

COLLÈGE  
DE FRANCE  
— 1530 —

CHAIRE DE MICROBIOLOGIE ET MALADIES INFECTIEUSES  
Année académique 2018-2019

Philippe SANSONETTI

Infections chroniques et récurrentes

Cours les mercredis de 16h à 17h30, suivis des séminaires  
Amphithéâtre Maurice Halbwachs

19 décembre 2018

16h00, Cours#2

Biofilms, « persisters », résistance : les défis de l'infection chronique

17h30, Séminaire#2

L'émergence d'un « persister »: Sophie Hélaïne (Imperial College, London)



**Biofilms, « persisters », résistance :  
les défis de l'infection chronique**

**Philippe J Sansonetti**

*Biofilm Staphylococcus aureus*

## Infections persistantes

Colonisation bactérienne prolongée d'une surface cutanée ou muqueuse  
Invasion bactérienne prolongée d'un tissu/organe = possiblement toute la vie

Chronicité = infection soutenue, stable ou progressive

Récurrence = éclipses cliniques et réapparitions +/- régulières

Impact négatif sur morbidité et mortalité, augmentation risque de transmission

Rôle possible dans l'oncogénèse (problématique d'intérêt croissant)

## Agents infectieux responsables d'infections aiguës susceptibles de se chroniciser

### **Infections chronicisées à partir d'une infection aiguë initiale**

- cutanées (brûlures)
- ostéoarticulaires (ostéomyélites, fistules)
- trachéobronchiques (mucoviscidose, BPCO)
- orales (pyorrhée alvéolodentaire)
- cardiaques (endocardite chronique)
- urinaires (infections urinaires chroniques/récurrentes)
- Intestinales (portage chronique)

# Agents infectieux « programmés » pour la chronicité/réurrence

## Pathogènes bactériens

- *Salmonella enterica Typhi*: Fièvre Typhoïde, portage chronique, récurrence
- *Helicobacter pylori*: gastrite chronique/ulcère, survie à la surface de la muqueuse gastrique.= résistance à l'acidité du liquide gastrique
- *Chlamydia trachomatis*: trachome, stérilité féminine
- *Borrelia burgdorferi*: maladie de Lyme

Autres borrélioses = survie et multiplication sang et tissu interstitiel, LCR, cerveau

Récurrences = variation antigénique, résistance au complément

- *Mycobacterium tuberculosis*: tuberculose)
- Brucella: brucellose

## Infections persistantes: vivre avec des invités indésirables

Persistance souvent établie après phase infectieuse aiguë ayant impliqué stimulation de la réponse immunitaire Innée et adaptative

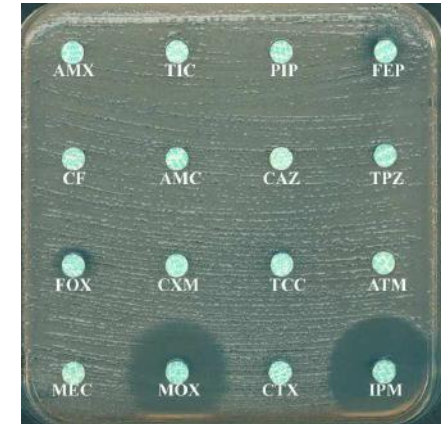
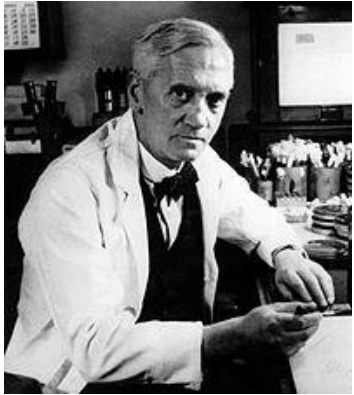
Persistance = capacité d'échapper aux défenses immunitaires

Bactéries pathogènes disposent - à degrés divers - de gènes/opérons codant/régulant expression/distribution effecteurs permettant adaptation à environnement du foyer infectieux et échappement aux réponses immunitaires

Persistance peut impliquer survie dans certains organes, sur certaines structures anatomiques, dans cellules, en particulier monocytes/macrophages, essentiellement dans compartiment d'endocytose dont maturation est activement affectée

**Organisation en biofilms apparaît comme mécanisme premier de résistance aux réponses immunitaires**

## Le monde des maladies infectieuses a changé il y a 70 ans...



Installation processus de persistance infectieuse se fait essentiellement dans le contexte de traitements antibiotiques

Contrairement au concept pré-antibiotique d'infection persistante, concept moderne est indissociable du paramètre antibiotique dans la relation microbe-hôte = **microbe-hôte traité...**

# Infections bactériennes persistantes: définition réactualisée

Le système immunitaire de l'hôte infecté peut généralement éliminer l'agent infectieux et assurer la stérilisation du/des foyer(s)

Réponse innée immédiate assure partie importante réduction charge bactérienne

Stérilisation = réponse adaptative initiée et orientée par le profil de la réponse innée

**Processus stérilisation considérablement renforcé et accéléré par utilisation antibiotiques**

Bactérie responsable peut échapper à réponse immunitaire et aux antibiotiques

Mécanismes d'échappement communs ou spécifiques

Infection persistante qui en découle difficile à stériliser =

- Soit infection asymptomatique durant longue période, puis réactivation tardive avec symptomatologie clinique locale ou systémique, nécessitant reprise thérapeutique
- Soit infection cliniquement patente avec symptômes chroniques, d'évolution « désespérante », nécessitant traitements antibiotiques itératifs, voire autres approches

Certaines bactéries pathogènes clairement adaptées à l'échappement au système immunitaire =

*Salmonella Typhi* et *Mycobacterium tuberculosis* (Monack et coll.2004. Nat Rev Microbiol)

D'autres comme *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* doivent user de « stratagèmes »: biofilms



# Infections bactériennes persistantes: définition réactualisée

Elément central engagement vers la persistance = adaptation bactérie au stress imposé par hôte infecté: **réponses immunitaires +/- traitement antibiotique**

Bactérie pathogène survivante va généralement entrer dans état physiologique différent/alternatif marqué par croissance lente, voire arrêtée, entraînant état de « **réfractance** »

**Bactéricidie** nécessite essentiellement bactéries en phase réplivative (Grant et Hung. 2013. Virulence)

# Infections bactériennes persistantes à l'ère des antibiotiques: un nouveau lexique

**Antibiorésistance:** capacité de certains clones au sein d'espèces pathogènes de croître en présence d'antibiotiques = modifications génétiques (mutations, transfert horizontal gènes) procurant propriétés dégradation, efflux, modification cible touchée par antibiotique...

**Antibiotolérance:** sensibilité réduite de certaines bactéries à des antibiotiques bactéricides au sein population généralement sensible = mutations entraînant diverses conséquences:

- Faible absorption antibiotique, faible activité cible
- Croissance lente, métabolisme ralenti (microcolonies)

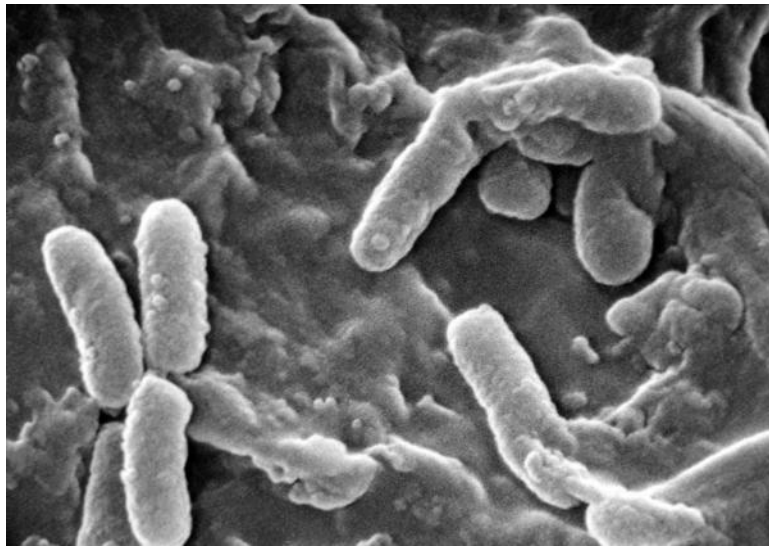
« **Persisters** »: sous-catégorie de bactéries résistant aux antibiotiques bactéricides au sein d'une population sensible du fait d'altérations phénotypiques non secondaires à des mutations entraînant une croissance lente, une diminution d'activité de la cible de l'antibiotique ou de son import, liés généralement à l'exposition à un stress

**Résistance phénotypique = réfractance:** sous population de bactéries résistantes au sein d'une population clonale sensible due à des conditions environnementales rendant difficile l'accès, l'import, la stabilité, l'activité de l'antibiotique

## Vie des bactéries en biofilm: règle plus qu'exception

Plupart espèces bactériennes ne vivent pas individuellement en suspension, mais en communautés complexes adhérant à des surfaces

*Certainly we felt that pure, planktonic cultures were the only way to work. Yet, in nature, bacteria don't live like that, in fact most of them occur in mixed, surface-dwelling, communities.*



*Roberto Kolter*

## Biofilm responsable d'infections persistantes

**80% des infections chroniques sont associées à des biofilms**

Parodontopathies

Plaque dentaire

Mucoviscidose

Infections urinaires chroniques/récurrentes

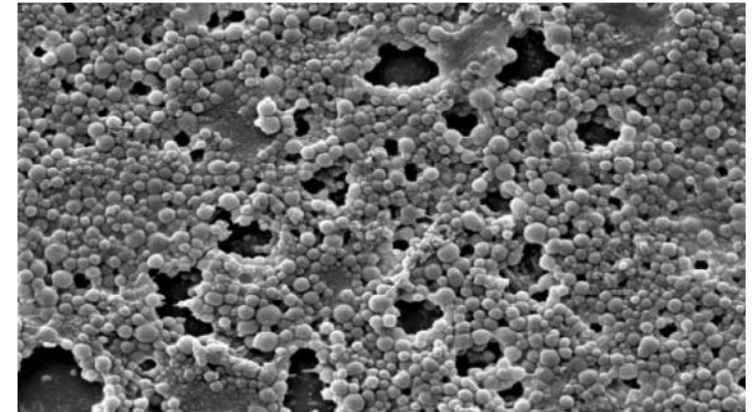
Rhino-sinusites chroniques

Angines récurrentes

Otite chronique

Suppurations chroniques brûlures/blessures cutanées

Infections sur corps étrangers



Biofilm *S. aureus*

## Modes de vie des bactéries

Vie microbienne sédentaire, en **biofilm** = un des deux modes de vie organismes unicellulaires.

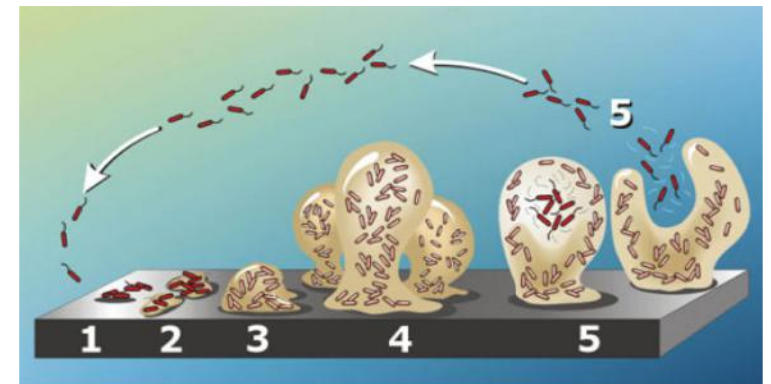
Représente mode de vie ancien, essentiel cycle de vie des procaryotes, prévalant dans divers environnements, dominant en milieu hostile (Hall-Stoodley L et coll. 2004. Nat.Rev.Microbiol., 2:95-108).

Structure et physiologie du biofilm donnent aux microorganismes qui le constituent conditions organisation sociale proches conditions établies par cellules eucaryotes au sein des tissus

Autre mode de vie = nomadisme  
en milieu liquide = **planctonique**

### Cycle «biofilmisation - planctonisation»

Beloin C et coll. 2008. Curr.Top.Microbiol.Immunol.,322:249-289



# Cadre clinique infections/biofilms

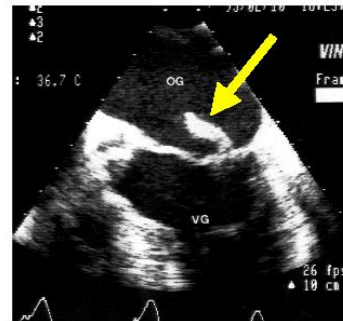
Développement infection dont physiopathologie repose sur existence biofilm  
= situation grave avec conséquences importantes (antibiothérapie aléatoire, ablation chirurgicale matériel étranger = prothèses)  
= changement vie patient atteint de mucoviscidose (survenue première surinfection bronchique, etc...) et pronostic parfois précaire

Infections souvent chroniques et/ou récidivantes, recouvrent situations difficiles à gérer: bactériémies/septicémies récurrentes par « planctonisation » microorganismes constitutifs, espèces bactériennes non-cultivables, inflammation chronique, arrêts de cicatrisation, dissémination embols septiques (infections sur prothèses valvulaires ou vasculaires)



Ostéomyélite  
fémorale  
périprothétique

Végétation valve mitrale / anévrysme mycotique



Di Salvo G et coll. 2001. J.Am.Coll.Cardiol., 37:1069-1076

## Trois caractéristiques des biofilms médicaux

« **Réfractance** » bactéries aux antibiotiques

**Persistance** malgré réponse immunitaire soutenue

**Hétérogénéité métabolique** population bactérienne due à accumulation multiples microniches:

- Zones privées de nutriments où bactéries prennent un phénotype « dormant » = phase stationnaire
- Gradients concentration oxygène faisant alterner zones anoxiques et oxygénées

Hétérogénéité participe largement propriétés de récalcitrance et persistance

**Biofilm = environnement favorable pour survenue « persisters »**

# Hétérogénéité phénotypique des biofilms

## Les bactéries des biofilms sont fonctionnellement hétérogènes

(Hall-Stoodley L et coll. 2004. Nat.Rev.Microbiol.,2:95-108; Lenz et coll. 2008. Appl.Environment. Microbiol., 74:4463-4471; Bagge N et coll. 2004. Antimicrob.Agents Chemother.,48:1168-1174):

Différences d'expression de protéines de surface

De niveaux de réfractance aux antibiotiques

D'utilisation de nutriments

D'expression de facteurs de virulence

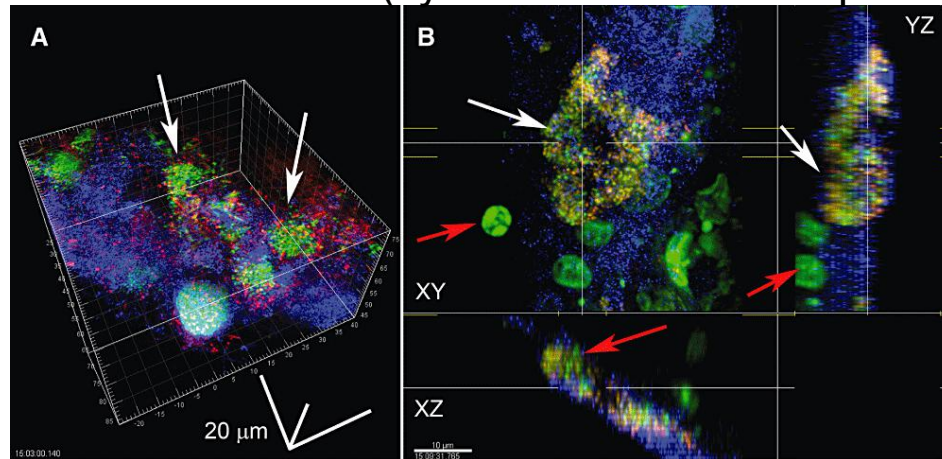
## Les bactéries coordonnent leur comportement dans les biofilms

(Jensen PO et coll. 2007. Microbiol., 153:1329-1338)

Grâce à l'émission/perception de signaux intercellulaires en fonction de leur densité (Quorum Sensing) et à la perception de paramètres environnementaux (systèmes à deux composants)

Microscopie confocale: analyse d'aggrégats de biofilms (flèches blanches) constitués de cocci et bacilles au sein d'une végétation adénoïde (otite chronique)  
Marquage par kit ADN vivant/mort.  
Bactéries vivantes = vertes,  
Bactéries mortes = rouges  
Cellules inflammatoires = noyaux (flèches rouges)

**Opportunités d'adaptation !**



Hall-Stoodley L, Stoodley P. 2009. Cell.Microbiol., 11:1034-1043



# Récalcitrance aux antibiotiques des bactéries en biofilm

Lorsque des bactéries s'engagent en mode de croissance en biofilm, elles tolèrent des concentrations d'antibiotiques de 10 à 1000 fois supérieures aux MIC (minimum inhibitory concentration) de bactéries génétiquement similaires cultivées en conditions planctoniques et des concentrations bien plus élevées sont sans doute nécessaires pour atteindre une bactéricidie vraie.

## **Réfractance: hypothèses et certitudes**

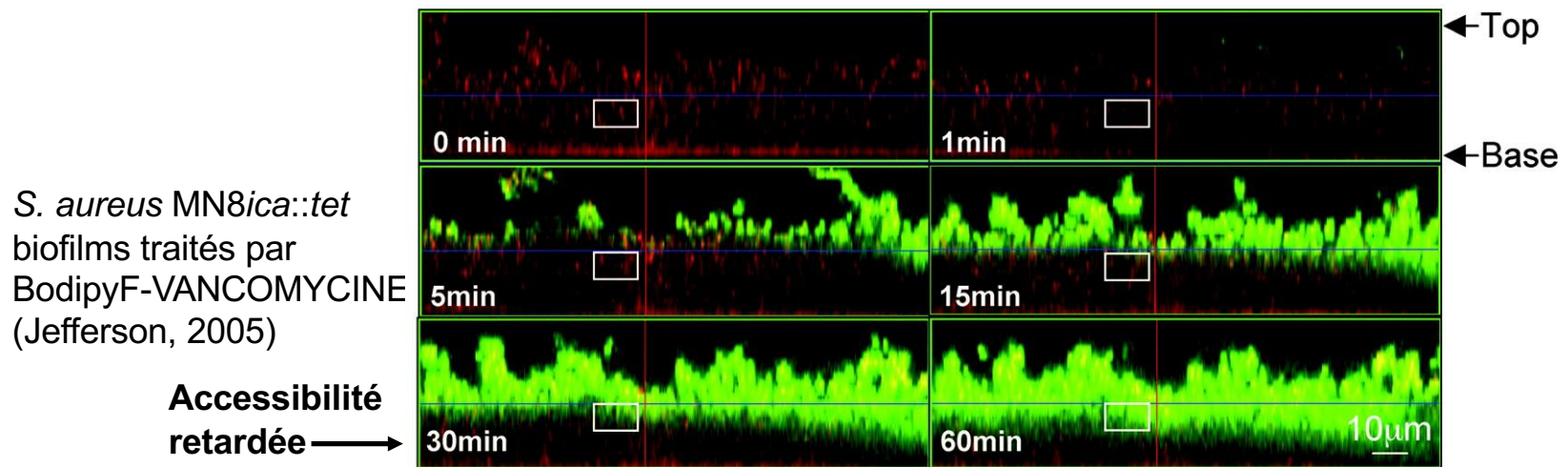
- 1 - Diminution de l'accessibilité des antibiotiques par la matrice du biofilm.
- 2 - Activité accrue des pompes à efflux (« multidrug efflux pumps »)
- 3 - Etat d'hétérogénéité métabolique, particulièrement de croissance lente voire dormance des bactéries dans certains secteurs du biofilm.
- 4 - Expression de gènes impliqués dans la réponse générale au stress.
- 5 - Emergence d'un phénotype spécifique aux bactéries en biofilm qui reste à caractériser. Implication du Quorum Sensing.
- 6 – Apparition de « persisters »
- 7 - Combinaison de plusieurs de ces facteurs**

# Réfractance aux antibiotiques des bactéries en biofilms (1)

## Accessibilité des antibiotiques au sein du biofilm.

La matrice du biofilm ne peut constituer une barrière physico-chimique étanche aux antibiotiques. Elle peut cependant retarder leur accessibilité aux bactéries, diminuant les doses bactéricides disponibles et laissant le temps aux bactéries d'exprimer leurs mécanismes inductibles de résistance (Jefferson KK et coll. 2005. Antimicrob. Agents Chemother., 49:2467-2473).

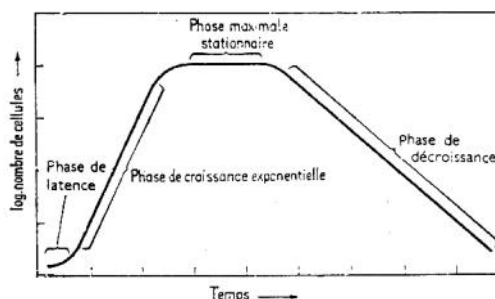
La charge des polymères (Walters et coll., 2003), la présence de bactéries mortes et d'enzymes dégradant les antibiotiques participe à cet effet de retardement (Bagge et coll. 2004)



**Accessibilité des bactéries planctoniques à BodipyFL-VAN = 5 mn !**

## Réfractance aux antibiotiques des bactéries en biofilms (2)

Présence de zones privées de nutriments/O<sub>2</sub> au sein du biofilm: situation de croissance stationnaire causant une dormance des bactéries, donc une résistance de niveau élevé, en particulier aux antibiotiques actifs uniquement sur les bactéries en division comme les beta-lactamines (Walkers et coll. 2003. Antimicrob.Agents Chemother., 47:317-323; Fux CA et coll. 2004. J.Bacteriol.,186:4486-4491)



Le niveau d'expression du gène *rpoS* (sous-unité Sigma S responsable de l'expression d'un groupe de gènes en début de phase stationnaire ou en condition de stress) s'accroît en fin de phase exponentielle-début de phase stationnaire et est corrélé avec l'arrêt de croissance et l'augmentation de bactéries antibio-résistantes (Ito A et coll. 2008. Biotechnol.Bioeng.,99:1462-1471).

RpoS pourrait donc réguler l'apparition de souches résistantes

RpoS est aussi impliqué dans la régulation génétique globale contrôlant l'engagement d'*E. coli* dans la formation d'un biofilm (Keren I et coll. 2004. FEMS Microbiol.Lett.,230:13-18)

Nature Reviews Microbiology. 2017

## REVIEWS

### Persistent bacterial infections and persister cells

Robert A. Fisher, Bridget Gollan and Sophie Helaine

frontiers in  
**CELLULAR AND INFECTION MICROBIOLOGY**

## Metabolic aspects of bacterial persisters

**Marcel Prax and Ralph Bertram\***

Department of Microbial Genetics, Faculty of Science, Interfaculty Institute of Microbiology and Infection Medicine Tübingen (IMI), University of Tübingen, Tübingen, Germany

Leading Edge  
**Review**

### Molecular Mechanisms Underlying Bacterial Persisters

Etienne Maisonneuve<sup>1</sup> and Kenn Gerdes<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Centre for Bacterial Cell Biology, Institute for Cell and Molecular Biosciences, Newcastle University, Richardson Road, NE2 4AX Newcastle upon Tyne, UK

<sup>2</sup>Department of Biology, University of Copenhagen, Ole Maaloes Vej 5, 2200 Copenhagen, Denmark

\*Correspondence: kenn.gerdes@ncl.ac.uk  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.050>

## Must read...

Virulence 4:4, 273–283; May 15, 2013; © 2013 Landes Bioscience

REVIEW

### Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response

Sarah Schmidt Grant<sup>1,2,3</sup> and Deborah T. Hung<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Broad Institute of MIT and Harvard; Cambridge, MA USA; <sup>2</sup>Division of Pulmonary and Critical Care Medicine; Department of Medicine; Brigham and Women's Hospital; Boston, MA USA; <sup>3</sup>Department of Microbiology and Immunobiology; Harvard Medical School; Boston, MA USA; <sup>4</sup>Department of Molecular Biology and Center for Computational and Integrative Biology; Massachusetts General Hospital; Boston, MA USA

**MINI REVIEW ARTICLE**

published: 22 October 2014  
doi: 10.3389/fcimb.2014.00148



Cell

**REVIEW ARTICLE**

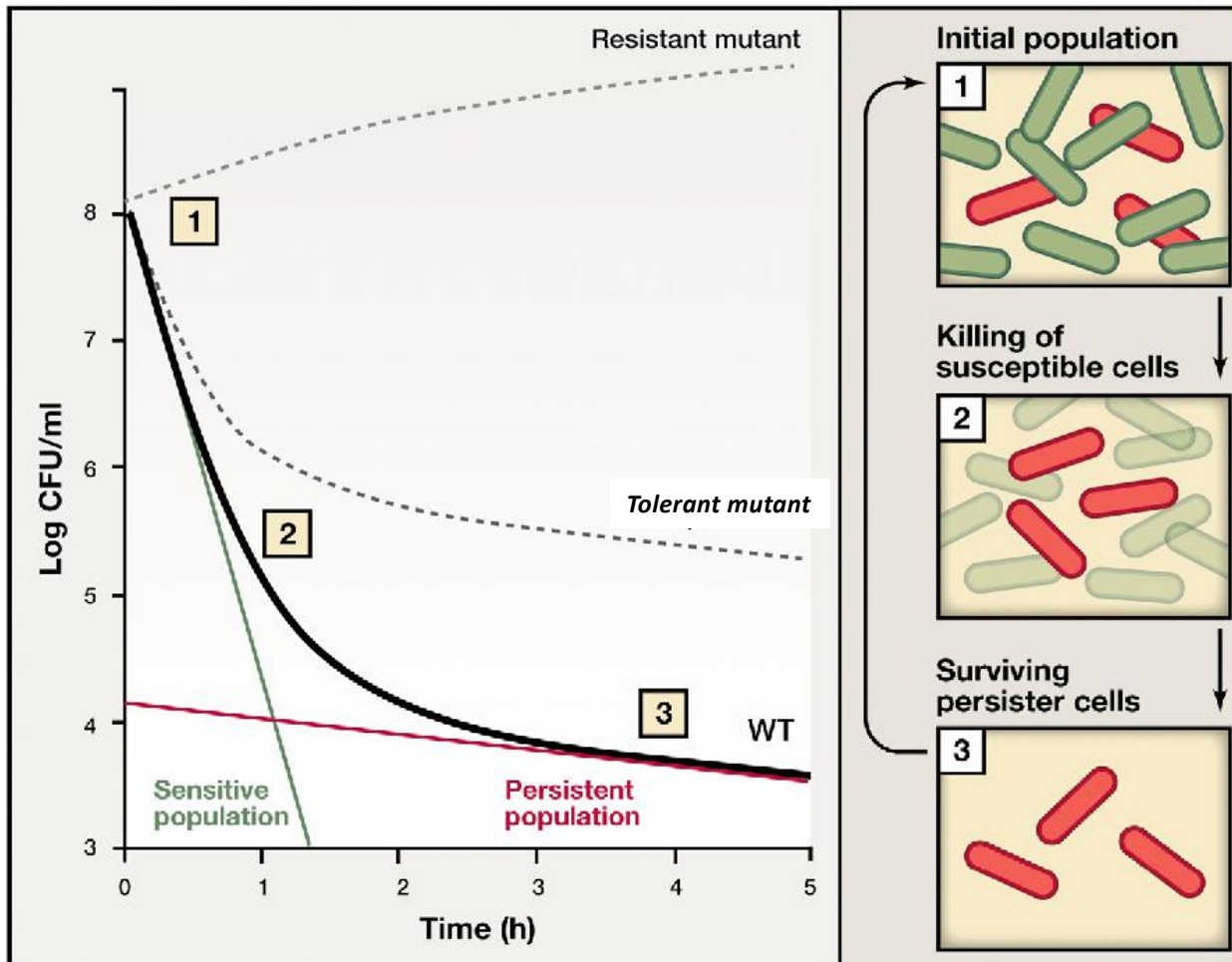
PUBLISHED ONLINE: 18 MARCH 2016 | DOI: 10.1038/NCEMBIO.2044

nature  
chemical biology

### Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence

Rebecca Page<sup>1\*</sup> & Wolfgang Peti<sup>2,3</sup>

# Du lexique au graphique



## Contexte survenue « persisters »

« Persisters » décrits pour la première fois en 1944 chez *S. aureus* qui, en présence de pénicilline, laissait quelques bactéries survivantes (Bigger. 1944. Ir J Med Sci)

« Persisters » pas causée par modifications génétiques car variants demeurent sensibles lorsque conditions croissance rétablies (Keren et coll. 2004. FEMS Microbiol Lett)

« Persisters » dans culture bactérienne isogénique = phénotype temporaire croissance lente ou arrêt  
Apparition « persisters » répond à paramètres stochastiques ou paramètres environnementaux

« Persisters » phase croissance stationnaire > exponentielle (Lechner et coll. 2012. J Med Microbiol Biotechnol)

**Biofilms = environnement favorable développement niveau élevé « persisters »**

(Lewis. 2005. Biochemistry)

Indole, 2'-amino-acetophenone, CSP phéromone, autoinducteurs quorum sensing (QS) induisent apparition bactéries « persisters » dans certaines espèces bactériennes (Leung et Levesque. 2012. J Bacteriol; Vega et coll. 2013. PNAS; Que et coll. 2013. PLoS One)

Addition milieu culture conditionné phase exponentielle « réveille « persisters » (Pinto et coll. 2013. Microbiolo

**Passage un état à l'autre dépend essentiellement de facteurs métaboliques**

**Rôle croissant considéré du stress oxydatif (ROS)**

**Rôle de la formation de « persisters » dans la facilitation de la survenue de résistances vraies ?**

Schmidt-Grant et Hung. 2013. Virulence

## Les « persisters »

« Persisters » constituent, **dans culture isogénique antibiosensible**, sous-population bactéries tolérantes à plusieurs familles antibiotiques (particulièrement AB nécessitant croissance bactérienne soutenue pour exécuter propriétés bactéricides)

Etudes sur bactéries Gram + et Gram – ont identifié grand nombre de gènes dont variation expression associée avec état de « persister »

Caractéristiques métaboliques des « persisters » commencent seulement à s'éclaircir

Altérations métaboliques caractérisant « persisters » =

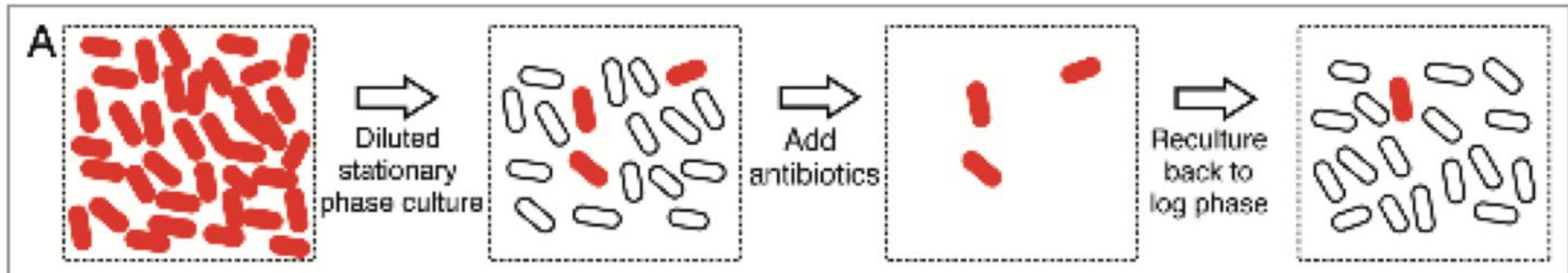
- Rôle bifonctionnel de carbohydrates: certains stimulent sortie état « persister », autres servent de substrat nutritif en situation dormante

Alarmones indiquant carence nutritionnelle (ppGpp) utilisées par « persisters » et influencent leur niveau apparition par activation cascades signalisation comme systèmes toxine-antitoxine et d'autres régulateurs

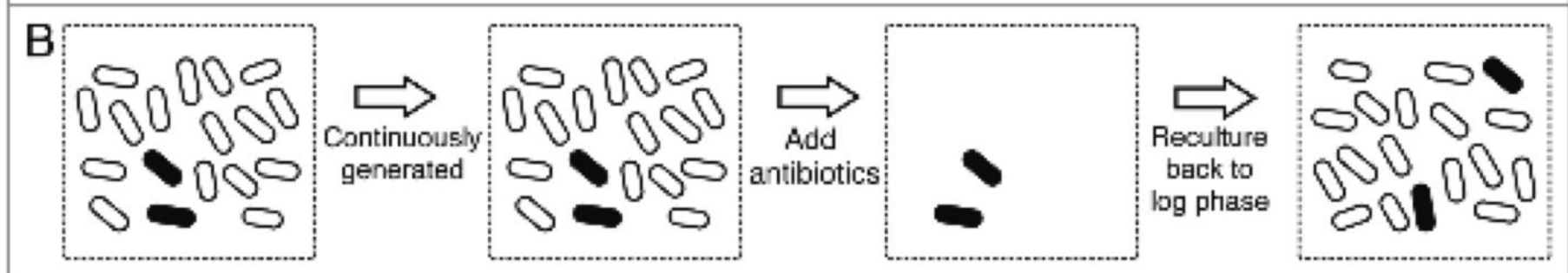
Chez *S. aureus*, utilisation profilage d'isotopologues-C13 révèle anabolisme actif acides aminés chez « persisters » lors « challenge » par doses élevées d'antibiotiques

# Différentes conditions d'apparition de « persisters »

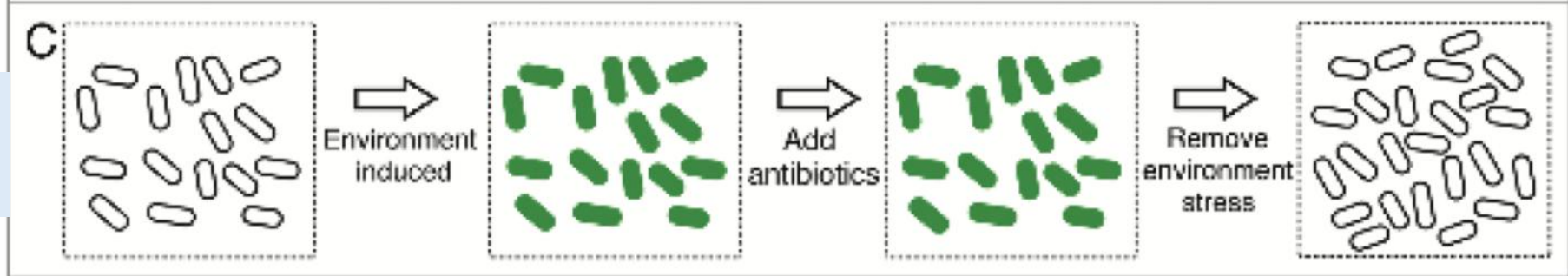
Type1



Type2

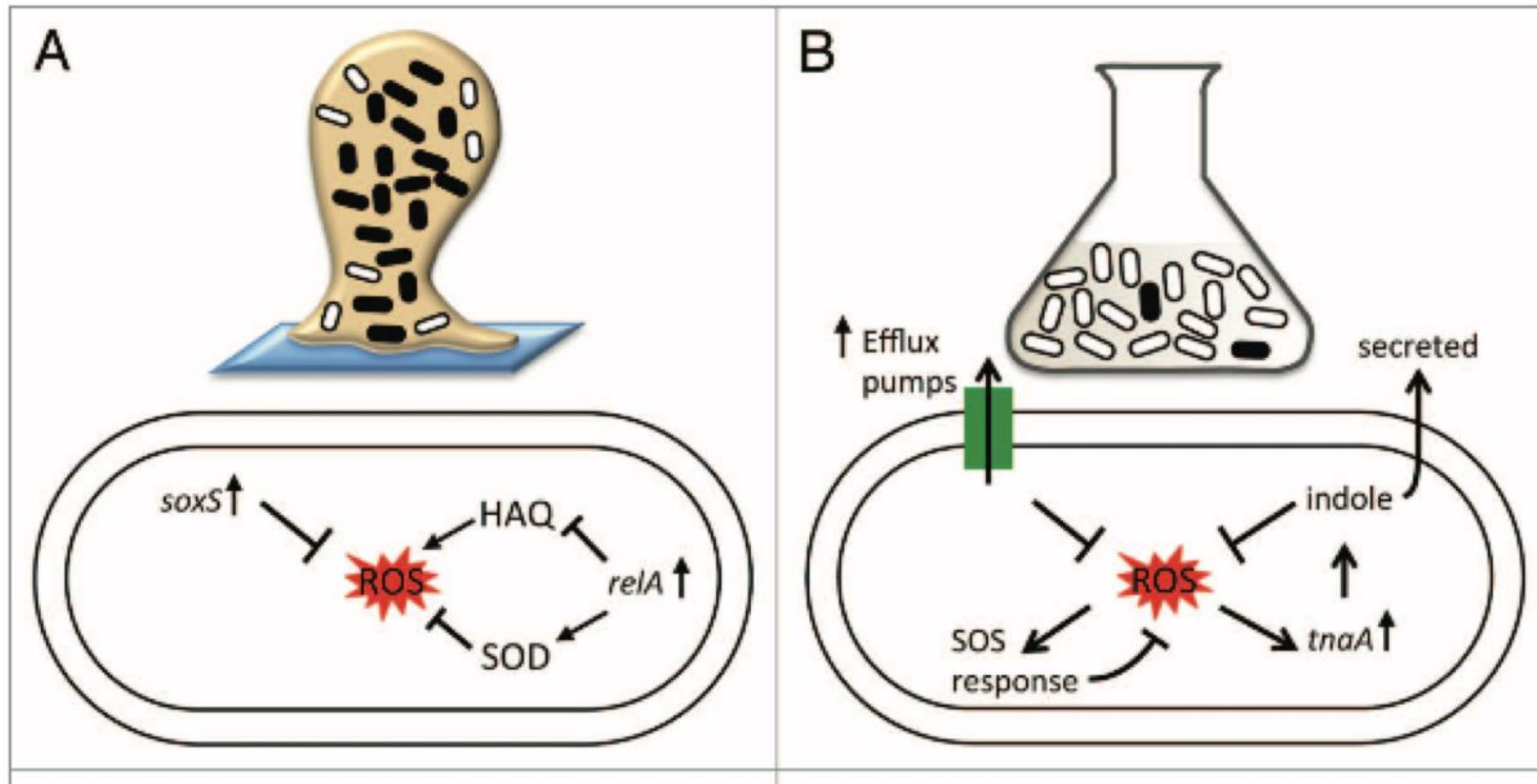


Induits par conditions environnementales

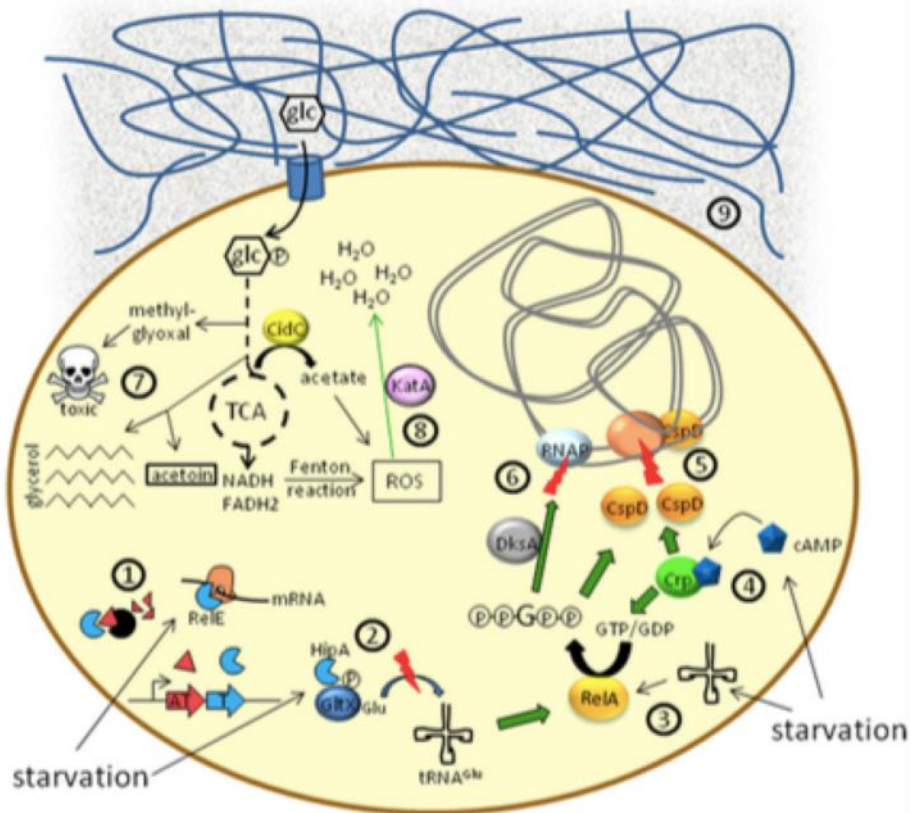




# Biofilm, stress oxydatif et « persisters »

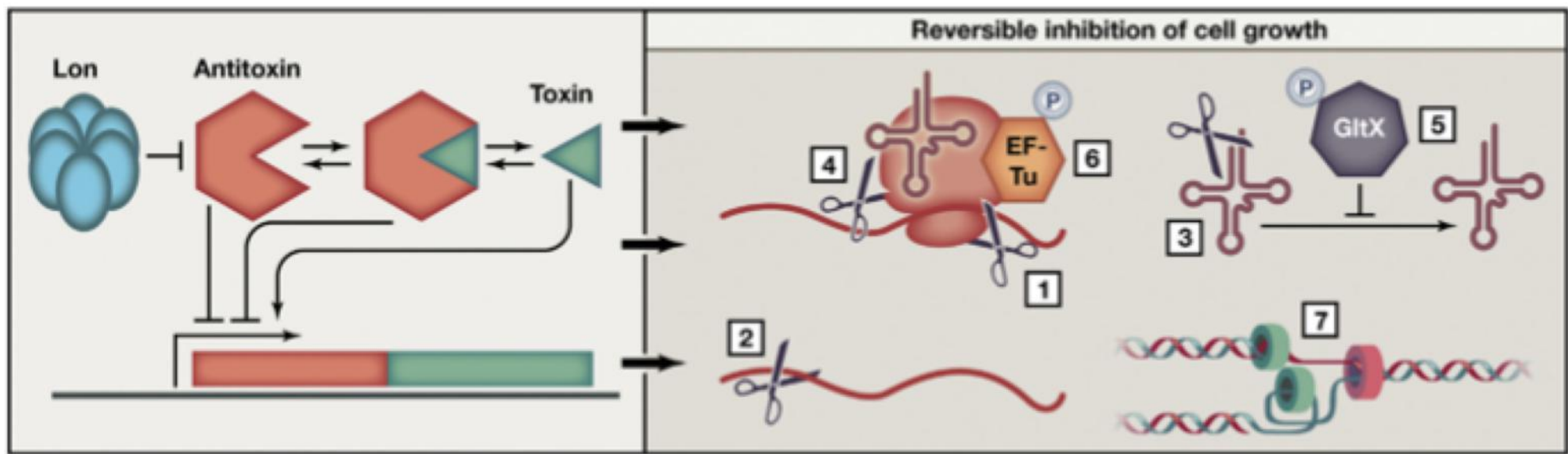


# Aspects métaboliques associés à l'état de « persister »



- 1,2** = Toxin/antitoxin-systems: chez nombreuses bactéries les protéases Lon et Clp activées par la carence en acides aminés dégradent les antitoxines. Toxines libérées (RelE) clivent les ARNm ou emploient un système de transduction de signal dépendant du ppGpp pour induire l'arrêt de la croissance bactérienne.
- 3** = ARNt non chargés en carence d'acides aminés entraînent la synthèse de ppGpp via RelA.
- 4** = Limitation en nutriments favorise la synthèse du second message AMPc par l'adénylate cyclase. AMPc se lie à Crp (récepteur AMPc) et le complexe active l'expression de relA et cspD.
- 5** = Inhibition de la replication de l'ADN par CspD.
- 6** = Modulation de l'activité ARN polymérase (RNAP) par complexe DksA/ppGpp.
- 7** = Altérations flux métaboliques entraînent ralentissement cycle TCA et accroissement de persistance. Synthèse de méthylglyoxal entraîne inhibition de croissance. Synthèse Acétoine et triglycérides = pathway alternatif à la carence en pyruvate et acétyl-CoA (effondrement TCA).
- 8** = Différentes voies du métabolisme peuvent donner lieu à la production de ROS comme by-products dangereux gênant la formation/survie de « persisters ». Des enzymes désactivant ROS comme KatA sont activés dans les « persisters ».
- Des protéines ou sucres aminés contenus dans biofilms (trame bleue) forment un environnement de faible concentration en glucose et de faible fourniture de nutriments en général qui favorise la production de « persisters ».

# Systemes toxine/antitoxine



# Fièvre typhoïde: de la maladie aiguë septicémique Aux rechutes et au portage asymptomatique

*Salmonella enterica* = 93 millions de cas annuels

*Salmonella enterica Typhi* = fièvre typhoïde = 21 millions de cas annuels, essentiellement dans pays à bas revenu (Asie du sud-est et Afrique sub-saharienne)

>190 000 décès = majoritairement chez enfants,

A cru de 39% entre 1990 et 2010 (largement du fait extension antibiorésistance)

D'autres formes sont causées par 3 sérotypes: *S. Paratyphi* A,B,C

## Symptômes=

Fièvre 40-41°C, frissons, céphalées, insomnie, épistaxis, courbatures, anorexie, angine, rash, Diarrhée ou constipation, abdomen tendu, splénomégalie

## Complications (+/- traitement)

Troubles de la conscience +/- agitation (Typhos)

Hémorragies/perforations intestinales

Choc septique, décès

## Caractéristiques =

convalescence très longue: dénutrition

rechutes

**portage fécal prolongé (voire à vie) après guérison (2-5%)**

Majowicz et coll. The global burden of non-typhoidal *Salmonella* gastroenteritis. 2010. Clin Infect Dis

Crump et coll. The global burden of typhoid fever. 2004. WHO Bulletin

Lozano et coll. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global burden of Disease Study 2010. 2012. Lancet



*Salmonella Typhi*

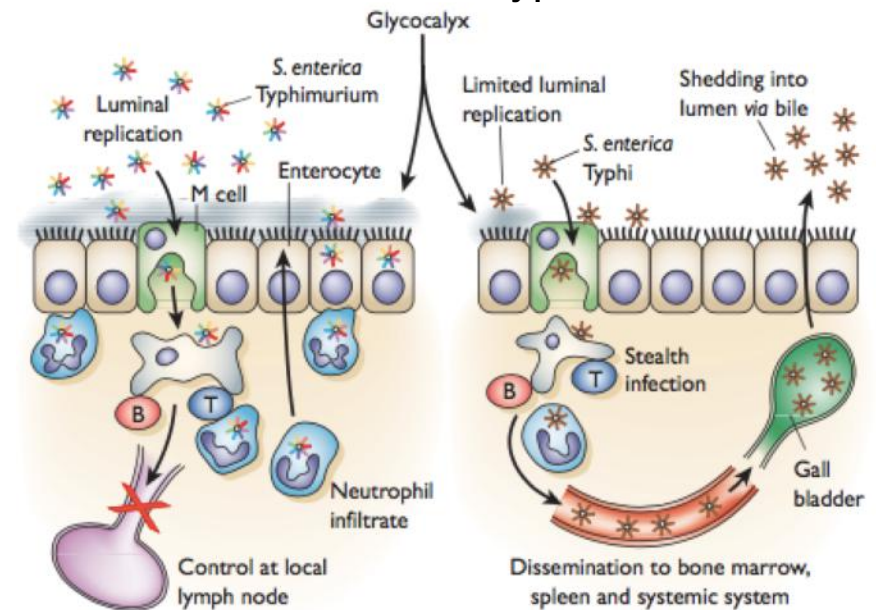


# Pathophysiologie Fièvre typhoïde

Nombreuses bactéries pathogènes peuvent causer infection localisée muqueuse intestinale  
*Salmonella enterica Typhimurium* cause gastroentérite/diarrhée chez homme et bétail  
Ne dépasse pas ganglions mésentériques = pas de septicémie sauf si déficit immunitaire (VIH/SIDA, drépanocytose)  
Infection septicémique chez souris

*S. enterica Typhi*, bien que proche de Typhimurium, cause dissémination septicémique à partir ganglions mésentériques = septicémie classique chez nourrisson et enfant, Fièvre Typhoïde chez adolescent et adulte

Dissémination dans « système réticulo-endothélial »  
= foie, rate, tissu hématopoïétique



## *Salmonella Typhi*: portage chronique

Certains patients guéris Fièvre typhoïde peuvent devenir porteurs chroniques asymptomatiques (2-5%)  
Parfois toute la vie

Peuvent périodiquement excréter grandes concentrations *S. Typhi*

= « porteurs asymptomatiques-distributeurs chroniques » décrits par Robert Koch

Autres patients peuvent rechuter à distance (plusieurs mois) avec la même souche isolée des prélèvements (hémoculture/coproculture) = 1-5% patients correctement traités par antibiotiques

### **Présence réservoir persistant *S. Typhi* dans organisme (Wain et al. 1999. J Clin Microbiol)**

Deux formes portage chronique:

**Chronique « court terme »** = colonisation cellules monocytaires immatures tissu hématopoïétique  
(Wain et coll. 2001. J Clin Microbiol)

**Chronique « long terme »** = années voire à vie = infection chronique vésicule biliaire d'où bactérie directement excrétée dans tube digestif par canal cholédoque via bile dans laquelle *S. Typhi* survit

Mauvaise connaissance mécanismes permettant ces états particuliers de persistance

Séquence génomes *S. Typhi* et *S. Typhimurium* a montré différences pas toujours évidentes à rapporter à capacité établir portage chronique

### **Élément prédominant =**

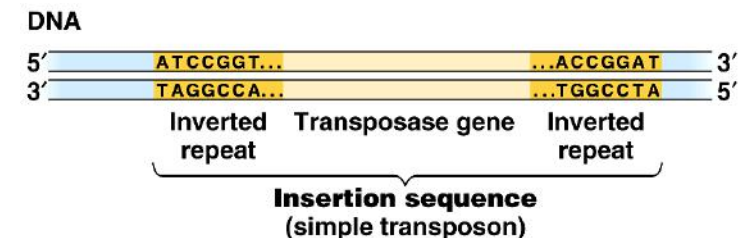
- **Accumulation pseudogènes chez *S. Typhi* par rapport à *S. Typhimurium***
- **Toxine typhoïdique propre à *S. Typhi***

## Qu'est-ce qu'un pseudogène ?

**Pseudogène** (définition originale) = gène inactif dans génome, du fait altérations génétiques le rendant non fonctionnel = incapable expression une protéine  
Cependant tous les gènes ne codent pas pour protéine (ARN régulateurs, etc...) ou suite à mutation peuvent produire transcrit protéine de fonction différente

Procaryotes = altérations gènes peuvent consister en mutations ponctuelles introduisant codon stop, microdélétions, inversions, intégration séquences insertion (IS)

Pression sélective tirant adaptation fait que différents types mutations peuvent être sélectionnées pour même gène dans différents clones (sous-groupes, sérotypes mêmes espèce pathogènes)



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Ohno, S. (1972). So much "junk" DNA in our genome. Brookhaven symposia in Biology, 23, 366-370.

## Accumulation pseudogènes chez *S. Typhi* en comparaison *S. Typhimurium*

### **Identité par altérations géniques (McClelland et coll. 2004. Nat Genet)**

Analyse génome *S. Typhi* = 200 pseudogènes dont 145 apparemment intacts chez *S. Typhimurium*

*S. Typhi* pseudogènes:

7/12 facteurs d'adhésion = opérons codant fimbriae (Townsend et coll. 2002. Infect Immun)

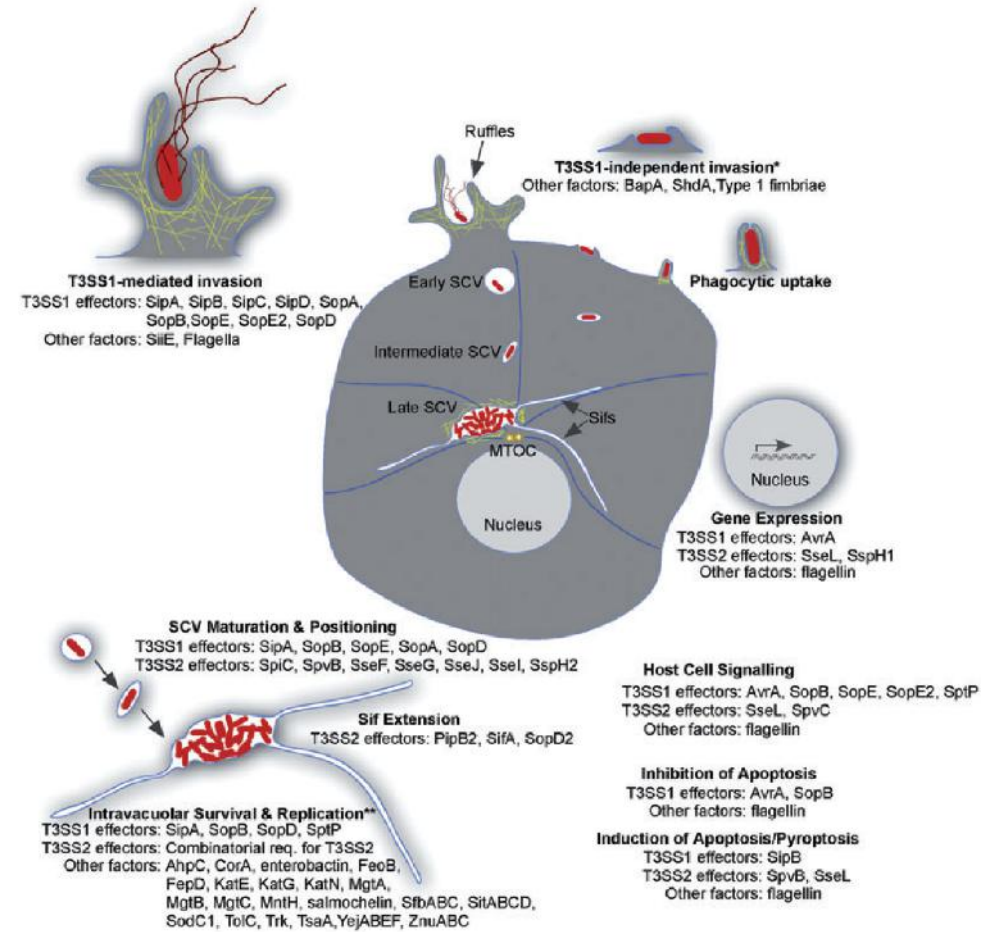
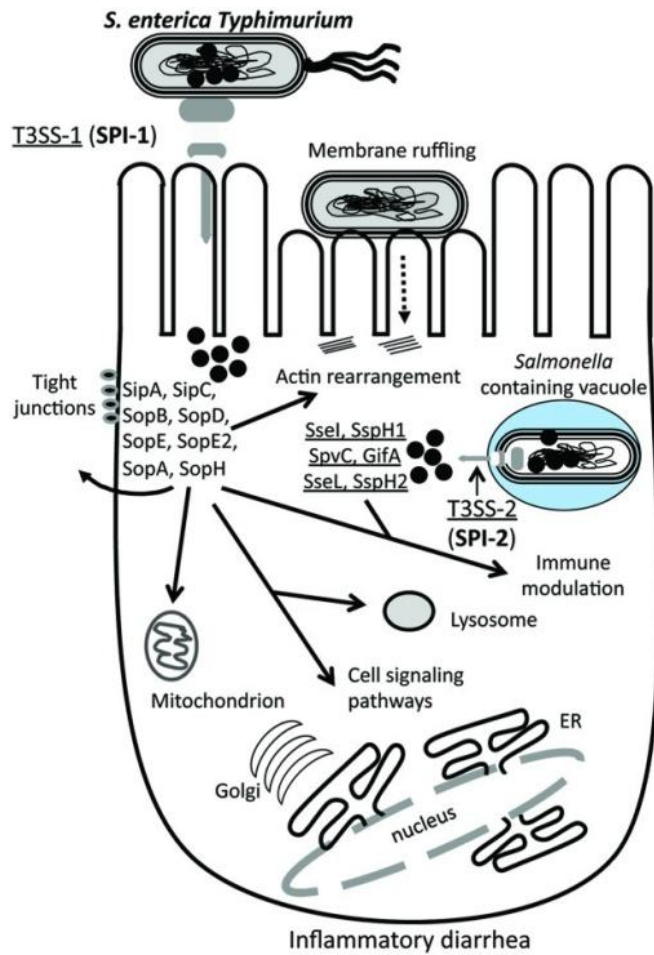
Mutations gènes impliqués dans excrétion bactéries (Kingsley et coll. 2002. Mol Microbiol)

Mutation dans gènes assurant/régulant vie intracellulaire = *sopA*, *sopD2*, *sopE2*, *sseJ*, *cigR*, *misL* (Hughes & Galan. 2002. Immunity)

Observations similaires dans adaptation stricte à hôte humain de *Yersinia pestis* (Parkhill et coll. 2001. Nature) et *Mycobacterium leprae* (Cole et coll. 2001. Nature)



# Physiopathologie Fièvre typhoïde



## Signification fonctionnelle pseudogènes *S. Typhi*

Perte plusieurs facteurs adhésion pourrait participer à glissement cible *S. Typhi* des cellules épithéliales vers cellules immunitaires = cellules dendritiques (Rescigno et coll. 2001. Nat Immunol), cellules phagocytaires CD18+ issues muqueuse intestinale (Vasquez-Torres et coll. 1999. Nature)

Pourrait donner à bactérie espace développement systémique = septicémie point départ lymphatique = décroissement épithélium intestinal où inversement *S. Typhimurium* se développe préférentiellement = maladie localisée à l'intestin (diarrhée +/- fébrile)

Souris pas modèle expérimental satisfaisant pour étudier physiopathologie *S. Typhi* spécifique espèce humaine, particulièrement pour étude persistance infectieuse

Etudes comparatives chez homme vaccins vivants *S. Typhimurium* et *S. Typhi* ayant subi mutations atténuation similaires (double mutation *aroC*, *ssaV*)

Double mutant *S. Typhi* colonise bien moins efficacement intestin (nb CFU feces et induction réponse Inflammatoire que *S. Typhimurium* (Hindle et coll. 2002. Infect Immun)

Evolution *S. Typhi* vers portage chronique et excrétion biliaire = caractéristique possiblement sélectionnée car homme étant seule espèce sensible et en l'absence réservoir animal, portage assure dissémination interhumaine microorganisme donc sa survie en tant que bacille typhique

Addition gènes chez *S. Typhi* en comparaison *S. Typhimurium*

## Identité par addition génique

A MICROBIOLOGICAL AND CLINICAL SCIENCE PUBLISHED BY

*Curr Opin Microbiol.* 2017 February ; 35: 70–77. doi:10.1016/j.mib.2017.01.012.

## Emerging insights into the biology of typhoid toxin

Casey C. Fowler, Shu-Jung Chang, Xiang Gao, Tobias Geiger, Gabrielle Stack, and Jorge E. Galán\*

Department of Microbial Pathogenesis, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, 06536

## Toxine typhoïdique = exotoxine A2B5

Addition gènes spécifiques *S. Typhi* pourrait aussi dicter spécificité d'espèce, profil clinique riche et portage chronique asymptomatique (House et coll. 2001. Curr Opin Infect Dis)

« Toxine typhoïdique » = acteur essentiel identité physiopathologique de *S. Typhi*

Contient composants homologues à deux toxines: « cytodistending toxin » et « pertussis toxin »

Modèle A (activité catalytique), B (activité liaison à récepteur dédié sur cellules cibles)

(Haghjoo et coll. 2004. PNAS; Spano et coll. 2008. Cell Host Microbe)

**Résultat = 3 gènes (CdtB, PltA et PltB)**

Toxine exclusivement produite par *S. Typhi* en position intracellulaire, diffuse dans SCV (Salmonella-containing vacuole) (Chang et coll. 2016. Cell Host Microbe)

Sécrétée par voie Sec standard dans périplasme, assemblée dans périplasme (environnement réducteur)

Passage membrane externe mal compris. Rôle endolysine hydrolysant peptidoglycane

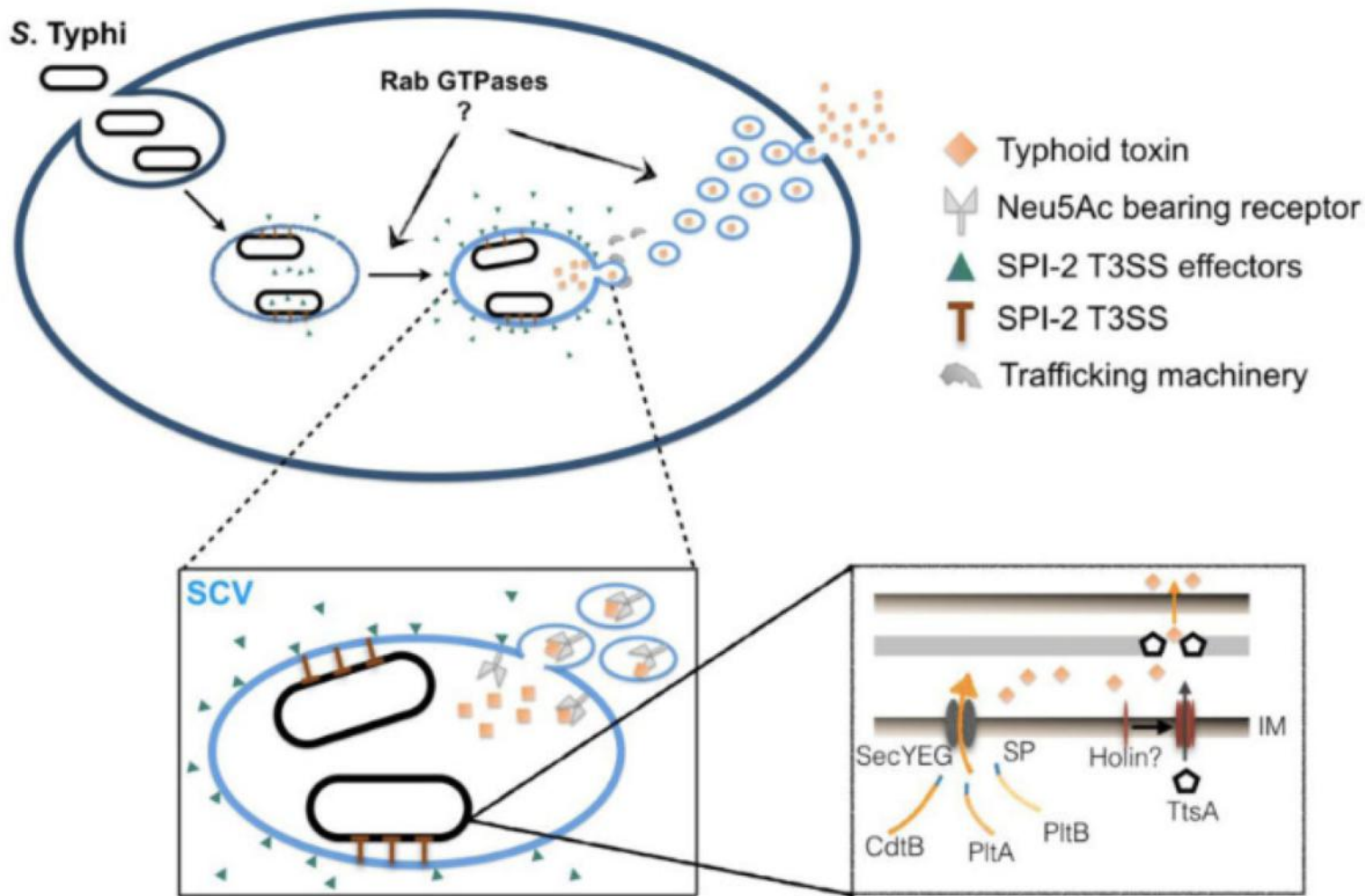
(Hodak et coll. 2013. EMBO Report)

Toxine quitte SCV pour former vésicules exocytose dans lesquelles elle est empaquetée grâce interaction sous-unité B (PltB) avec glycanes sialylés Neu5Ac nécessaire, Neu5Gc inefficace

Après export, toxine typhoïdique se fixe sur gangliosides surface cellulaire = glycanes terminaison Neu5Ac Neu5Gc non permissif (Deng et coll. 2014. Cell)

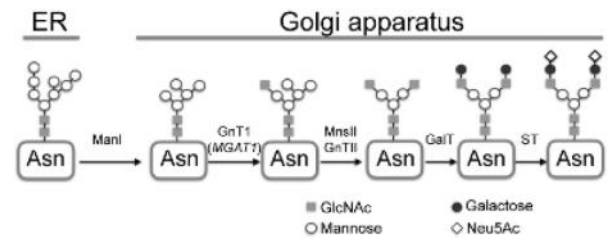
Récepteur = Podocalyxine sur cellules épithéliales et CD45 sur leucocytes (Song et coll. 2013. Nature)

# Traffic Toxine Typhoïdique



## Receptor-Mediated Sorting of Typhoid Toxin during Its Export from *Salmonella Typhi*-Infected Cells

Shu-Jung Chang,<sup>1</sup> Jeongmin Song,<sup>1,2</sup> and Jorge E. Galán<sup>1,3\*</sup>  
<sup>1</sup>Department of Microbial Pathogenesis, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06536, USA  
<sup>2</sup>Present address: Department of Microbiology & Immunology, Cornell University College of Veterinary Medicine, Ithaca, NY 14853-6401, USA  
<sup>3</sup>Lead Contact  
 \*Correspondence: jorge.galan@yale.edu  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.10.005>



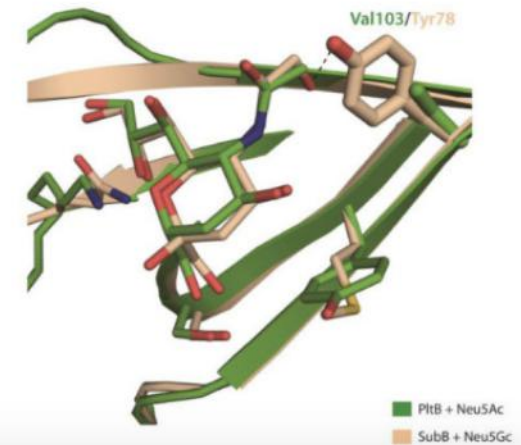
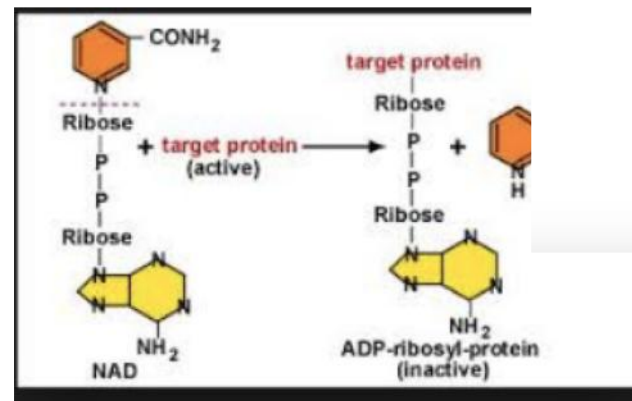
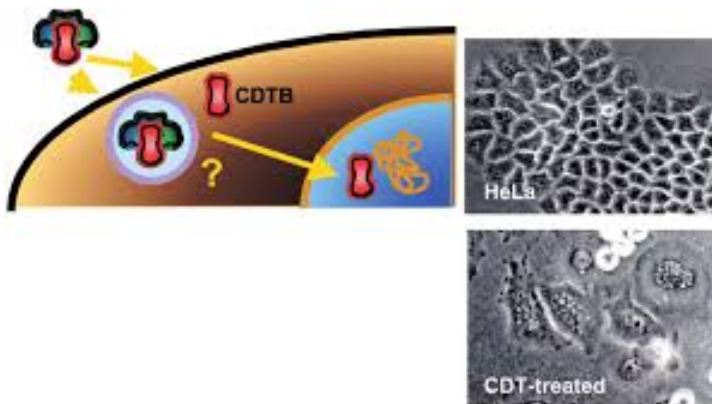
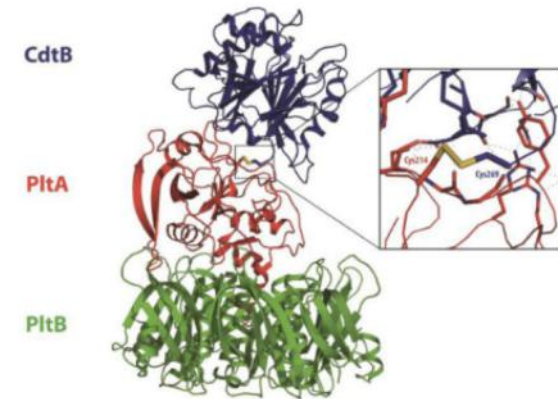
# Mode d'action Toxine Typhoïdique

Après liaison au récepteur cellulaire, CdtB et PItA transloqués dans cytoplasme

**CdtB** = DNase induisant cassures double-brin ADN cellule cible entraînant arrêt cycle cellulaire (Guerra et coll. 2011. Toxins)

**PItA** = ADP-ribosyltransférase

Activité catalytique démontrée sur lysats cellulaires, mais cibles protéiques ADP-ribosylées pas encore connues (Song et coll. 2013. Nature)



Song et coll. 2013. Nature

# Toxine Typhoïdique = Facteur majeur de spécificité d'espèce ?

Présence des gènes sur îlot de 5 kb présent chez *S. Typhi* et *S. Paratyphi A*

Pas chez *S. Typhimurium* et *S. Enteritidis* responsables seulement diarrhée +/- fièvre

Malgré non permissivité souris - même humanisée - à infection par *S. Typhi*, injection souris C57BL/6 toxine A2B5 active entraîne symptômes pathognomoniques fièvre typhoïde

Contrairement autres lignées murine, C57BL/6 produit quantité importante terminaisons Neu5Ac

(Hedlund et coll. 2007. Mol Cell Biol):

Fièvre = 0, mais perte de poids, déplétion massive des polynucléaires neutrophiles

Léthargie, coma (typhos), décès

= symptômes associés à la forme aiguë de la fièvre typhoïde (Song et coll. 2013. Nature)

Mutation CdtB = symptômes -

Mutation CltA = Symptômes +

Mutation CltB = Symptômes -

Rôle de la toxine typhoïdique dans la persistance de *S. Typhi* ? (Song et coll. 2010. Cell Host Microbe)

*S. Typhimurium* recombinante produisant la toxine typhoïdique montre persistance, mais souche n'exprime pas *ttsA* essentiel pour sa sécrétion par la bactérie

Chimpanzé résistant infection par *S. Typhi* (Edsall et coll. J Exp Med. 1960)

Pas clair quand îlot toxine typhoïdique acquis. Pathoadaptativité en conjonction avec pseudogènes ?

Îlot présent chez *S. bongori* colonisant animaux à sang froid...

# Etablissement portage chronique asymptomatique *S. Typhi*

Suite à résolution phase aiguë, 2-5% patients = échec capacité assurer stérilisation microorganisme  
Etat de portage chronique asymptomatique (Levine MM. 1982. J Infect Dis)

« Cahier des charges »:

Passage de la barrière épithéliale intestinale

Evasion de la réponse immunitaire innée initiale

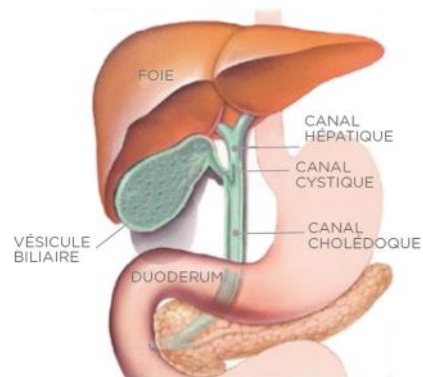
Localisation dans une niche permissive = essentiellement la vésicule biliaire

(Gonzalez-Escobedo et coll. 2011. Nat Rev Microbiol)

Mode d'accès ?

- Rétrograde à partir de l'intestin/Sphincter d'Oddi/cholédoque/vésicule ? **Peu probable...**

- Antérograde à partir foieensemencé durant phase septicémique, échec stérilisation par cellules de Kupfer, passage arbre hépato-biliaire puis canal hépatique et vésicule biliaire ? **Très probable...**



Lithiase biliaire





# Etablissement portage chronique asymptomatique *S. Typhi*

Vésicule biliaire = réservoir principal *S. Typhi* + site génération nouveaux génotypes (Roumagnac. 2006. Science)

Série cholécystectomies au Népal a montré présence *S. Typhi* et *S. Paratyphi A* (Dongol et coll. 2012. Plos One)

Signes échographiques altération vésicule biliaires chez 60% patients en phase aiguë maladie, suggérant colonisation/infection précoce vésicule biliaire (Mateen et coll. 2006. Indian J Pediatrics)

Très forte corrélation avec présence lithiases biliaires retrouvées chez 88% porteurs chroniques vs 11% chez sujets sains (Schioler et coll. 1983. Scand J Infect Dis)

Lithiase biliaire – 5-10% population (Enachsson et coll. 2013. JAMA Surgery))

Chez patients vivant en région d'endémie Typhique et cholécystectomisés, 3,5% des tissus positifs pour *S. Typhi*. Vésicules ectomisées positives pour *S. Typhi* et *Paratyphi A* montrent la présence d'un BIOFILM (Dongol et coll. 2012. Plos One)

Biofilm pas observé en présence d'autres Entérobactéries parfois retrouvées (Crawford et coll. 2010. PNAS)

Expérimentalement de telles bactéries ne forment pas de biofilm sur des lithiases contrairement à *Salmonella* (Prouty et coll. 2002. Infect Immun))

Capacité de *S. Typhi* de former des biofilms *in vitro*, y compris en utilisant des calculs vésiculaires cholestéroliques comme matrice (Prouty et coll. 2002. Infect Immun)

Problème : *S. Typhimurium* est aussi capable *in vitro* de former des biofilms... Mais du fait physiopathologie locale n'accède pas à vésicule biliaire faute de phase systémique infection (Simm et coll. 2014. Future Microbiol)

Confirmé sur modèles murin

Rôle colonisation chronique vésicule biliaire par *S. Typhi* et autres bactéries dans survenue cancers vésiculaires ? (Di Domenico et coll. 2017. Int J Mol Sci)

# Etablissement portage chronique asymptomatique *S. Typhi*

*Trends Microbiol.* 2014 November ; 22(11): 648–655. doi:10.1016/j.tim.2014.06.007.

## **Salmonella chronic carriage: epidemiology, diagnosis and gallbladder persistence**

John S. Gunn<sup>1</sup>, Joanna M. Marshall<sup>1</sup>, Stephen Baker<sup>2,3,4</sup>, Sabina Dongol<sup>5</sup>, Richelle C. Charles<sup>6,7</sup>, and Edward T. Ryan<sup>6,7,8</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbial Infection and Immunity, Center for Microbial Interface Biology, The Ohio State University

<sup>2</sup>The Hospital for Tropical Diseases, Wellcome Trust Major Overseas Programme, Oxford University Clinical Research Unit, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>3</sup>Centre for Tropical Medicine, Oxford University, Oxford, United Kingdom

<sup>4</sup>The London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, United Kingdom

<sup>5</sup>Oxford University Clinical Research Unit, Patan Academy of Health Sciences, Kathmandu, Nepal

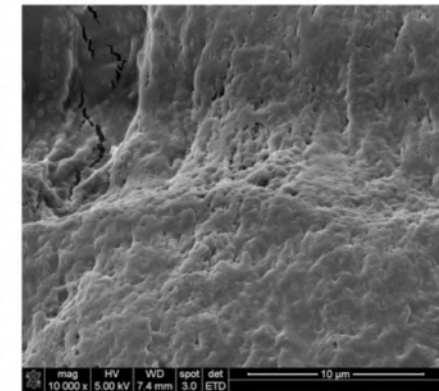
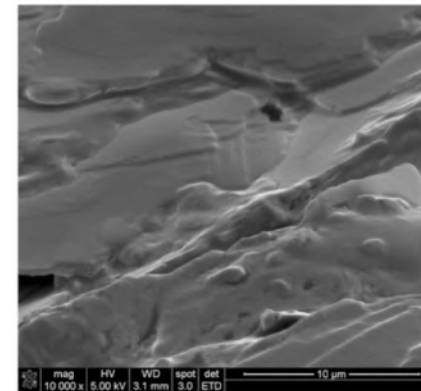
<sup>6</sup>Division of Infectious Diseases, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts, USA

<sup>7</sup>Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

<sup>8</sup>Department of Immunology and Infectious Diseases, Harvard School of Public Health, Boston, Massachusetts, USA

## Immunoreactive *S. Typhi* proteins in carriers identified via In vivo-induced antigen technology

<i>S. Typhi</i> gene	<i>S. Typhimurium</i> gene	Function/details
<i>corC</i> (STY0712)	<i>ybeX</i> (STM0667)	Magnesium and cobalt efflux protein; magnesium and cobalt transporter [34]
<i>artB</i> (STY1364)		Upregulates chemokines, cytokines and adhesion molecules in human macrophage, colonic epithelial, and brain microvascular endothelial cell lines [34]
<i>yncE</i> (STY1479)		Unknown, ATP and DNA-binding domains [70]
<i>sirA</i> (STY2155)	<i>uvrY</i> (STM1947)	Response regulator; post-transcriptional regulatory system regulate the expression of both the SPI-1 and SPI-2 genes ( <i>Salmonella</i> pathogenicity islands); transcription regulator; cytoplasmic protein [71]
STY2386		Putative lipoprotein [72]
<i>pduG</i> (STY2248)	<i>pduG</i> (STM2043)	Propanediol degradation; <i>pdu</i> operon co-regulated with <i>cob</i> operon appears to encode for cobalamin adenosyl transferase activity [73]
STY2386	STM2156A	Putative lipoprotein [34]
<i>yejE</i> (STY2454)	<i>yejE</i> (STM2218)	Confers resistance to antimicrobial peptides and contributes to virulence; ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system permease component; upregulated in macrophages [74]
<i>xapB</i> (STY2657)	<i>xapB</i> (STM2421)	Xanthosine permease; proton nucleoside symporter that can transport 6-oxo-purine ribonucleosides, adenosine, cytidine, uridine, and thymidine; biosynthesis [75]
<i>purH</i> (STY3709)	<i>purH</i> (STM4176)	Purine biosynthesis [76]
<i>repE</i> (HCM1.137)		On plasmid; replication initiation protein [77]
HCM1.213c		Unknown, on plasmid [34]
HCM2.0043		Unknown, on plasmid [34]
HCM2.0069c		Unknown, on plasmid [34]



Biofilms vésicule biliaire porteurs chroniques asymptomatiques *S. Typhi*

Recherches immunomarqueurs portage chronique

## Etablissement portage chronique asymptomatique *S. Typhi*

### **Salmonella adaptée à colonisation voies biliaires**

**Biofilm** = élément important capacité survie Salmonella dans vésicule biliaire  
= mécanisme pathoadaptatif permettant aggrégation, adhérence à matrice stable, réfractance traitement antibiotique

En présence bile et cholestérol *in vitro*:

*S. Typhi* accroît rapidement capacité de former un biofilm et résister aux antibiotiques (Prouty et al. 2002. Infect Immun; Gunn. 2000. Microbes and Infection)

De modifier expression pili et protéines de surface (Gonzalez-Escobedo et Gunn. 2013. Infect Immun; Antunes et coll. 2012. J Bacteriol)

Evidence profil transcriptionnel adaptation souches isolées vésicule par rapport isolats systémiques (Kalai-Chelvann et coll. 2014. Gut Pathogens)

Profil reproduit expérimentalement *in vitro* dans différentes conditions: croissance sur cellules vésicule biliaire, surfaces recouvertes de cholestérol, lithiases (Gunn. 2000. Microbes and Infection; Hernandez et coll. PLoS Genetics)

# Etablissement portage chronique asymptomatique

## Epithelium vésiculaire = niche alternative/complémentaire ?

*S. Typhimurium* = Typhoïde murine, adhère, envahit, survit dans cellules épithélium

Forme biofilm surface épithélium (Menendez et coll. 2009. J Infect Dis)

*S. Typhimurium* pousse dans bile = puissant antibactérien et source nutriments = phospholipides (Antunes et coll. 2011. J Bacteriol)

Invasion et élimination cellules épithéliales en phase aiguë infection dans modèle murin infection

Replication/élimination bactéries > 2 mois (Gonzalez-Escobedo et coll. 2013. Infect Immun)

## Modèle mixte émerge...

*Salmonella* Infection of Gallbladder Epithelial Cells Drives Local Inflammation and Injury in a Model of Acute Typhoid Fever

Alfredo Menendez,<sup>1\*</sup> Ellen T. Arena,<sup>1\*</sup> Julian A. Guttman,<sup>4</sup> Lisa Thorson,<sup>1</sup> Bruce A. Vallance,<sup>3</sup> Wayne Vogl,<sup>2</sup> and B. Brett Finlay<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Michael Smith Laboratories and <sup>2</sup>Department of Cellular and Physiological Sciences, Division of Anatomy and Cell Biology, Life Sciences Centre, University of British Columbia, and <sup>3</sup>Division of Gastroenterology, BC Children's Hospital, Vancouver, and <sup>4</sup>Department of Biological Sciences, Simon Fraser University, Burnaby, British Columbia, Canada

MAJOR A

