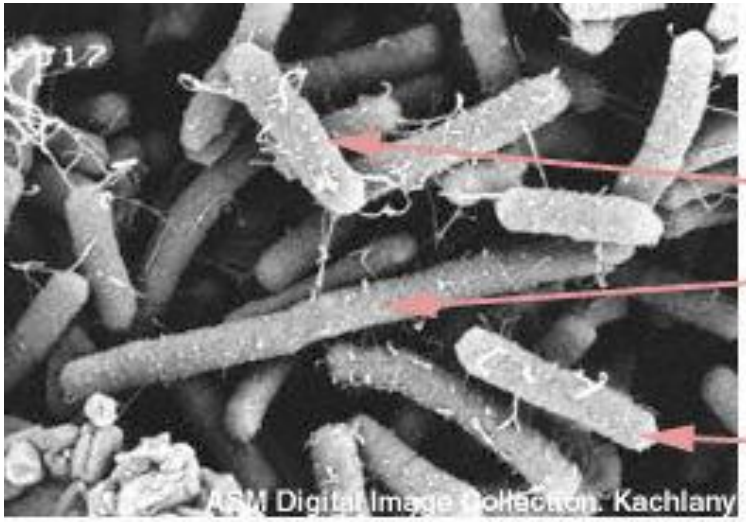
> cycle lytique

Transduction spécialisée :

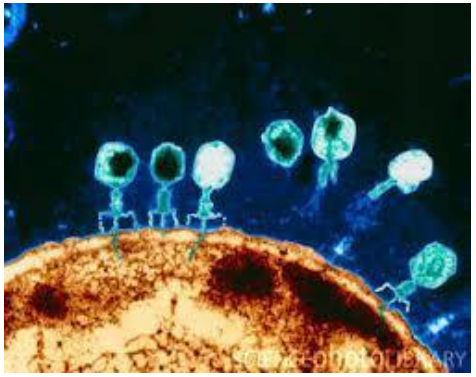
Phages tempérés intégrés dans des régions particulière du chromosome (**prophages**)

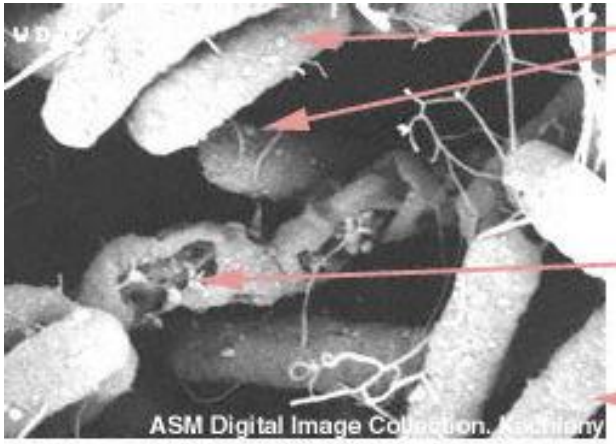
> cycle lysogénique

Transfert d'ADN par transduction



This scanning electron micrograph (SEM) shows *Escherichia coli* cells with phage particles attached to the outside of the cells.



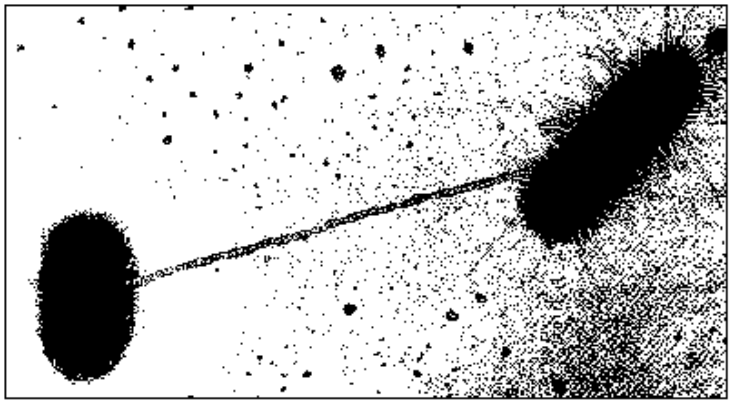


This scanning electron micrograph (SEM) shows *Escherichia coli* cells with disrupted cell envelopes, presumably due to phage release.

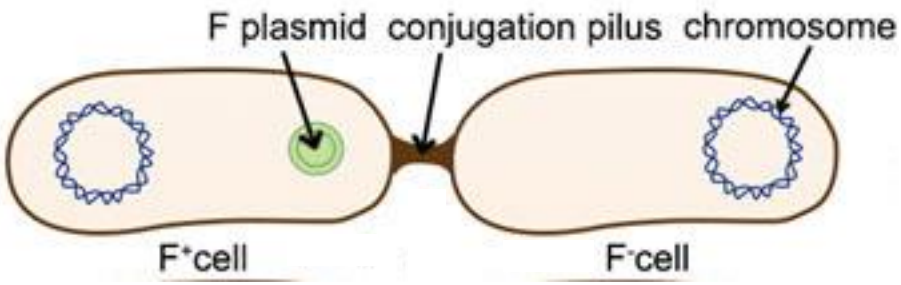
Transfert d’ADN par conjugaison

Transfert d'ADN par conjugaison

- Echange d'ADN sous forme de **plasmide**
- Rôle essentiel des pili sexuels (facteurs de fertilité ou facteurs F)



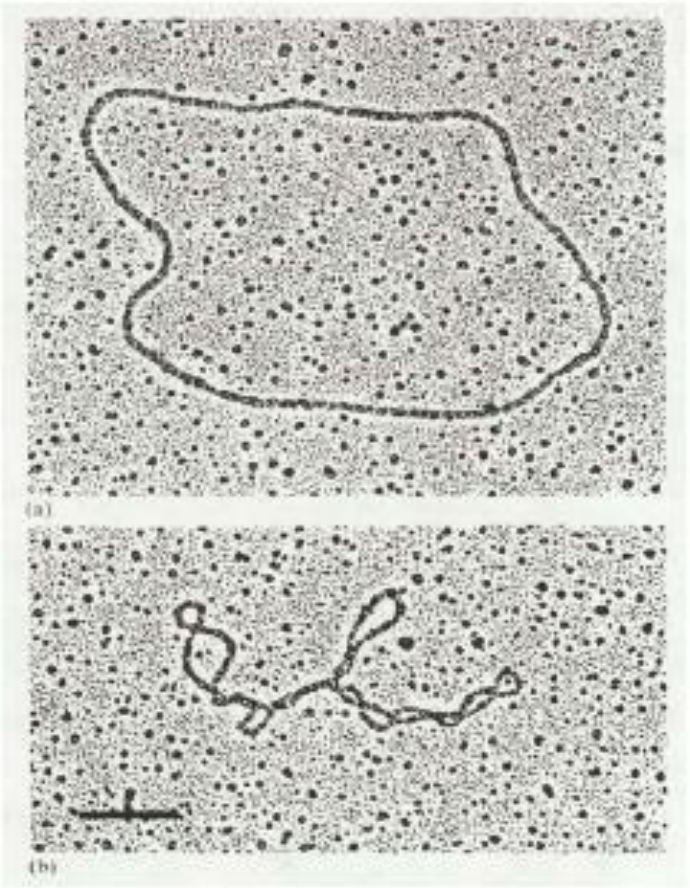
> Bactérie donneuse : bactérie mâle (F+)
> Bactérie réceptrice : bactérie femelle (F-)



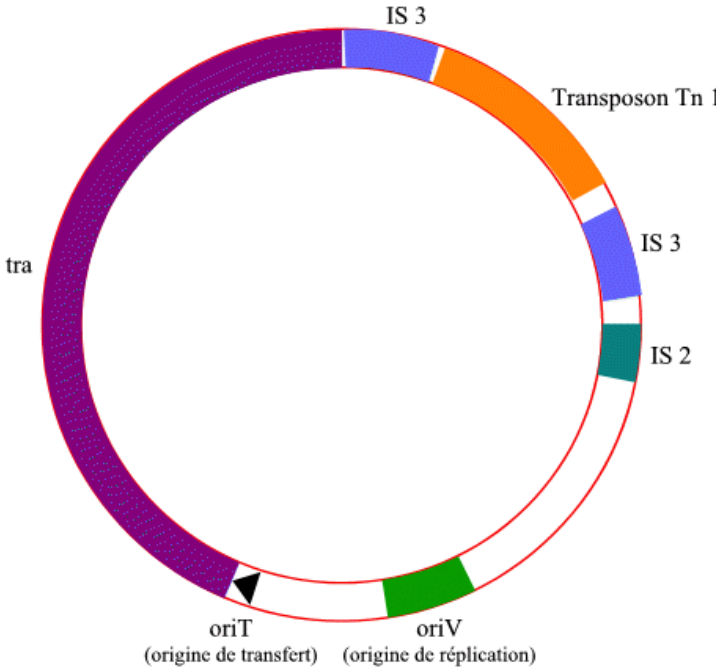
Mécanisme très impliqué dans la diffusion de la résistance aux antibiotiques

Les plasmides

- Molécules d'ADN bicaténaire, circulaires et cytoplasmiques
- Petite taille (5 à 4000 < chromosome)
- Capables de réplication autonome
- Transmission verticale & horizontale +++
- Non indispensables au métabolisme normal de la bactérie hôte
- Caractérisés par :
  - type et origine de réplication (oriV)
  - nombre de copies
  - compatibilité (groupes InC)
  - spécificité d'hôte
  - mode de transfert



La conjugaison



Facteur de fertilité ou facteur F

- **Plasmides conjugatifs**
  ⟶ portent l'opéron *tra*
- Plasmides non-conjugatifs

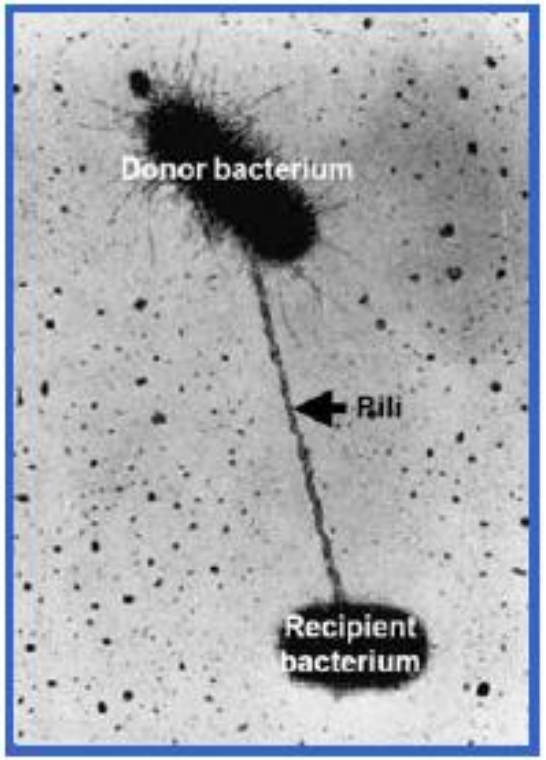
⇢ Opéron tra :

Synthèse des pili sexuels
traA, traL, traE, traK, traB, traV, traC, traW, traU, traF, traQ, TraH, traG

Exclusion de surface
traS, traT

Transfert de l'ADN
traM, traY, traD, traI, traZ

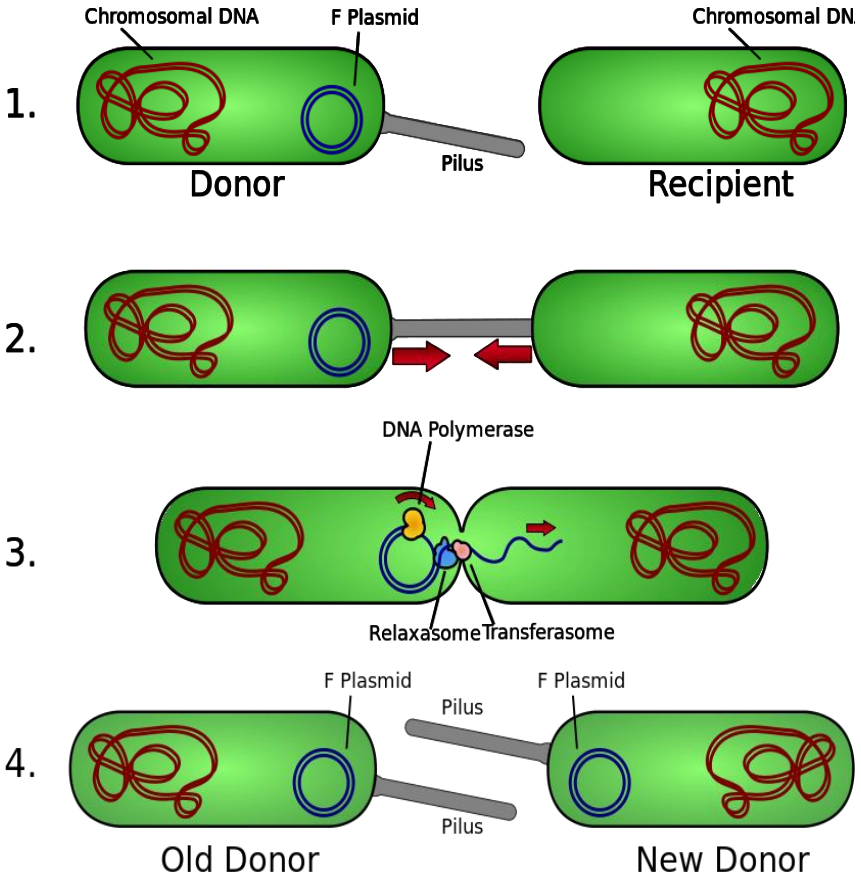
Régulation
finP, finO, traJ



La conjugaison

Transfert en 4 étapes :

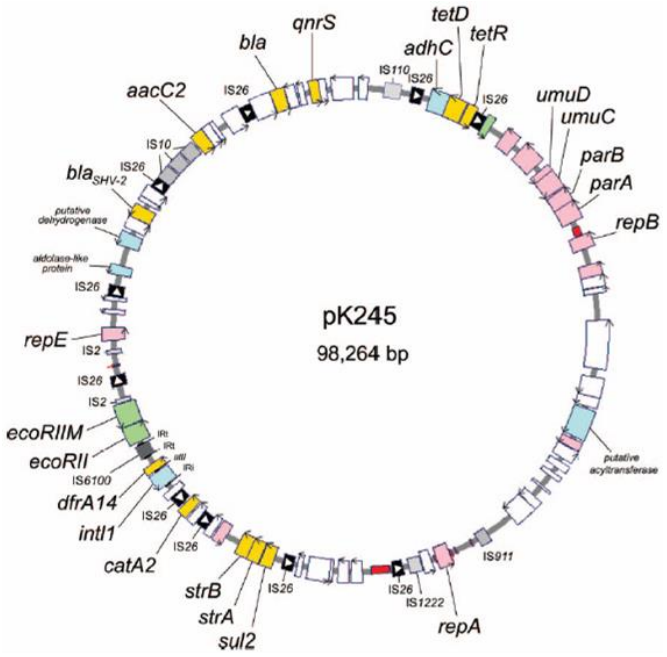
1) Reconnaissance entre donneur (F+) et accepteur (F-) grâce à la synthèse du pilus
2) Transfert d'un des 2 brins du plasmide
3) Synthèse du brin complémentaire chez l'accepteur et le donneur
4) Recircularisation du plasmide chez l'accepteur et le donneur



Finalement, le facteur F persiste chez la bactérie donatrice (F+) et une copie du plasmide est acquise par la bactérie réceptrice qui devient F+

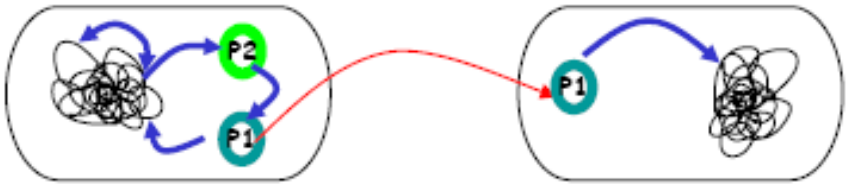
Les plasmides

- **Supports de gènes impliqués dans une meilleure adaptation à l'environnement :**



- résistance aux antibiotiques
- résistance aux antiseptiques
- résistance aux métaux lourds
- résistance aux bactériophages
- synthèse de bactériocines
- pouvoir pathogène des colibacilles entéropathogènes
- pouvoir pathogène des staphylocoques dans l'impétigo (exfoliatine)
- …

Éléments transposables



Séquences d'insertion (IS)
Transposons composites
Transposons non composites
Transposons conjugatifs
Ilots de pathogénicité

Éléments transposables

- Capables d'être transférés d'un **site donneur** vers un **site cible**, localisé ou non sur une même molécule d'ADN, plasmidique ou chromosomique

- Séquences d'ADN linéaire, mobiles, n'apparaissant jamais à l'état libre

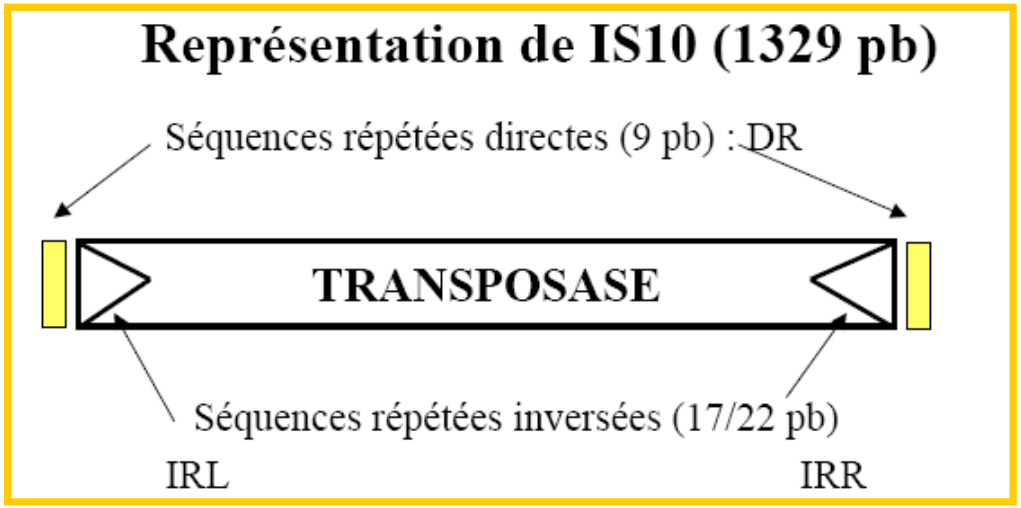
- À l'origine de variations génétiques et de remaniement des gènes sur le chromosome bactérien

- Transposition fait intervenir une recombinase de différents types :
  - transposases
  - intégrases
  - résolvases / invertases

1) Séquences d'insertion (IS)

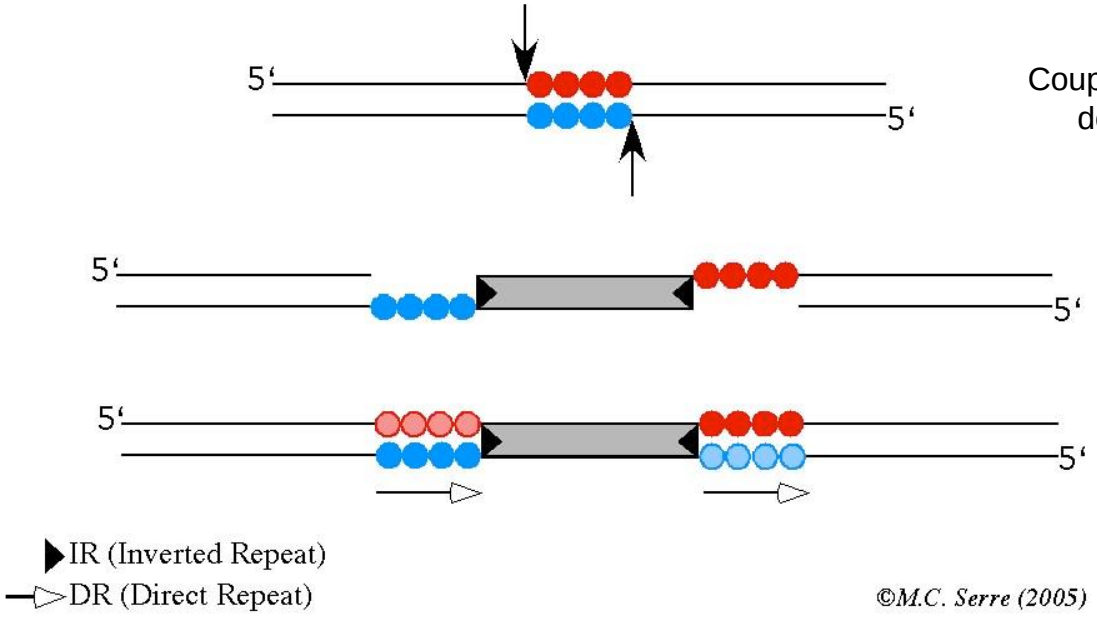
- ≈ 1000 IS recensées
- Petite taille (800 à 2500 pb)
- **Eléments mobiles les plus simples**
- Ne codent que pour leur mobilité (pas d'autre fonction)
- Localisées dans le chromosome et/ou les plasmides (1 ou plusieurs copies)
- Interviennent dans **l'expression** de certains gènes en les **inactivant** par interruption ou en les **activant** (présence de promoteur sur l'IS)

1) Séquences d'insertion (IS)



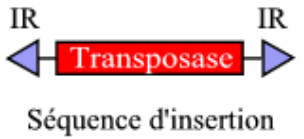
- Délimitées par de courtes séquences répétées (jusqu'à 40 pb) en orientation inverse (IRS)
- Cadre de lecture codant pour une transposase
- ***Transposase*** excise le transposon et coupe la cible

1) Séquences d'insertion (IS)



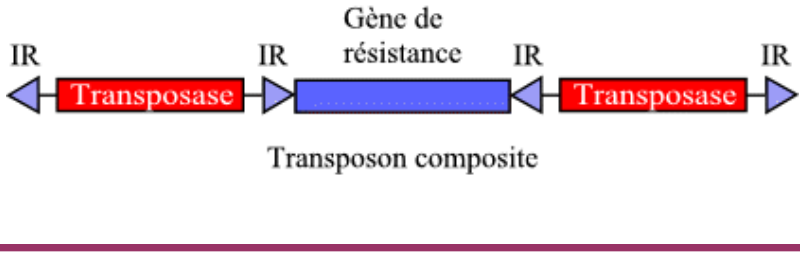
- L'insertion de ces éléments génétiques conduit toujours à la duplication d'une courte séquence d'ADN (5 à 9 paires de bases)
- Il existe des sites d'insertion privilégiés, particulièrement riches en adénine et thymine

2) Transposons composites

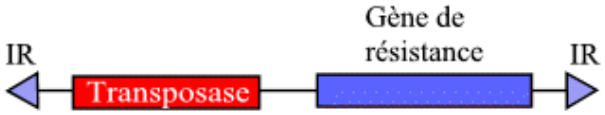


Séquence d'insertion

- Taille moyenne (3 à 10 kb)
- Encadrés de 2 copies d'IS en orientation directe ou inverse
- Gènes centraux non liés aux fonctions de transposition
- IS fonctionnent de paire et emportent le segment d'ADN qu'elles encadrent



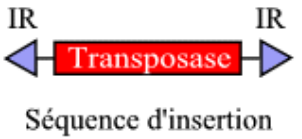
Transposon composite



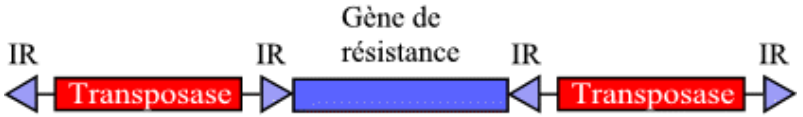
Transposon simple ou non composite

3) Transposons non composites

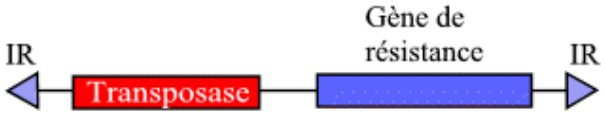
- Taille allant jusqu'à 70 kb



Séquence d'insertion



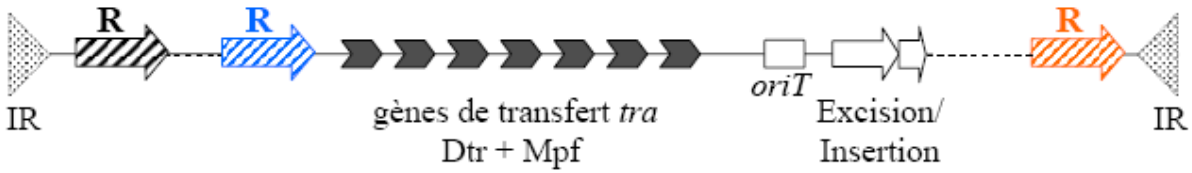
Transposon composite

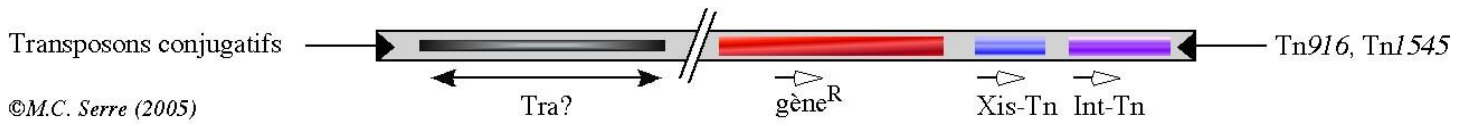


Transposon simple ou non composite

4) Transposons : conjugatifs

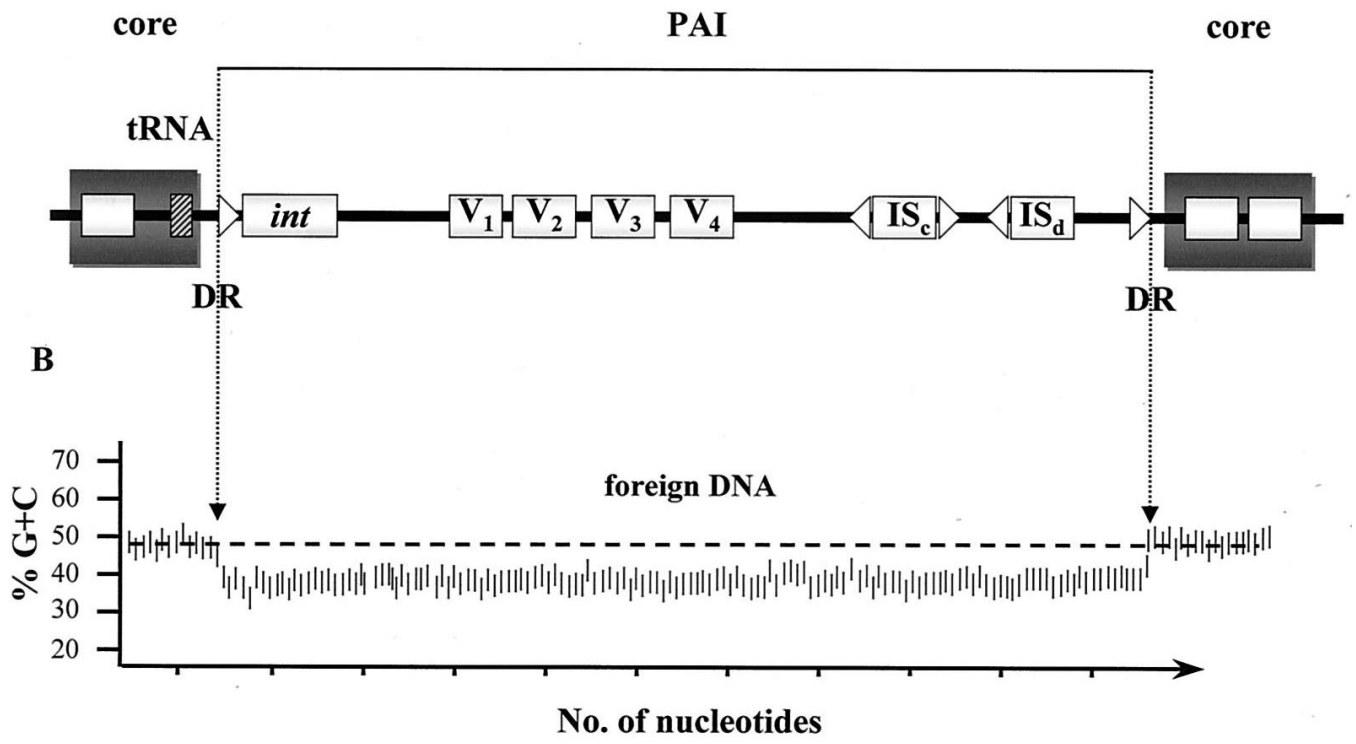
- Éléments de grande taille
- Seuls capables de transfert intercellulaire
- Propriétés d'intégration des bactériophages (gène d'intégrase) et propriétés de transfert des plasmides conjugatifs (gènes *tra*)
- Ne possèdent pas les fonctions de réplication





5) Ilots de pathogénicité

- Fragments d'ADN de grande taille (20 à 200 kb)
- % G-C différent du chromosome
- Bornes : courtes séquences répétées inversées
- Association avec des gènes de transfert



5) Ilots de pathogénicité

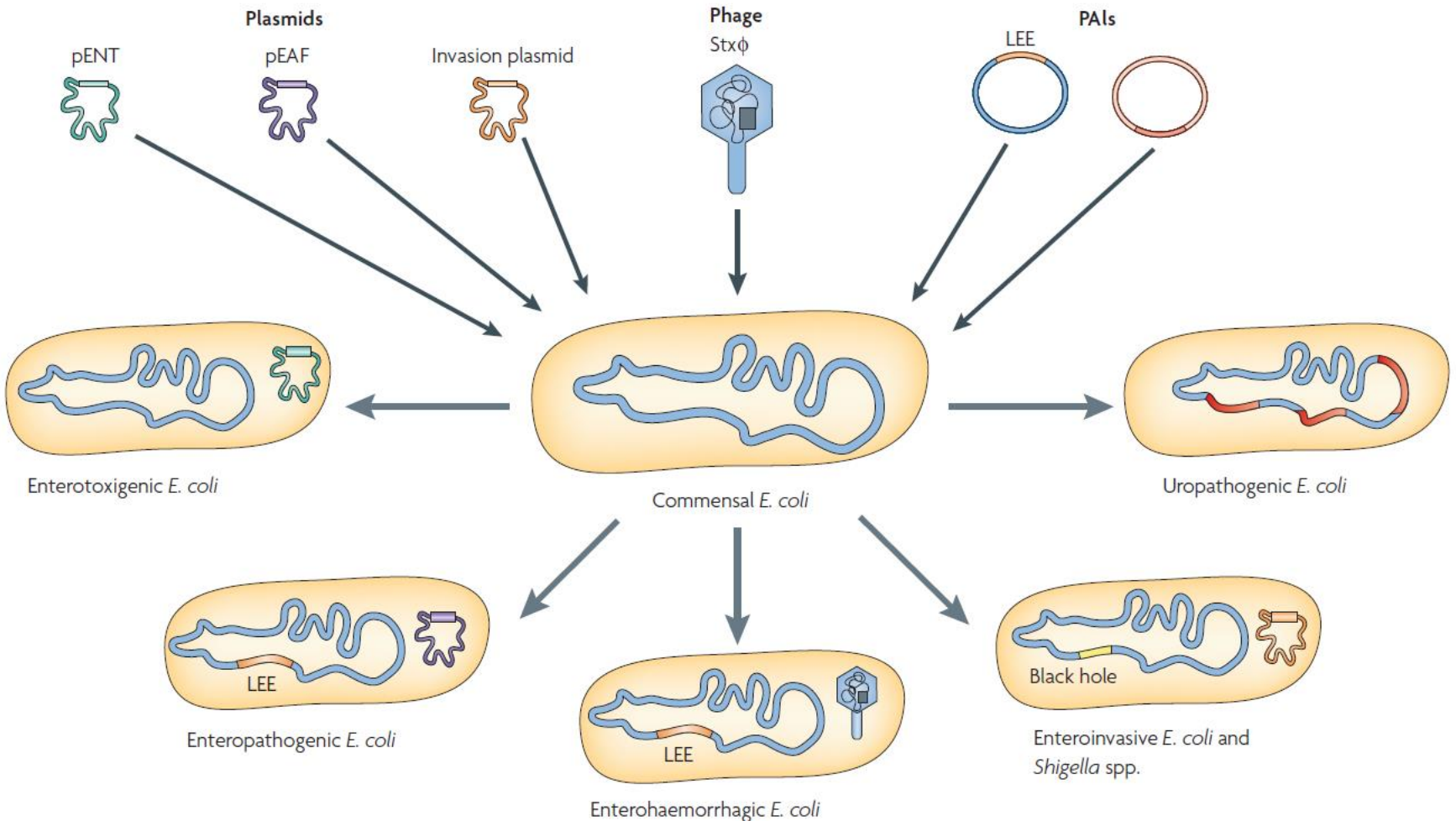
- Caractérisent les souches pathogènes
- Portent des gènes de virulence et de régulation
- Issus d'éléments transposables ou de bactériophages
- Proviennent probablement de transferts horizontaux

TABLE 1 Major virulence features encoded by pathogenicity islands

Virulence feature	Examples
Adherence factors	Diarrheagenic *Escherichia coli* Uropathogenic *Escherichia coli* *Vibrio cholerae* *Listeria* spp.
Toxins	Uropathogenic *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus*
Iron uptake systems	Uropathogenic *Escherichia coli* *Shigella flexneri* *Yersinia* spp.
Invasions, modulins, effectors	Diarrheagenic *Escherichia coli* *Salmonella* spp. *Shigella* spp. *Listeria* spp.
Type III secretion systems	Diarrheagenic *Escherichia coli* *Pseudomonas syringae* *Erwinia* spp. *Yersinia* spp. *Salmonella* spp. *Shigella* spp.
Type IV secretion system	*Helicobacter pylori* *Agrobacterium tumefaciens*

L’exemple de *Escherichia coli* dans les infections urinaires

Supports génétiques de la virulence



Chaque sous groupe de *E. coli* pathogène a une signature génétique complexe

Escherichia coli uropathogène (UPEC)

- **Infections urinaires, physiopathologie :**

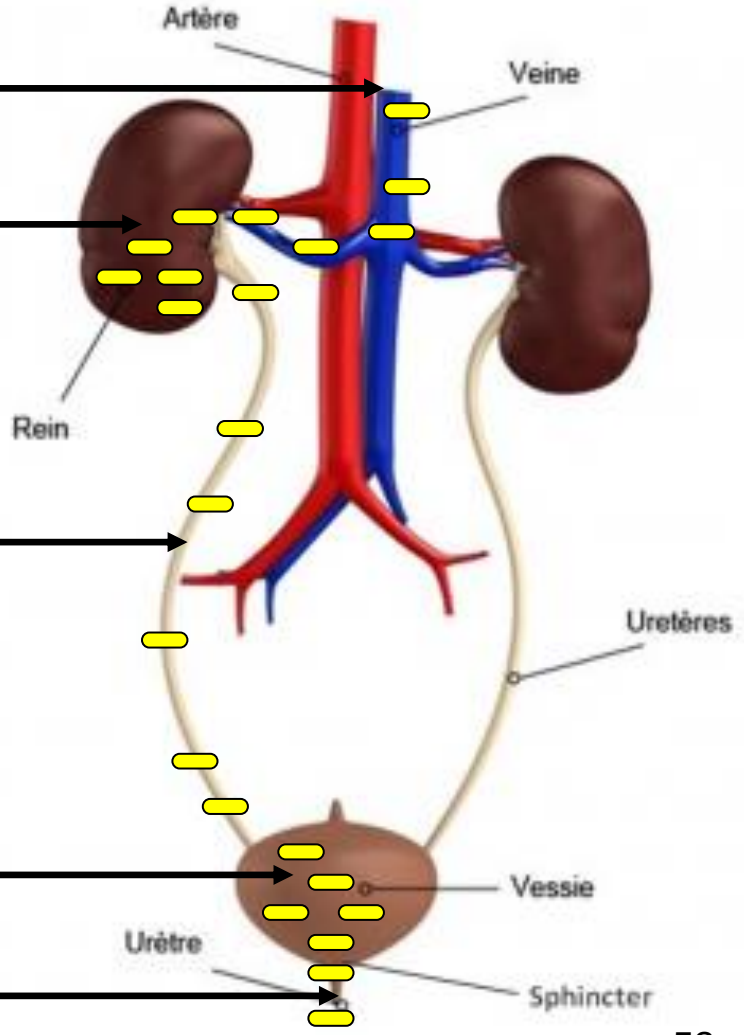
5 Bactériémie

4 Infection du parenchyme rénal (pyélonéphrite)

3 Colonisation ascendante des uretères

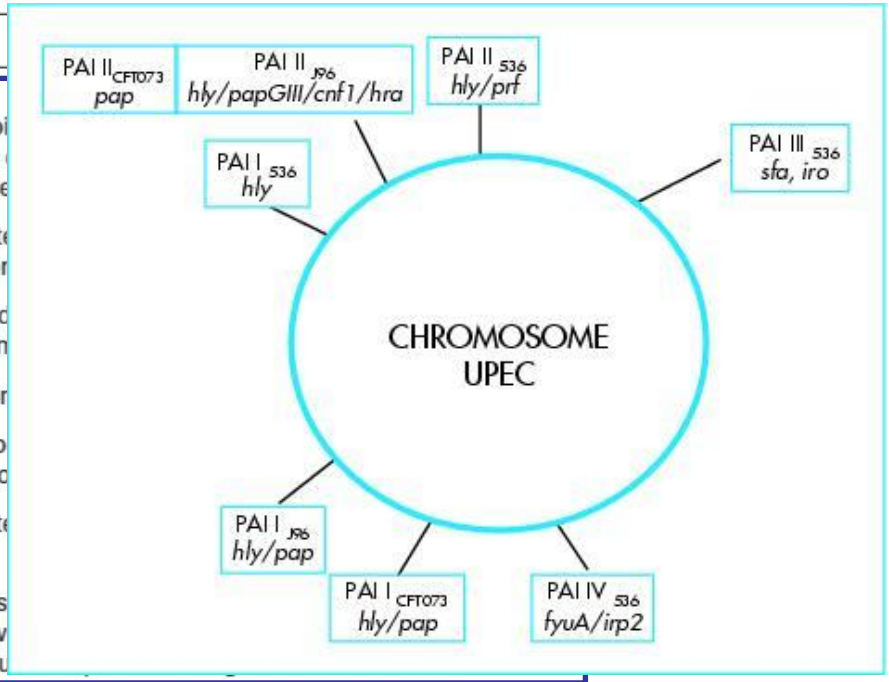
2 Infection vésicale (cystite)

1 Colonisation urétrale



Virulence Factor	Function
Adhesins	
CUP pili (e.g. type 1 pili, P pili, S pili, F9 pili)	Adherence to a broad range of biotic and abiotic surfaces. For example type 1 pili Mediate adherence to bladder epithelial cells and catheter material. Type 1 and P pili have been shown to induce TLR4 signaling independent of LPS.
Antigen 43	AIDA-I-type autotransporter protein involved in adhesion, cell aggregation, biofilm formation, and long-term colonization of the urinary tract.
UpaB	Autotransporter protein that binds to extracellular matrix components, such as fibrinogen, fibronectin, and laminin.
UpaC	Autotransporter protein that promotes biofilm formation on abiotic surfaces.
UpaG	Trimeric autotransporter that promotes cell aggregation, biofilm formation, and adherence to bladder cells through binding fibronectin and laminin.
UpaH	AIDA-I-type autotransporter protein that promotes biofilm formation and bladder colonization.
Curli fibers	Amyloid fibers involved in adhesion, cell aggregation, and biofilm formation. Curli have been shown to interact with the human LL-37 anti-microbial peptide, and elicit a pro-inflammatory immune response through induction of IL-8.
Toxins	
α-Hemolysin	Pore-forming toxin that initiates degradation of host cell protein paxillin, along with other targets, to disrupt cell-to-cell interactions and signaling cascades leading to lytic events.
Cytotoxic necrotizing factor-1 (CNF-1)	Constitutively activates GTPases Rho, Rac, and Cdc42 through deamidation leading to alterations in actin cytoskeleton arrangement.
Cytolethal distending toxin	Blocks eukaryotic cell cycle in G_2 phase, leading to the development of giant mononucleated cells.
Immune suppression	
TcpC	Toll/interleukin-1 receptor (TIR) UPEC protein homolog, which inhibits MyD88 and downstream signaling to suppress the host innate immune response.
YbcL	Suppresses acute neutrophil migration.
Metal acquisition and chelation	
Siderophores (e.g. hydoxamateaerobactin, enterobactin, salmochelin, yersiniabactin)	Bacterial-secreted molecules for scavenging essential metals from the host environment. UPEC yersiniabactin has also been shown to protect UPEC from the harmful effects of copper ions through chelation.
Motility	
Flagella	Allows for motility within the urinary tract and can serve in adhesion to surfaces.

Virulence Factor	Function
Adhesins	
CUP pili (e.g. type 1 pili, P pili, S pili, F9 pili)	Adherence to a broad range of bi Mediate adherence to bladder pili have been shown to induce
Antigen 43	AIDA-I-type autotransporter prote formation, and long-term color
UpaB	Autotransporter protein that binc fibrinogen, fibronectin, and lan
UpaC	Autotransporter protein that pror
UpaG	Trimeric autotransporter that pro adherence to bladder cells thro
UpaH	AIDA-I-type autotransporter prote colonization.
Curli fibers	Amyloid fibers involved in adhes have been shown to interact w elicit a pro-inflammatory immu
Toxins	
α-Hemolysin	Pore-forming toxin that initiates degradation of host cell protein paxillin, along with other targets, to disrupt cell-to-cell interactions and signaling cascades leading to lytic events.
Cytotoxic necrotizing factor-1 (CNF-1)	Constitutively activates GTPases Rho, Rac, and Cdc42 through deamidation leading to alterations in actin cytoskeleton arrangement.
Cytolethal distending toxin	Blocks eukaryotic cell cycle in G_2 phase, leading to the development of giant mononucleated cells.
Immune suppression	
TcpC	Toll/interleukin-1 receptor (TIR) UPEC protein homolog, which inhibits MyD88 and downstream signaling to suppress the host innate immune response.
YbcL	Suppresses acute neutrophil migration.
Metal acquisition and chelation	
Siderophores (e.g. hydoxamateaerobactin, enterobactin, salmochelin, versiniabactin)	Bacterial-secreted molecules for scavenging essential metals from the host environment. UPEC yersiniabactin has also been shown to protect UPEC from the harmful effects of copper ions through chelation.
Motility	
Flagella	Allows for motility within the urinary tract and can serve in adhesion to surfaces.



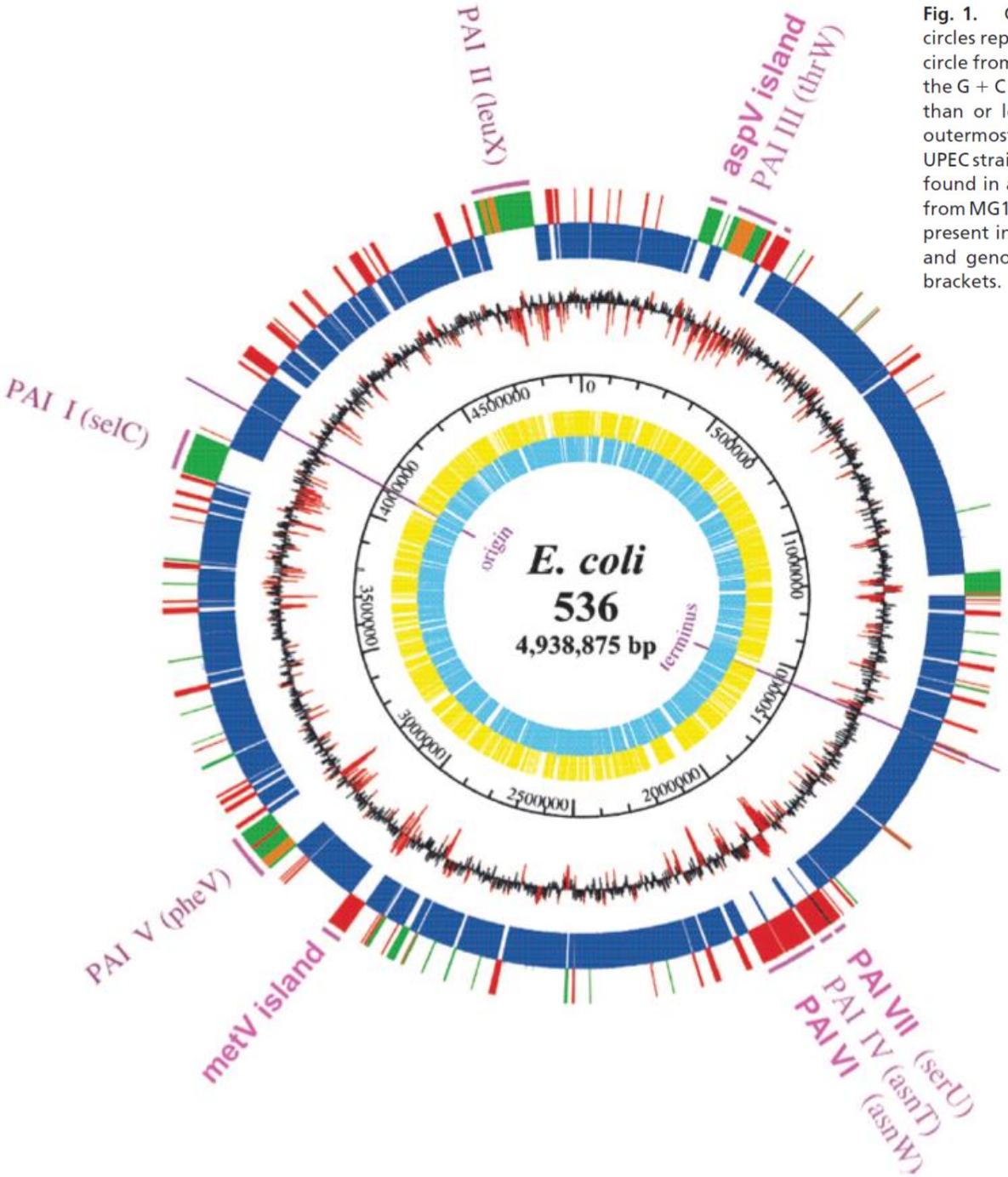


Fig. 1. Genetic map of the UPEC strain 536 chromosome. The two inner circles represent all putative genes, depending on ORF orientation. The third circle from the center gives the scale. The fourth circle from the center shows the G + C distribution. Regions with a highly aberrant G + C content (greater than or less than 2-fold standard deviation) are highlighted in red. The outermost circles show the result of a three-way genome comparison with the UPEC strain CFT073 and *E. coli* MG1655 (K-12) genomes: blue, backbone genes found in all three strains; red, genes present in 536 and CFT073 but absent from MG1655; green, genes found in 536 only; orange, genes of 536, which are present in CFT073 but located in a different genomic region. Pathogenicity and genomic islands (GEIs) are highlighted; flanking tRNAs are given in brackets.

Comparaison :

E. coli 536 (UPEC) *vs*
CFT073 (UPEC) *vs*
K-12 (commensale)

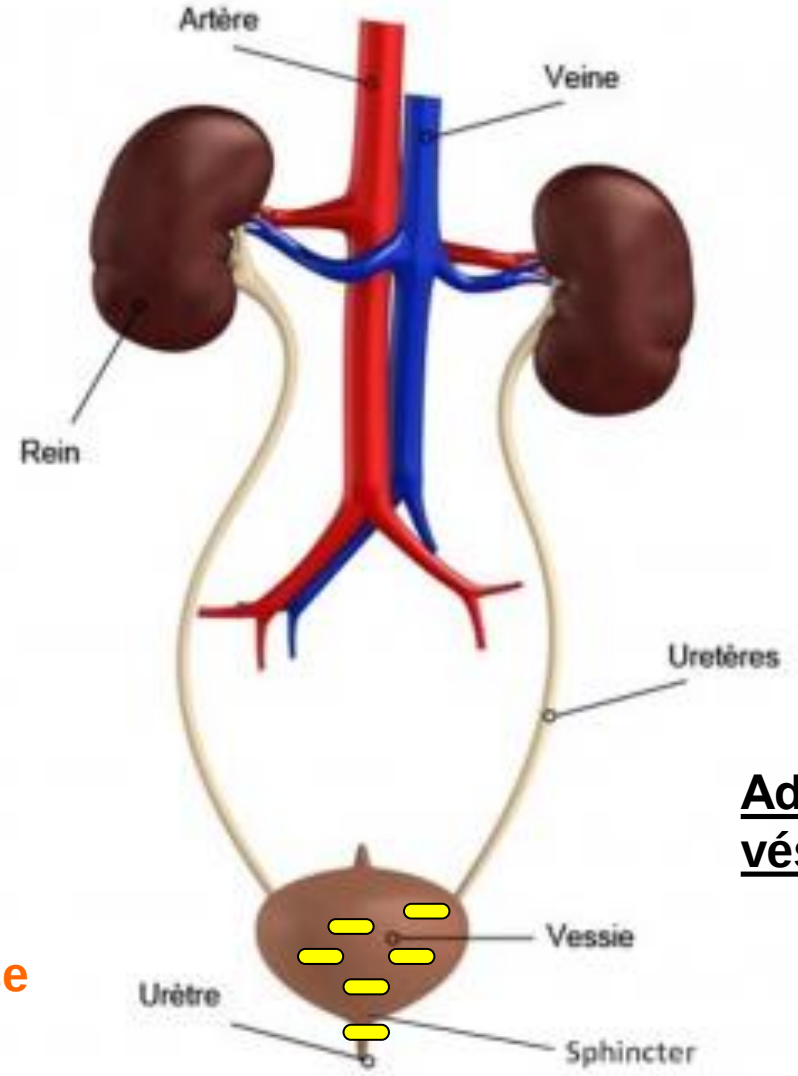
Bleu: core génome
Rouge: gènes absents chez **K-12**
Vert: gènes absents chez **K-12** & CFT073
Orange: gènes autre endroit chez CFT073

432 gènes pourraient contribuer à l'urovirulence

Escherichia coli uropathogène (UPEC)

FACTEURS DE I'HÔTE

FACTEURS BACTERIENS



Adhésion à l'épithélium vésical :

Pili type 1 « on »

PapGIII

Récepteurs Mannose

Escherichia coli uropathogène (UPEC)

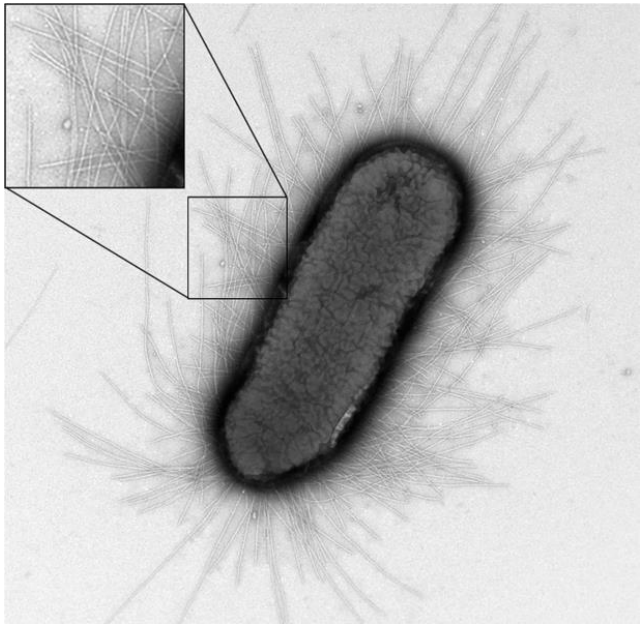
- **Rôle des adhésines (fimbriae ou pili) :**

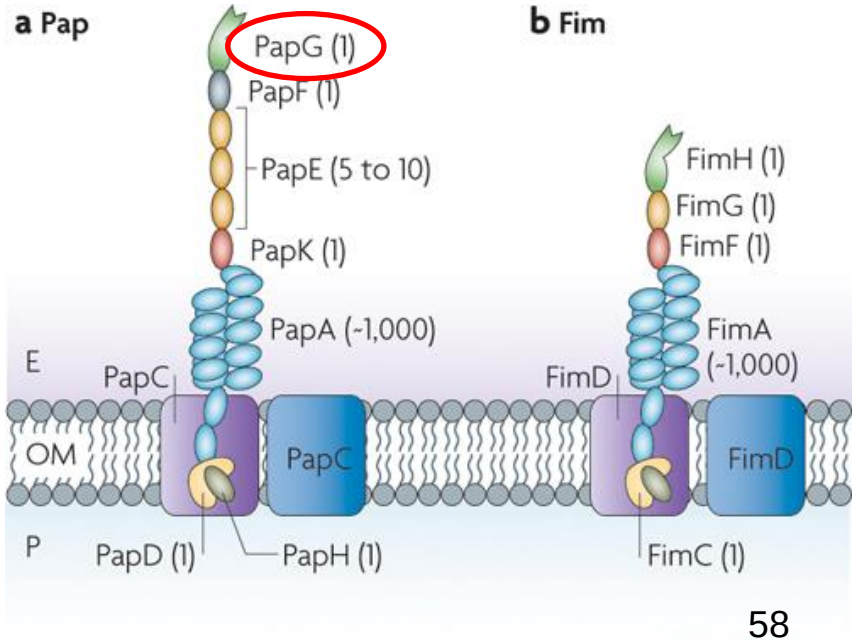
- Pili de type 1 (opéron fim – 9 gènes) :

  Adhésion aux récepteurs mannose des cellules de l'épithélium vésical

- Pili de type P (opéron pap – 11 gènes) :

  Adhésion aux récepteurs αGal [1-4] βGal des cellules eucaryotes





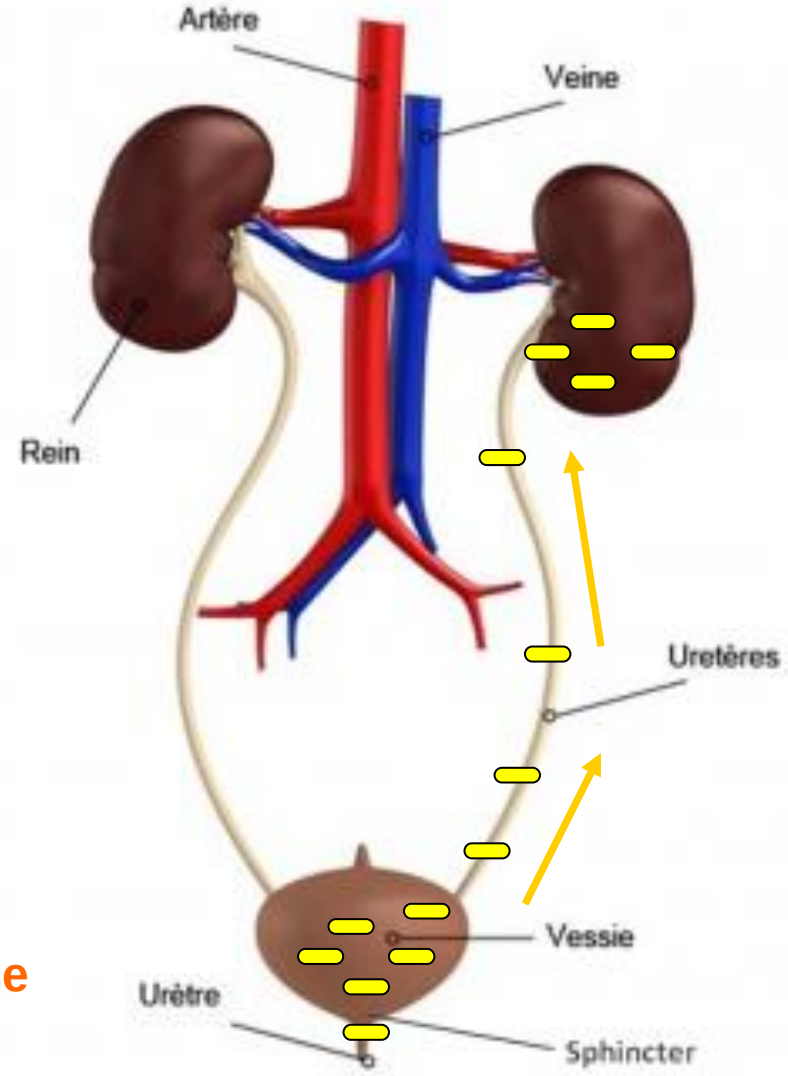
Nature Reviews | Microbiology

Escherichia coli uropathogène (UPEC)

FACTEURS DE I'HÔTE

Récepteurs Gal-Gal

Récepteurs Mannose

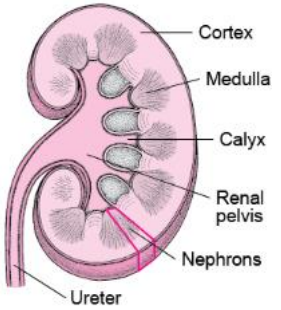


FACTEURS BACTERIENS

PapGII

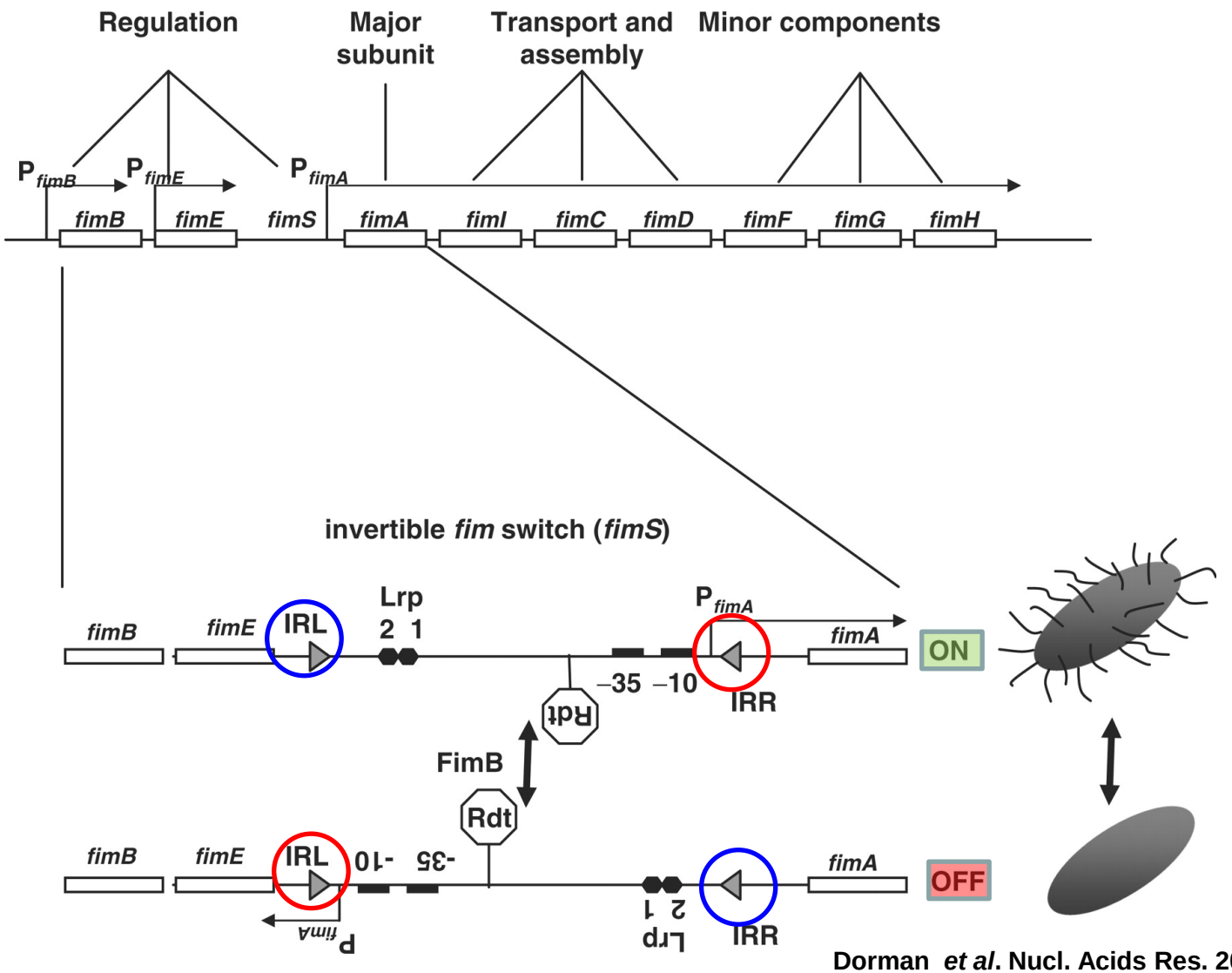
Pili type 1 « off »

infection ascendante jusqu'au néphron



Escherichia coli uropathogène (UPEC)

- **Pili type 1 switch « ON/OFF » :**



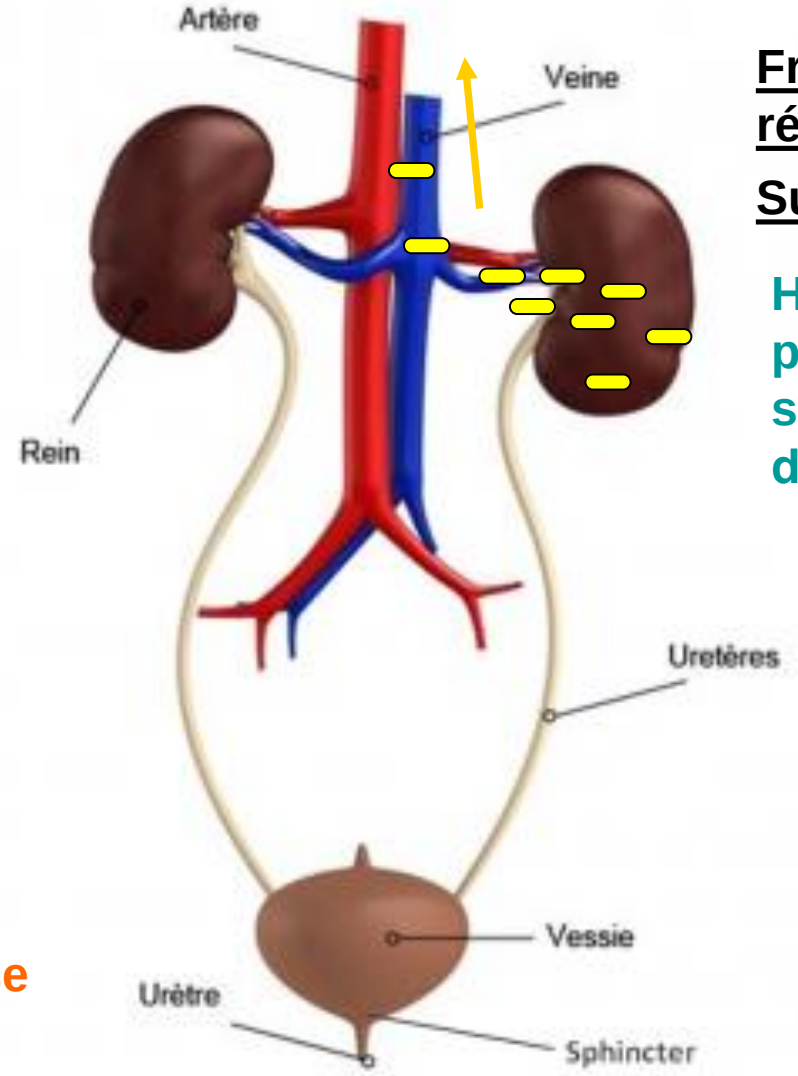
Dorman *et al*. Nucl. Acids Res. 2009;37:672-678

Escherichia coli uropathogène (UPEC)

FACTEURS DE I'HÔTE

Récepteurs Gal-Gal

Récepteurs Mannose



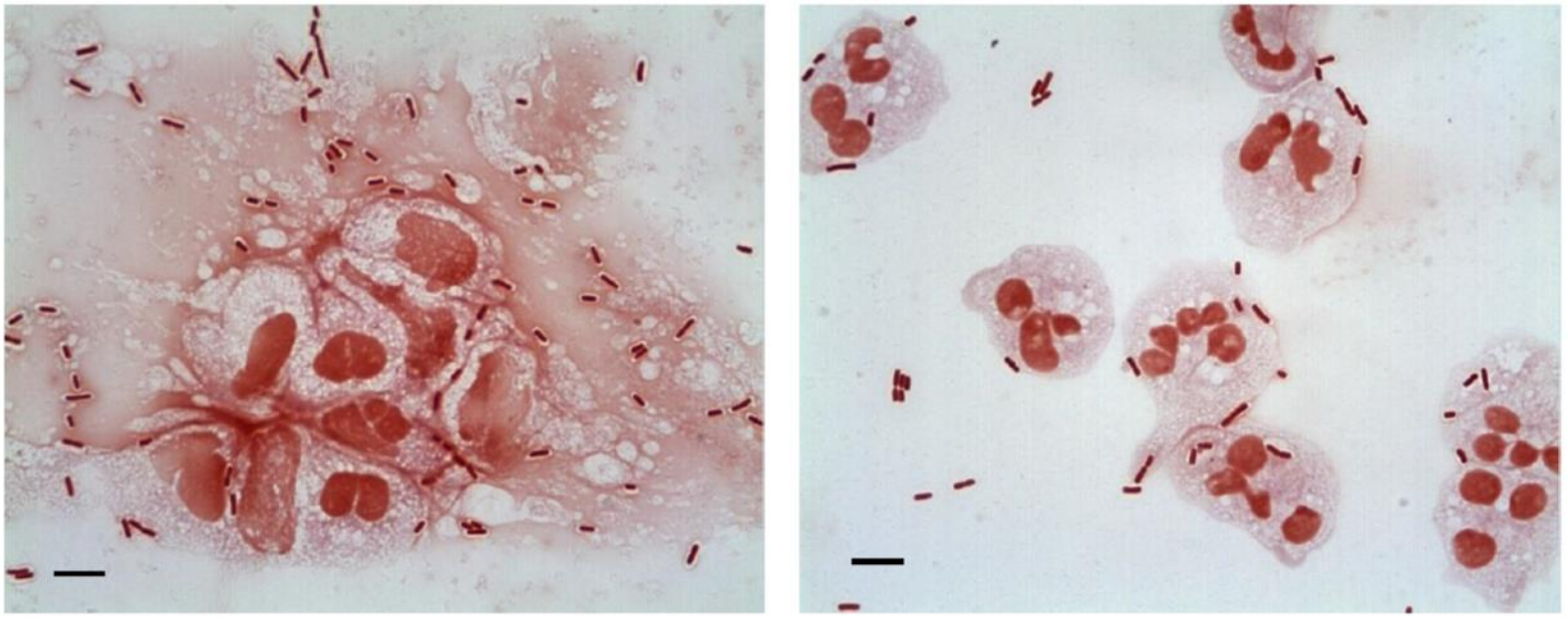
FACTEURS BACTERIENS

Fragilisation des tissus rénaux

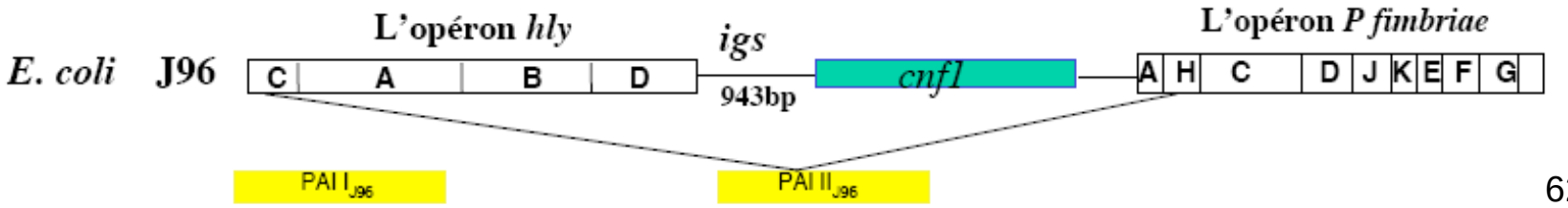
Survie dans le sang

Hémolysine, toxines, protectines, capsule, systèmes de capture du fer…

α-hémolysine (opéron *hly*) : rôle cytotoxique direct sur les cellules rénales, les globules rouges et les polynucléaires neutrophiles



→ PAI II J96 (110 kb) contenant les gènes *hly*, *papGIII*, *cnf1 :*



Séquençage nouvelle génération (NGS)

Les nouvelles méthodes de séquençage à haut débit

Objectif : Séquencer plus vite et de façon plus efficace

Principe : Obtention de séquences en très grand nombre, puis assemblage de ces séquences

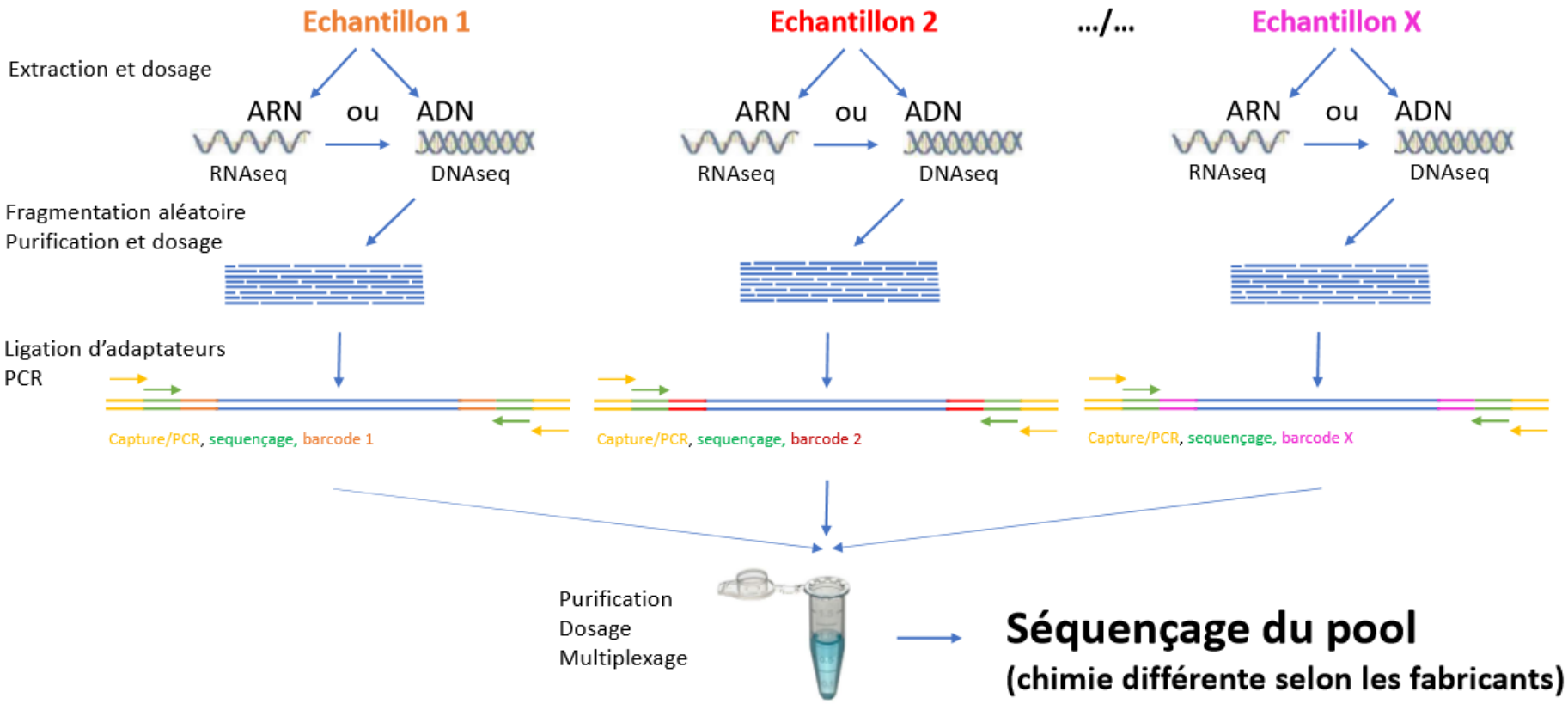
- **3 étapes :**
  - Préparation de librairies d'ADN
  - Séquençage
  - Analyse bioinformatique

Field revolutionized through the advent of Next Generation DNA Sequencing (NGS) & bioinformatics

Les systèmes et leurs performances

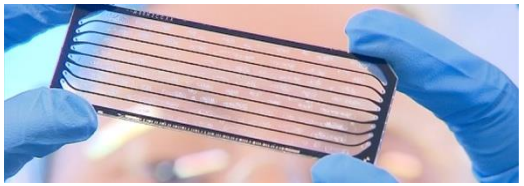
	Société	Séquenceurs	Nombre de bases/run	Tailles des reads	Taux d'erreur	Durée du séquençage	Coût / Gb
2G	*Roche*	*454*	*0,3 à 0,7 Gb*	*400 à 1000 pb*	*1% (indel)*	*10 à 23h*	*9500-40000 $*
	Thermo Fisher Sc.	Ion PGM Ion Proton	0,03 à 15 Gb	200 à 400 pb	1% (indel)	4-7h	80-2400 $
	Applied Biosystems	*SOLiD systems*	*10-15 Gb*	*35-75 pb*	*≤1% (biais AT)*	*6 à 10j*	*70-130 $*
	Illumina	MiniSeq	1,6 à 7,5 Gb	1 x 75pb à 2 x 150pb	≤1% (mutation)	7 à 14h	200-300 $
		MiSeq	0,5 à 15 Gb	1 x 36 pb à 2 x 300 pb	0,1% (mutation)	4 à 56h	110-1000 $
		NextSeq	16 à 120 Gb	1 x 75 pb à 2 x 150 pb	≤1% (mutation)	15 à 29h	33-43 $
		HiSeq	47-900 Gb	1 x36 pb à 2 x 150 pb	0,1% (mutation)	7h à 6j	7-130 $
3G	Pacific Biosciences	PacBio RSII	0,5-1 Gb	~20 kb	10-15% (indel), <1% CCS)	30min-4h	1000 $
	Oxford Nanopore	MinION	10-20 Gb / 48h	jusqu'à 200 kb	5% (2D) 13% (1D)	3min à 48h	50-100 $

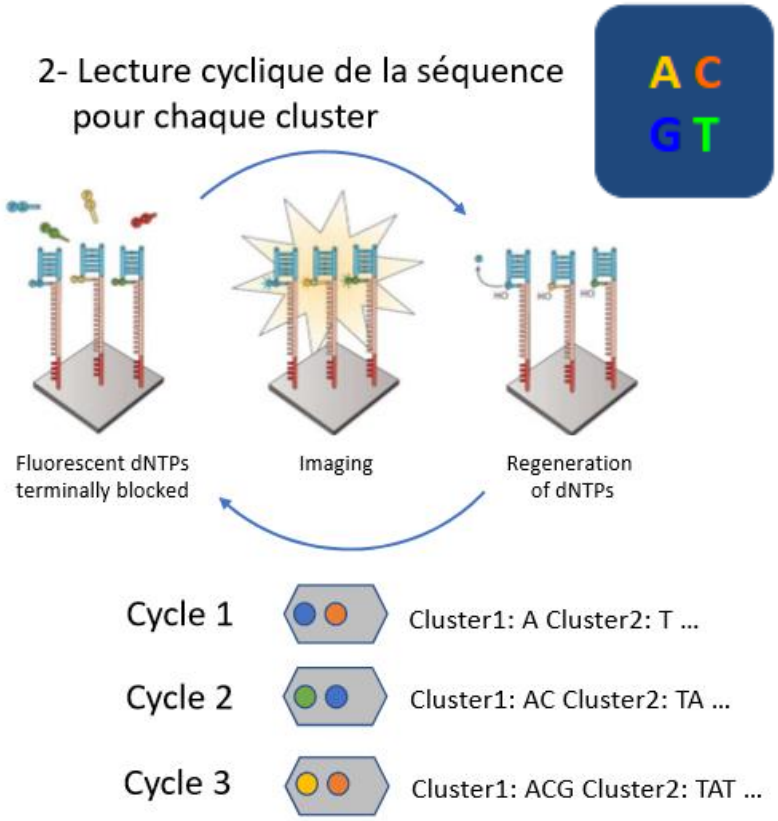
NGS : Préparation des librairies

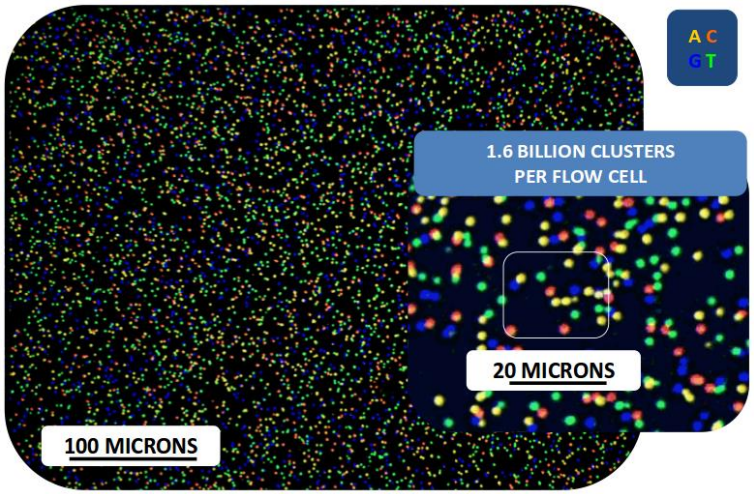


Séquençage 2ème Génération

Ex. Illumina



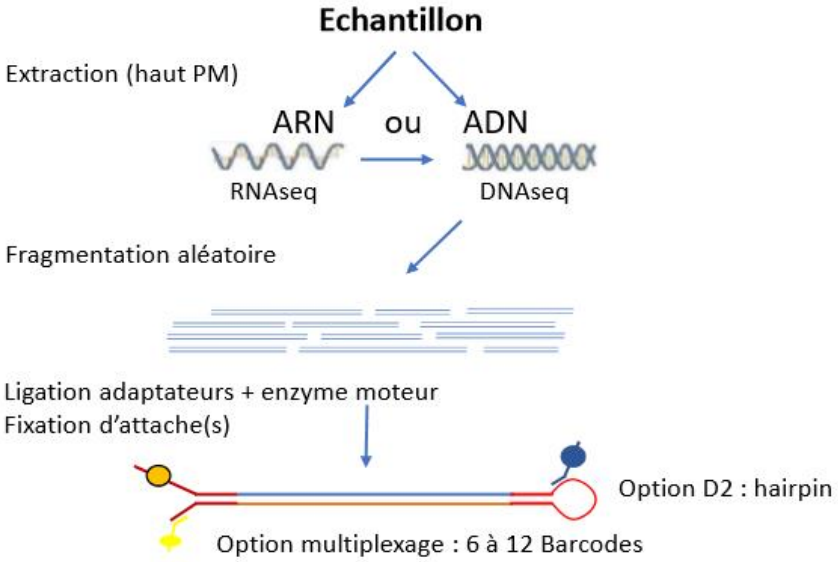


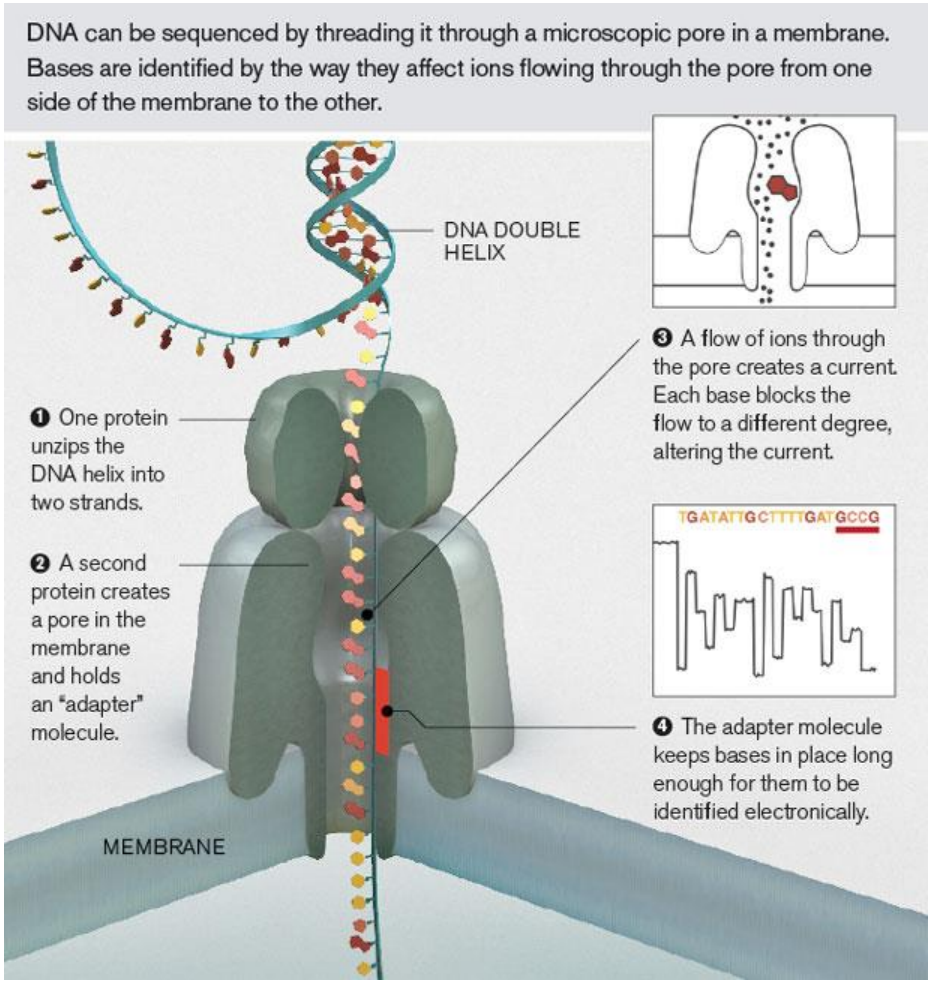


75 à 300 cycles de séquençage = séquence de 75 à 300 bases (+ 1)

Séquençage 3ème génération

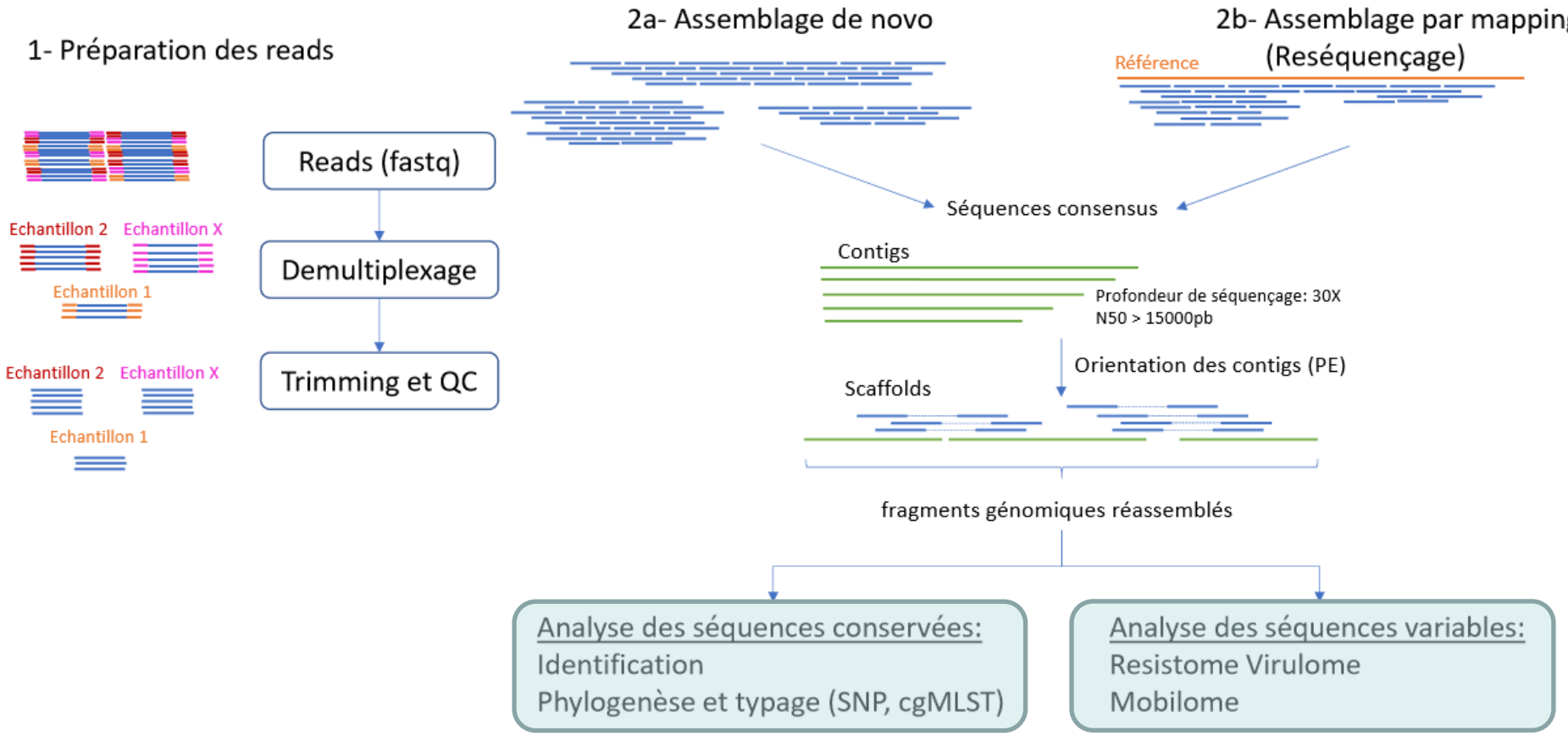
Ex. Oxford Nanopore

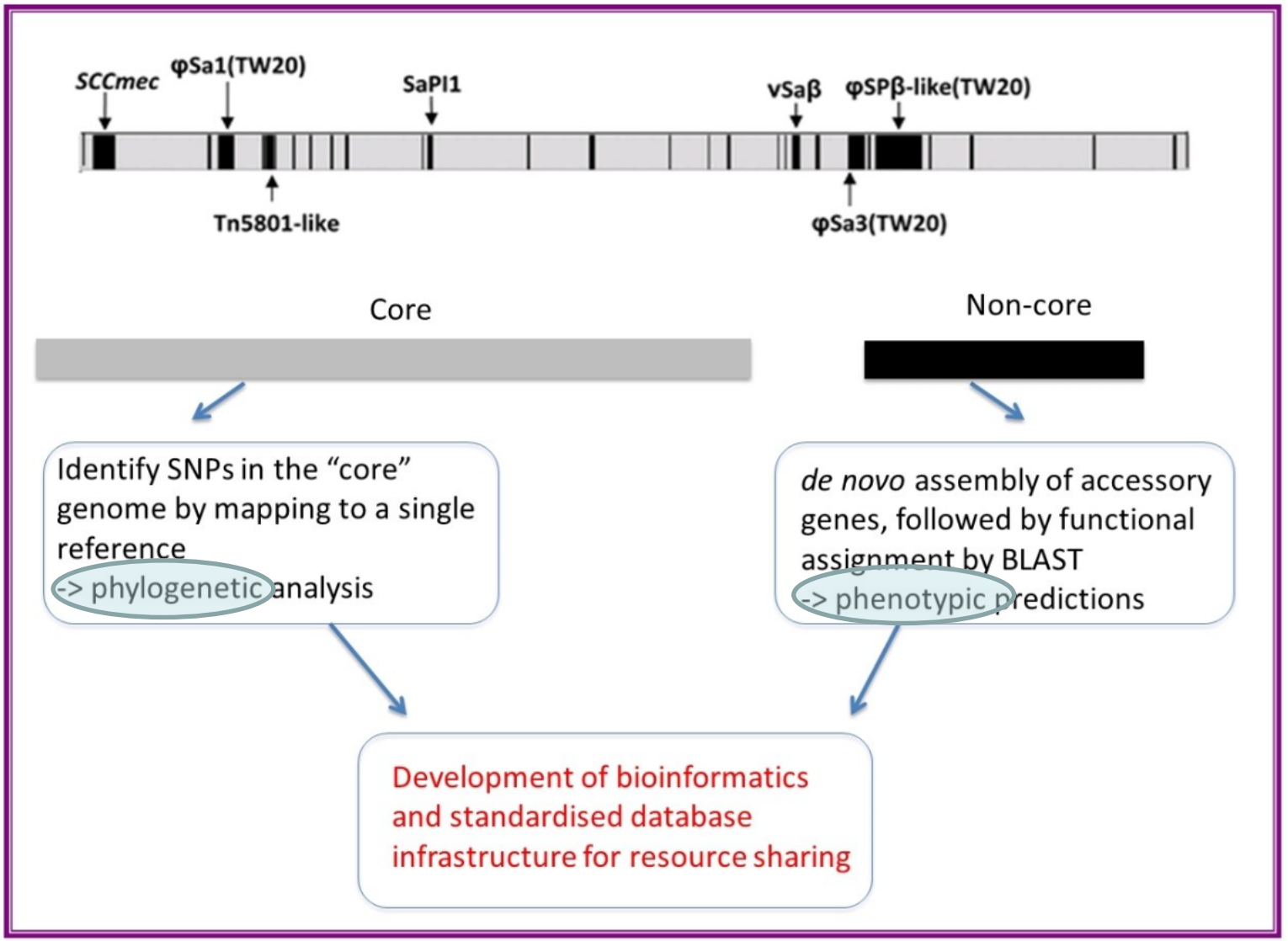




Analyse informatique des données de séquençage

Principe de l'analyse des données




SCCmec
φSa1(TW20)
SaPI1
vSaβ
φSPβ-like(TW20)
Tn5801-like
φSa3(TW20)
Core
Non-core
Identify SNPs in the "core" genome by mapping to a single reference
-> phylogenetic analysis
de novo assembly of accessory genes, followed by functional assignment by BLAST
-> phenotypic predictions
Development of bioinformatics and standardised database infrastructure for resource sharing

SEQUENCAGE GENOMIQUE : Applications

- Identifier des facteurs de virulence : pathogénomique

- Etudier l'émergence et la diffusion de pathogènes importants

- Etudier les processus patho-adaptatifs intra-hôte des bactéries

Identifier et caractériser les déterminants de la virulence à partir d'une séquence génomique complète

« Pathogénomique »

> 2 Approches :

- Utilisation d'outils bioinformatiques permettant le décryptage des gènes ou des PAI :

  recherche de gènes de virulence connus, ou d'homologies avec des facteurs de virulence connus…

- Approche comparative :

  comparaison de souches pathogènes avec d'autres non pathogènes

« Pathogénomique »

Portrait robot de l'agent pathogène > conséquences cliniques

- La virulence peut être liée à un seul gène (ex. PVL)
- La virulence peut être liée à une mutation dans un gène

- La virulence peut être due à plusieurs gènes agissant à des étapes différentes de l'infection : *quel panel minimum de gènes pour virulence chez un patient ?*
- Présence gène ≠ expression > Transcriptomique
- Gènes de virulence n'ont pas tous été identifiés
- Certaines bactéries virulentes avec peu de gènes de virulence

Permet un meilleur suivi des épidémies

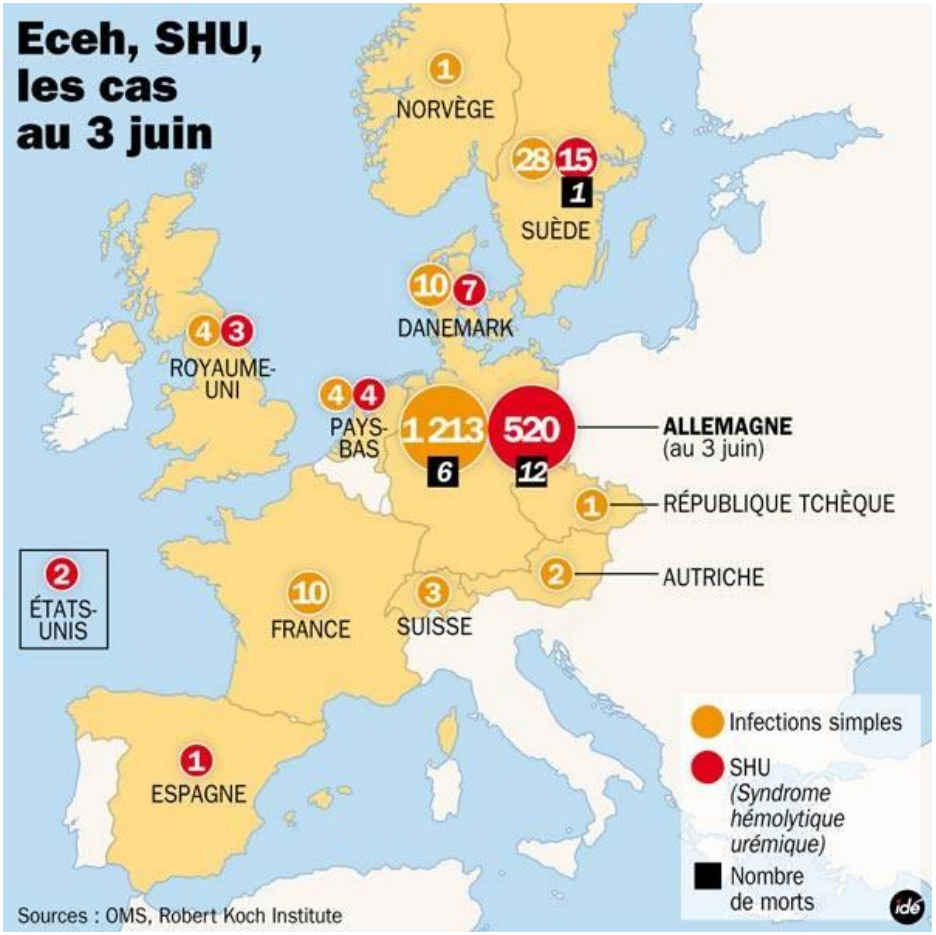
- Suivre la diffusion mondiale et locale des pathogènes importants
- Comprendre les mécanismes d'émergence de bactéries hautement pathogènes et/ou résistantes

> Analyse phylogénétique détaillée :

- Empreinte génétique précise, basée sur des 100aines de gènes
- Classement des souches en groupes clonaux (cluster) pour identifier les cas groupés – *étude du core génome*
- Recherche de gènes spécifiques de niche – *étude du génome accessoire*

E. coli O104:H4
un pathotype hybride

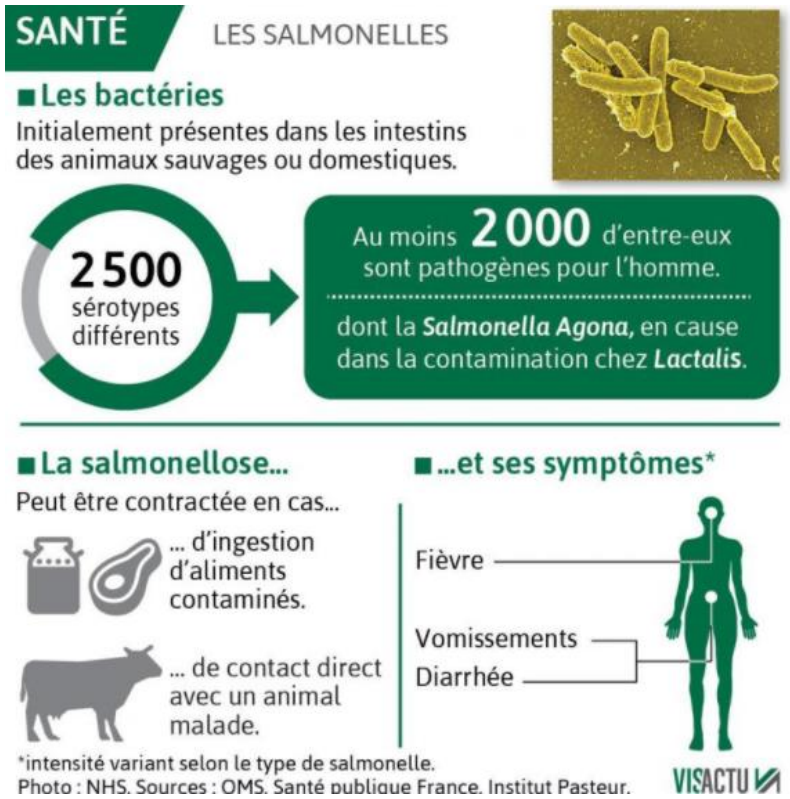
En Mai-Juin 2011, une épidémie lié à une souche de *E. coli* entéro-hémorragique a eu lieu en Allemagne, puis en Europe



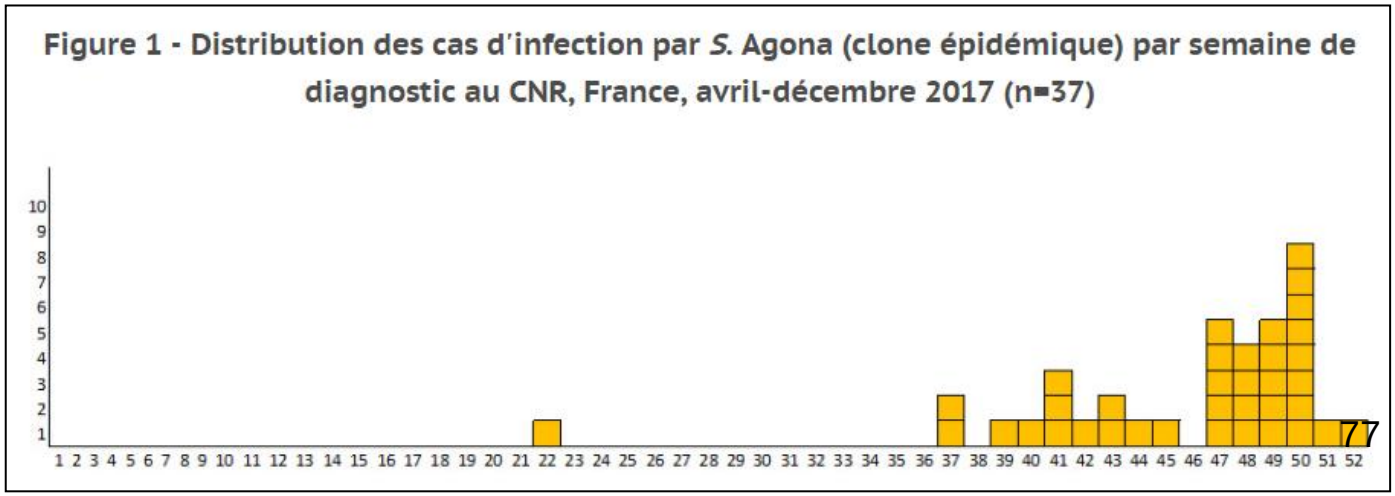
- **Bilan :** 4321 cas (852 SHU, 50 décès) – 12 cas recensés en France
- **Source :** graines germées de Fenugrec importées d'Egypte
- **Souche :** *E. coli* O104:H4 virulence inhabituelle

Jamais impliquée dans épidémie, seulement des cas sporadiques en Allemagne (2001) et Corée (2005)

Salmonellose à *Salmonella* Agona



- **37 nourrissons atteints fin 2017**
- Consommation de laits élaborés sur un même site de production
- Retrait et rappel des produits concernés : aucun nouveau cas depuis



SCANDALE SANITAIRE

Lactalis: la salmonelle n'avait pas été éradiquée en 2005

"On peut scientifiquement penser qu'il y a eu contamination à bas bruit de cette usine durant toute la période 2005-2017"

Cette révélation a été rendue possible par la technique dite du "séquençage complet du génome", que les chercheurs ont appliqué à la collection de souches de salmonelle conservées au fil du temps à l'Institut Pasteur.

[…] *les travaux effectués dans l'usine en 2017 ont pu réactiver cette salmonelle",*

Usine de Craon: une tour de séchage de l'usine est à l'origine de la contamination

INFO FRANCE INFO.

L'ADN PARLE

L'Institut Pasteur a recensé, **entre 2006 et 2016**, **25 cas** de nourrissons contaminés à la **même souche de salmonelle** que celle découverte fin 2017 à l'usine de Craon de Lactalis. L'**épidémie de 2005** avait touché **146 nourrissons**. Le bilan dépasse donc **200 enfants malades à cause d'une souche unique**.

Permet aussi une meilleure compréhension de l'évolution intra-hôte des bactéries

Processus patho-adaptatif

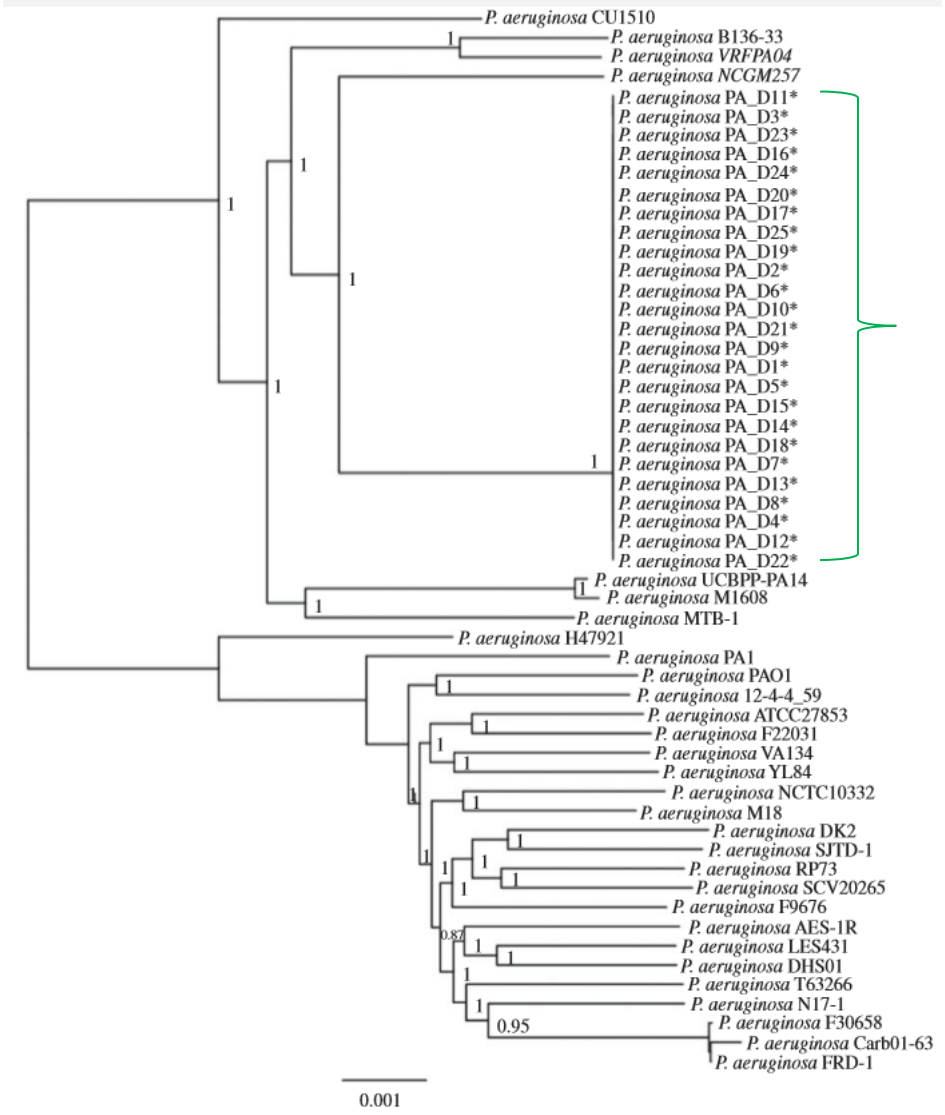
- **Etude de la micro-évolution bactérienne en réponse aux pressions de sélection spécifiques de l'hôte, rencontrées au cours d'une infection (autres micro-organismes, réponse immunitaire, stress oxydatif, antibiothérapie…)**
  - Apporte des informations sur le répertoire de facteurs bactériens impliqués dans l'interaction avec l'hôte
  - Recherche de mutations patho-adaptatives, fonctionnellement importantes dans la pathogénèse
  - Trouver nouvelles cibles thérapeutiques

Open Biol. 2017 Sep;7(9). pii: 170029. doi: 10.1098/rsob.170029.

The rapid in vivo evolution of Pseudomonas aeruginosa in ventilator-associated pneumonia patients leads to attenuated virulence.

OPEN BIOLOGY

Wang K[1,2], Chen YQ[3], Salido MM[4], Kohli GS[4], Kong JL[1], Liang HJ[5], Yao ZT[2], Xie YT[6], Wu HY[7], Cai SQ[1], Drautz-Moses DI[4], Darling AE[8], Schuster SC[4,9], Yang L[4,9], Ding Y[10,9,11].



- 25 isolats de *P. aeruginosa* collectés chez 4 patients au cours de PAVM dans un hôpital Chinois
- Analyse phylogénétique des 25 génomes : un seul clone épidémique

Patient 1 **– 4 isolats**

D1 D20 D38D39

Patient 2 **– 7 isolats**

D1 D14 D25 D29 D50 D77D78

Patient 3 **– 8 isolats**

D1 D8 D27 D36 D43 D50D57 D68

Patient 4 **– 6 isolats**

D1D2D8 D21D24D25

Evolution adaptative de *P. aeruginosa* au niveau pulmonaire au cours de PAVM

isolate	time	coding region change	amino acid change	type	non-synonymous	remarks on *lasR* quorum sensing
patient 1						
PA_D1	Day 1	—	—	—	—	functional *lasR* quorum sensing
PA_D3	Day 20	***mpl*, 782T > G**	Val261Gly	SNV	yes	functional *lasR* quorum sensing
PA_D8	Day 38	**deletion of *lasR***	—	—	—	*lasR* mutant
		deletion of *mpl*	—	—	—	
PA_D9	Day 39	**deletion of *lasR***	—	—	—	*lasR* mutant
		deletion of *mpl*	—	—	—	

- Apparition de mutations *lasR* aussi chez patients 2, 3 et 4
- Apparition de mutations *mpl* aussi chez patients 2 et 3
- Par ailleurs, apparition de mutations *pvdS* chez patients 2, 3 et 4

  - LasR : système du *quorum sensing* impliqué dans la régulation de la virulence
  - Mpl : rôle dans la résistance aux β-lactamines ?
  - PvdS : synthèse de pyoverdine

➢ **Convergence d'évolution** du génome de *P. aeruginosa* au cours d'infections *in vivo*

Conclusion

- Facteurs de virulence bactériens impliqués dans le développement des infections
- Pouvoir pathogène dicté par le panel de gènes de virulence exprimés
- Echanges génétiques entre bactéries et modifications du génome contribuent à la diversité bactérienne et ont des conséquences sur la Santé humaine (résistance aux antibiotiques, gain de virulence, persistance).
- Mécanismes moléculaires à l'origine de l'évolution des bactéries de mieux en mieux compris, grâce aux nouvelles techniques de séquençage à haut-débit (NGS)
- WGS = Analyse de génomes tant sur le plan de la virulence, que de la résistance, ou de leur éventuel lien de clonalité