



Commensal ou pathogène, tout est-il écrit dans le génome?

Erick Denamur

Collège de France

16 Décembre 2015



Un peu de vocabulaire

Commensalisme

cum « avec », *mensa* « table » : « qui mange à la même table »

Une association entre la bactérie et son hôte sans conséquence pour chacun

Mutualisme

Une relation entre deux organismes dans laquelle les deux sont bénéficiaires

Pathogène

Un microbe capable de causer des dommages à l'hôte

Pathogène opportuniste

Un microbe capable de causer des dommages à l'hôte quand les défenses de celui-ci sont diminuées

Virulence

La capacité relative pour un microbe de causer des dommages à l'hôte

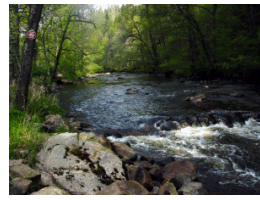
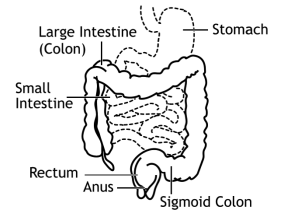
Saprophytisme

La vie dans l'eau ou le sol sans dépendre d'un autre être vivant

Un candidat idéal : *Escherichia coli*

- Un savoir considérable accumulé sur une souche modèle :
« K-12 »
- Une grande diversité :
 - 10^{20} cellules de *E. coli* estimées sur terre
 - Styles de vie variés

**Habitat
primaire**



**Habitat
secondaire**

Tube digestif des vertébrés
Homme = 10^8 *E. coli* / g de fèces

Commensal ou **Mutualiste**?

(protège l'hôte de la colonisation par des pathogènes,
est protégé de l'extérieur dans un milieu nutritif riche)

Saprophyte



Pathogène

1 M de morts / an

Intestinal (diarrhées)

Extra-intestinal

Un pouvoir pathogène extra-intestinal varié

- **Infections localisées**

- infections urinaires

- basse=cystite ; haute=pyélonéphrite

- suppurations profondes (abdominales)

- pneumonies

- **Infections généralisées**

- septicémies/bactériémies

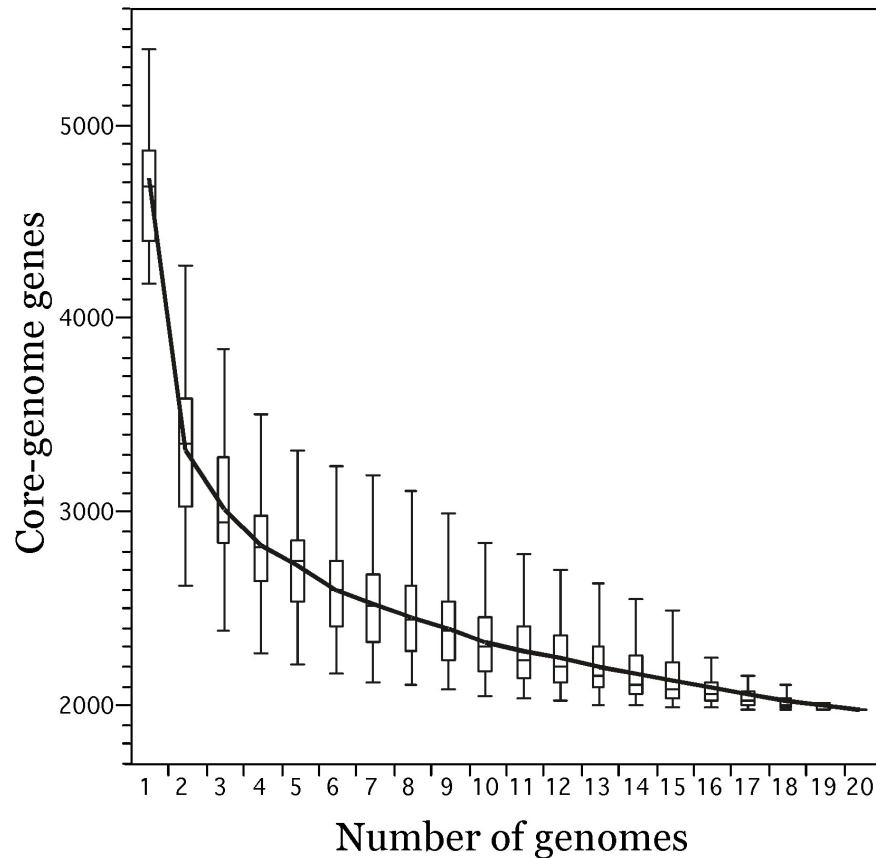
- (point de départ urinaire, digestif)

- une forme particulière (rare)

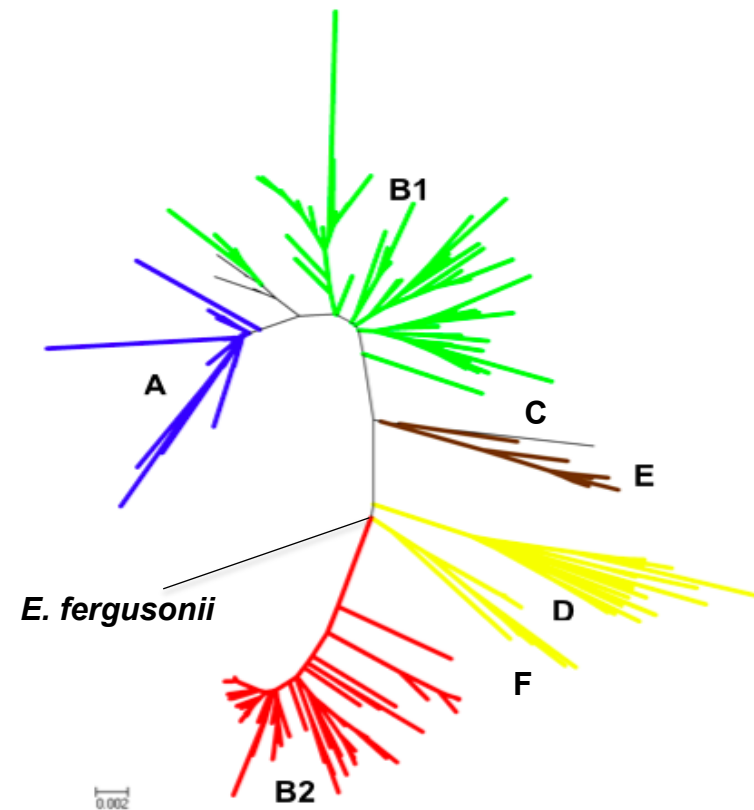
- méningite néonatale avec septicémie

La génomique de l'espèce

Un « core » génome qui définit des grands groupes phylogénétiques



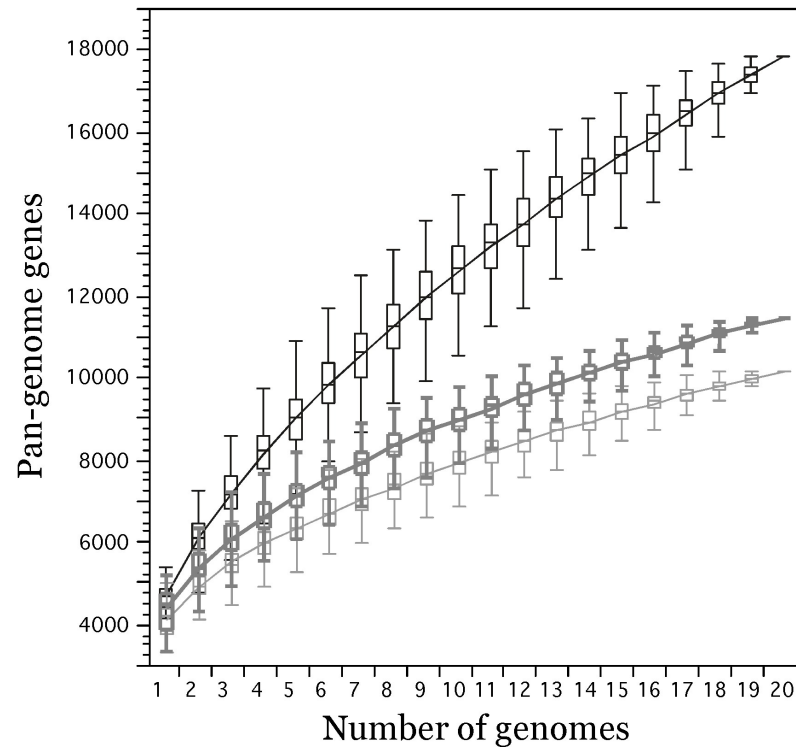
1976 gènes en commun
46 % du génome



7 groupes phylogénétiques majeurs

Gordon *et al.*, Environ. Microbiol., 2008
Touchon *et al.*, PLoS Genet., 2009

Une diversité du contenu en gènes considérable

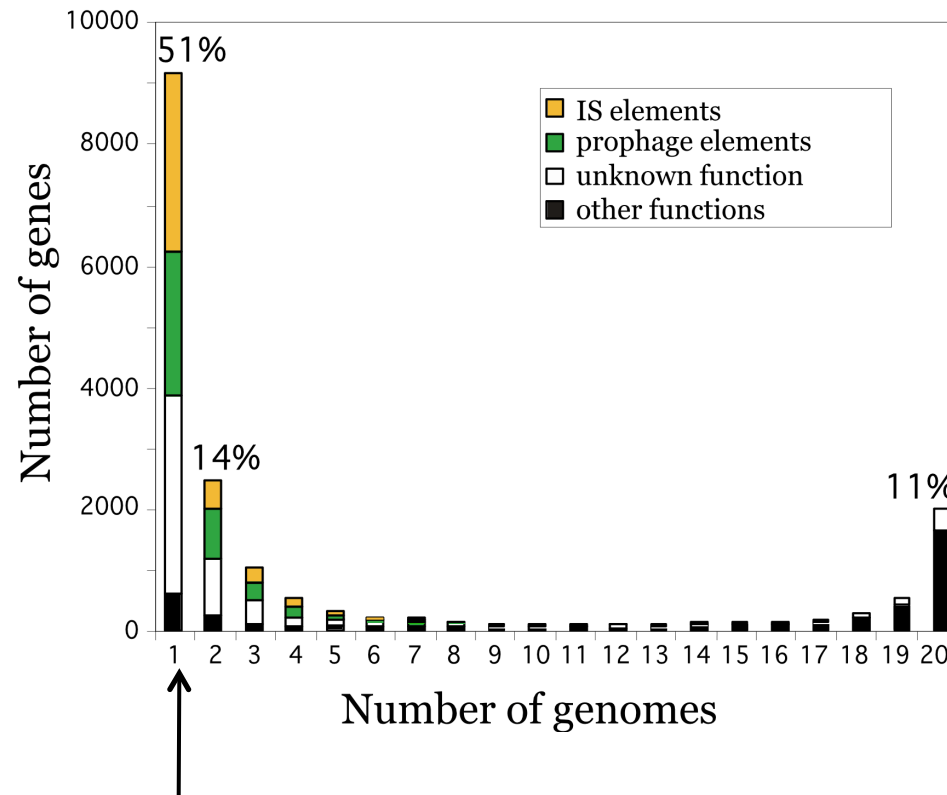


17 838 gènes non-orthologues

10 131 gènes sans SI et prophages

L'espèce *E. coli* a autant de gènes que *Homo sapiens*

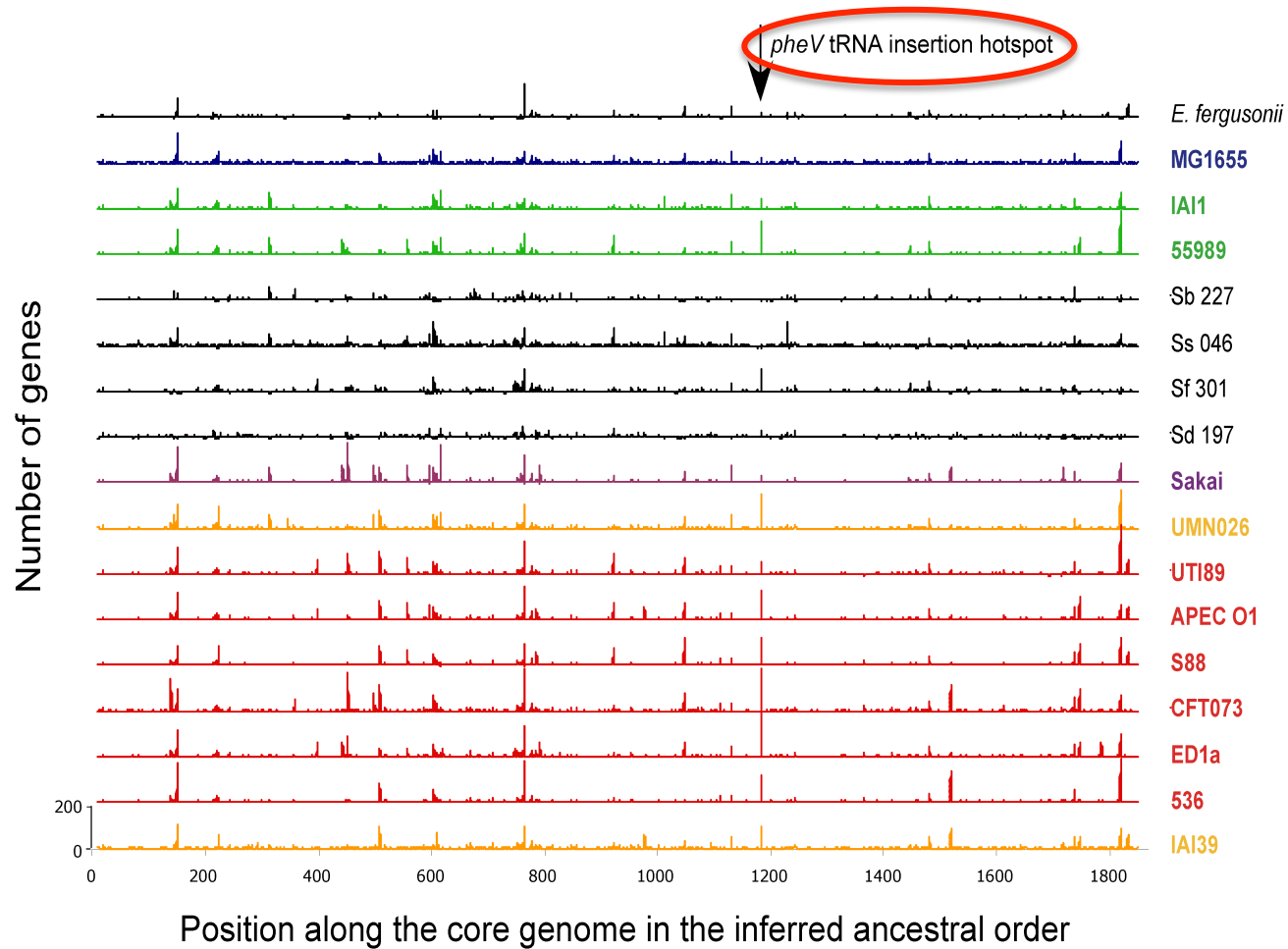
Des pressions de sélection variables selon le type de génome (« core » ou variable)



« Core » génome :
11% du pangénome

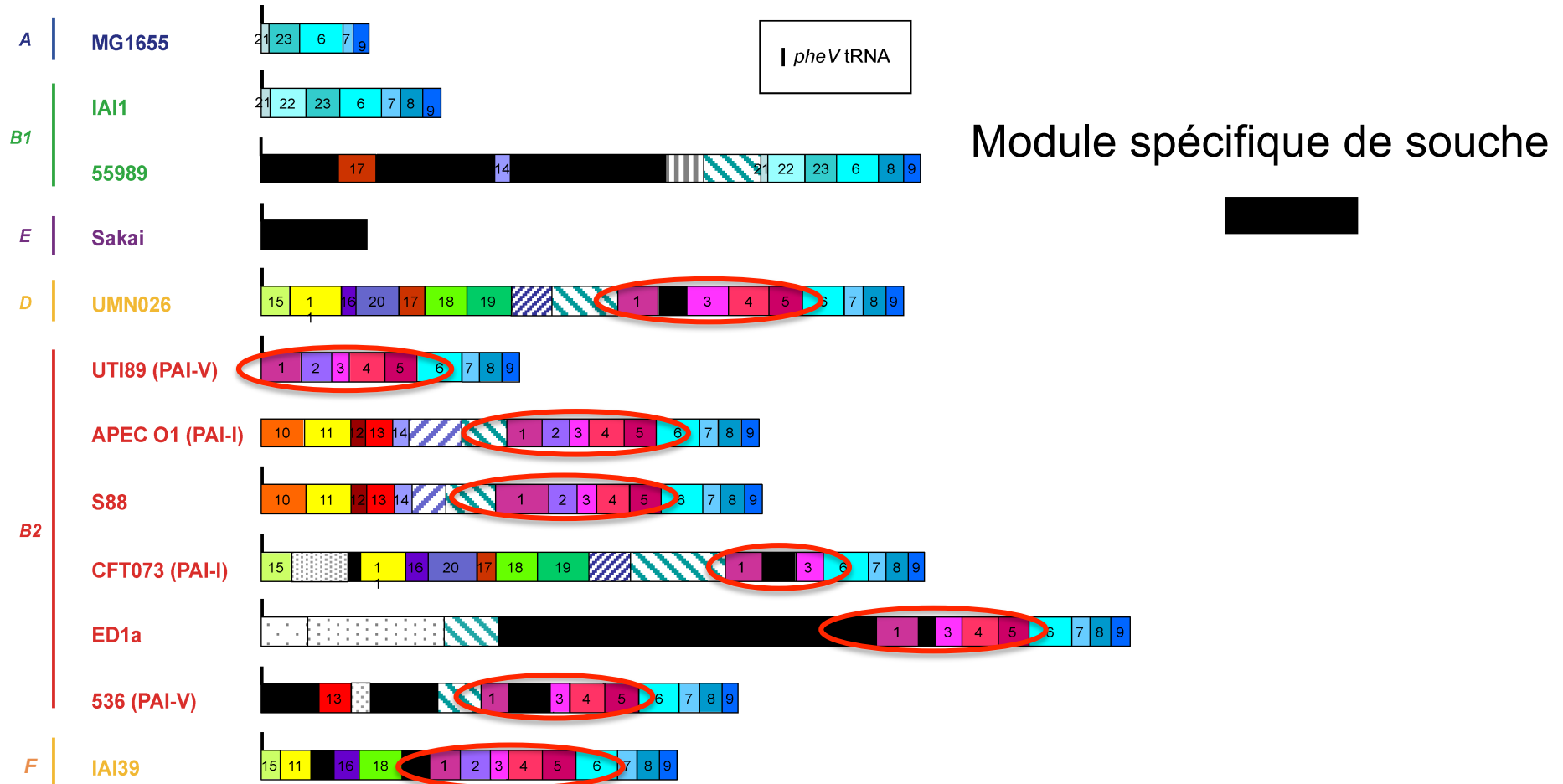
9 054 gènes spécifiques de souches
(le plus souvent délétères ou neutres,
transitoires et purgés au cours de l'évolution,
rarement adaptatifs)

De l'ordre dans le désordre du chromosome bactérien



133 points chauds d'insertion/délétion

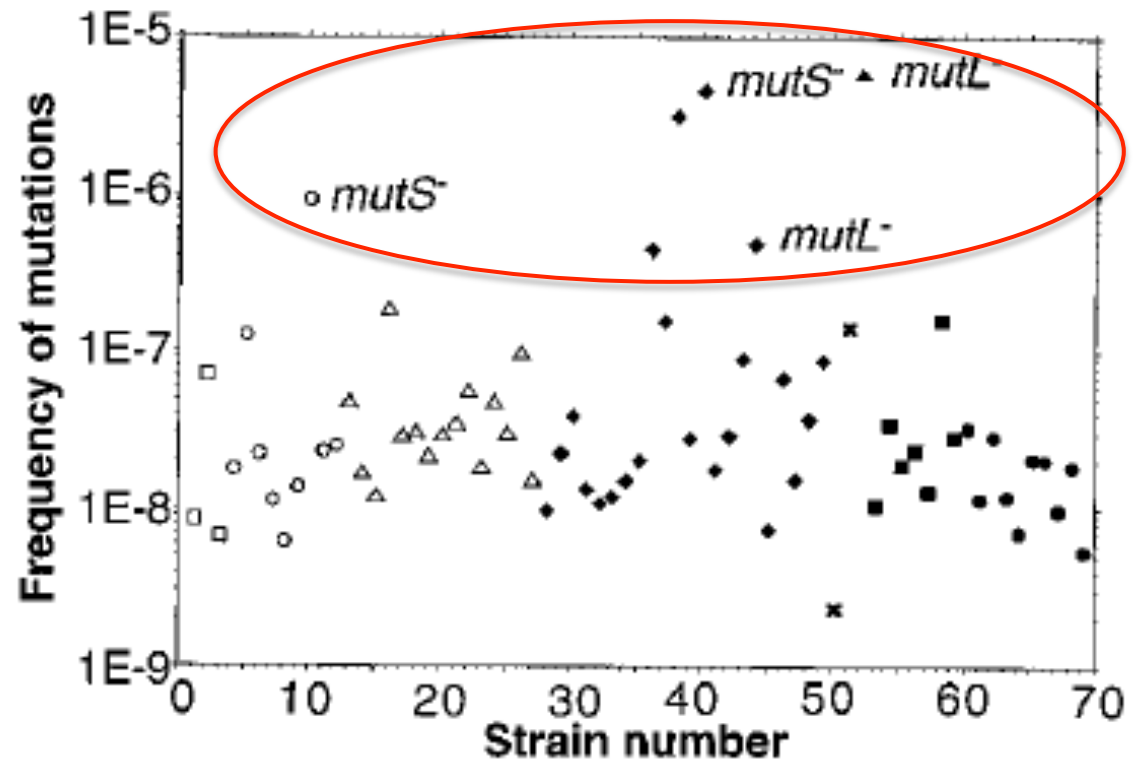
Les îlots génomiques : un LEGO® génétique



La mutagénèse dans l'espèce

Le taux de mutations d'un organisme n'est pas toujours le plus bas possible

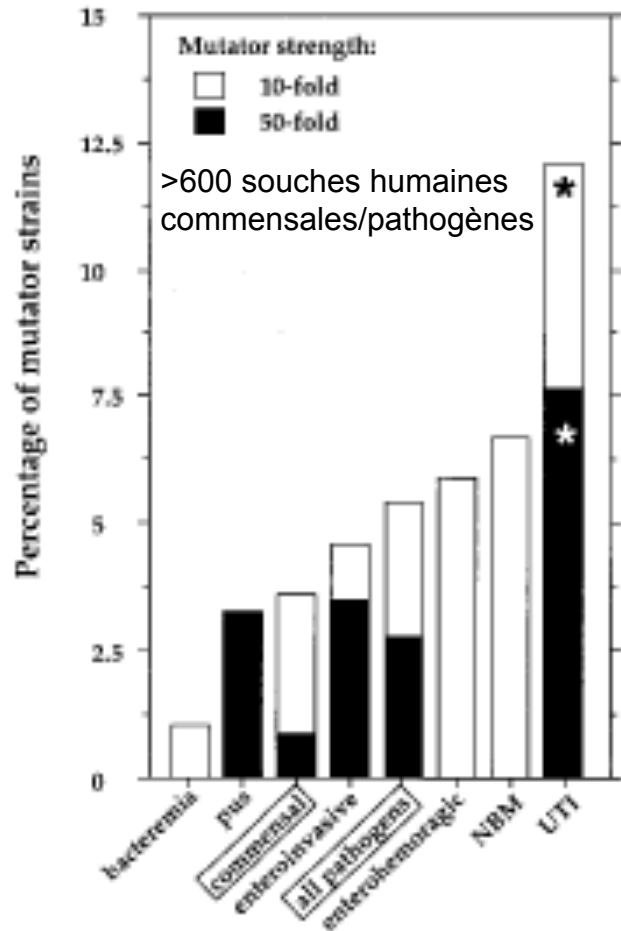
- Mutations non létales dans *rpoB* conférant la résistance à la rifampicine
- >500 souches humaines commensales/pathogènes



Le **système de réparation des mésappariements** répare les erreurs de biosynthèse de l'ADN et inhibe la recombinaison entre les séquences d'ADN non identiques

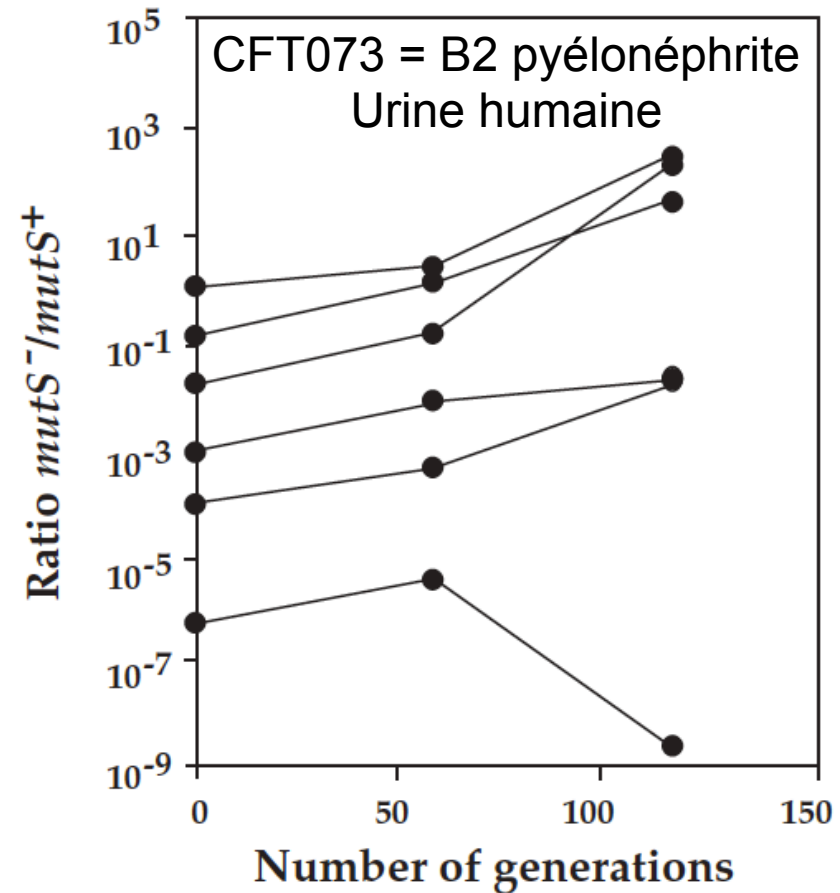
La sélection des mutateurs : une sélection de second ordre

Argument épidémiologique



Denamur *et al.*, J Bacteriol, 2002

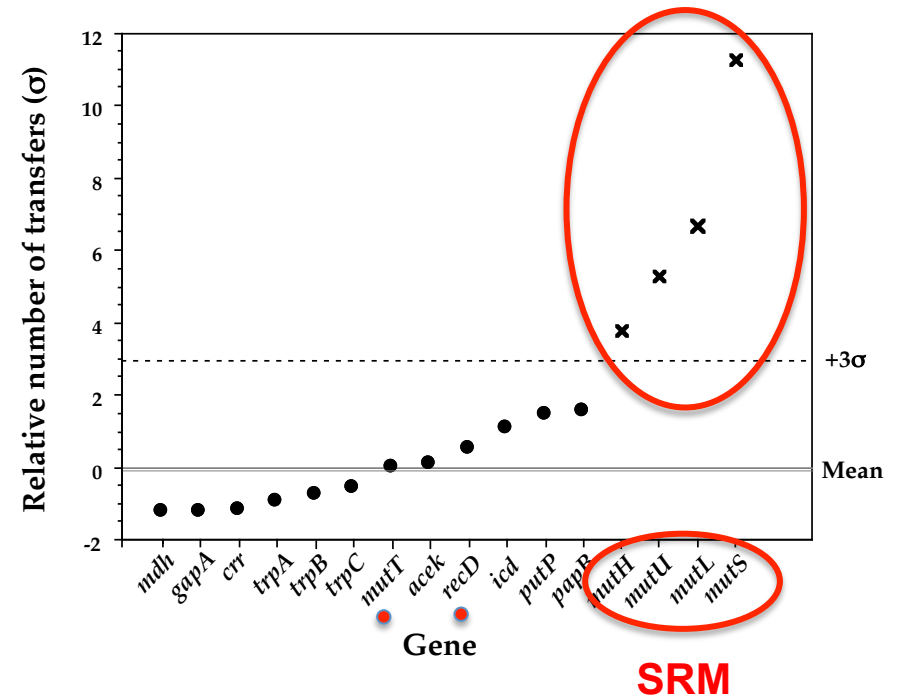
Argument expérimental



Labat *et al.*, FEMS Immunol Med Microbiol, 2005
 Denamur et Matic, Mol Microbiol, 2006

Les gènes du SRM ont une histoire évolutive particulière

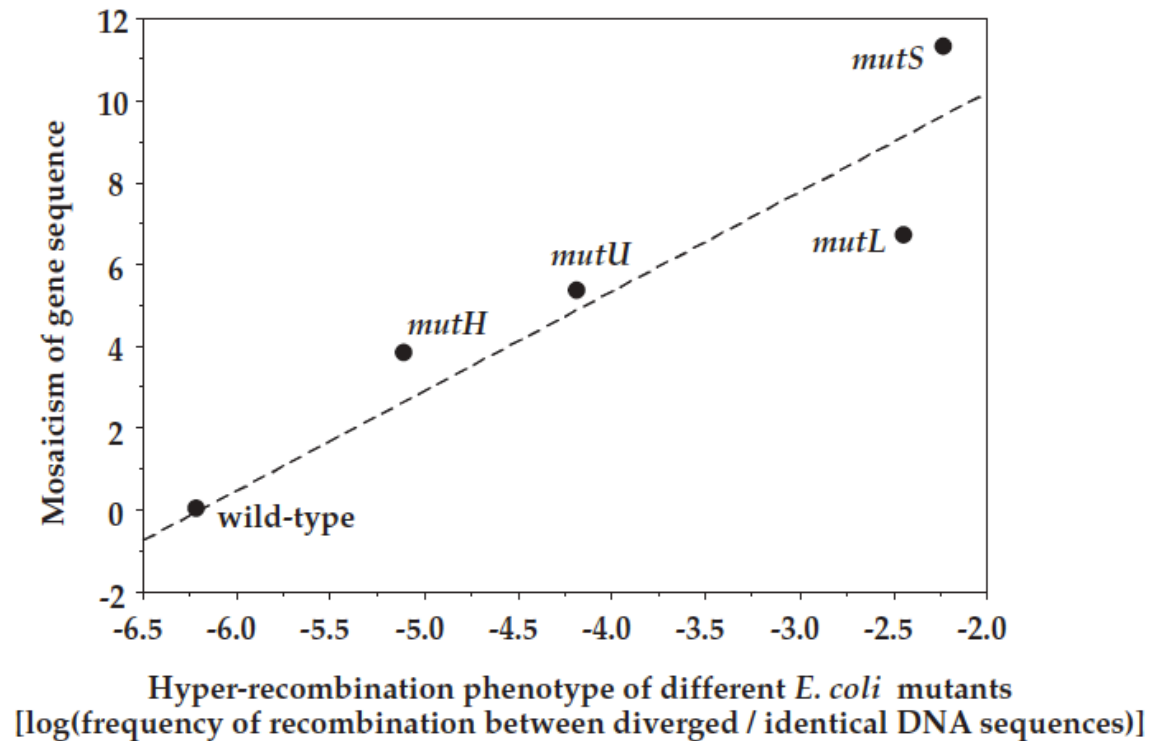
Phylogenetic group	Strain	<i>mutS</i> gene
A	ECOR20	TGCCCTCAGGCCCTAATCTCCGATCGCAGCCTACCGCATGCTAGCTGCAGTGCAGCTCT
	ECOR23	TGCCCTCAGGCCCTAATCTCCGATCGCAGCCTACCGCATGCTAGCTGCAGTGCAGCTCT
	ECOR4	TGCCCTCAGGCCCTAATCTCCGATCGCAGCCTACCGCATGCTAGCTGCAGTGCAGCTCT
	ECOR1	TGCCCTCAGGCCCTAATCTCCGATCGCAGCTACCACTACTAGCCCGGTGATATCT
	ECOR10	TGCCCTCAGGCCCTAATCTCCGATCGCAGCTACCACTACTAGCCCGGTGATATCT
	ECOR13	TGCCCTCAGGCCCTAATCTCCGATCGCAGCTACCACTACTAGCCCGGTGATATCT
	ECOR24	TGCCCTCAGGCCCTAATCTCCGATCGCAGCTACCACTACTAGCCCGGTGATATCT
	ECOR17	TGCTCCTCGTGTCCCGGCTCGATCTCAGCTACCGCGCTCACCTGCGGTAGCGCT
	ECOR70	TGCTCCTCGTGTCCCGGCTCGATCTCAGCTACCGCGCTCACCTGCGGTAGCGCT
	ECOR26	TGCTCCTCGTGTCCCGGCTCGATCTCAGCTACCGCGCTCACCTGCGGTAGCGCT
B1	ECOR27	TGCTCCTCGTGTCCCGGCTCGATCTCAGCTACCGCGCTCACCTGCGGTAGCGCT
	ECOR68	TGCTCCTCGTGTCCCGGCTCGATCTCAGCTACCGCGCTCACCTGCGGTAGCGCT
	ECOR45	TGCTCCTCGTGTCCCGGCTCGATCTCAGCTACCGCGCTCACCTGCGGTAGCGCT
	ECOR58	TGCTCCTCGTGTCCCGGCTCGATCTCAGCTACCGCGCTCACCTGCGGTAGCGCT
	ECOR34	TGCTCCTCGTGTCCCGGCTCGATCTCAGCTACCGCGCTCACCTGCGGTAGCGCT
	ECOR35	CGTCCCTCAGGCTCCCGGCTCGTCTATAGCCCGCGGCGTGTAGTGTCTGTATGCTC
	ECOR41	CGTCCCTCAGGCTCCCGGCTCGTCTATAGCCCGCGGCGTGTAGTGTCTGTATGCTC
	ECOR40	CGTCCCTCAGGCTCCCGGCTCGTCTATAGCCCGCGGCGTGTAGTGTCTGTATGCTC
	ECOR46	CGTCCCTCAGGCTCCCGGCTCGTCTATAGCCCGCGGCGTGTAGTGTCTGTATGCTC
	ECOR47	CGTCCCTCAGGCTCCCGGCTCGTCTATAGCCCGCGGCGTGTAGTGTCTGTATGCTC
D	ECOR49	CGTCCCTCAGGCTCCCGGCTCGTCTATAGCCCGCGGCGTGTAGTGTCTGTATGCTC
	ECOR50	CGTCCCTCAGGCTCCCGGCTCGTCTATAGCCCGCGGCGTGTAGTGTCTGTATGCTC
	ECOR60	CGTCCCTCAGGCTCCCGGCTCGTCTATAGCCCGCGGCGTGTAGTGTCTGTATGCTC
	ECOR59	CGTCCCTCAGGCTCCCGGCTCGTCTATAGCCCGCGGCGTGTAGTGTCTGTATGCTC
	ECOR62	CGTCCCTCAGGCTCCCGGCTCGTCTATAGCCCGCGGCGTGTAGTGTCTGTATGCTC
	ECOR64	CGTCCCTCAGGCTCCCGGCTCGTCTATAGCCCGCGGCGTGTAGTGTCTGTATGCTC
	ECOR57	CATCCTTCGTTGCTCCCGGCTCTTTGTTTTAGCCTACCACTGCTAGCTATGACAGGCTCT
	ECOR52	CATCCTTCGTTGCTCCCGGCTCTTTGTTTTAGCCTACCACTGCTAGCTATGACAGGCTCT
	ECOR51	CATCCTTCGTTGCTCCCGGCTCTTTGTTTTAGCCTACCACTGCTAGCTATGACAGGCTCT
	ECOR37	TGCGTTTCAGGCTCCCGGCTCGATTTTATAGCTACCGCGCTCAGCTGCGGTGCGGCT



Gènes « mosaïques » signant de multiples transferts horizontaux de gènes avec recombinaison homéologue au cours du temps

Les gènes du SRM sont des points chauds de recombinaison

Les bactéries alternent entre des phases de mutagénèse élevée et basse

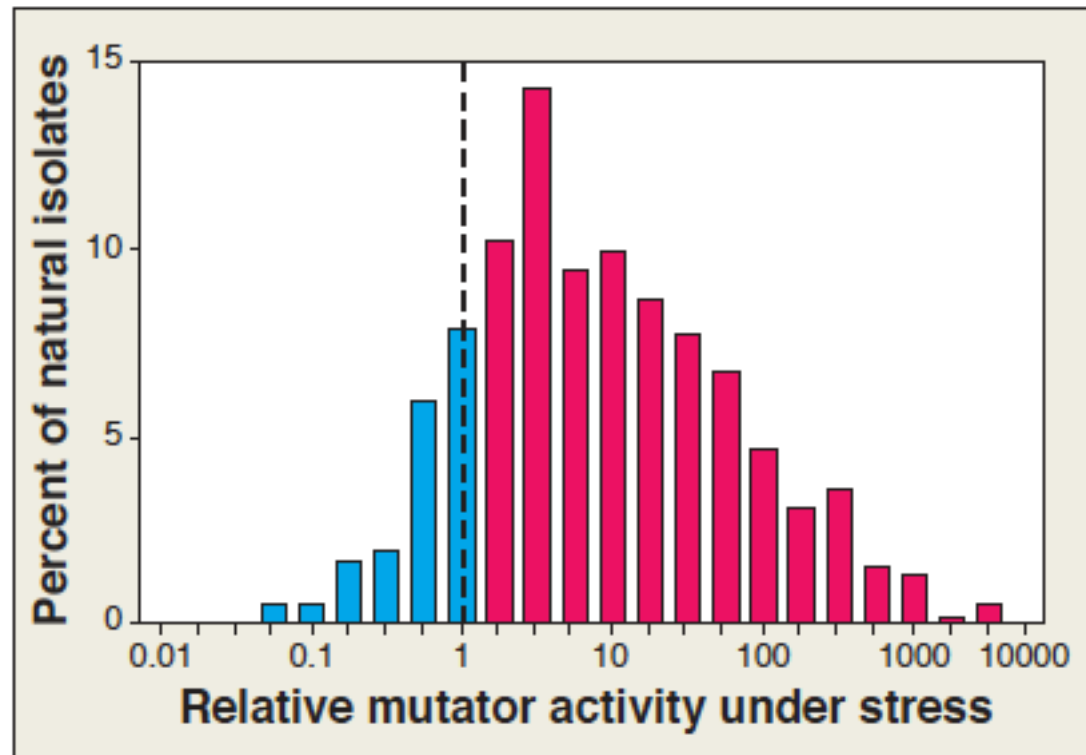


Mesuré au laboratoire

**Alternance de phases SRM+/SRM- :
Le SRM agit comme un changement de vitesse de l'évolution**

La majorité des bactéries augmentent leur mutagénèse en période de stress

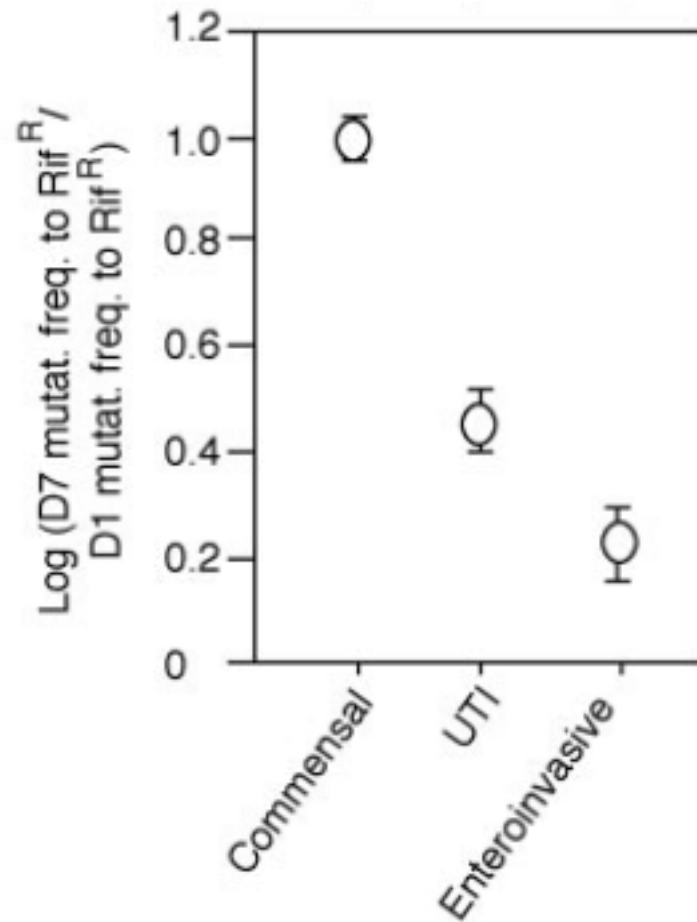
- Stress : carence nutritive 7 jours sur une gélose à 37°C
- Mesure de la fréquence de mutations à J1 et J7 (rapport J7/J1)
- > 800 souches humaines, animales, environnement



Mutagénèse inductible

Implique la croissance en biofilm, l'O₂, de nombreux régulons (RpoS, AMPc) et les ADN pol trans-lésionnelles

Les commensales et les pathogènes ont des stratégies de mutagenèse distinctes



Commensales : inducible

Pathogènes (infection urinaire) :
constitutive

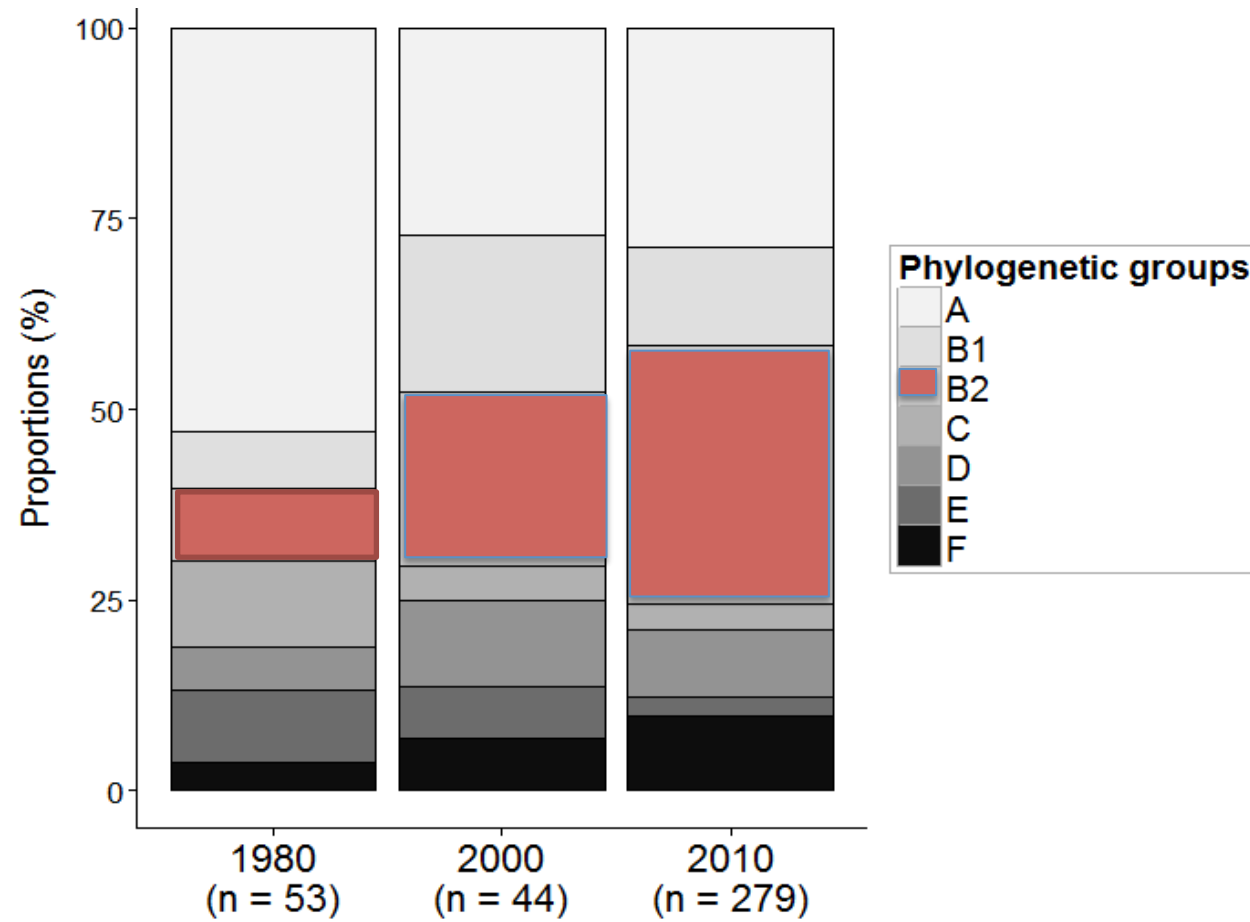
**Epidémiologie moléculaire, étude
d'associations et pouvoir
pathogène expérimental**

Les populations d'*E. coli* humains commensaux sont structurées

Population		Phylogenetic group			
		A	B1	D	B2
Brittany (PF) ^a	(n ^d =25)	32.0	28.0	24.0	16.0
Brest University students	(n=21)	14.3	23.8	28.6	33.3
Paris area residents	(n=27)	29.6	11.1	22.2	37.1
Brittany (BIW) ^b	(n=25)	24.0	24.0	20.0	32.0
Michigan residents ^c	(n=88)	20.5	12.5	19.3	48 %
Tokyo residents ^c	(n=61)	28.0	0.0	28.0	44.0
Tours residents ^c	(n=24)	25.0	21.0	25.0	29.0
Bogotá residents	(n=28)	57.1	3.6	14.3	25.0
Cotonou residents	(n=46)	50.0	32.6	0.0	17.4
French Guyana Amerindians	(n=93)	63.4	20.4	12.9	3 %

^a PF: pig farmers, ^b BIW: bank and insurance workers, ^c data taken from previous published works (see the text), ^d n: number of individuals.

Elles évoluent au cours du temps : région Parisienne



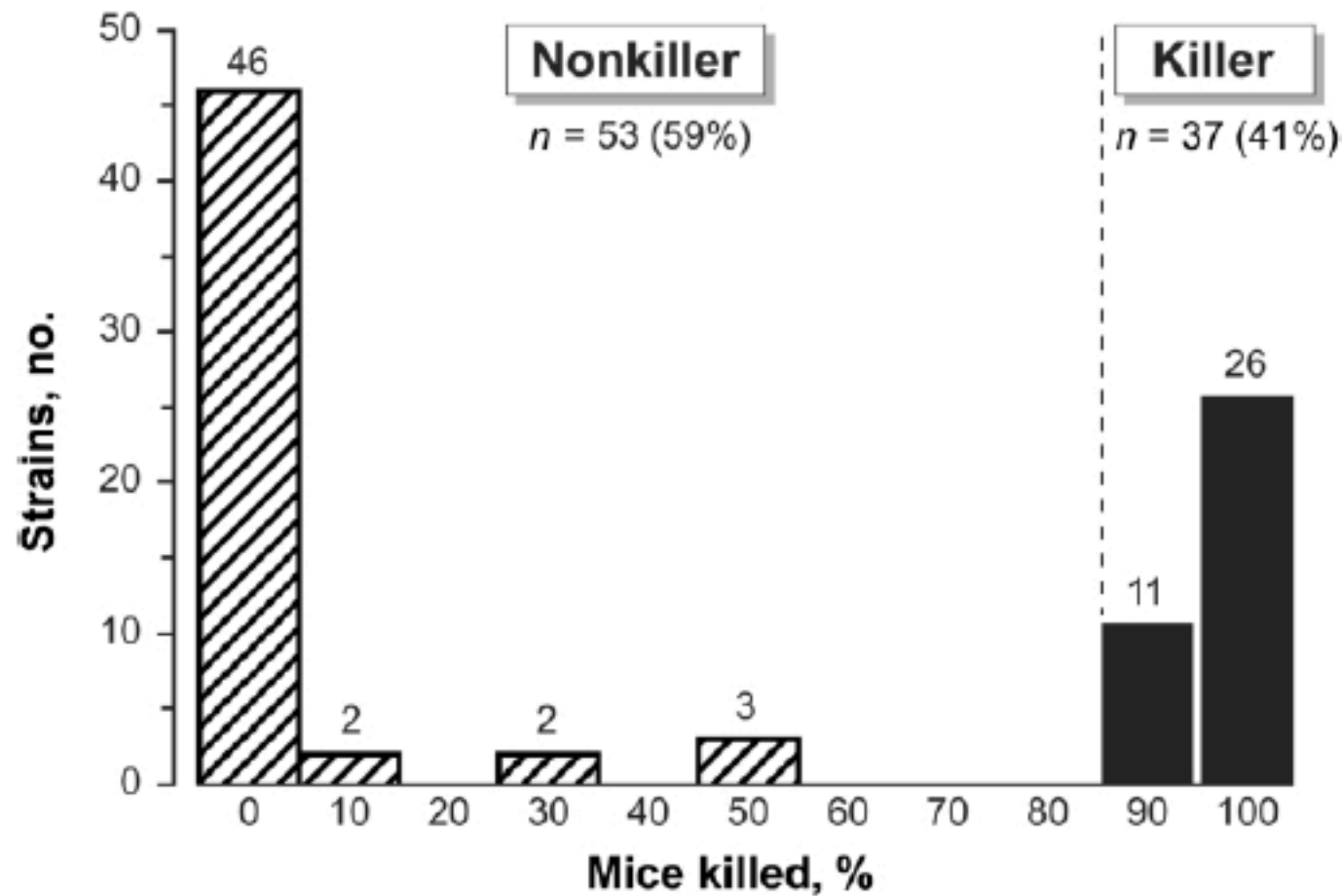
Comparaison commensales « COLIVILLE » - septicémies « COLIBAFI » Paris, 2005-2010 (appariement sexe, âge)

Phylogenetic groups/subgroups	n (%)		Adjusted p values for groups
	COLIVILLE (n = 279)	COLIBAFI (n = 279)	
A	80 (28.7)	38 (13.6)	<0.001
B1	36 (12.9)	23 (8.2)	0.10
B2	95 (34.0)	142 (50.9)	<0.001
C	9 (3.2)	23 (8.2)	0.05
D	25 (9.0)	42 (15.0)	0.07
E	7 (2.5)	0 (0)	0.05
F	27 (9.7)	11 (3.9)	0.05
			<0.001*

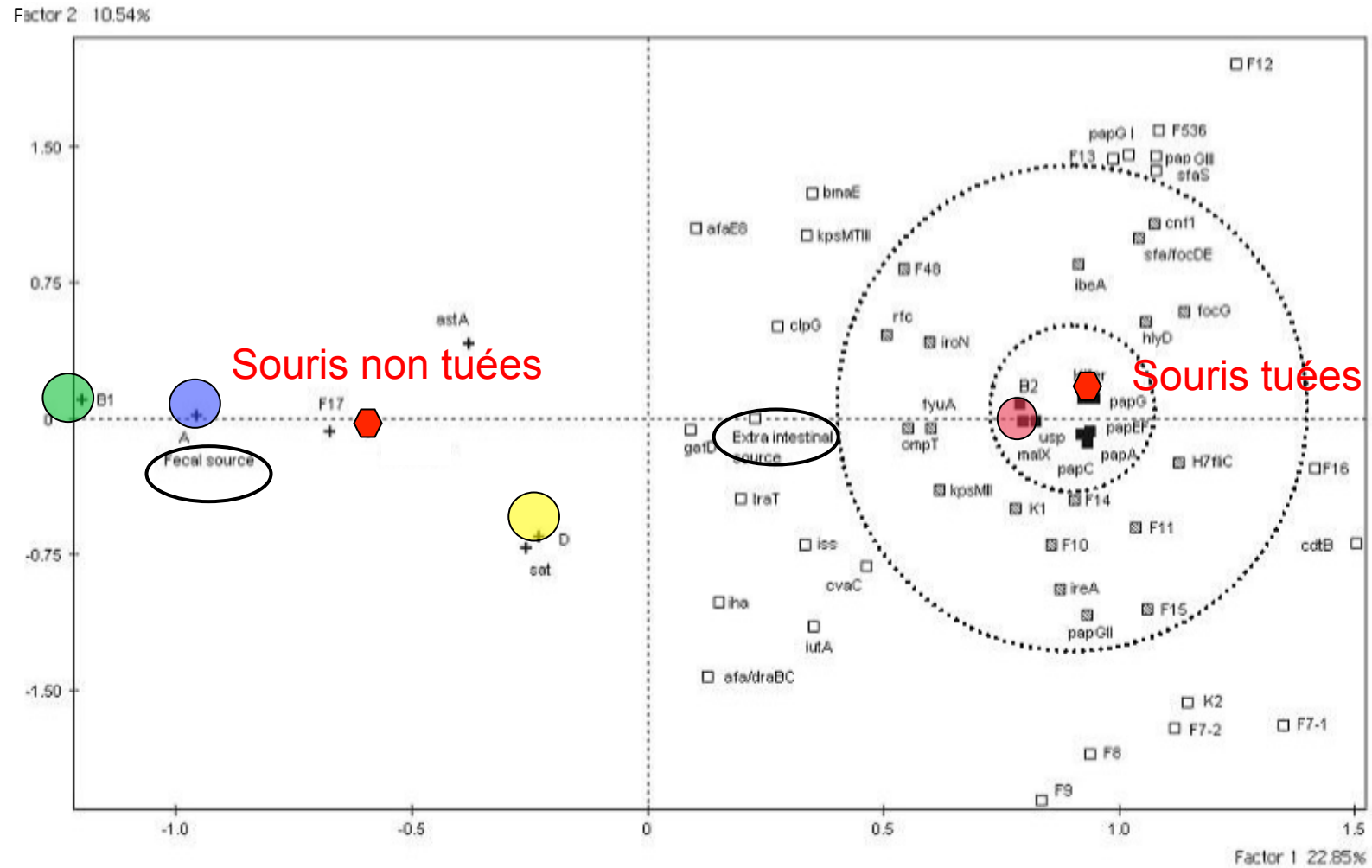
Les « gènes de virulence »

- Appartiennent à **4 grandes classes fonctionnelles** :
 - adhésines
 - systèmes de capture du fer
 - toxines
 - « protectines » (capsule)
- Sont le plus souvent localisés dans les **îlots génomiques** :
« îlots de pathogénicité » = « PAIs »
- Sont associés majoritairement aux souches du groupe **phylogénétique B2**
- Sont retrouvés préférentiellement dans les souches responsables **d'infections extra-intestinales**

Un modèle animal de septicémie chez la souris pour évaluer la virulence intrinsèque de la souche

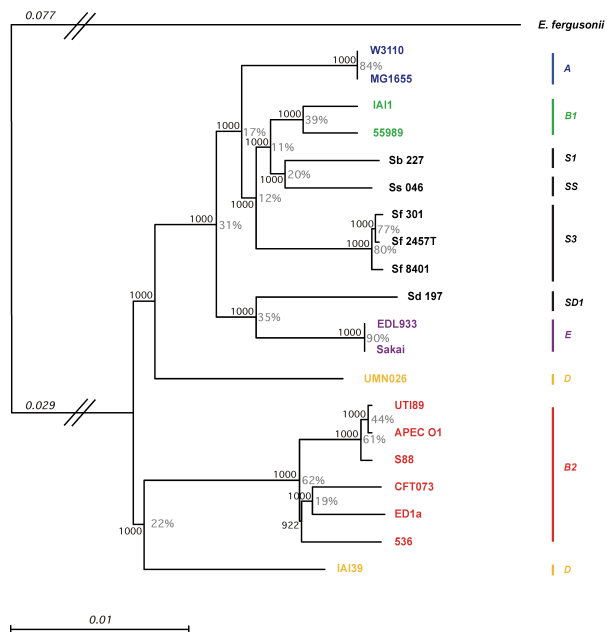


Un lien entre phylogénie, « gènes de virulence » et virulence intrinsèque



90 souches humaines
commensales/pathogènes

La virulence extra-intestinale est un phénomène complexe



. Pas de gène unique associé à la virulence chez la souris!



Phénotype complexe

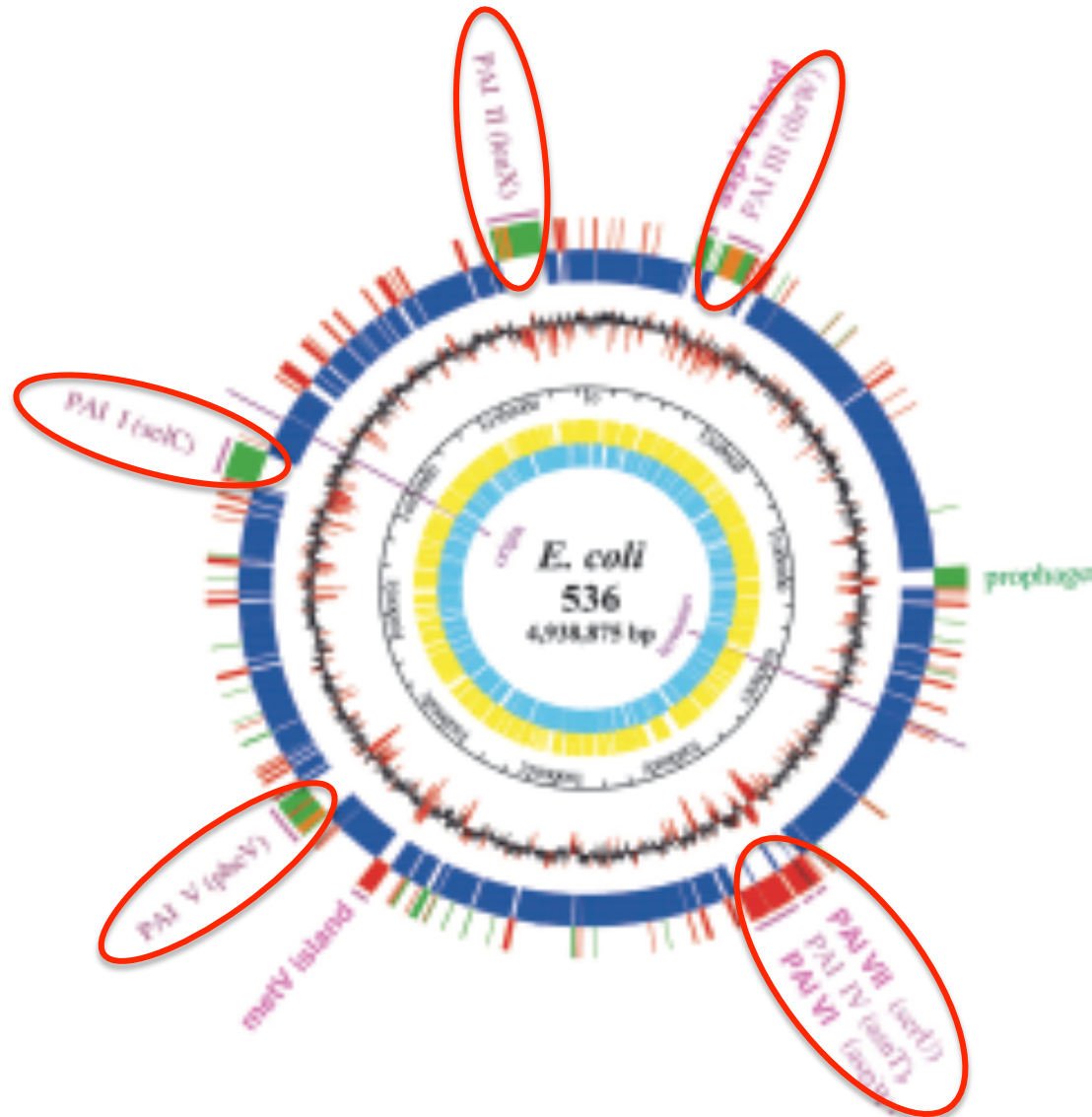
. Multigénique (gènes du pool variable)

. Multiples combinaisons possibles (cf LEGO®)

. Un fond génétique particulier :
Importance des phénomènes d'épistasie (interactions entre les différentes parties du génome)

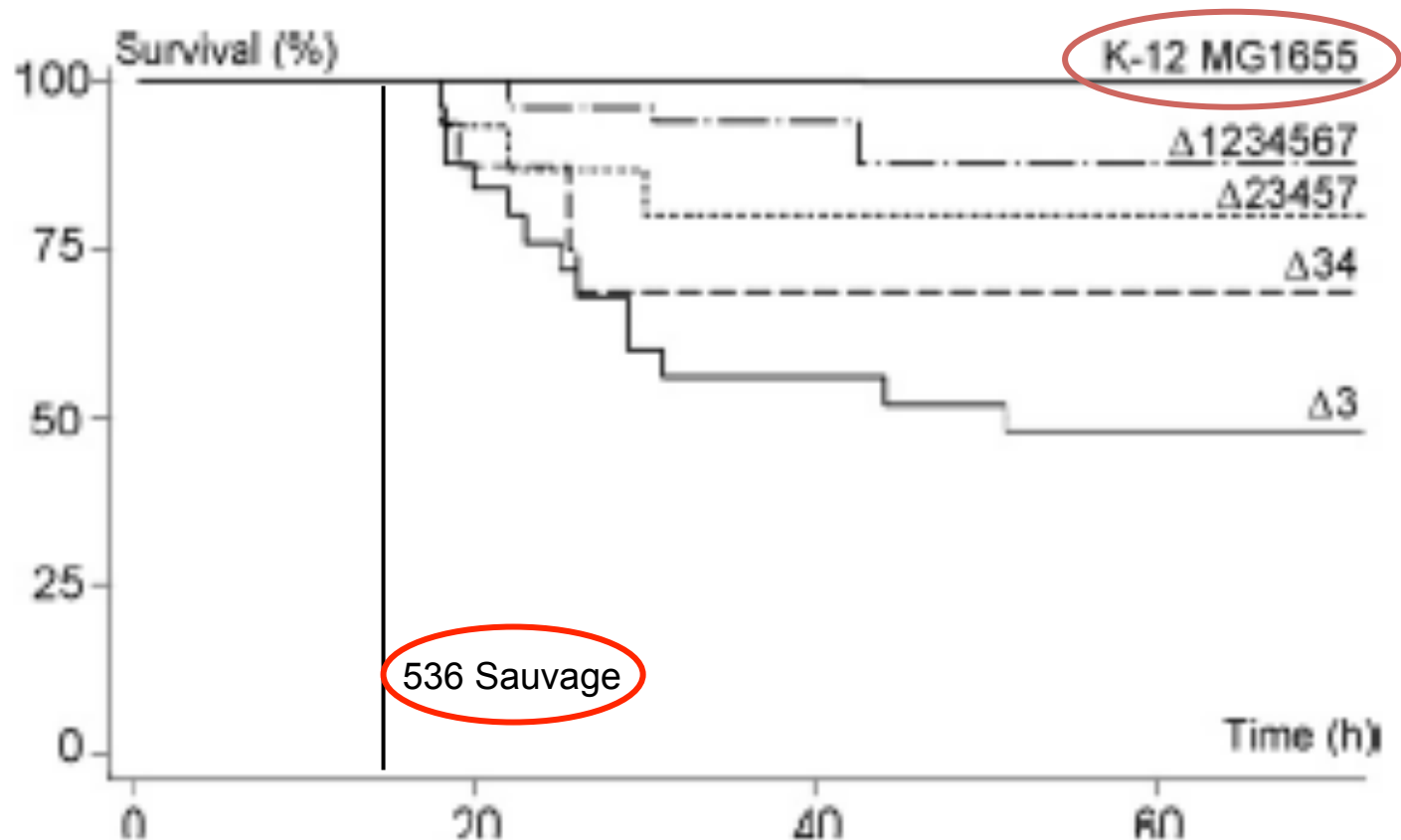
. Survenu de nombreuses fois au cours de l'évolution avec des chemins évolutifs différents (convergence)

Construction d'une souche B2 (pyélonéphrite) sans « PAIs »

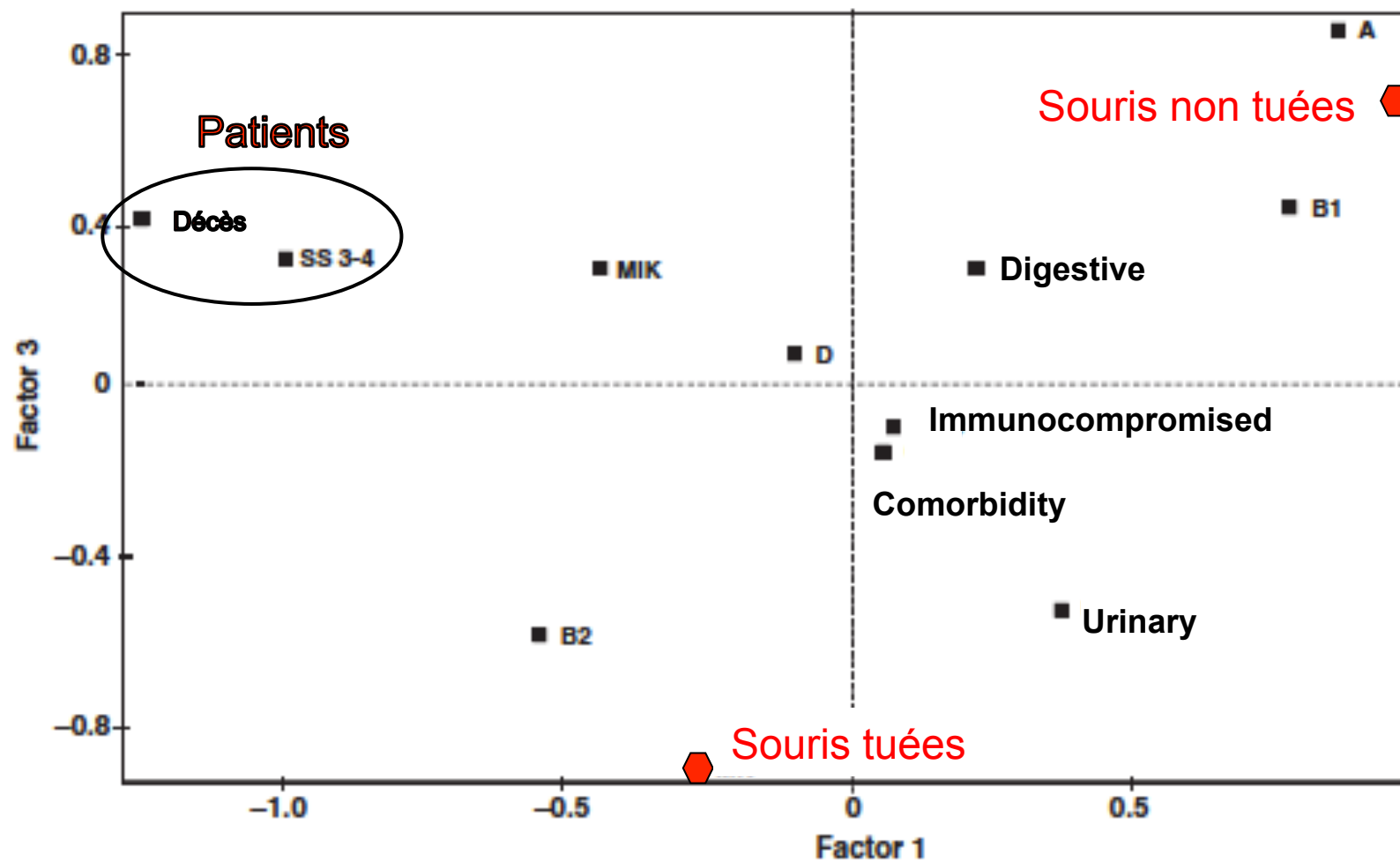


7 « PAIs »
=
7,7 % du génome

Les « PAIs » coopèrent de manière additive pour exprimer la virulence extra-intestinale



Les Hommes du XXIème siècle ne sont pas des souris



60 patients bactériémiques

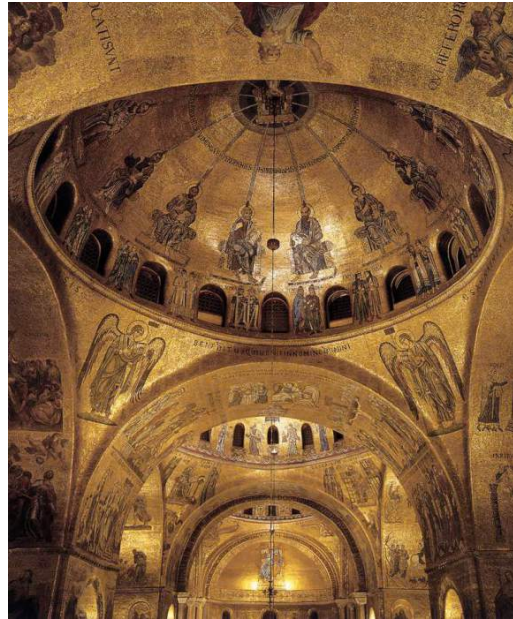
La sévérité des bactériémies chez l'Homme dépend essentiellement de l'hôte et de la porte d'entrée

- Etude prospective Française multicentrique COLIBAFI
 - 1051 patients adultes avec une bactériémie
 - 13% de mortalité
- Analyse multivariée, facteurs prédictifs du décès :
 - Age (65-79), immunosuppression, cirrhose
 - Porte d'entrée non urinaire (digestive, cutanée)
 - Absence de *ireA/papC*
- Les souches B2 avec beaucoup de “gènes de virulence” sont majoritairement responsables de pyélonéphrites avec bactériémies chez la femme jeune, facilement traitées par les antibiotiques

Quelles sont les forces évolutives qui sélectionnent la “virulence” extra-intestinale ?

- Les souches B2 avec des gènes de virulence sont aussi trouvées en situation commensale
- Tuer son hôte est un cul de sac évolutif pour un *E. coli* extra-intestinal (différent des diarrhées)
- Etude génomique sur 60 souches du groupe B2 montre que le phénotype de virulence chez la souris est :
 - un caractère ancestral quand on le replace sur l'arbre phylogénétique (état primitif et non dérivé)
 - associé à des gènes impliqués dans le commensalisme ou la survie dans l'environnement (régulateur transcriptionnel, métabolisme du fer, adhésion, biosynthèse du LPS)

La “virulence” extra-intestinale : un effet collatéral du commensalisme ?



La basilique Saint Marc de Venise

Gould et Lewontin, Proc R Soc Lond, 1979, « Critique of the adaptationist program »

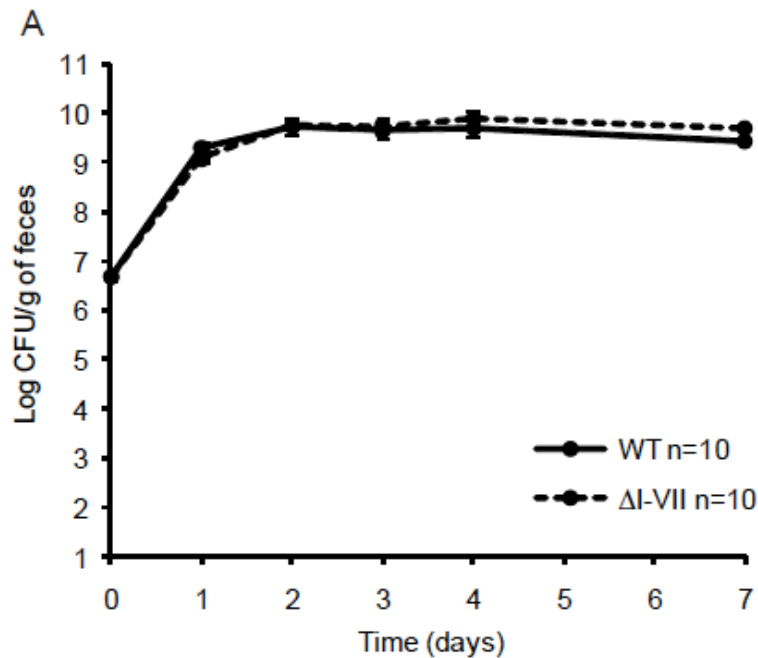
Un écoinçon (« spandrel ») :

« Une caractéristique phénotypique (**la représentation de l'ange**) qui a évolué comme un effet collatéral de la véritable adaptation (**la voute**) »

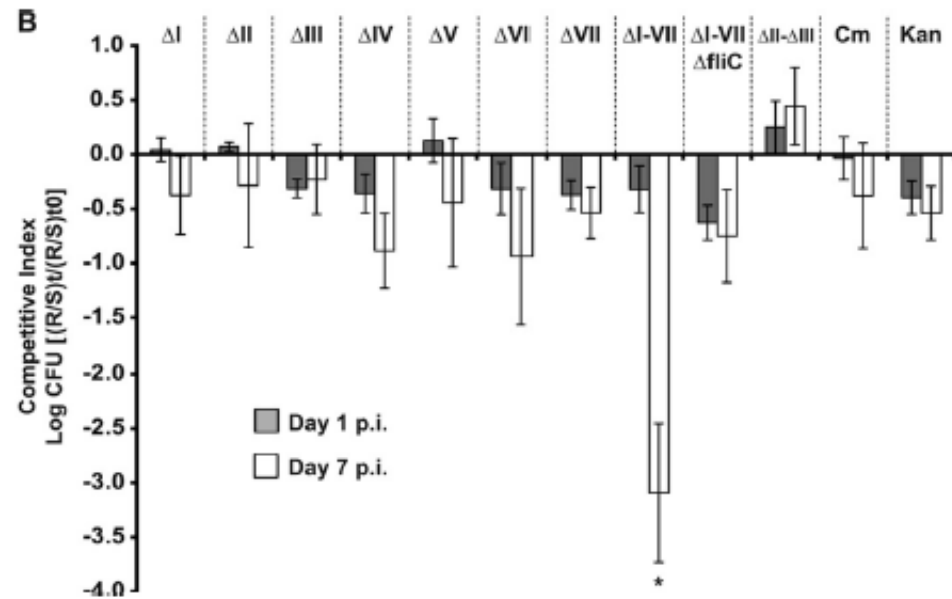
L'ange = virulence

La voute = commensalisme

Les « PAIs » sont impliqués dans la colonisation intestinale



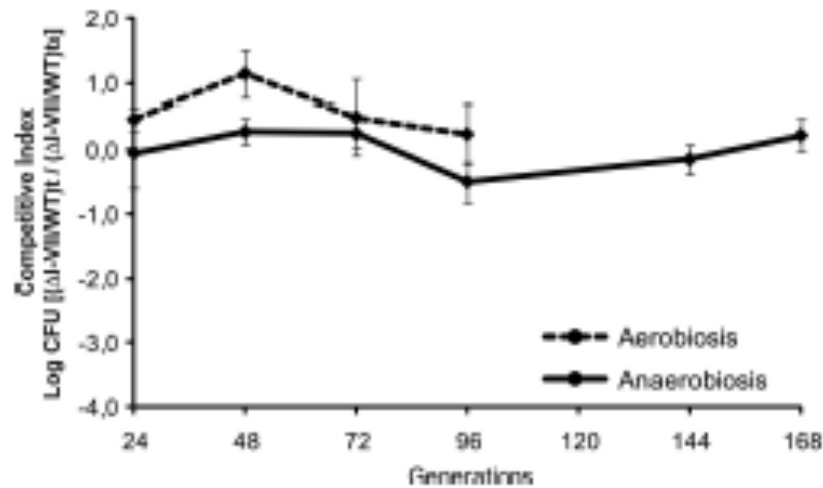
Monocolonisation



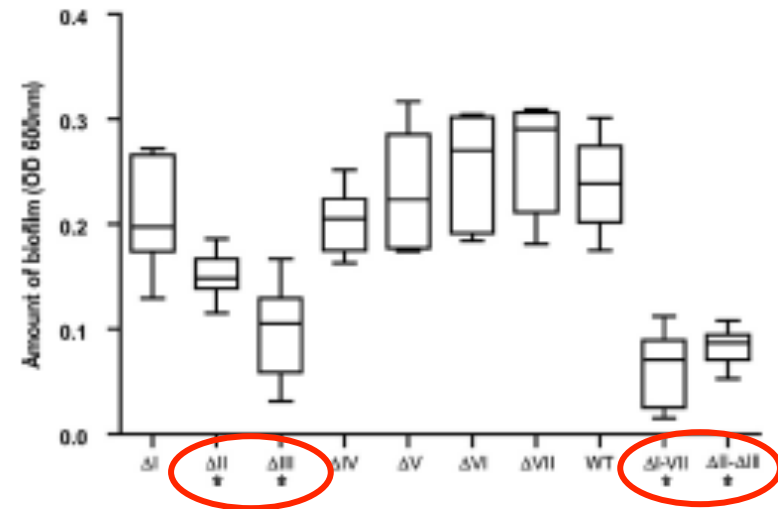
Compétition

dans l'intestin de la souris

A la recherche de phénotypes corrélés au défaut de colonisation intestinale



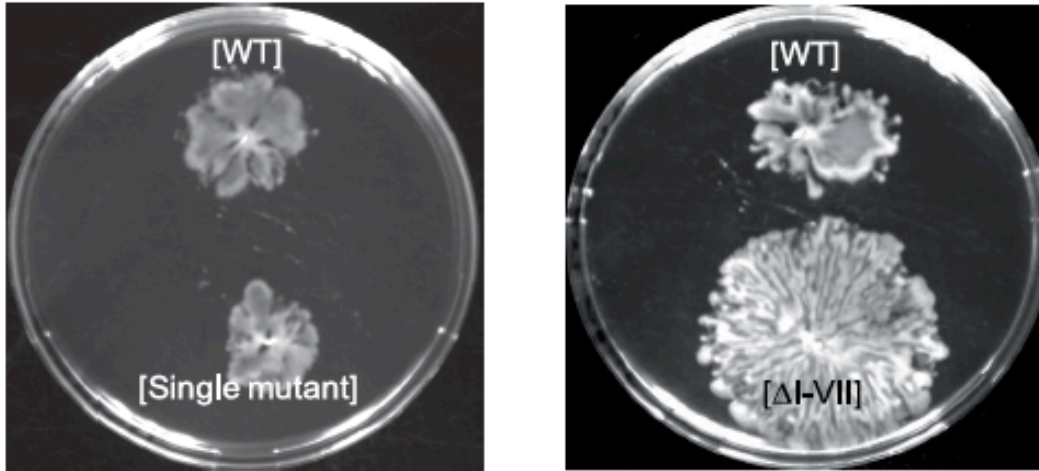
Compétitions en chémostats
avec ou sans stress (acide, biliaire, ...) :
Pas de différence



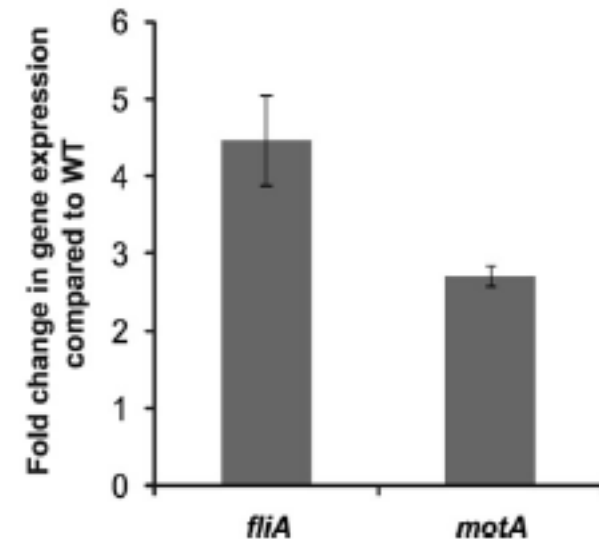
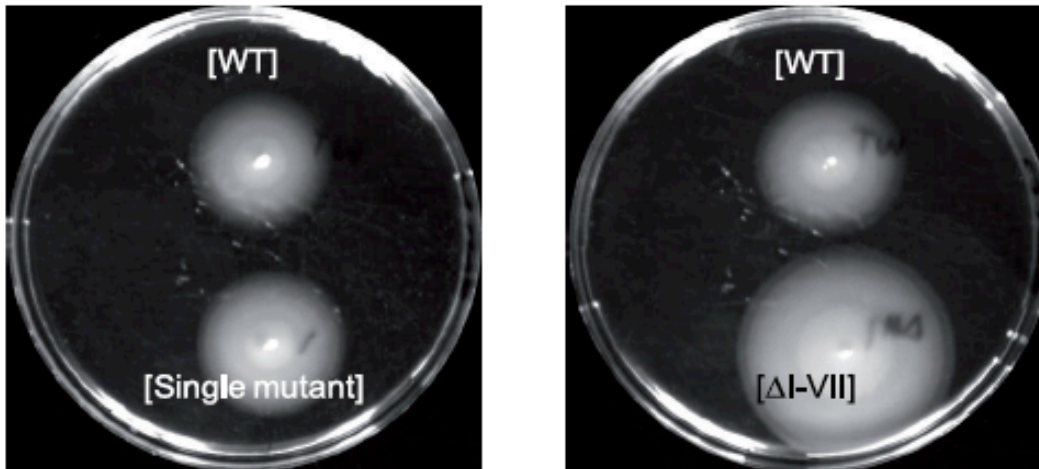
Formation de biofilm :
Pas corrélé

La mobilité *in vitro* est augmentée dans les mutants PAI_{I-VII}

A Essaimage



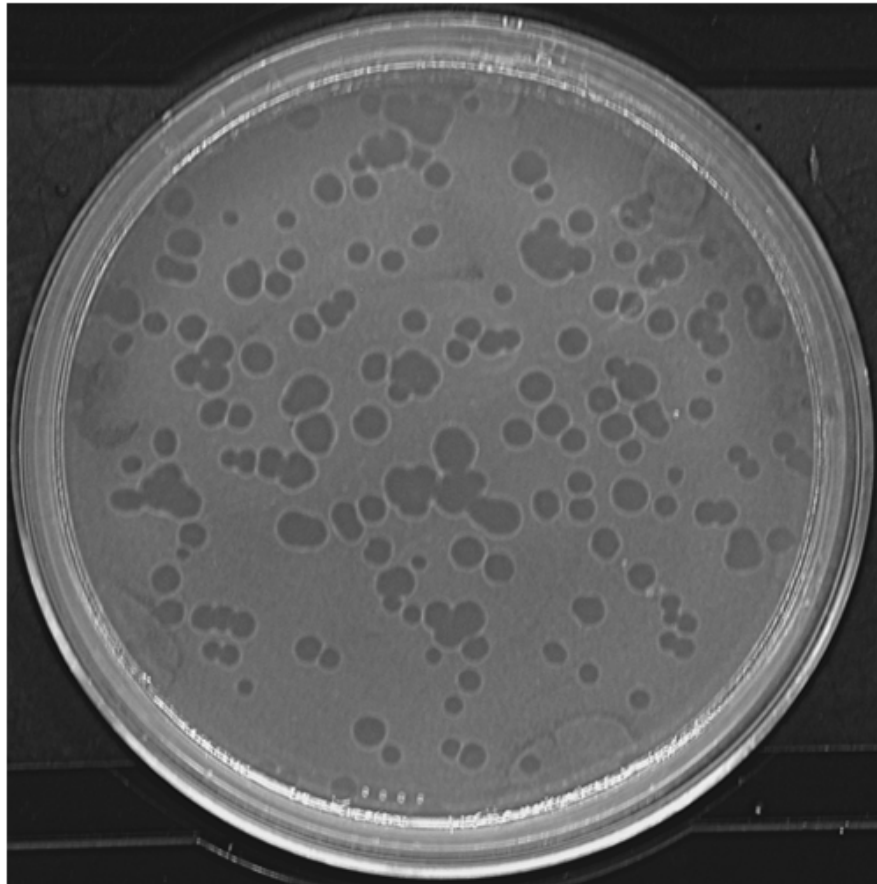
B Nage



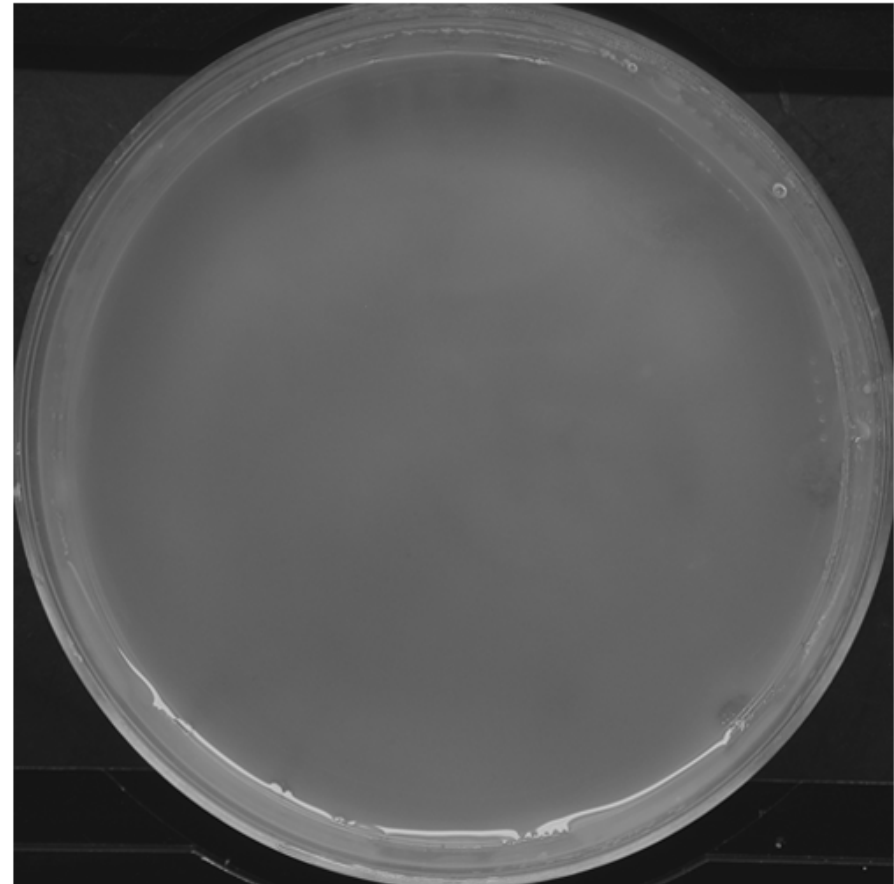
Surexpression des gènes du flagelle

De la résistance au broutage (phagocytose) par les protozoaires à la pathogénèse

10^2 *Dictyostelium discoideum*, une amibe sociale haploïde

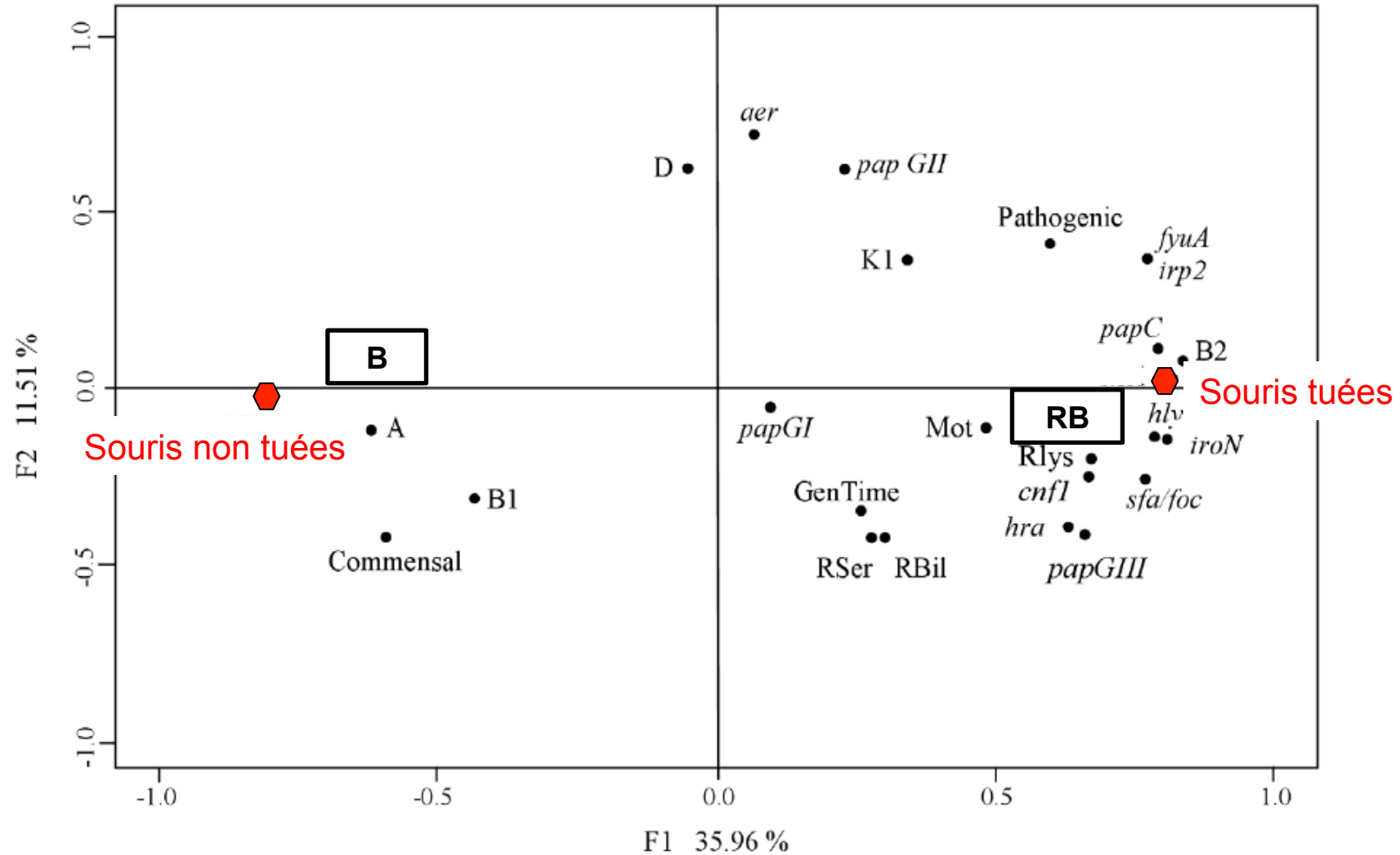


Commensal (K-12) 10^8
Broutage de la bactérie par l'amibe



B2 pathogène (536)
Résistance de la bactérie, mort de l'amibe

La résistance au broutage est associée à la virulence chez la souris



31 souches humaines commensales/pathogènes

B : Broutage ; **RB** : Résistance au Broutage

Le rôle du « High Pathogenicity Island » (HPI) dans la résistance au broutage

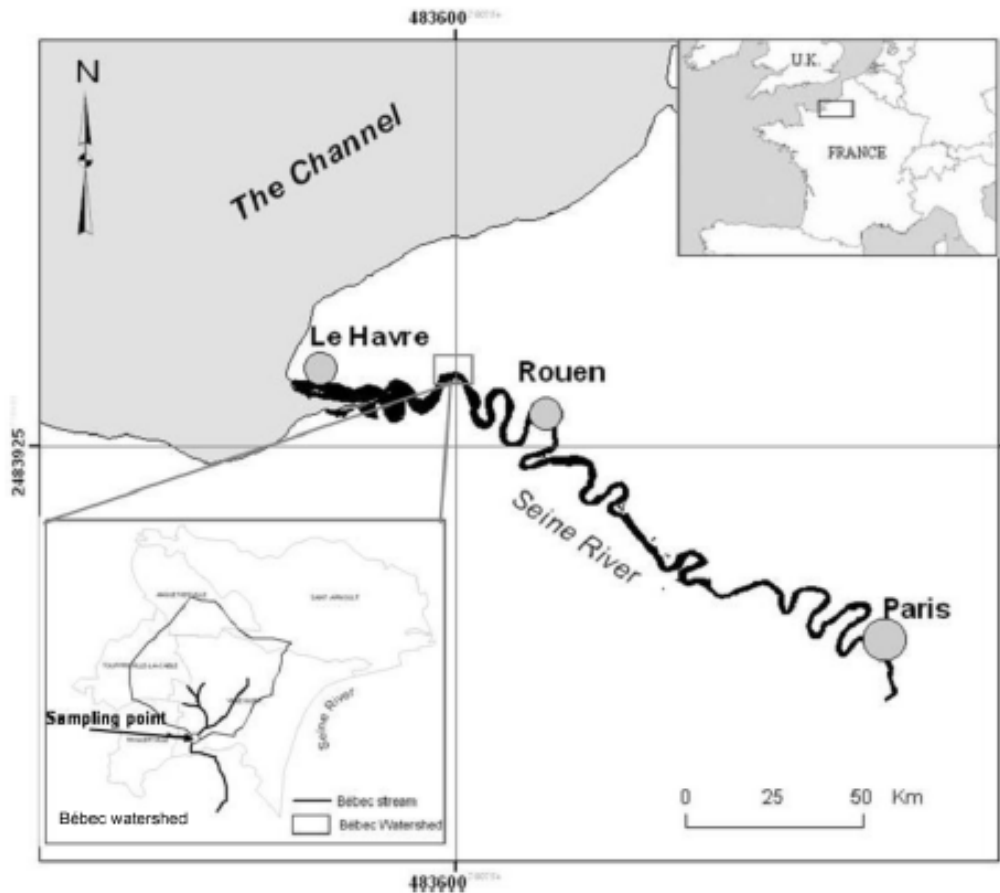
HPI = système de capture du fer (*irp*)

IAI51 = B2 pyélonéphrite

Strain	IAI51 pCP1	+	+	++	RB
	IAI51 <i>irp</i> -	+++	++++	++++	B
	IAI51	–	+	–	RB ++
	606	+++++	+++++	+++++	B (contrôle)
		1	2	3	
log(number amoeba)					

Bacterial lysis plaques (strains REL 606, IAI51, IAI51 *irp*-, IAI51 pCP1) observed six days after plating. A density of 10^8 bacteria was plated with 10 , 10^2 and 10^3 amoebae. (+) represents the number of replicates with lysis plaques, (–) means no replicate showing plaques.

E. coli dans son environnement secondaire, l'eau et les sédiments

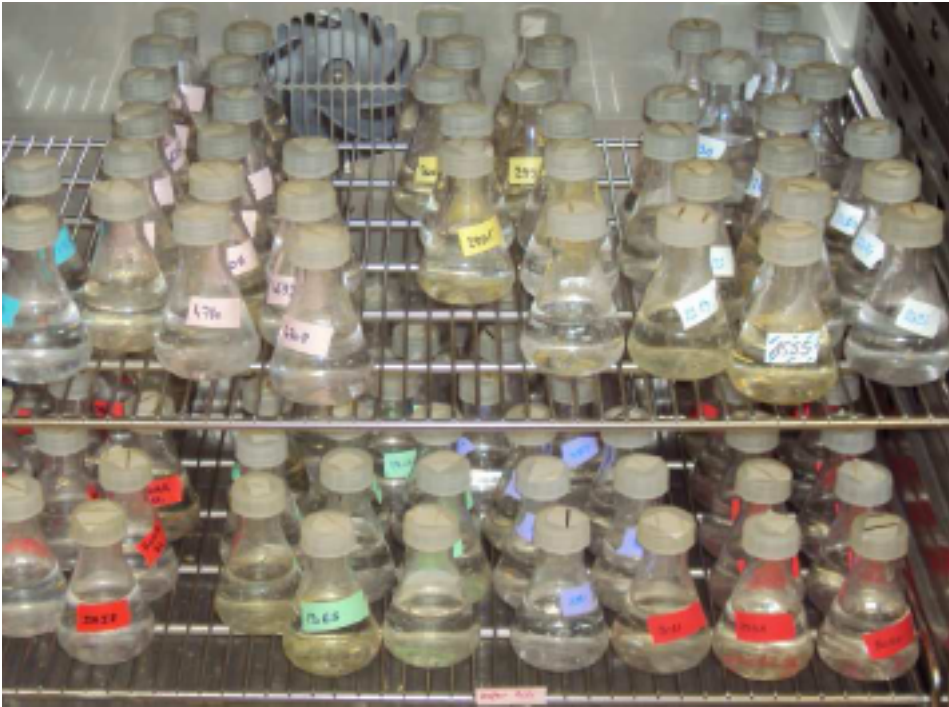


- Site atelier « Le Bébéc »
- 230 souches
- 1×10^2 à 4×10^4
E. coli / 100 ml

La structure des populations de *E. coli* est variable

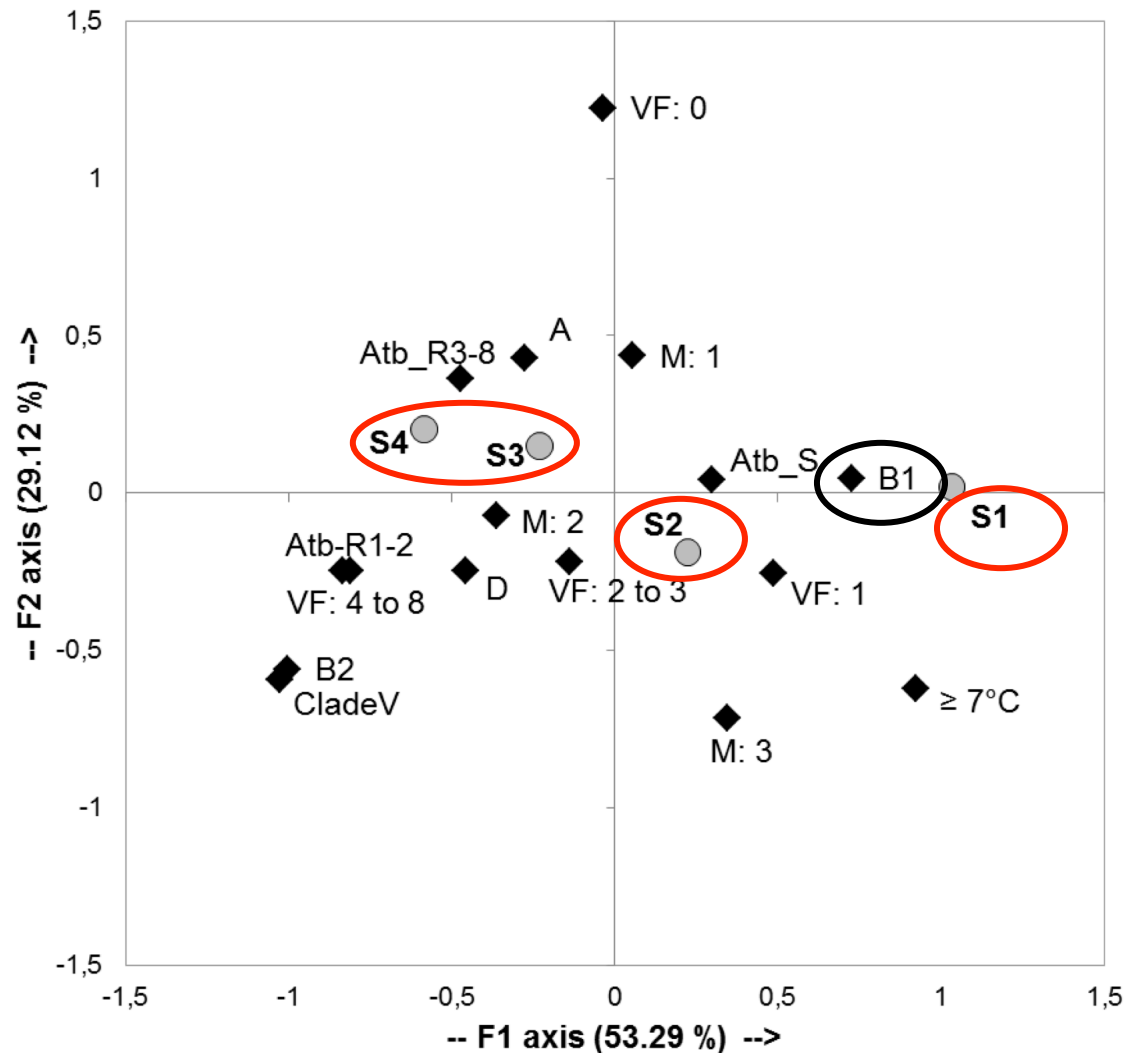
- Dépend :
 - des conditions hydrologiques (saison sèche, pluies)
 - de l'utilisation du bassin versant
(animaux sauvages, bétail, degré d'anthropisation)
- Des clones du phylogroupe B1 semblent persistants et adaptés dans l'eau non contaminée par l'homme et les animaux

Des tests phénotypiques adaptés sur 88 souches représentatives



- **Expérience en microcosme**
Etude de la survie 14 jours dans de l'eau d'estuaire de Seine filtrée à 10°C dans la nuit
- **Croissance à 7, 10, 20°C**
- **Utilisation de sources de carbone (Biolog)**

Des souches B1 adaptées à l'eau avec des caractéristiques particulières



S1 : 7 à 14 jours, S2 : 4 à 6 jours,
S3 : 2 à 3 jours, S4 : <2 jours

B1 : phylogroupe

VF: 1 : *kps* ou *ompT* (protectines)

7°C : croissance

M: 3 : dégradation de macromolécules
(pectine, gélatine, Tween 40)

Atb_S : sensible aux antibiotiques

**Commensal ou pathogène, tout
est-il écrit dans le génome?**

- Une grande partie du commensalisme, saprophytisme et virulence est sans doute écrite dans le génome
- Une petite partie à peine est déchiffrée : résultats montrés pour la mutagénèse, la présence / absence de gènes, déjà complexes (multigénique, multiples combinatoires, épistasie)
- Reste à étudier :
 - Les variations en termes de polymorphismes nucléotidiques (SNPs) dans les régions codantes
 - Les variations de régulation (SNPs promoteurs, petits ARNs, méthylation)
- La pathogénicité dépend aussi de l'hôte et de la physiopathologie, l'homme n'est pas la souris
- La virulence extra-intestinale est un effet collatéral du commensalisme

**Les isolats naturels d'*E. coli* sont
un merveilleux modèle pour
l'étude des mécanismes écologiques
et évolutifs de la virulence**

“Infection, Antimicrobiens, Modélisation, Evolution”
<http://www.iame-research.center/>





FONDATION
RECHERCHE
MÉDICALE

ASSISTANCE
PUBLIQUE  HÔPITAUX
DE PARIS

PHRC

Agence Nationale de la Recherche
ANR



IDEX

INSERM/Université Paris Descartes

Ivan Matic, Miroslav Radman

Institut Pasteur

Eduardo Rocha, Marie Touchon

Genoscope/CEA

Valérie Barbe, Claudine Médigue

ENS Paris

Sandrine Adiba

Université de Rouen

Fabienne Petit

Université du Minnesota, USA

James Johnson

Université de Canberra, Australie

David Gordon

Une interaction entre la phylogénie de la souche, la présence de « gènes de virulence » et le mode de vie

