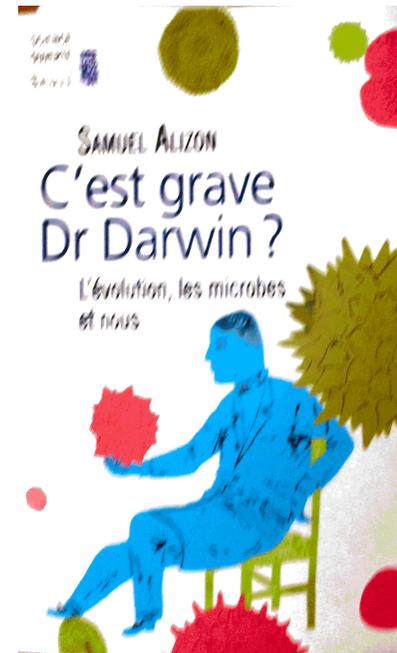
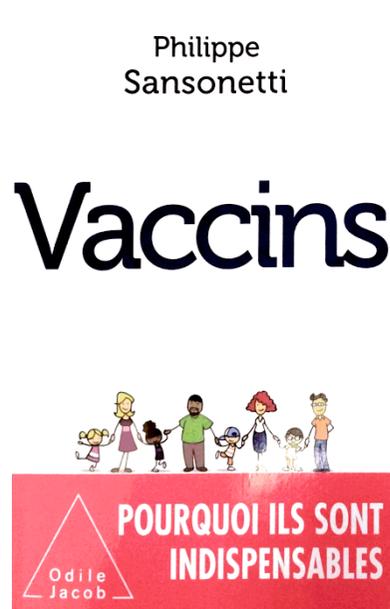


Leçon #3 :

Evolution des pathogènes sous pression sélective (antibiotiques, immunité)

Séminaire #3 :

Vers une synthèse "darwino-pasteurienne"
Samuel Alizon (CNRS/IRD, Montpellier)



Evolution des pathogènes sous pression sélective

Prof. Philippe Sansonetti

Leçon # 3

Collège de France

11 janvier 2017

AMX

TIC

PIP

FEP

CF

AMC

CAZ

TPZ

FOX

CXM

TCC

ATM

MEC



COLLÈGE
DE FRANCE
— 1530 —

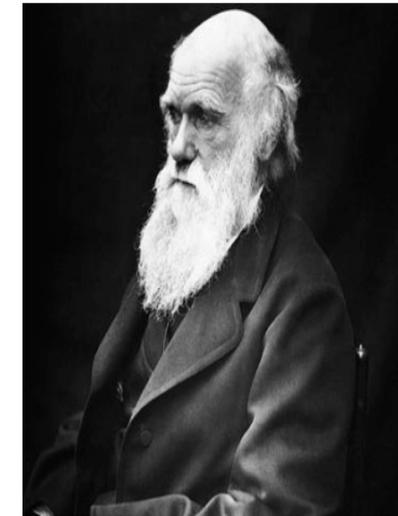


INSTITUT PASTEUR

Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale

Concept de valeur sélective/adaptative = "fitness"



Charles Darwin
1809-1882

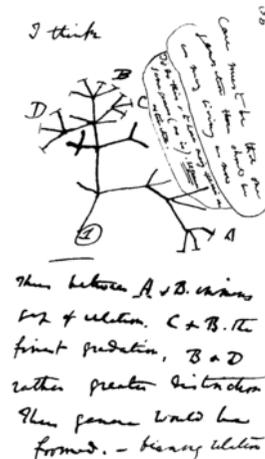
1859: "Sur l'origine des espèces au moyen de la sélection naturelle, ou la préservation des races les meilleures dans la lutte pour la vie"

Les conditions d'un habitat sélectionnent naturellement les individus les mieux adaptés à ces conditions

Introduction (extrait):

Comme il naît beaucoup plus d'individus de chaque espèce qu'il n'en peut survivre, et que par conséquent il se produit souvent une lutte pour la vie, il s'ensuit que tout être, s'il varie, même légèrement, d'une manière qui lui est profitable, dans les conditions complexes et quelquefois variables de la vie aura une meilleure chance de survivre et ainsi se retrouvera choisi de façon naturelle.

En raison du principe dominant de l'hérédité, toute variété ainsi choisie aura tendance à se multiplier sous sa forme nouvelle et modifiée.



"Pas d'événement scientifique notable...".1859. Président de la "Linnean Society"

What *did* Darwin say about microbes, and how did microbiology respond?

Maureen A. O'Malley

Egenis (ESRC Centre for Genomics in Society), University of Exeter, Byrne House, St Germans Road, Exeter, EX4 4PJ, UK

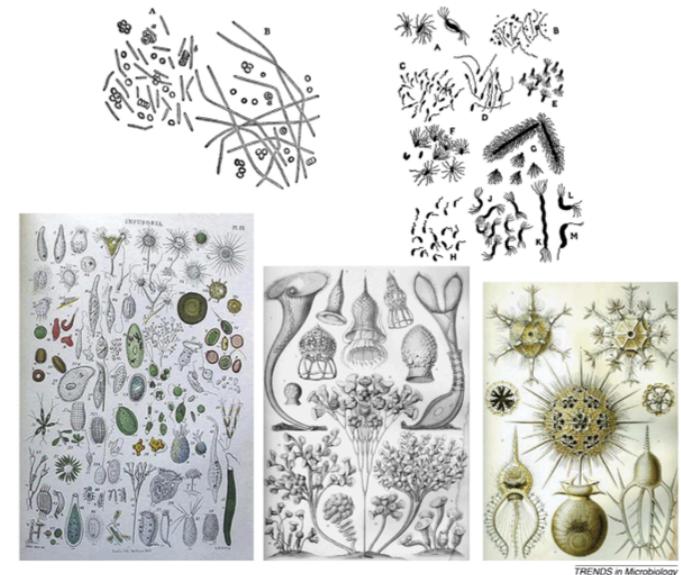
On assume habituellement que Darwin n'avait rien à dire au sujet des microbes
Inexact

Il les avait inclus dans ses études lors du voyage de la Beagle concernant deux domaines particuliers:

- La distribution géographique des organismes
- L'usage des microbes pour démontrer qu'adaptation n'impliquait pas nécessairement complexification

Discussion des microbes comme modèles dans ses correspondances

Les microbiologistes payèrent peu d'attention à sa théorie
Raison du désintérêt ?



Infusions microscopiques

Eco-Evo

Question clé:

Dans cette époque d'accélération d'incidence des maladies émergentes et réémergentes (homme, animaux, plantes), quel est le poids respectif des changements liés à l'évolution des pathogènes et des modifications environnementales/écologiques (intensification de l'agriculture/élevage, mobilité, changements climatiques) ?

Vu avec la peste qu'il était finalement difficile de lire dans les génomes l'histoire des émergences pandémiques: manque de clés ou dominance des facteurs humains et environnementaux ?

Plutôt succession:

1^{ère} étape: "saut d'espèce" = dominance des facteurs écologiques

2^{ème} étape: "diffusion" = dominance des facteurs d'adaptation/évolution

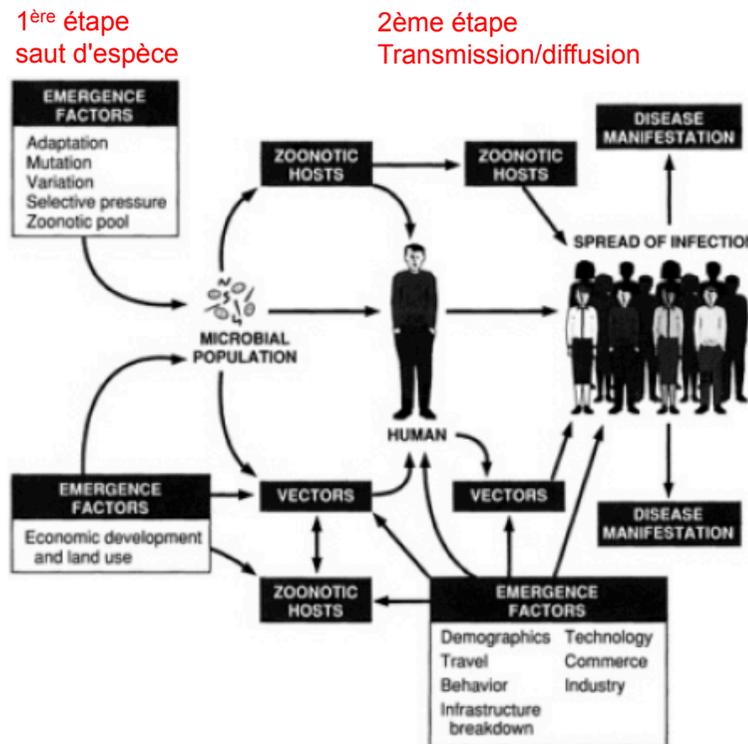
Défi pour comprendre: éco-évo

Evolution microbienne et émergence infectieuse

Idée communément acceptée/affirmation fréquemment exprimée: l'évolution microbienne sous-tend l'émergence des maladies infectieuses

Regard objectif: les cas où les forces de l'évolution ont significativement influencé l'émergence de nouvelles maladies infectieuses sont rares en regard de la contribution évidente des conditions/changements écologiques et des facteurs anthropologiques (cf Leçon#2)

Schéma "historique"
de Joshua Lederberg



Sources de variation génétique chez les bactéries: **mutations**

Les génomes bactériens peuvent être altérés par la survenue de mutations ou par le transfert horizontal de gènes chromosomiques ou d'éléments accessoires (plasmides, transposons, intégrons) et bactériophages

Mutations: la fréquence de mutations varie entre 10^{-6} et 10^{-9} par paire de bases (f/phénotype mutateur)

Mutations ponctuelles, délétions, insertions (IS) et inversions

Peuvent conduire à des modifications significatives des "performances" des facteurs de virulence (colonisation, adhésion, invasion, survie intracellulaire/intratissulaire)

Peuvent toucher les gènes codant les facteurs eux mêmes ou ceux régulant leur expression

Peuvent aussi modifier des gènes codant pour les antigènes dominants du pathogène, entraînant son échappement à la réponse immunitaire

Sources de variation génétique chez les bactéries: **transfert horizontal de gènes**

Transposition: les transposons sont des segments d'ADN capables de s'intégrer dans de nouveaux sites identiques ou différents de leur site d'insertion d'origine
Des transposons conjugatifs peuvent promouvoir leur propre transfert interbactérien

Transformation: capture et intégration d'ADN exogène. Certaines espèces sont plus **compétentes** que d'autres pour la transformation

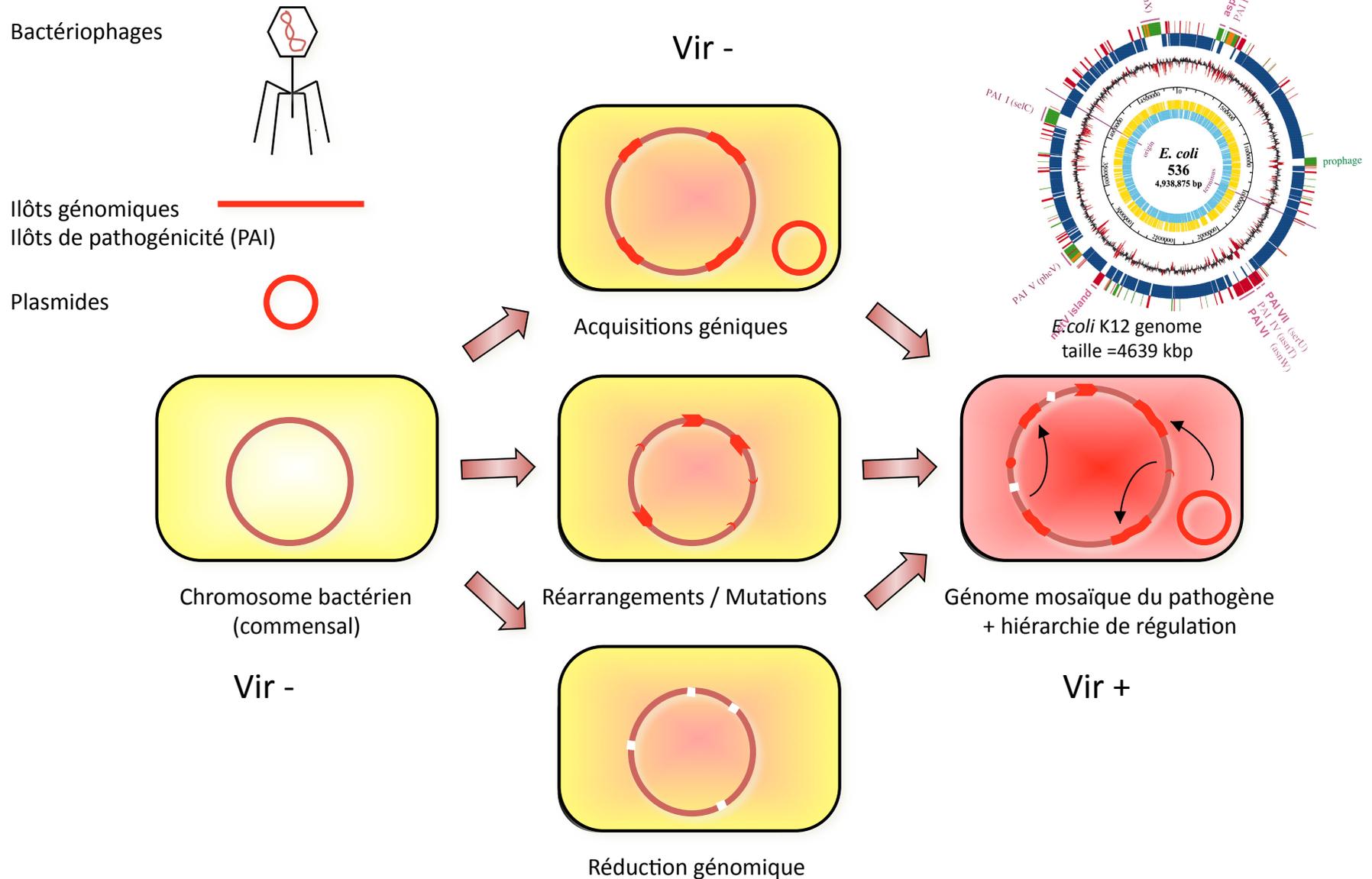
Plasmides: éléments autotransférables vecteurs de gènes présents sur des transposons/intégrons
Porteurs de gènes métaboliques, antibiorésistance, virulence, toxines

Conjugaison: transfert de fragments chromosomiques assuré par un plasmide intégré

Lysogénie: intégration d'un phage dans le chromosome bactérien lui offrant la capacité d'exprimer des gènes de virulence (toxines)

Transduction: transfert de fragments chromosomiques bactériens par l'intermédiaire d'un bactériophage

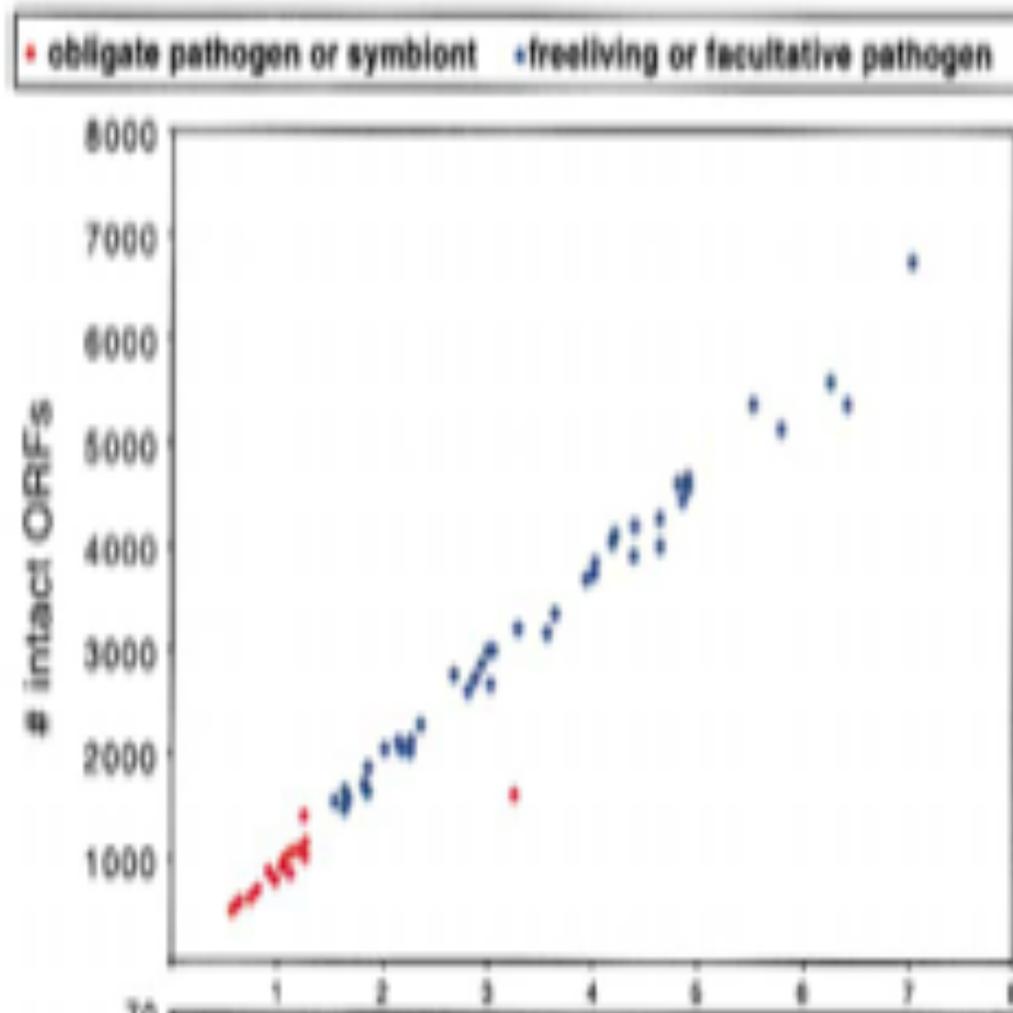
Construction d'un pathogène bactérien: combinaison **accrétion génomique** (transfert horizontal) et **dégradation/ réduction génomique** (mutations pathoadaptatives)



Microbial Minimalism: Genome Reduction in Bacterial Pathogens

Nancy A. Moran¹
Department of Ecology and Evolutionary Biology
University of Arizona
Tucson, Arizona 85721

Minireview



Evolution des pathogènes et émergence

1^{ère} étape (émergence stricto sensu): rencontre / saut d'espèce:

EHEC

Expansion dans réservoir animal et ou accroissement de la compétence vectorielle liée à une meilleure adaptation du pathogène à son vecteur (arthropode)

Y. pestis/Ymt/colonisation de la puce

à l'âge de bronze

Autres ?

Difficulté de datation de l'événement de l'altération génétique microbienne

2^{ème} étape (post-émergence) phase d'expansion: survie et croissance chez l'hôte, échappement aux mécanismes de défenses intrinsèques (immunité), extrinsèques (antibiotiques), accroissement de la transmissibilité (R_0 augmenté), accroissement de la croissance au sein des tissus

Synthèse

Changements écologiques/anthropologiques et évolution microbienne sont deux moteurs essentiels de l'émergence ou (la réémergence) de maladies infectieuses

Malgré l'extraordinaire potentiel de versatilité génétique des bactéries et des virus, les facteurs écologiques/anthropologiques dominant largement en tant que moteurs ("drivers") de l'épisode d'émergence

Cependant, ces épisodes de "spill over" ne seront consolidés que par l'existence d'une phase d'expansion où les opportunités d'altération génétique – donc d'adaptation - du pathogène sont maximales et leurs conséquences plus pertinentes et mesurables quant à leur effet sur la dynamique de l'épidémie

Deux points:

Des altérations génétiques accentuant virulence/résistance peuvent exiger un coût d'adaptation ("fitness cost") incompatible avec la survie et la transmissibilité à long terme du microbe en cause (ex: résistance à la vancomycine)

La phase d'expansion nécessite aussi l'intervention de facteurs écologiques et anthropologiques (fréquence des contacts, voyages, etc...)

Concept "éco-évo élargi"

La compréhension de la dynamique des émergences exige donc l'établissement d'une solide interface "écologie-évolution"

Création d'un contexte global de recherche entre microbiologistes, biologistes de l'évolution, écologistes et (maintenant) anthropologues

Défis:

Développer des approches intégrant biologie du pathogène et de l'hôte dans les modèles épidémiologiques d'émergence = essentiel pour la prévention

Analyse des phases précoces de l'épidémie et anticipation de leur développement
Développement de vaccins

Compréhension des mécanismes de résistances des microorganismes et de leurs vecteurs

Analyse génomique comparative et phylogénique des pathogènes maintenant essentielles pour "tracer" les voies de transmission intra/inter-espèces et anticiper l'efficacité de transmission

Analyse des cycles infectieux animaux/vecteurs (one world-one health) et étude des interactions hôtes-pathogènes

Evolution microbienne et émergence (2^{ème} étape)

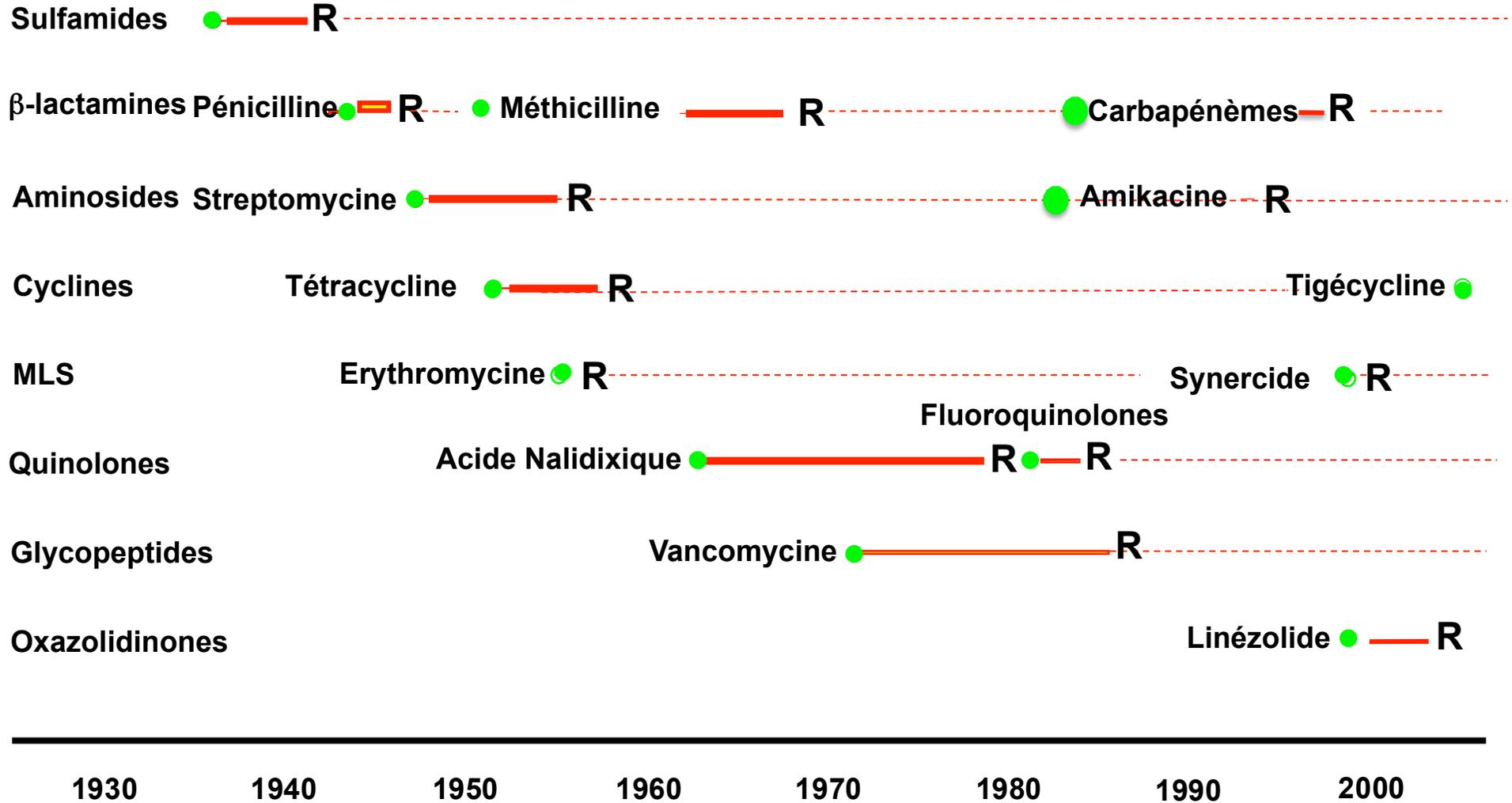
Antibiorésistance

Echappement aux vaccins

Antibiotiques et survenue de la résistance

● Introduction en clinique

R Apparition de la résistance



Résumé des mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques (1)

Protection de la cible de l'antibiotique:

- Mutation rendant la bactérie insensible à l'antibiotique

Mutations dans les PBP: résistance progressive aux BETA-LACTAMINES

Mutation dans la RNA polymérase, résistance à RIFAMPICINE

Mutations dans des protéines ribosomales, résistance à STREPTOMYCINE

- Modification secondaire par une enzyme

Modification composition ponts peptidiques PGN, résistance à VANCOMYCINE

Méthylation d'un résidu Adénine dans l'ARN ribosomal 23S rendant la souche insensible aux MACROLIDES

- Remplacement de la cible comme les protéines de protection du ribosome rendant la bactérie insensible aux TETRACYCLINES

- **Protection contre l'accès de l'antibiotique à sa cible:** pompes à efflux

- **Protection physique empêchant l'accès de l'antibiotique:** production d'exopolysaccharide et ADN dans la matrice des biofilms et piégeant l'antibiotique qui ne peut atteindre sa cible

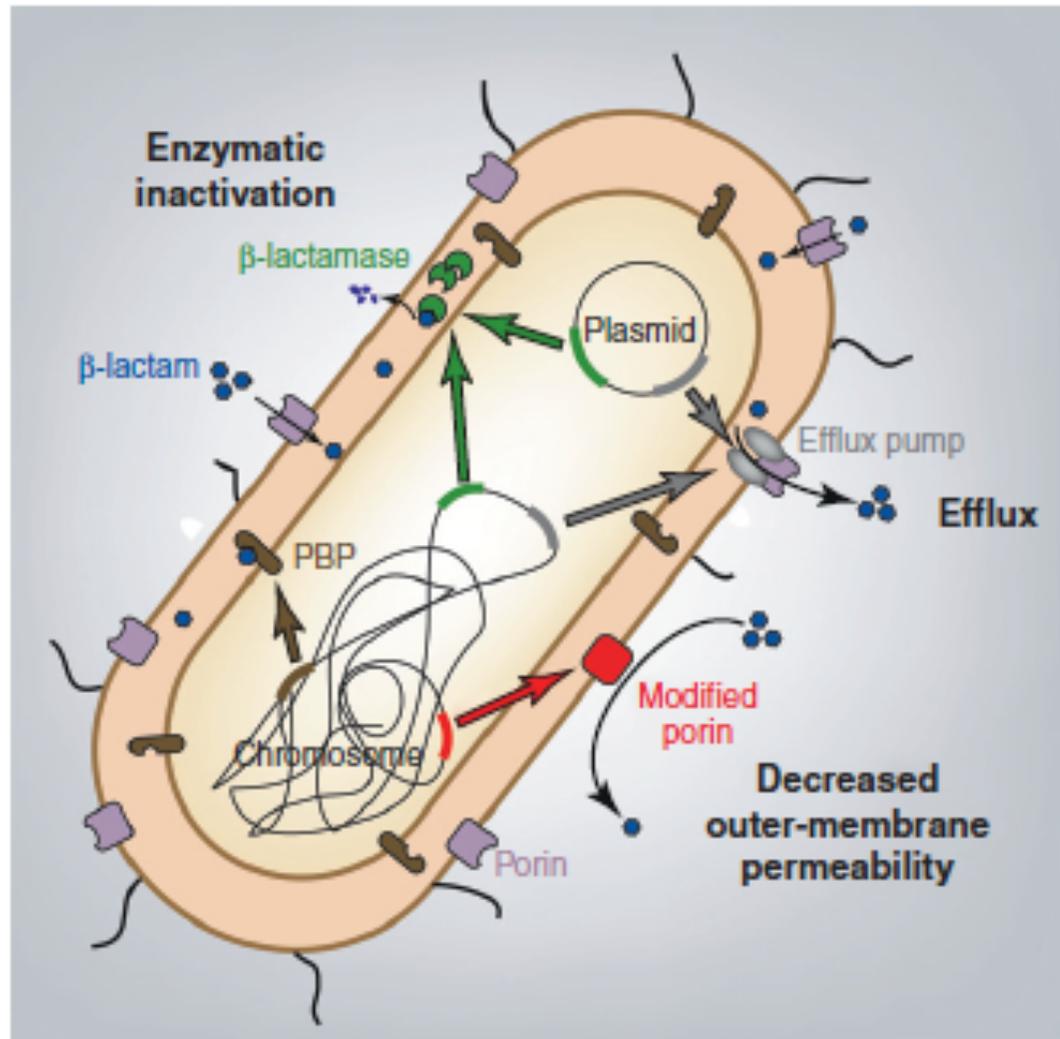
2 types = SPECTRE LARGE DE RESISTANCE

Résumé des mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques (2)

Modification / destruction de l'antibiotique:

- Modification secondaire par une enzyme
Acétylation, phosphorylation des AMINOGLYCOSIDES
- Destruction par une enzyme hydrolytique
Destruction des BETA-LACTAMINES par les beta-lactamases

Synthèse des principaux mécanismes "actuels" d'antibiorésistance



D'après Nordmann & coll

Causes principales de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques

Utilisation suboptimale des agents antiinfectieux pour la prophylaxie et le traitement des infections

Hospitalisations prolongées, augmentation du nombre et de la durée des séjours en unités de soins intensifs

Comorbidités chez les malades hospitalisés et utilisation accrue de dispositifs invasifs (catheters, etc...)

Non respect ou inefficacité des pratiques de contrôle des infections dans les hôpitaux, transferts de malades colonisés d'hôpitaux à hôpitaux

Maintien/regroupement prolongé de patients colonisés au sein de structures médicales

Utilisation indiscriminée des antibiotiques dans l'agriculture et l'élevage

Le transfert latéral de gènes (TLG) est à la base du réarrangement et de l'évolution des génomes chez les procaryotes.

L'étendue des réarrangements est considérable: 25 % du génome, dans certaines espèces, dérive de TLG sur de longues périodes évolutives
Evidences d'évolution à plus court terme chez certains pathogènes comme *E. coli* dont le pangénome atteint 20 000 gènes pour environ 3500 gènes pour un génome individuel (Touchon & coll, 2009, PLoS Genetics)

Résistance aux antibiotiques = exemple le plus clair d'évolution accélérée, mue par TLG sous pression sélective

Les bactéries peuvent compter - grâce à l'énorme résistome existant - sur un potentiel constant d'évolution par un flux de gènes capables de passer les barrières phylogéniques (même Gram+/Gram-)

Différent de la sélections de polymorphismes générés par des évènements mutationnels rares chez les eucaryotes (excepté dans le système immunitaire)

Ne veut pas dire que des mutations ponctuelles ne jouent pas un rôle, mais bien moindre

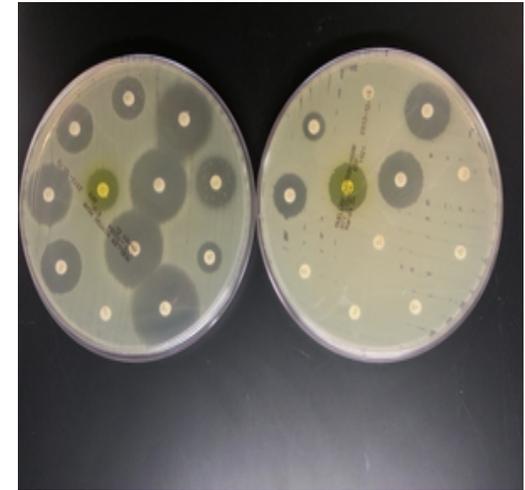
Résistome

Ensemble des gènes de résistance à un ou plusieurs antibiotiques dans une situation donnée:

Isolat / clone bactérien émergent

Pangénome d'une espèce

Niche polymicrobienne (microbiome intestinal)



Ensemble des génomes de toutes les espèces séquencées !

Base de données = annotation de l'ensemble des données de séquences de génomes bactériens disponibles = 20 000 gènes potentiels de résistance de 400 types différents

Tous ne sont pas fonctionnels ou ne codent que pour des molécules candidates, mais donnent une idée du "résistome" global potentiel (Liu & Pop, 2009, Nucleic Acid Res)

Causes de la capacité d'émergence et d'extension de la résistance des bactéries aux antibiotiques

Richesse du "résistome" = répertoire global de gènes potentiels de résistance aux antibiotiques

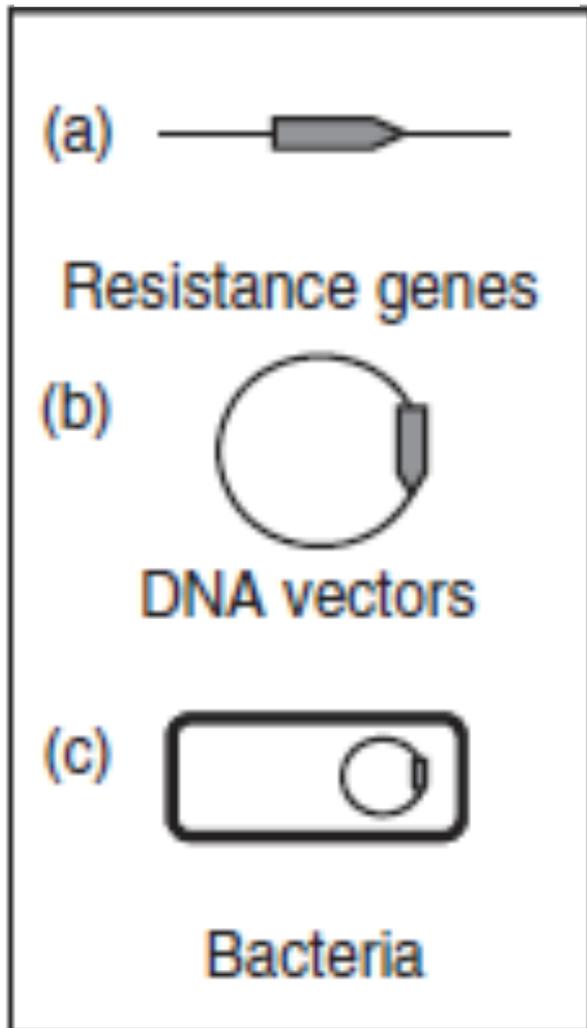
Efficacité de dissémination des vecteurs des gènes de résistance, plasticité génomique

Unicité du monde microbien: homme/animal/environnement

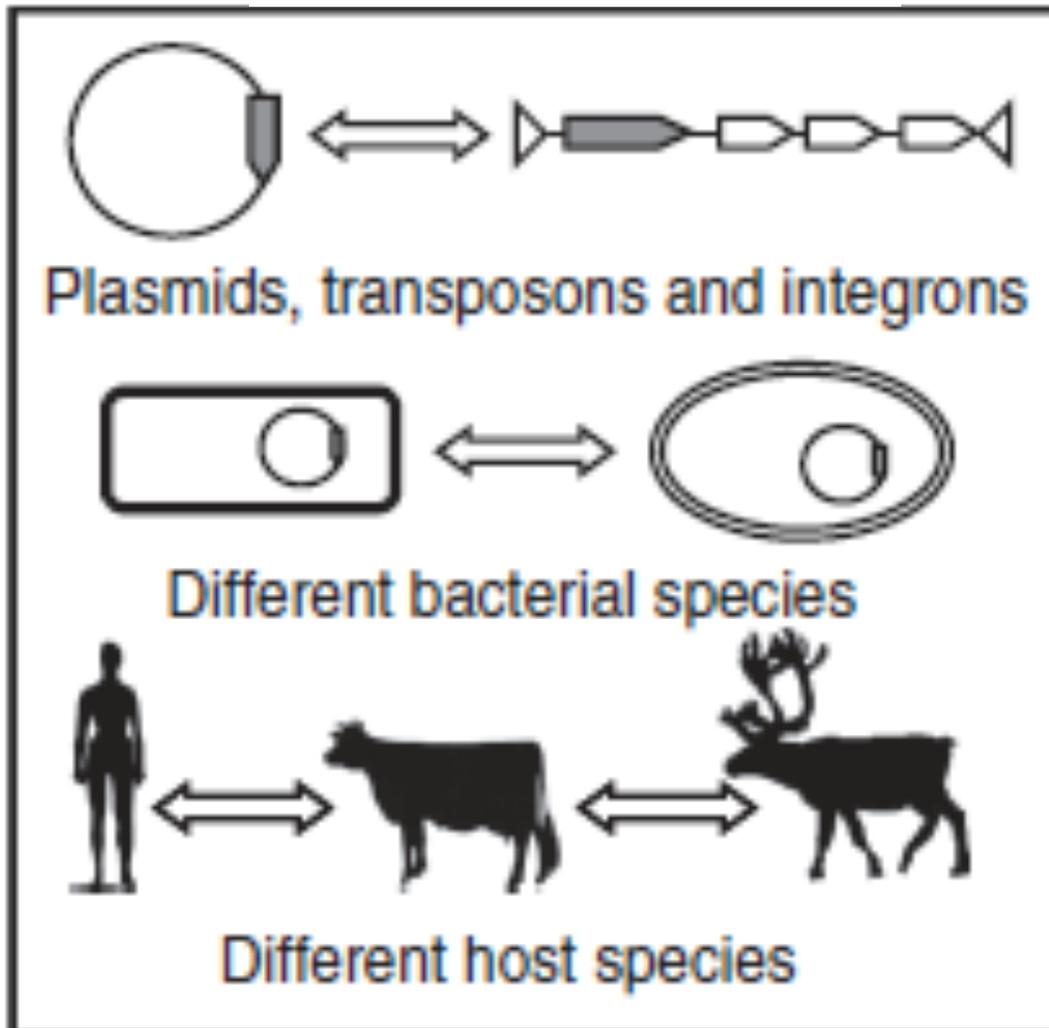
Amplification par l'augmentation des échanges nationaux et internationaux

Différentes perspectives du mouvement et de la mobilisation de gènes assurant la résistance aux antibiotiques (Stokes & coll, 2011, FEMS Microbial Rev)

Unités de transfert



Vecteurs & receveurs

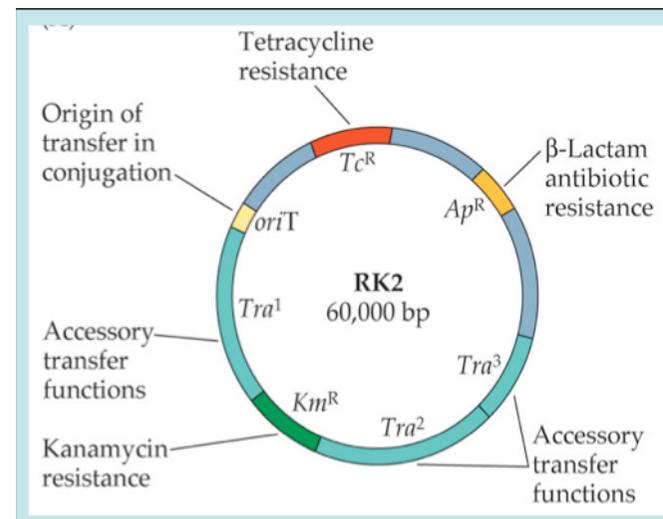
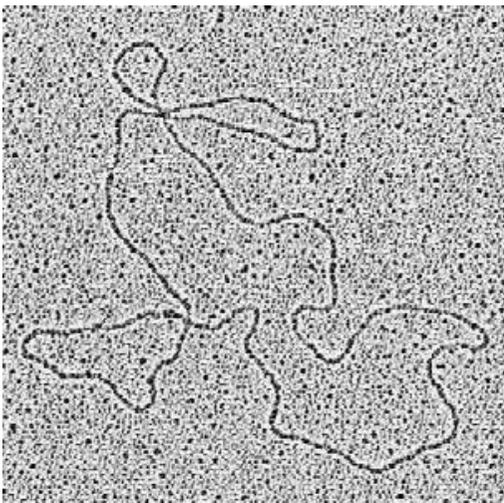


Vecteurs du transfert horizontal de gènes: **plasmides**

Plasmides: structures autoreplicatives, (le plus souvent) circulaires, extrachromosomiques, (souvent) autotransférables par conjugaison, de taille variable allant de quelques kilobases à plusieurs centaines de kilobases

Sans conteste le vecteur le plus efficace pour transmettre horizontalement des gènes et leurs éléments génétiques porteurs (transposons/intégrons) de bactérie à bactérie, dans de nombreux environnements.

Caractéristiques fondamentales: taille, incompatibilité, exclusion d'entrée, transfert, réplication (Novick 1969, Falkow, 1975)



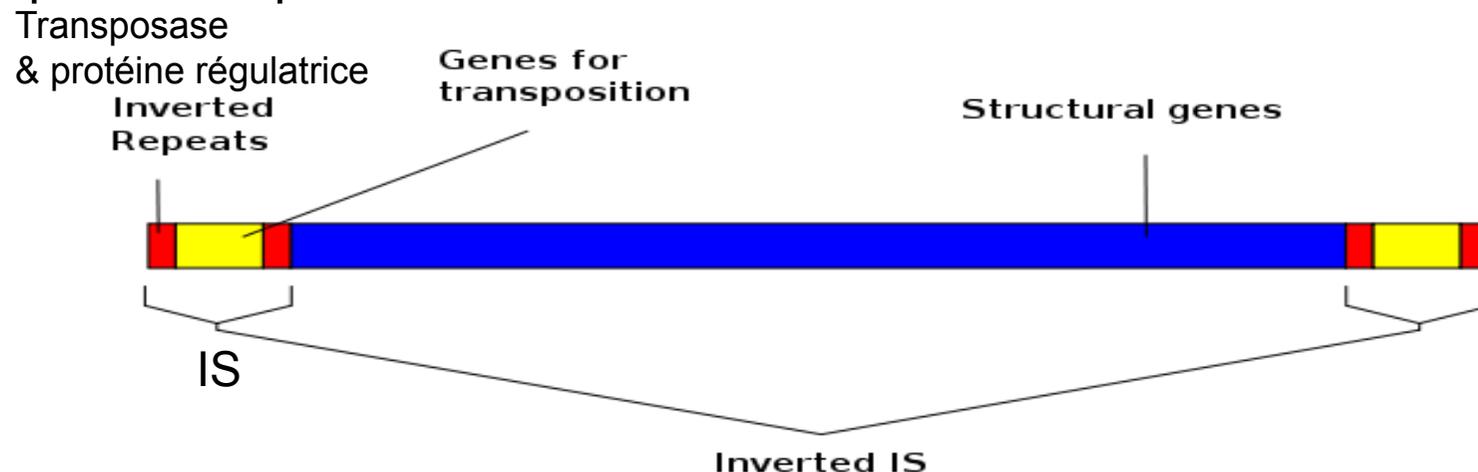
Vecteurs de sauts géniques entre chromosome et plasmides (plasmide-plasmide): **transposons**

Séquences d'insertion (IS) = Eléments transposables les plus simples

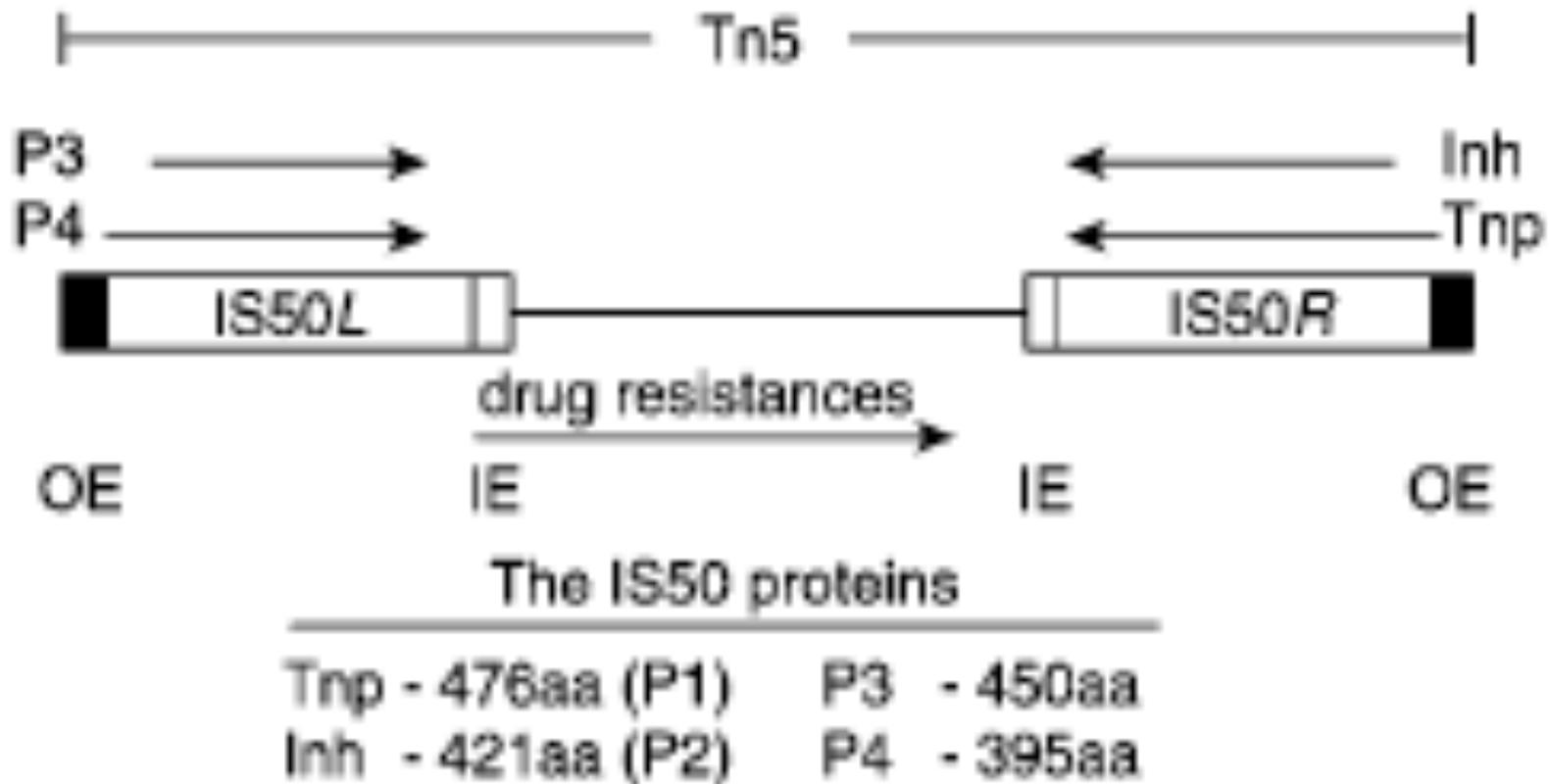
- Un gène codant une transposase encadré par des séquences répétitives inversées (inverted repeat sequences), limitant l'IS et site de reconnaissance par la transposase
- Reconnaissance sur la cible de deux courtes séquences directement répétées (direct repeat sequences).

Transposon = IS transportant d'autres gènes (résistance aux antibiotiques, métaux lourds, antiseptiques). Toujours encadré de deux IS assurant le saut d'une structure génétique à une autre.

La transposase ne peut fonctionner que si elle reconnaît à la fois les deux courtes séquences répétées sur l'ADN cible et ses propres séquences répétitives inversées.



Tn5: transposon modèle



Deux séquences cibles:

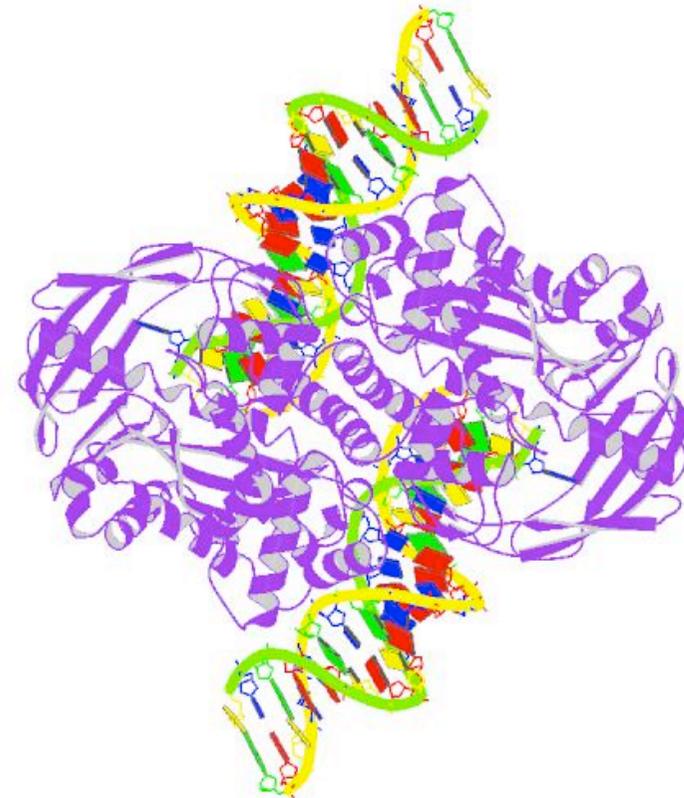
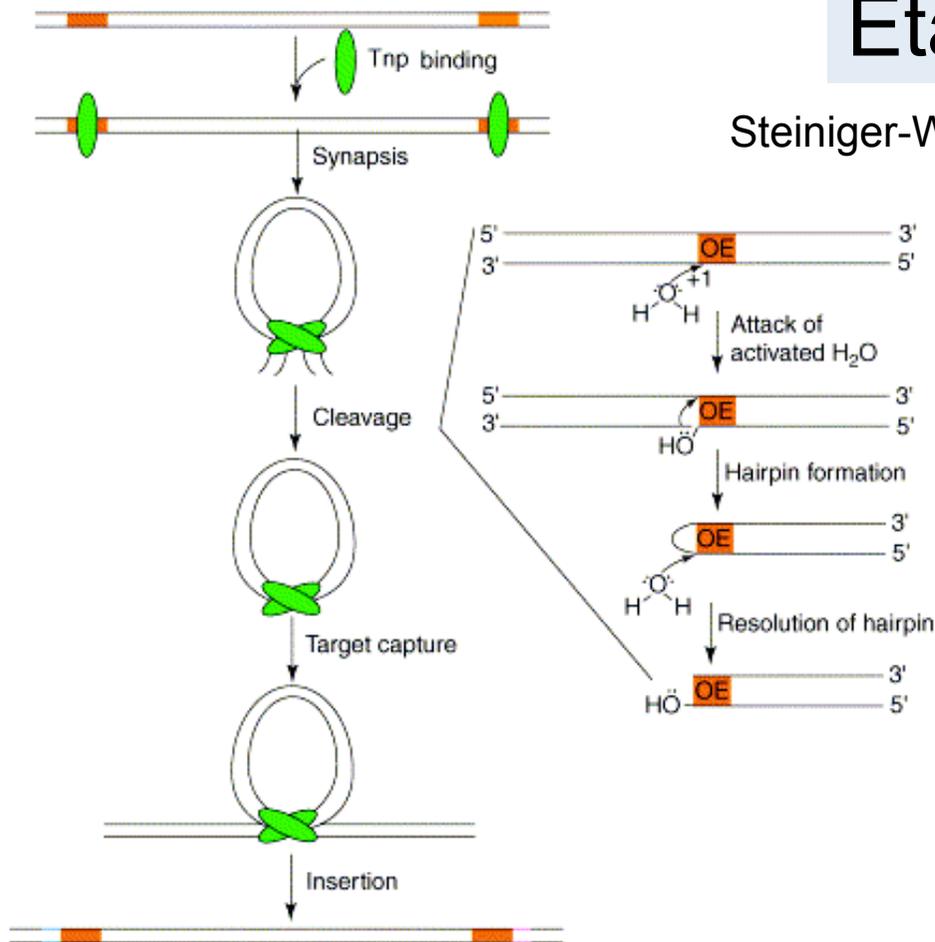
IE (inner): 5'CTGTCTCTTGATCAGATCT3'

OE (outer): 5'CTGACTCTTATACACAAGT3'

Tnp peut se lier indifféremment à OE et IE, mais doit se lier aux deux OE pour que l'évènement d'excision-transposition survienne

Etapes de la transposition

Steiniger-White & coll. 2004 Curr Opin Structural Biology



Transposition débute lorsque deux monomères de Tnp se lient respectivement aux deux séquences cibles OE

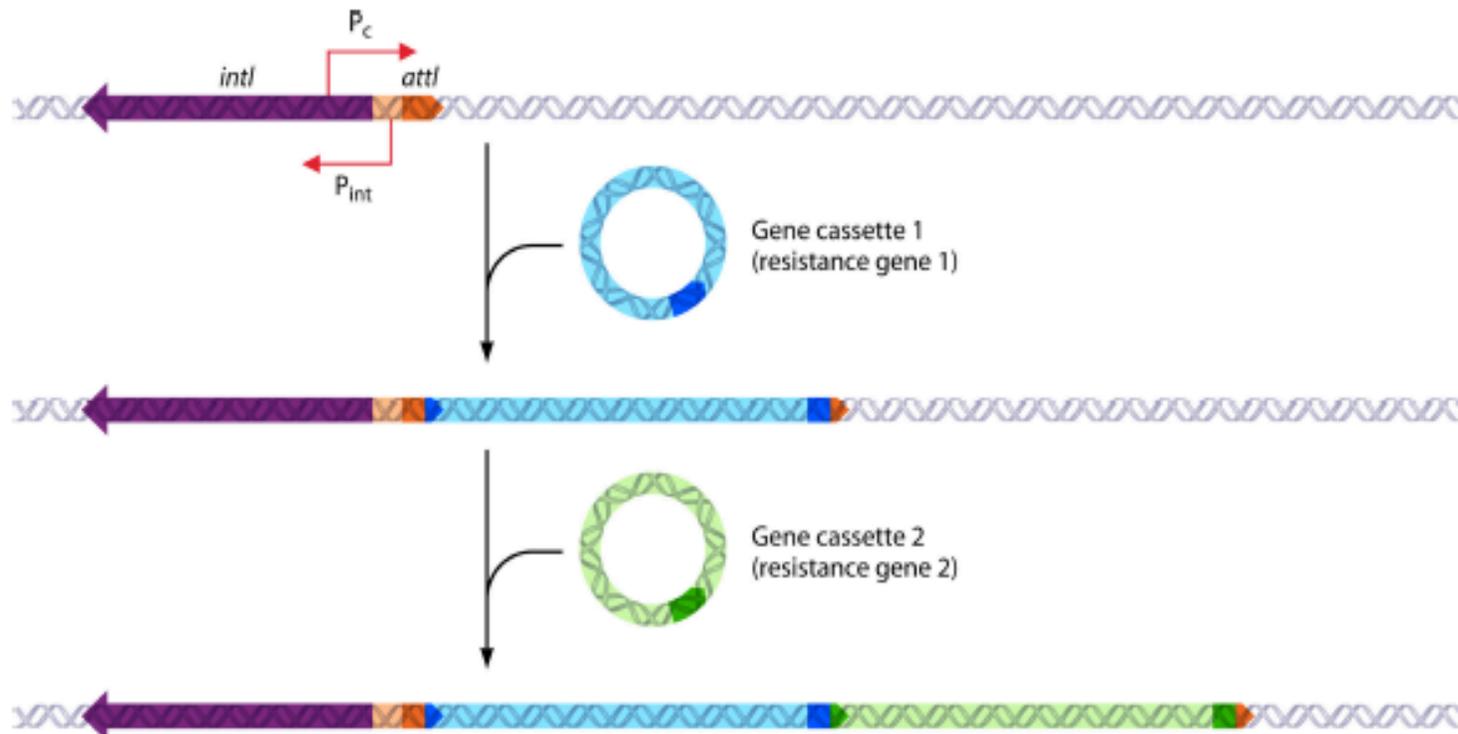
Homodimérisation par l'extrémité C-terminale formant un "complexe synaptique" qui coupe (ouverture de la liaison phosphodiester) l'ADN et expose l'extrémité 3' de OE (ou IE ?)

Attaque nucléophile du brin opposé d'ADN formant une structure intermédiaire en épingle à cheveu à chaque extrémité.

Extrémité 3' régénérée, permettant attaque nucléophile côté 5' et intégration dans l'ADN cible.

Pas de séquence signature de reconnaissance sur l'ADN hétérologue "hot spots" riches en AT

Porteurs/vecteurs de cassettes de résistance: **intégrons**



Principalement chez les bactéries à Gram négatif. Capture, expression, dissémination de gènes permettant l'adaptation bactérienne à des contraintes environnementales (antibiotiques, etc...)

Structure et processus de capture de cassettes:

Intégrase (*int*) + promoteurs (P_{int} & P_c) à son extrémité 3' et **séquence d'attachement/insertion** (*attI*)

Intégrase catalyse l'intégration séquentielle de cassettes de résistance, créant, grâce au promoteurs une structure d'opéron où les gènes de résistance vont être transcrits à partir du promoteur P_{int} .

Vecteurs du transfert horizontal de gènes: intégrons

Très anciens (Mazel & coll, 2006)

Système de recombinaison spécifique de site capable de capturer des gènes individuels localisés sur des cassettes mobiles (Stokes & Hall, 1989)

Plusieurs classes sur la base de la séquence de la recombinase

Quasi exclusivement les Int de classe 1 transmettent des résistances

Pourquoi ? pourquoi si abondants ?

- Essentiellement localisés dans des éléments génétiques très mobiles: plasmides et transposons. Le plus souvent associés aux "restes" d'un Tn (Tn402/Tn5070) ayant perdu son module de transposition (Shapiro & Sporn, 1977). Complémentations en trans.

- Intégrons-Tn402 et équivalents = "Res hunters" qui ciblent le complexe de résolution (Résolvase/Res) important dans la replication et/ou la mobilité des plasmides et des transposons (Kholiidi & coll, 1995)

- Isolat de *P. aeruginosa* du permfrost datant de 15 000 ans montre un intégron de classe 1 présentant toutes les caractéristiques d'un intégron d'isolat clinique de la période antibiotique... (Peron & coll, 2015, PLoS One)

Diversité d'intégrons codant pour des enzymes de résistance, Gram -

Intégrons de classe 1

Résistance aux β -lactamines

β -lactamases classes A, C, D

β -lactamases classe B

Résistance aux aminosides

6' - acétyltransférases

3 - acétyltransférases

2'' - adénylyltransférases

3'' - adénylyltransférases

Résistance au chloramphénicol

acétyltransférases

mécanisme non enzymatique

Résistance au triméthoprim

dihydrofolate réductases

classes A et B

Résistance à la rifampicine

ADP-ribosyl transférase

Résistance à l'érythromycine

érythromycine estérase

Résistance aux ammoniums quaternaires

Rôle des antiseptiques, en particulier des ammonium quaternaires, comme pression sélective ?.

Intégrons de classe 2

Résistance aux aminosides

3'' - adénylyltransférases

Résistance à la streptomycine

acétyltransférase

Résistance au triméthoprim

dihydrofolate réductases

classes A et B

Intégrons de classe 3

Résistance aux β -lactamines

β -lactamases classe B

Résistance aux aminosides

6' - acétyltransférases

Pourquoi certains éléments mobiles sont-ils plus associés à des gènes de résistance aux antibiotiques?

Coïncidence ?...

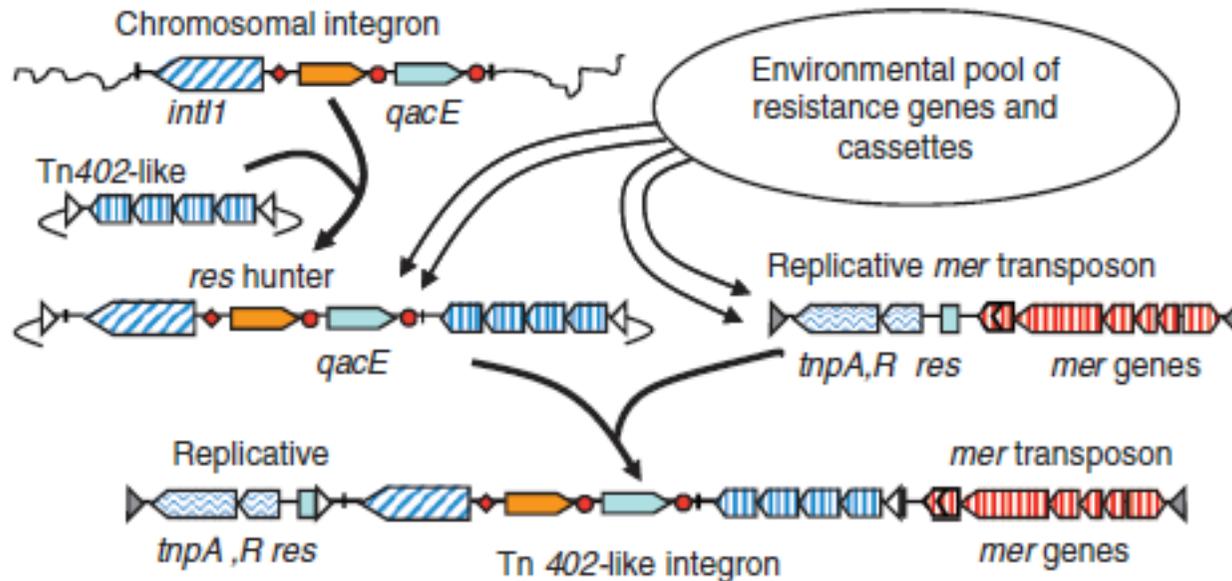
Certains groupes d'éléments mobiles pourraient avoir été pré-conditionnés pour diffuser au sein de certaines espèces bactériennes.

Transposons codant pour résistance au mercure. Existaient bien avant l'apparition des antibiotiques modernes par nécessité de détoxification du mercure très prévalent dans l'environnement (réaction de réduction indispensable avec l'apparition de l'O₂ sur la planète qui a rendu le mercure toxique, Barclay & coll, 2010)

Relai plus récent par antiseptiques contenant du mercure ?

Ayant commencé à capturer des gènes de résistance aux antibiotiques, ce sous-groupe de transposons a pu assurer une rapide évolution des bactéries hôtes sous pression sélective des antibiotiques (Kholodii & coll, 2003).

Modèle de construction séquentielle d'éléments génétiques "ultramobiles" au sein des bactéries à Gram - "contemporaines"



Les désinfectants ont sélectionné des gènes de résistance aux ammoniums quaternaires dans des intégrons de classe 1 avant les antibiotiques. Cette structure s'est liée à Tn402 (Tn délété) et est devenue mobile. L'usage des antibiotiques y a amené le recrutement de gènes d'antibiorésistance. En parallèle, la contamination de l'environnement microbien (naturelle et thérapeutique) par le mercure a permis le recrutement indépendant de gènes d'antibiorésistance en association avec la résistance au mercure. Les capacités de "res-hunting" (préférence d'insertion dans gène de la résolvasse (*res*) du transposon cible) de Tn402 ont permis de fusionner les système en un élément complexe.

Antibiotiques et résistance aux antibiotiques: longue co-évolution, récente accélération

Ere pré-antibiotique:

Pool global de gènes mobiles, mobilisables et d'éléments génétiques mobilisateurs

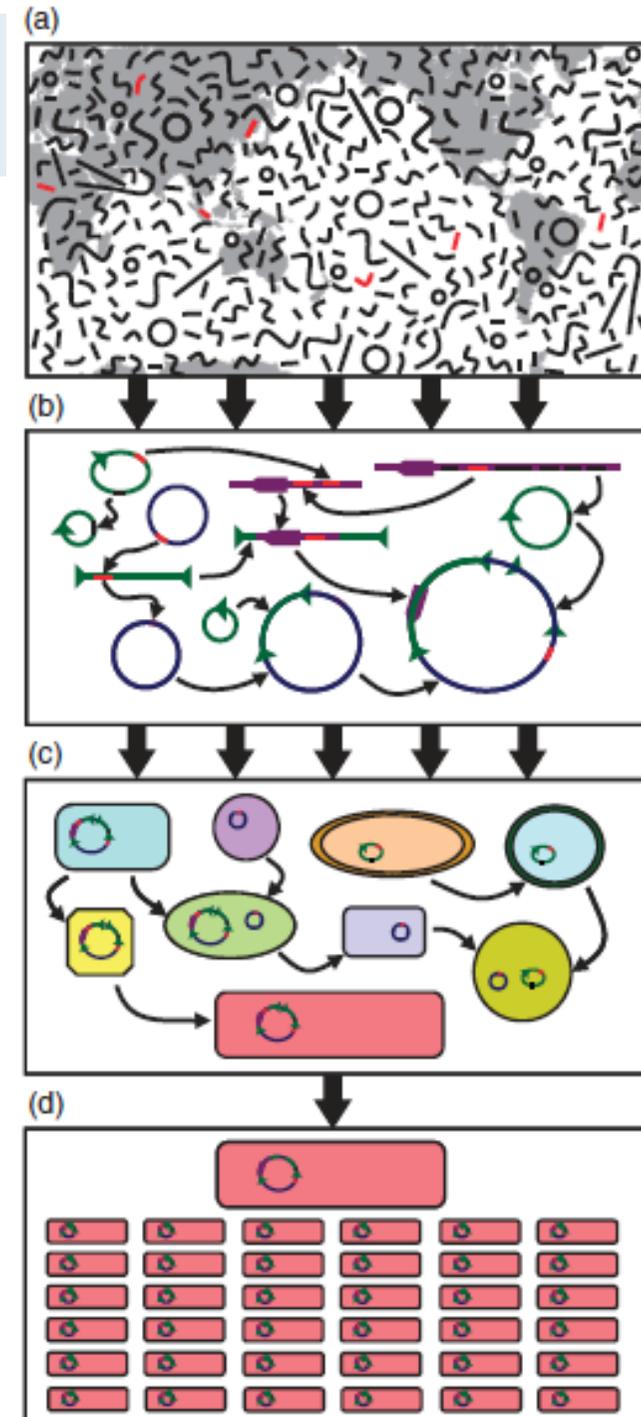
Ere pré- et post-antibiotique:

réarrangement aléatoire d'éléments génétiques mobiles et de gènes d'adaptation à l'environnement de niches variées

Les éléments mobilisateurs touchent des communautés microbiennes diverses, y compris les pathogènes humains

Ere post-antibiotique:

Puissante pression sélective sur les pathogènes humains ayant acquis les gènes de résistance



Evolution microbienne et émergence (2^{ème} étape)

Antibiorésistance

Echappement aux vaccins

Adaptation microbienne et échappement aux vaccins

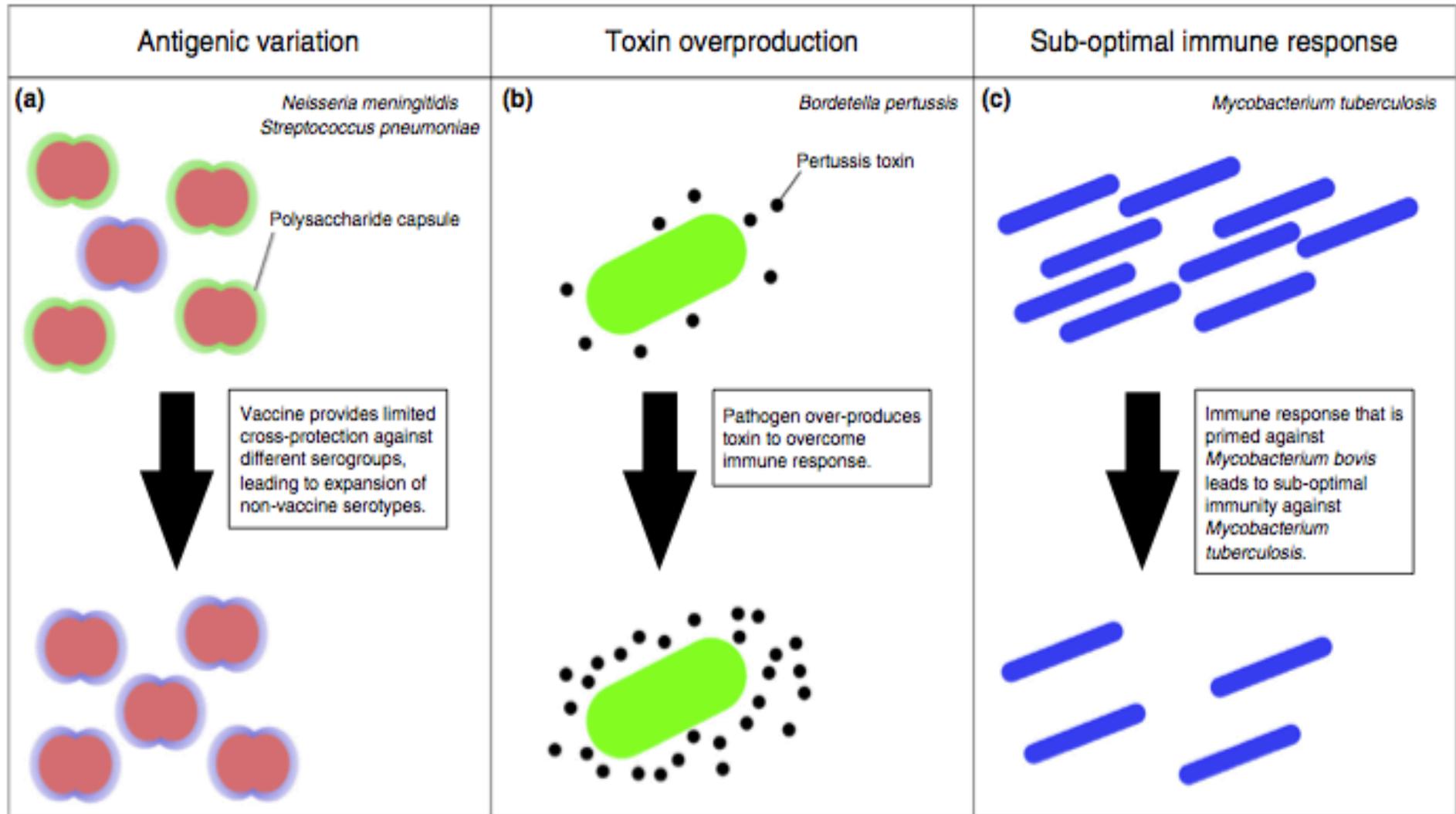
La vaccination universelle établit maintenant une pression sélective à l'échelle de la planète facilitant la sélection de mutants "d'échappement"

La pression sélective immunologique va-t-elle se manifester à une échelle comparable à celle des antibiotiques ?

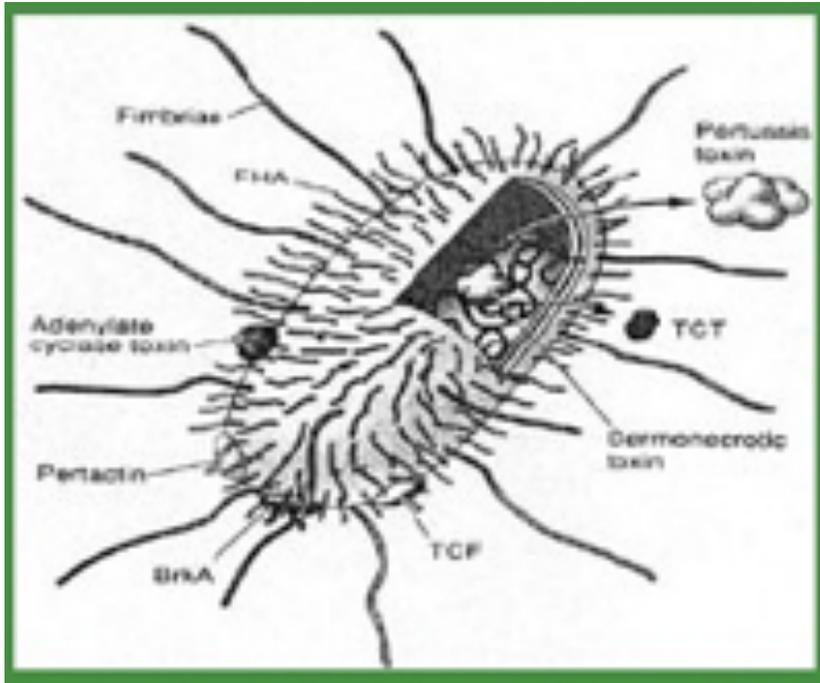
Situations:

- Coqueluche
- Pneumocoque, sérotype 19

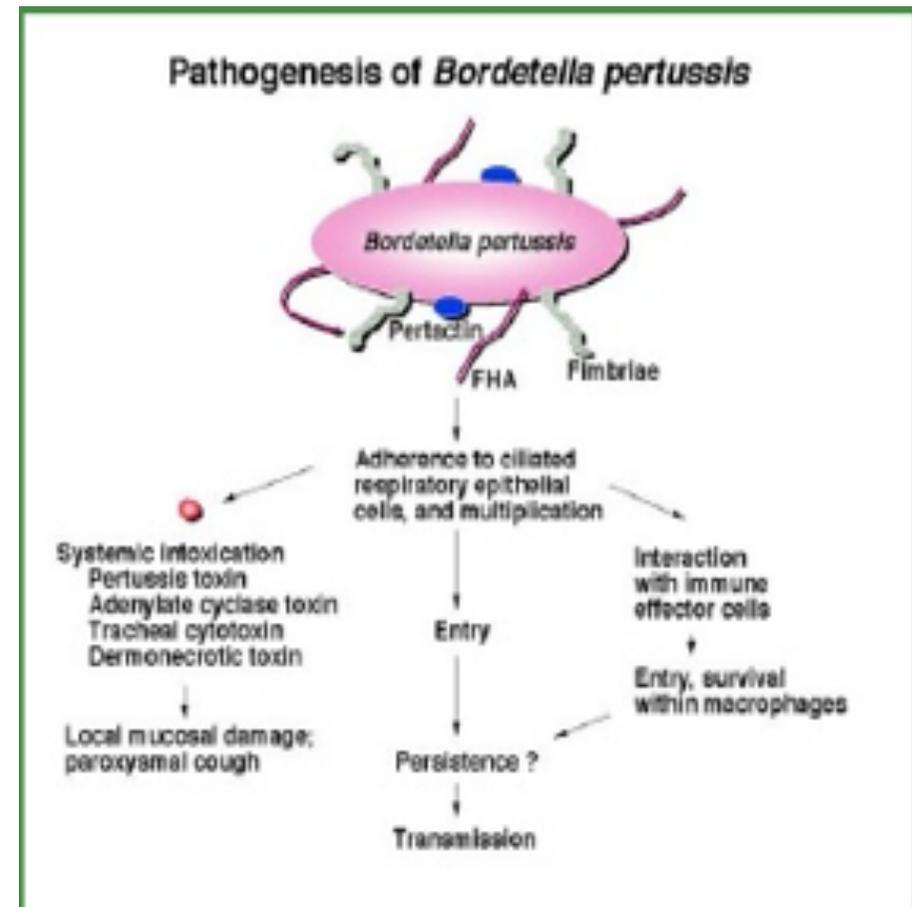
Mécanismes d'échappement des bactéries pathogènes aux vaccins



Vaccins coqueluche cellulaires et acellulaires

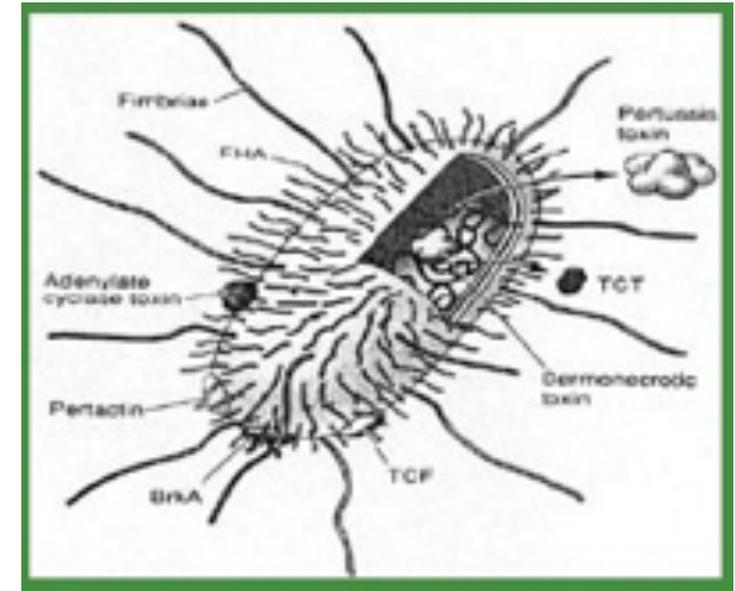


Contrôle régulon BvgAS
(senseur membranaire à deux composants.)



Des incertitudes au sujet du vaccin coqueluche

Le vaccin "classique" cellulaire inactivé efficace mais mal toléré a été progressivement remplacé depuis les années 1990 par des vaccins sous-unités



Ces vaccins sous-unités contiennent:

- Toxine Pertussis détoxifiée (chimiquement ou génétiquement)
- Hémagglutinine filamenteuse (FHA)
- Pertactine (protéine de membrane externe de 69 kd)
- Antigènes fimbriaux 2 & 3

Vaccins adjuvantés mieux tolérés, mais d'efficacité et de durée de protection moindre.

Semble créer des formes cliniques atténuées, atypiques, non diagnostiquées et facilitant la circulation du bacille coquelucheux. Repousse l'âge de la maladie chez adolescents et jeunes adultes

Bordetella pertussis vers une régression génomique sous pression sélective vaccinale

Bordetella pertussis (et *Bordetella parapertussis*) persistent avec un contrôle relatif de la maladie (cycles de 4-5 ans), continuent à circuler au sein de leur réservoir humain exclusif et évoluent:

Les isolats cliniques identifiés ont montré une dérive par rapport au clone Tohama utilisé pour préparer le vaccin cellulaire tué après la généralisation de celui-ci

Polymorphismes accumulés +

Augmentation de l'expression de la Toxine Pertussis (Ptx) (Mooi. 2012. Infect Genet Evol)

Perte de l'expression de facteurs de virulence

Ptx (Bouchez et al. 2009. Vaccine)

FHA (Mastrantonio et coll. 1999. Microbiology; Zaretzky et coll. 2002. Mol Microbiol)

Pertactine (Otsuka et coll. 2012. PLoS One)

La perte de la Pertactine (Prn-) s'est récemment accélérée sous la pression du vaccin sous-unité, touchant environ 15 % des isolats en France (Hegerle & Guiso. 2014. Exp Rev Vaccines), jusqu'à 80 % des isolats aux USA (Pawloski et coll. 2013. Clin Vaccine Immunol)

Signification de la perte de l'expression de la Pertactine pour l'efficacité du vaccin sous-unités ?

Prevalence and Genetic Characterization of Pertactin-Deficient *Bordetella pertussis* in Japan

Nao Otsuka, Hyun-Ja Han^{1a}, Hiromi Toyozumi-Ajisaka, Yukitsugu Nakamura, Yoshichika Arakawa^{1b}, Keigo Shibayama, Kazunari Kamachi*

Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

121 souches isolées entre 1990 et 2009

33 Prn- (27 %)

Tous portant l'allèle *prn1* de la souche vaccinale

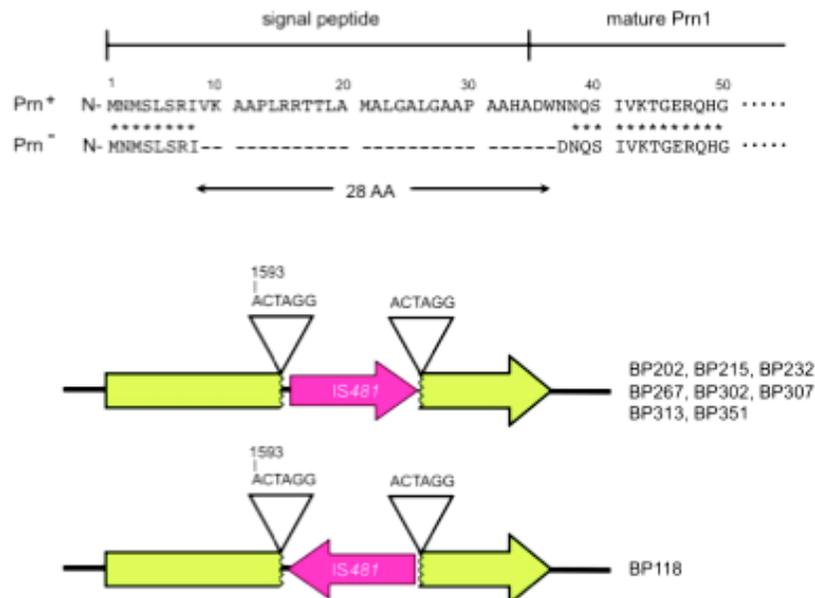
Avantage de croissance Prn1- sur Prn1+

Deux types de mutations:

1 – Délétion de 84 bp dans la séquence signal de *prn1* (*prn1*ΔSS)

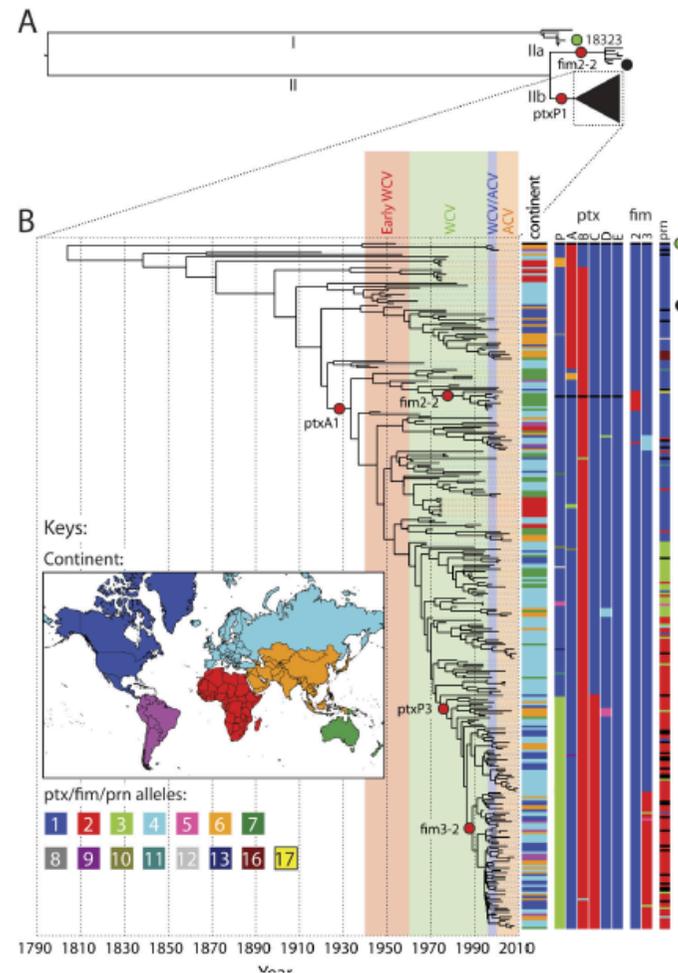
Fréquence accrue depuis les années 2000

2 – Insertion IS481 dans le gène de structure *prn1*



Global Population Structure and Evolution of *Bordetella pertussis* and Their Relationship with Vaccination

Marieke J. Bart,^{a,b} Simon R. Harris,^c Abdolreza Advani,^d Yoshichika Arakawa,^e Daniela Bottero,^f Valérie Bouchez,^{g,h} Pamela K. Cassiday,ⁱ Chuen-Sheue Chiang,^j Tine Dalby,^k Norman K. Fry,^l María Emilia Gaillard,^f Marjolein van Gent,^a Nicole Guiso,^{g,h} Hans O. Hallander,^d Eric T. Harvill,^m Qlushui He,ⁿ Han G. J. van der Heide,^a Kees Heuvelman,^a Daniela F. Hozbor,^f Kazunari Kamachi,^e Gennady I. Karataev,^o Ruiting Lan,^p Anna Lutyńska,^q Ram P. Maharjan,^p Jussi Mertsola,^r Tatsuo Miyamura,^e Sophie Octavia,^p Andrew Preston,^s Michael A. Quail,^c Vitali Sintchenko,^{t,u} Paola Stefanelli,^v M. Lucia Tondella,ⁱ Raymond S. W. Tsang,^w Yinghua Xu,^x Shu-Man Yao,^j Shumin Zhang,^x  Julian Parkhill,^c Frits R. Mooi^{a,b}



Vaccins polysaccharidiques conjugués



Polysaccharide-Protein Conjugates: A New Generation of Vaccines

John B. Robbins and Rachel Schneerson

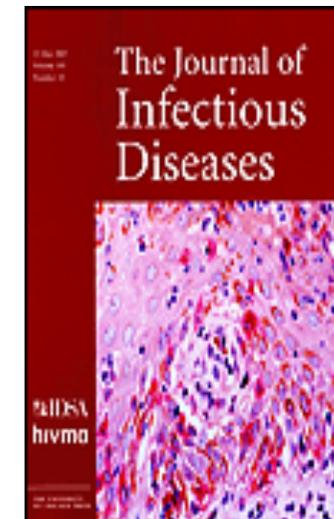
The Journal of Infectious Diseases

Vol. 161, No. 5 (May, 1990), pp. 821-832

(article consists of 12 pages)

Published by: Oxford University Press

Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/30132387>



IDSA MEETING PRESENTATIONS

Polysaccharide-Protein Conjugates: A New Generation of Vaccines

John B. Robbins and Rachel Schneerson

*From the Laboratory of Developmental and Molecular Immunity,
National Institute of Child Health and Human Development, National
Institutes of Health, Bethesda, Maryland*

What has been is that which shall be: and that which is done
is that which will be done: and there is nothing new under
the sun. — *Ecclesiastes i, 9*

surface antigens include CP of both gram-negative and
gram-positive bacteria and the lipopolysaccharides (LPS) of
gram-negative bacteria. When purified, most of these poly-

Vaccins polyosidiques capsulaires

Polyosides purifiés

Antigène polyosidique capsulaire purifié.

T-indépendant, faiblement immunogène chez le nourrisson.

1946 : *Streptococcus pneumoniae*

1989 : *Salmonella typhi* Ag Vi

Polyosides purifiés-conjugués

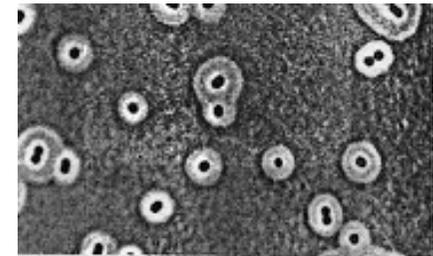
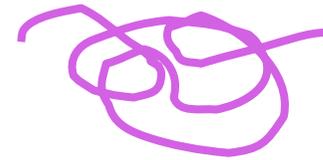
Liaison covalente du polyoside capsulaire à une protéine « carrier » assurant une réponse T-auxiliaire particulièrement utile chez le nourrisson.

Après injection parentérale, les anticorps (IgG) induits sont protecteurs au niveau systémique, mais aussi muqueux. Protection contre la colonisation !

1987 - 1993 : *Haemophilus influenzae* b (Hib)
(Schneerson & Robbins)

2001 : *Neisseria meningitidis* C

2001 : *Streptococcus pneumoniae* (7/23 sérotypes)



Réalités microbiologiques:
Immunisation contre les infections sévères à
pneumocoques = pneumonie, septicémie, méningite,
otite aiguë

91 sérotypes capsulaires connus

Vaccins conjugués:

7 valences: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F

23 valences: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14,
15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F,33F

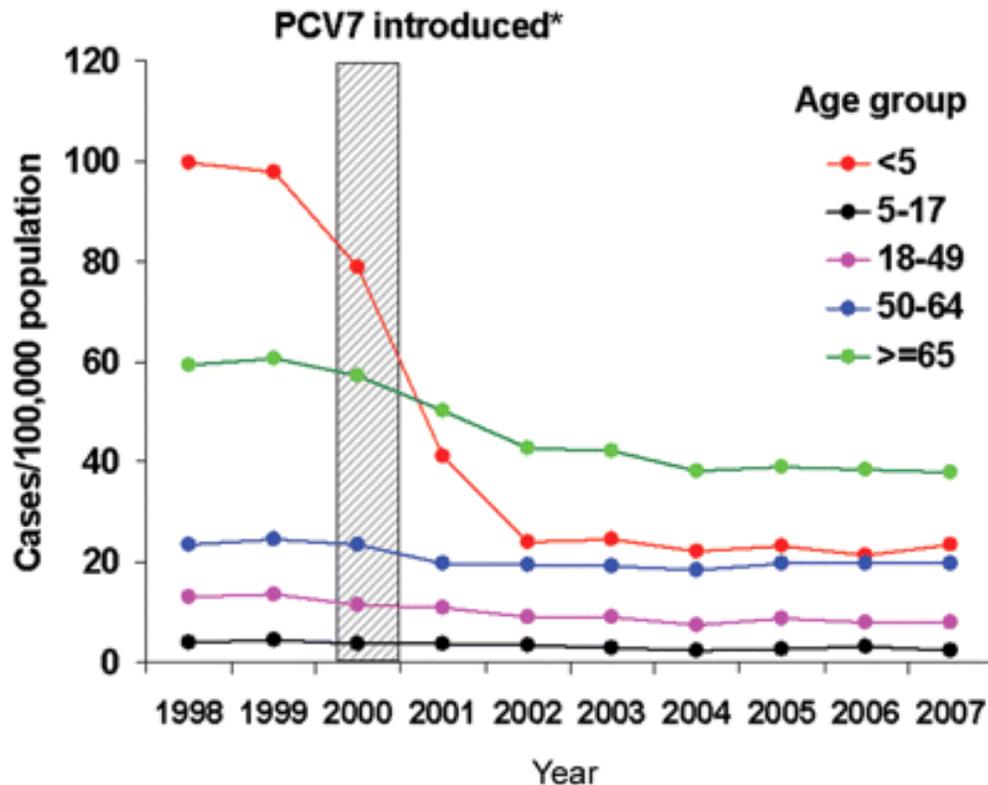
Anatoxine diphtérique. CRM197

Adsorption sur phosphate d'aluminium

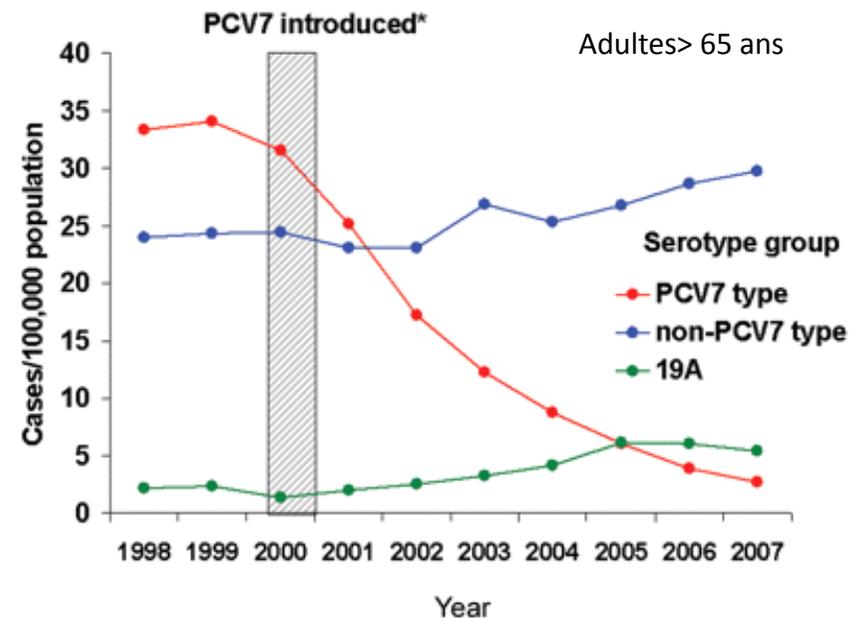
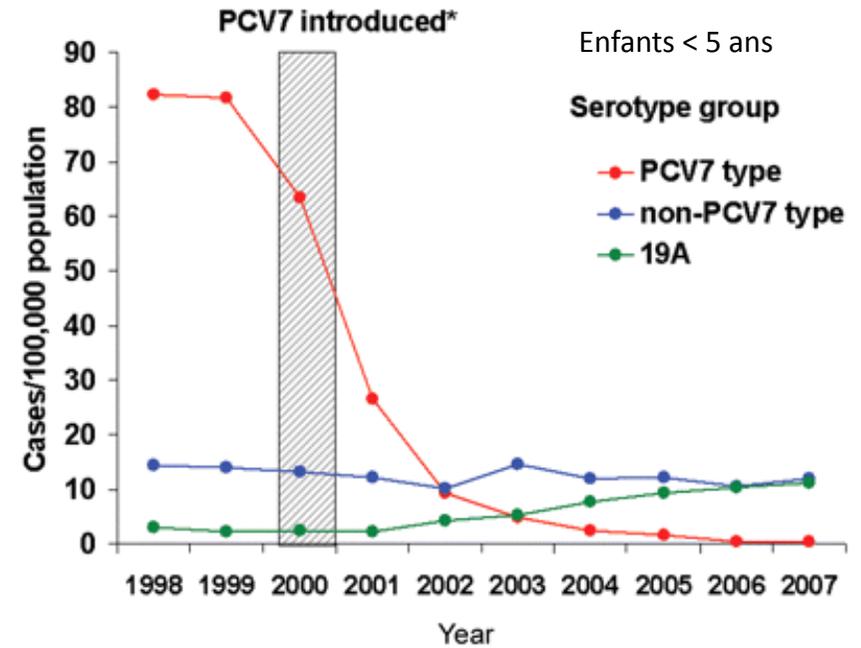
Sustained Reductions in Invasive Pneumococcal Disease in the Era of Conjugate Vaccine

Tamara Pilishvili,¹ Catherine Lexau,⁸ Monica M. Farley,^{3,4} James Hadler,⁵ Lee H. Harrison,⁶ Nancy M. Bennett,⁷ Arthur Reingold,⁹ Ann Thomas,¹⁰ William Schaffner,¹¹ Allen S. Craig,¹² Philip J. Smith,² Bernard W. Beall,¹ Cynthia G. Whitney,¹ and Matthew R. Moore,¹ for the Active Bacterial Core Surveillance/Emerging Infections Program Network*

JID 2010;201 (1 January)



Modification du taux d'incidence des infections pneumococciques Invasives, tous sérotypes confondus



Modification du taux d'incidence des infections pneumococciques Invasives, selon les sérotypes

Vaccine Escape Recombinants Emerge after Pneumococcal Vaccination in the United States

November 2007 | Volume 3 | Issue 11 | e168

Angela B. Brueggemann^{1*}, Rekha Pal², Derrick W. Crook³, Bernard Beall⁴

¹ Department of Zoology, University of Oxford, Oxford, United Kingdom, ² Department of Gastrointestinal Sciences, Christian Medical College, Vellore, India, ³ Nuffield Department of Clinical Laboratory Sciences, University of Oxford, Oxford, United Kingdom, ⁴ Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, United States of America

Epidemics. 2010 June 1; 2(2): 80–84. doi:10.1016/j.epidem.2010.03.005.

Evidence that pneumococcal serotype replacement in Massachusetts following conjugate vaccination is now complete

William P. Hanage^{1,*}, Jonathan A. Finkelstein², Susan S. Huang³, Stephen I. Pelton⁴, Abbie E. Stevenson⁴, Ken Kleinman², Virginia L. Hinrichsen², and Christophe Fraser¹

¹Imperial College London, UK

²Harvard Medical School and Harvard Pilgrim Health Care, Boston, Massachusetts, USA

³University of California Irvine School of Medicine, California, USA

⁴Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts, USA

RESEARCH ARTICLE

High Levels of Recombination among *Streptococcus pneumoniae* Isolates from the Gambia

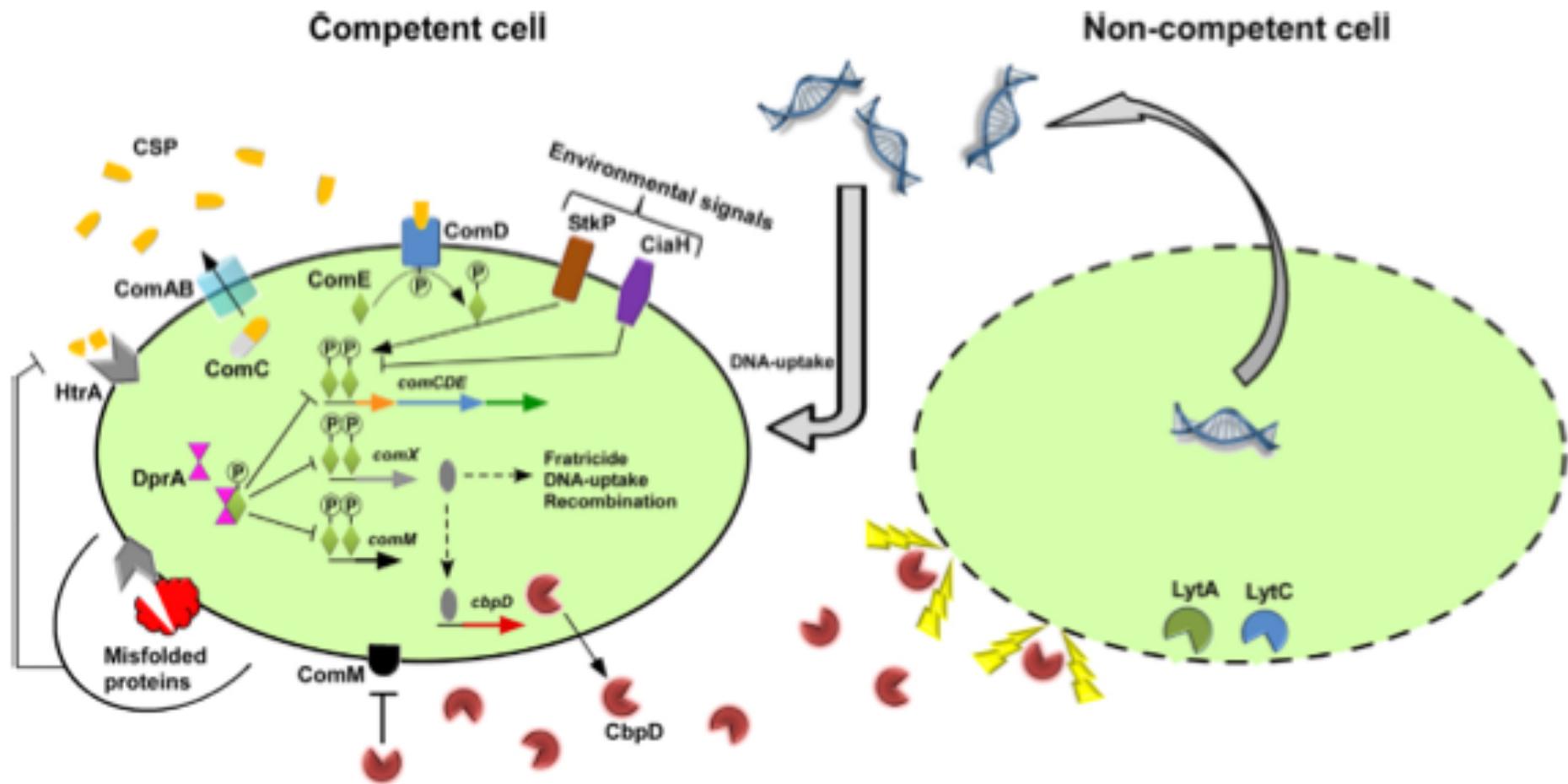
May/June 2011 | Volume 2 | Issue 3 | e00040-11

E. S. Donkor,^a C. J. Bishop,^b M. Antonio,^c B. Wren,^a and W. P. Hanage^{b*}

Department of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, United Kingdom^a; Department of Infectious Disease Epidemiology, Imperial College London, London, United Kingdom^b; and Bacterial Diseases Programme, Medical Research Council Laboratories (United Kingdom), Fajara, the Gambia^c

* Present address: Department of Epidemiology, Harvard School of Public Health, Boston, Massachusetts, USA.

Compétence: coeur des mécanismes d'adaptation de *Streptococcus pneumoniae*



Régulation de la compétence permettant la transformation naturelle, source de variabilité génétique/adaptation chez *S. pneumoniae*

Le régulateur majeur (switch) est un complexe de 5 protéines (ComA-E) constituant un système proche du quorum sensing (Hävarstein et coll. 1995, Pestova et coll. 1996)

ComC code pour un précurseur maturé par ComA en un peptide sécrété agissant comme signal d'induction de la compétence (competence stimulating signal, CSP). Dans des conditions permissives pour la compétence, CSP s'accumule dans le milieu extra-cellulaire jusqu'à atteindre une concentration seuil qui déclenche l'état de compétence de la bactérie.

Un système à deux composants CiaRH et une sérine/thréonine kinase StkP régulent en amont le système Com en influençant le niveau respectif d'expression de CSP et des composants tardifs du système Com (Echenike et coll. 2004; Guenzi et coll. 1997; Halfmann et coll. 2007).

La protéase membranaire HtrA dégrade CRP sous sa forme libre, non liée à des protéines non repliées (Sebert et coll. 2005). Sa dégradation de CSP décroît quand augmente le niveau d'erreurs translationnelles (Cassone et coll. 2012). Le killing fratricide dépend de CbpD, une muréine-hydrolase

La concentration de SDP est perçue par l'histidine-kinase ComD qui s'autophosphoryle en liant CSP (Hävarstein et coll. 1996). La liaison de ce groupe phosphorylé au régulateur transcriptionnel ComE (système de régulation à deux composants) entraîne la transcription de 20 gènes précoces de compétence (Peterson et coll. 2004) dont *comA-E*, *comX* codant un facteur sigma alternatif et *comM* codant une protéine d'immunité fratricide.

L'induction du système ComA-E enclenche l'état de compétence et le facteur sigma alternatif ComM entraîne la transcription de quatrevingts gènes tardifs impliqués dans la capture de l'ADN et la recombinaison homologue (Campbell et coll. 1998). Le killing fratricide est lié à la sécrétion d'une muréine-hydrolase CbpD (Guiral et coll. 2006). ComM protège les cellules compétentes contre la lyse (Kausmally et coll. 2005). LytA et LytC, peptidoglycane-hydrolases participent à la destruction des cellules non compétentes.

DprA contrôle la sortie de compétence en inactivant ComE phosphorylé (Mortier-Barrière et coll. 2007).

Compétence: coeur des mécanismes d'adaptation de *Streptococcus pneumoniae*

1 – Stade initial du processus de transformation: des signaux environnementaux déclenchent le processus de compétence naturelle chez un pneumocoque

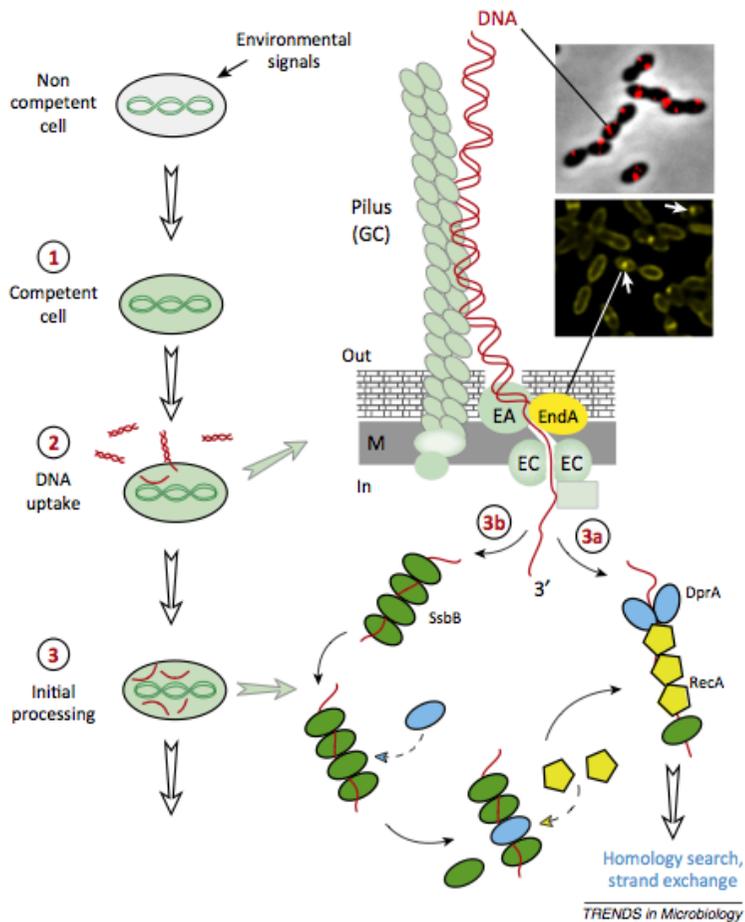
Une fois compétente, la cellule bactérienne capture de l'ADN double-brin étranger par l'intermédiaire d'un long pilus de transformation.

Les fragments d'ADN double-brin sont capturés dans la portion moyenne du corps bactérien (foyer rouge), suggérant la position du pilus dans cette zone (Bergé et coll. 2013. PLoS Pathogens)

Après capture, les fragments d'ADN double-brin sont transférés au récepteur à l'ADN ComEA, lui aussi situé dans la portion moyenne du corps bactérien, avant d'être transférés à l'endonucléase EndA (jaune) qui dégrade un des deux brins d'ADN, le simple-brin restant étant transféré à travers la membrane par le pore Com EC (Prud'homme et coll. 2006. Science)

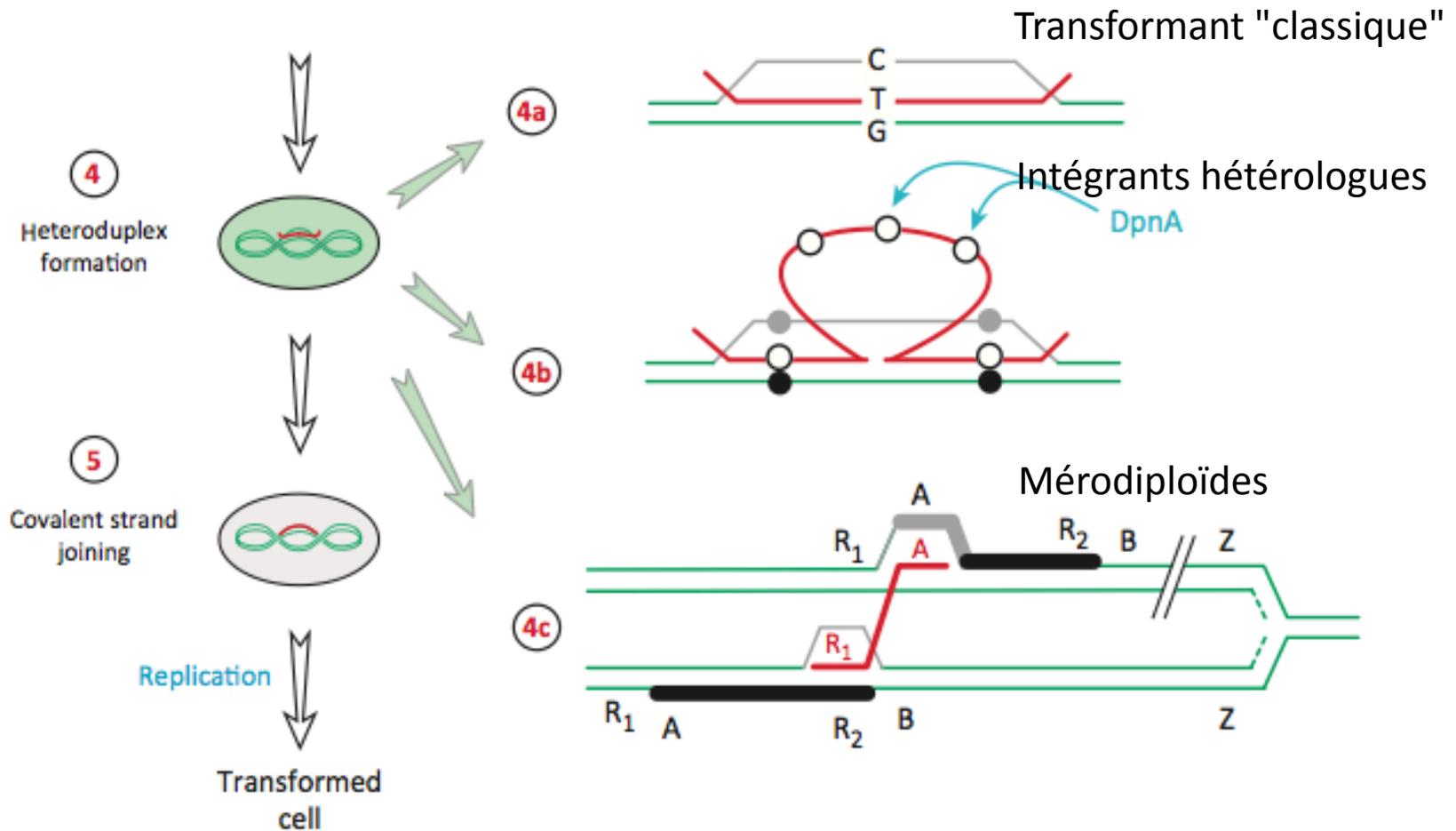
Après internalisation dans le cytoplasme, les fragments d'ADN simple-brin sont protégés des nucléases par la protéine SsbB (vert), assurant la constitution d'un réservoir de molécules d'ADN simple-brin prêtes pour la recombinaison (Claverys et coll. 2006. Annu Rev Microbiol)

La protéine DprA (bleu) lie aussi l'ADN simple-brin et entraîne la nucléation de la recombinaise RecA (polygone jaune) sur l'ADN simple-brin



Johnston et coll. 2014. Trends in Microbiol
Laurenceau et coll. 2015. PLoS Pathogens

Compétence: coeur des mécanismes d'adaptation de *Streptococcus pneumoniae*



TRENDS in Microbiology

Stade 2: RecA peut ensuite polymériser sur les molécules d'ADN simple-brin, aidé de SsbB et promouvoir la recherche d'homologie et l'échange de brin (traits verts = chromosome résident, trait rouge = DNA simple-brin transformant).

Emergence de clones résistants aux vaccins par compétence/recombinaison

Malgré l'utilisation des vaccins pneumococciques capsulaires non-conjugués puis conjugués qui a nettement diminué l'incidence des infections invasives causées par les sérotypes inclus dans les vaccins – en particulier dans le vaccin conjugué heptavalent (Suga et coll. 2015. Vaccine), certaines souches appartenant à d'autres sérotypes que ceux couverts par le vaccin voient leur incidence augmenter. Initialement sérotype 19A dont l'incidence passa de 0,8 à 2,5/100 000 entre 1998 et 2005 alors que son antibiorésistance de ce sérotype passait de 6,7 à 35 % (Moore et coll. 2008. J Infect Dis). Clone en rapide émergence jusqu'à l'introduction de ce sérotype 19A dans le vaccin 23-valent.

Puis d'autres sérotypes (van der Linden et coll. 2015. BMC Infect Dis): 15A, 23B en présence du vaccin 13-valent en Allemagne. Ce switch sérotypique est souvent associé à l'apparition de l'antibiorésistance (Chancey et coll. 2015. Front Microbiol)

Au cours d'une infection chronique à *S. pneumoniae* chez un patient porteur de plusieurs sérotypes, la souche responsable de l'infection avait remplacé en 6 mois 7,8 % de son génome (Hiller et coll. 2010. PLoS Pathogens). Largement due au phénotype de compétence permettant la prédation de l'ADN des autres souches (Claverys et coll. 2006. Mol Microbiol) ="switch sérotypique"



Cite this article: Mitchell PK, Lipsitch M, Hanage WP. 2015 Carriage burden, multiple colonization and antibiotic pressure promote emergence of resistant vaccine escape pneumococci. *Phil. Trans. R. Soc. B* **370**: 20140342.

Carriage burden, multiple colonization and antibiotic pressure promote emergence of resistant vaccine escape pneumococci

Patrick K. Mitchell¹, Marc Lipsitch^{1,2} and William P. Hanage¹

¹Center for Communicable Disease Dynamics, Department of Epidemiology, and ²Department of Immunology and Infectious Diseases, Harvard T.H. Chan School of Public Health, Boston, MA 02115, USA

Pneumococcal conjugate vaccines target the limited subset of the more than 90 known serotypes of *Streptococcus pneumoniae* responsible for the greatest burden of pneumococcal disease and antibiotic resistance. Following the introduction of these vaccines, serotypes not targeted were able to expand and

Pays à bas revenus (colonisation des voies aériennes lourde et diversifiée en sérotypes) + usage mal maîtrisé des antibiotiques = émergence de mutant d'échappement au vaccins anti-pneumococques

In vivo veritas

Le phénomène de "capsule switch" avait été démontré de longue date in vitro, mais rien ne prouvait que celui-ci survenait effectivement in vivo

L'apparition de variants sérotypiques non inclus dans le vaccin pouvait parfaitement correspondre à l'émergence d'un clone "remplissant le vide" (cas de 19A qui était reconnu comme invasif avant le développement du vaccin heptavalent mais n'avait pas été introduit dans le vaccin car sa prévalence était trop limitée)

Séquençage à haut débit apporte la preuve formelle, sur des isolats cliniques de plus en plus nombreux, de la survenue d'événements de transformation incluant en particulier "capsule switch" et antibiorésistance

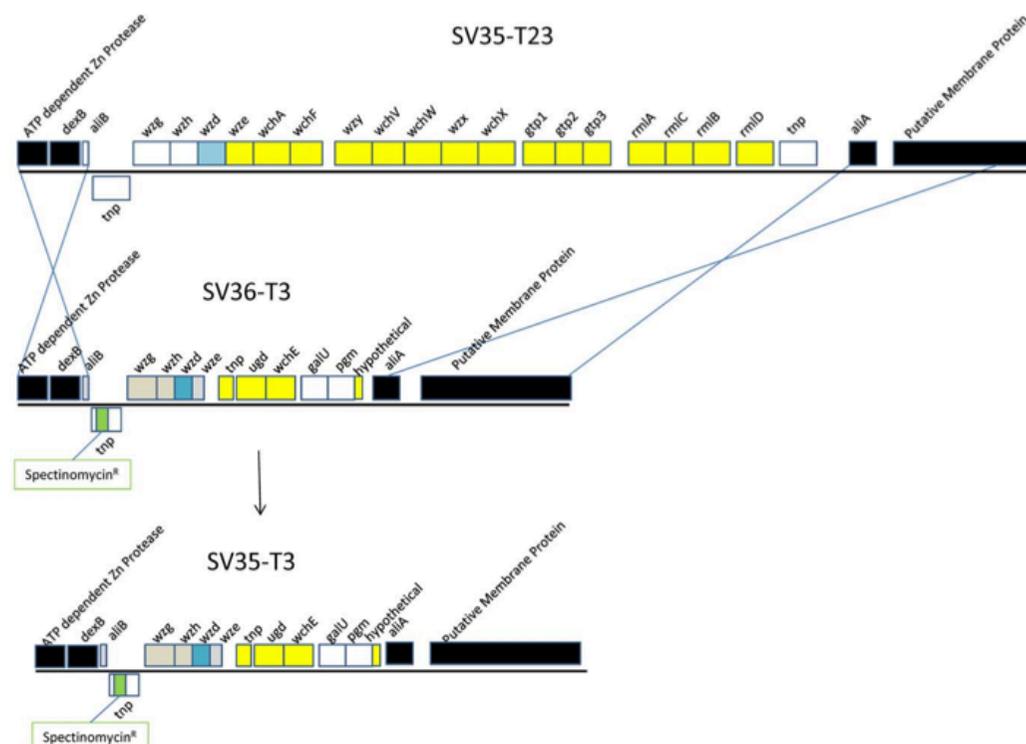
Première évidence: Séquençage du génome de 6 isolats d'un patient sur une période de 7 mois montrant avec le temps, l'existence de nombreux événements de recombinaison (Hu et coll. 2012. PLoS One)

SV35-T23 + SV36-T3 = SV35-T3 plus virulent que SV

In Vivo Capsular Switch in *Streptococcus pneumoniae* – Analysis by Whole Genome Sequencing

Fen Z. Hu^{1,2}, Rory Eutsey¹, Azad Ahmed¹, Nelson Frazao^{4,5}, Evan Powell¹, N. Luisa Hiller¹, Todd Hillman¹, Farrel J. Buchinsky¹, Robert Boissy¹, Benjamin Janto^{1,2}, Jennifer Kress-Bennett^{1,2}, Mark Longwell¹, Suzanne Ezzo¹, J. Christopher Post^{1,2,3}, Mirjana Nesin⁵, Alexander Tomasz⁵, Garth D. Ehrlich^{1,2,3*}

1 Center for Genomic Sciences, Allegheny Singer Research Institute, Pittsburgh, Pennsylvania, United States of America, 2 Department of Microbiology and Immunology, Drexel College of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania, United States of America, 3 Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Drexel College of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania, United States of America, 4 Laboratory of Molecular Genetics, Instituto de Tecnologia Química e Biológica Oeiras, Portugal, 5 Laboratory of Microbiology and Infectious Diseases, Rockefeller University, New York, New York, United States of America



Vaccine Escape Recombinants Emerge after Pneumococcal Vaccination in the United States

Angela B. Brueggemann^{1*}, Rekha Pai², Derrick W. Crook³, Bernard Beall⁴

1 Department of Zoology, University of Oxford, Oxford, United Kingdom, **2** Department of Gastrointestinal Sciences, Christian Medical College, Vellore, India, **3** Nuffield Department of Clinical Laboratory Sciences, University of Oxford, Oxford, United Kingdom, **4** Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, United States of America

Published in final edited form as:

Science. 2011 January 28; 331(6016): 430–434. doi:10.1126/science.1198545.

LETTERS

nature
genetics

Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions

Nicholas J. Croucher¹, Simon R. Harris¹, Christophe Fraser², Michael A. Quail¹, John Burton¹, Mark van der Linden³, Lesley McGee⁴, Anne von Gottberg⁵, Jae Hoon Song⁶, Kwan Soo Ko⁷, Bruno Pichon⁸, Stephen Baker⁹, Christopher M. Parry⁹, Lotte M. Lambertsen¹⁰, Dea Shahinas¹¹, Dylan R. Pillai¹¹, Timothy J. Mitchell¹², Gordon Dougan¹, Alexander Tomasz¹³, Keith P. Klugman^{4,5,14}, Julian Parkhill¹, William P. Hanage^{2,15}, and Stephen D. Bentley^{1,*}

ARTICLES

nature
genetics

Pneumococcal genome sequencing tracks a vaccine escape variant formed through a multi-fragment recombination event

Tanya Golubchik^{1,6}, Angela B Brueggemann^{2,6}, Teresa Street¹, Robert E Gertz Jr³, Chris C A Spencer⁴, Thien Ho¹, Eleni Giannoulatou⁴, Ruth Link-Gelles³, Rosalind M Harding², Bernard Beall³, Tim E A Peto⁵, Matthew R Moore³, Peter Donnelly^{1,4,7}, Derrick W Crook^{5,7} & Rory Bowden^{1,4,5,7}

Population genomics of post-vaccine changes in pneumococcal epidemiology

Nicholas J Croucher^{1,2}, Jonathan A Finkelstein^{3,4}, Stephen I Pelton⁵, Patrick K Mitchell¹, Grace M Lee^{3,6,7}, Julian Parkhill², Stephen D Bentley^{2,8,10}, William P Hanage^{1,10} & Marc Lipsitch^{1,9,10}

Whole-genome sequencing of 616 asymptotically carried *Streptococcus pneumoniae* isolates was used to study the impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. Comparison of closely related isolates showed the role of transformation in facilitating capsule switching to non-vaccine serotypes and the emergence of drug resistance. However, such recombination was found to occur at significantly different rates across the species, and the evolution of the population was primarily driven by changes in the frequency of distinct genotypes extant before the introduction of the vaccine. These alterations resulted in little overall effect on accessory genome composition at the population level, contrasting with the decrease in pneumococcal disease rates after the vaccine's introduction.

After the vaccine's introduction, overall effect on accessory genome composition at the population level, contrasting with the decrease in pneumococcal disease rates in the frequency of distinct genotypes extant before the introduction of the vaccine. These alterations resulted in little

Conclusion

Les vaccins ont été déployés contre plusieurs pathogènes bactériens d'importance majeure en santé publique.:

Neisseria meningitidis, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus pneumoniae*,
Mycobacterium tuberculosis

Ces vaccins sont généralement considérés comme un succès en santé publique dans le contrôle des maladies infectieuses.

Cependant, une conséquence troublante commence à émerger à l'issue des récents programmes de vaccination: la sélection de mutants d'échappement exprimant un répertoire antigénique de celui représenté dans les vaccins correspondants.

Ce phénomène exige la mise en place et le maintien d'une surveillance épidémiologique étroite, utilisant des outils moléculaires comme le séquençage de nouvelle génération afin de reformuler au mieux les vaccins en cours d'utilisation si nécessaire