

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

9 janvier 2019
16h00, Leçon#3

Pathogènes bactériens: immunomanipulation, réduction génomique, « en marche » vers le parasitisme ?
Séminaire : Infection par Chlamydia : la « boîte noire » de la chronicité entre-ouverte, Agathe SUBTIL,
Institut Pasteur

Infections persistantes

Colonisation bactérienne prolongée surface cutanée ou muqueuse

Invasion bactérienne prolongée tissu/organe = possiblement toute la vie

- Infection asymptomatique = infection silencieuse durant longue période, puis réactivation tardive avec symptomatologie clinique (tuberculose)
- Chronicité = infection soutenue, stable ou progressive (staphylococcies)
- Récurrence = éclipses cliniques et réapparitions +/- régulières (typhoïde, borrélioses)

Impact négatif sur morbidité et mortalité, augmentation risque transmission

Rôle possible dans pathologies inflammatoires chroniques et oncogénèse
(problématiques d'intérêt croissant)

Infections bactériennes persistantes: définition réactualisée

Systeme immunitaire hôte infecté peut généralement éliminer agent infectieux et assurer la stérilisation du/des foyer(s)

Réponse innée immédiate = assure part importante réduction charge microbienne

Réponse adaptative = stérilisation. Initiée et orientée par profil/intensité réponse innée

Processus stérilisation considérablement renforcé et accéléré par utilisation antibiotiques

Physiopathologie, prévention, traitement Infections persistantes à réévaluer de nos jours dans contexte bactéries échappant à réponse immunitaire ET aux antibiotiques

Mécanismes échappement communs aux pathogènes responsables (biofilm) et/ou spécifiques

Infections persistantes qui en découlent difficiles à stériliser

Mécanismes microbiens « anti-immunité » de persistance

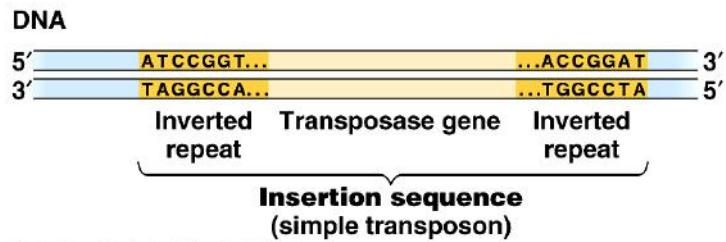
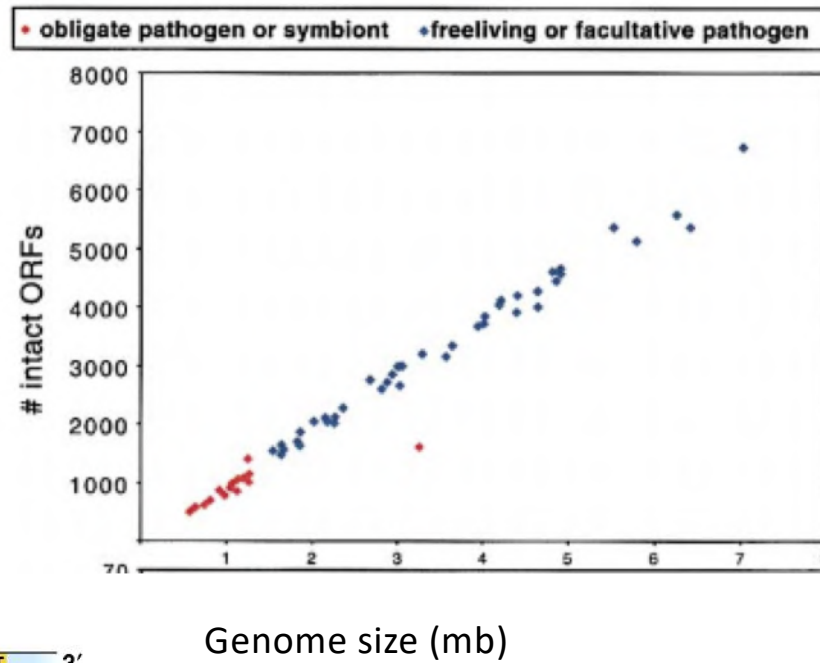
Mécanismes physiopathologiques généraux	Pathogènes modèles	Détails mécanismes physiopathologiques
Variation antigénique	<i>N. meningitidis</i> <i>N. gonorrhoeae</i> <i>B. burgdorferi</i> <i>B. fragilis</i>	Bactéries varient composants de surface utilisant répertoire de gènes existants ou acquis par transfert horizontal
Colonisation d'un organe particulier	<i>S. Typhi</i> <i>M. Leprae</i> <i>H. pylori</i>	Persistance dans cellules système réticulo-endothélial (moelle hématopoïétique) & vésicule biliaire (biofilm/lithiase) Colonisation système nerveux Colonisation surface muqueuse gastrique (résistance bas pH)
Mimétisme antigènes hôte	<i>N. gonorrhoeae</i> <i>N. meningitidis</i> <i>T. pallidum</i>	Sialylation LPS Mimétisme PS de l'hôte « Coating » par protéines de l'hôte
Résistance aux effecteurs immunité	<i>B. pseudomallei</i> <i>M. tuberculosis</i>	Résistance aux PNN Résistance aux macrophages

Mécanismes microbiens « anti-immunité » de persistance

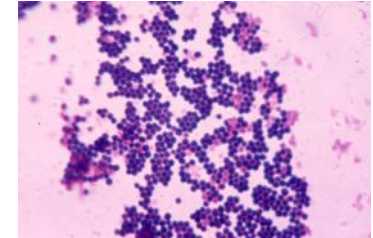
Mécanismes physiopathologiques généraux	Pathogènes modèles	Détails mécanismes physiopathologiques
Modification environnement intracellulaire	<i>S. Typhi</i> <i>Brucella sp.</i> <i>M. Tuberculosis</i> <i>Chlamydia sp.</i>	Capacité d'éviter fusion phago-lysosomale, modif. environnement vacuole Etablissement vie intracellulaire obligatoire
Défense antiphagocytaire	<i>P. aeruginosa</i> <i>M. tuberculosis</i>	Production capsule (alginate, polysaccharides) Production lipides extracellulaires
Délétion génique	<i>M. leprae</i> <i>S. Typhi</i>	Perte gènes, accumulation pseudogènes, croissance hyperlente, dormance métabolique Perte gènes/accumulation pseudogènes = perte phénotypes (adhésion épithélium), changement tropisme vers SRE
Young et coll. 2002. Nat Immunol		

Microbial Minimalism: Genome Reduction in Bacterial Pathogens

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



Staphylococcus



Espèces de staphylocoques, particulièrement *S. aureus* et *S. epidermidis* = étiologies fréquentes
Infections hospitalières et communautaires

S. epidermidis = étiologie fréquente infections sur dispositifs invasifs (catheters, prothèses) = biofilm
(Fitzpatrick et coll. 2005. J Med Microbiol ; Otto et coll. 2008. Curr Top Microbiol Immunol ;
Fey . 2010. Curr Opin Microbiol)

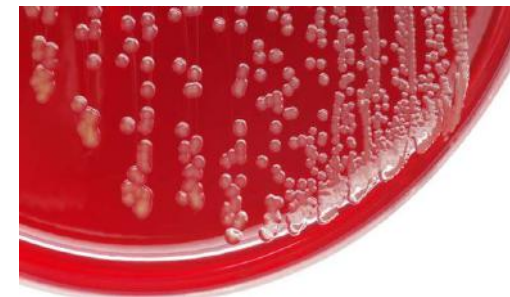
S. aureus = infections tissulaires: endocardites (Fitzsimmons et coll. 2010. Br J Biomed Sci)
et ostéomyélites (Zuluaga et coll. 2006. Arch Intern Med)

Emergence de souches de Staphylocoques résistantes aux beta-lactamines (méthicilline) dans années
60 (SARM) a fait des staphylocoques des microorganismes dominants en pathologie humaine
Infections chroniques, débilantes et induisant des coûts de soins élevés

Biofilm au premier plan



S aureus



S epidermidis

Pourcentage de la mortalité annuelle due à infections par bactéries résistantes attribuable à Staphylocoques

Bactériémies à SARM 9,8%

Infections urinaires à SARM 0,2%

Infections respiratoires à SARM 7,0%

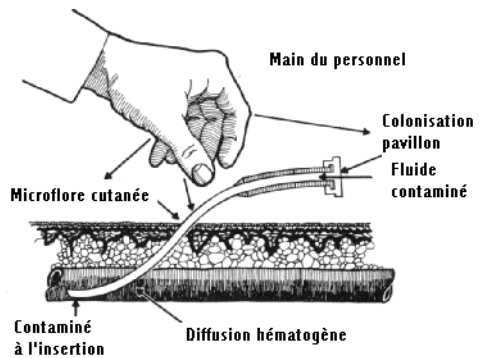
Total = 28,2%

Infections peau, tissus mous
et sites opératoires à SARM 1,4%

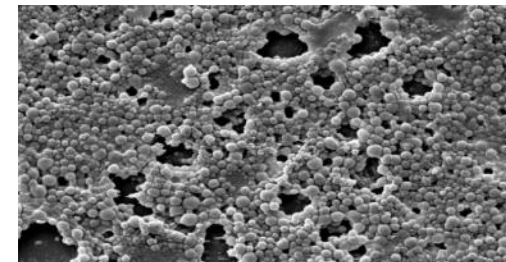
Infections os et articulations à SARM 9,8%

Sur total 12-17000 décès annuels estimés
150000-200000 cas estimés

Biofilms et infections à staphylocoques



Infections sur cathéter

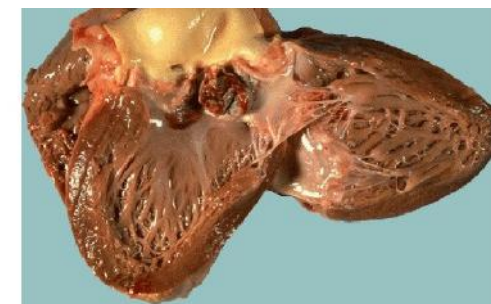


Infections sur prothèse

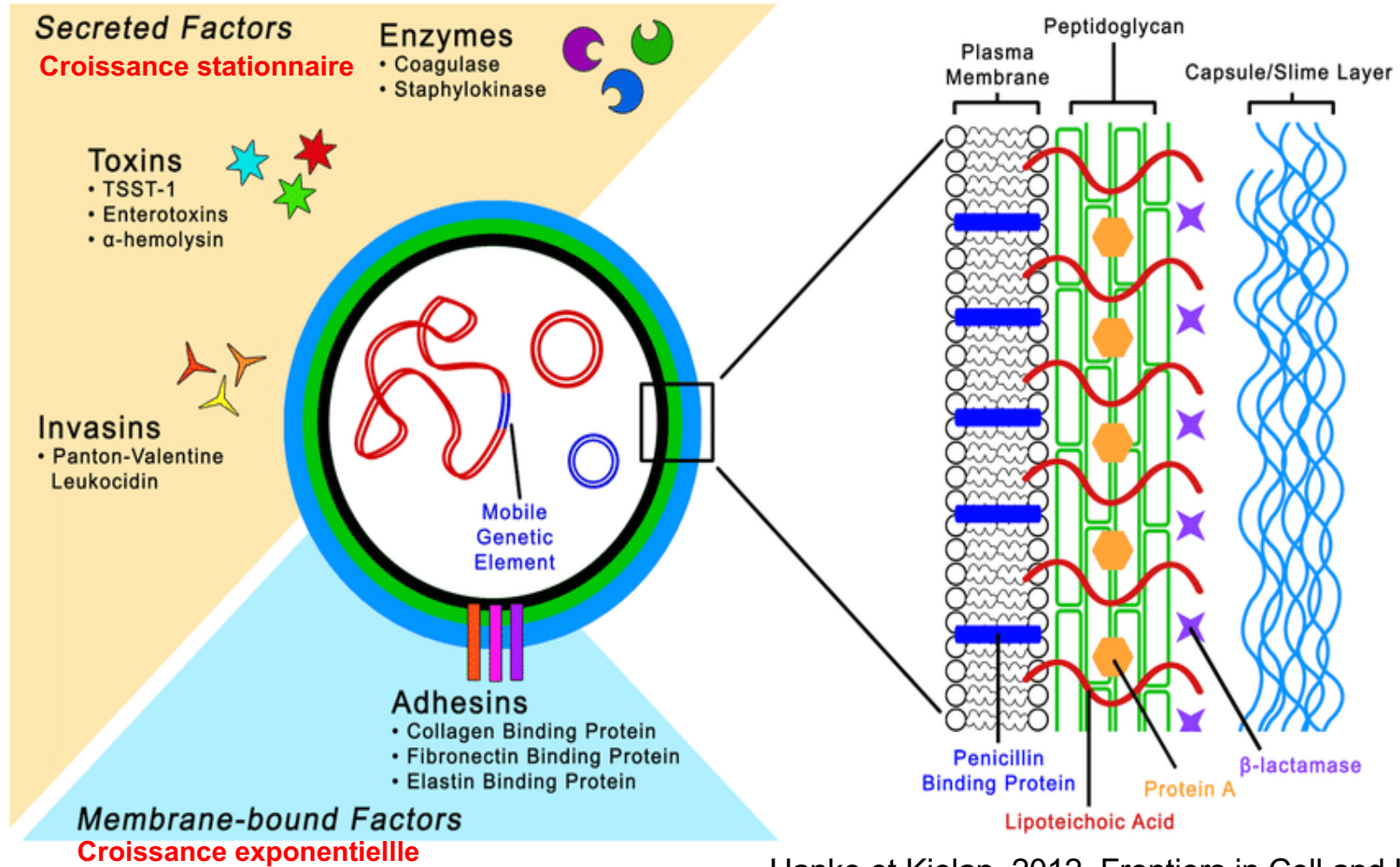
Ostéomyélites chroniques



Endocardites

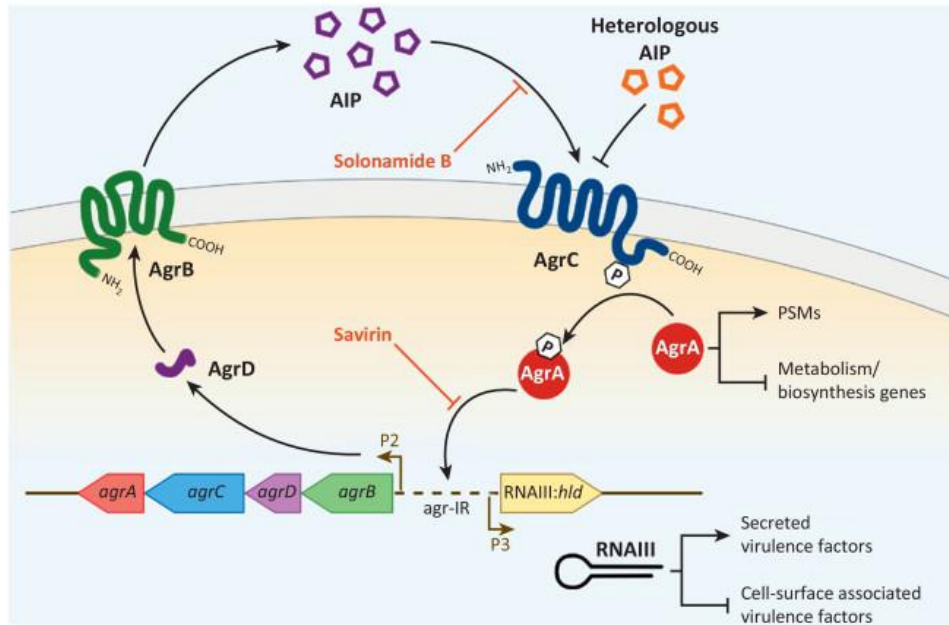


Interface *S. aureus* et immunité

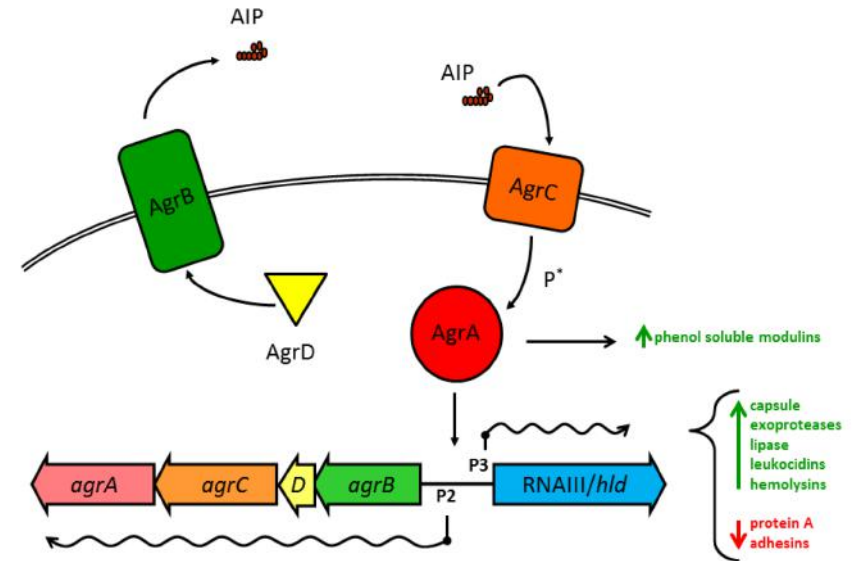
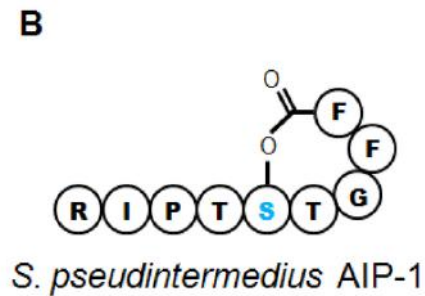
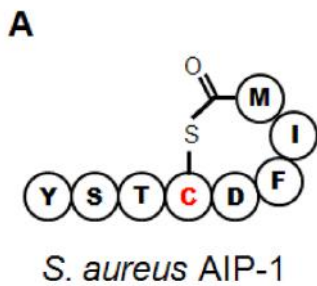


Hanke et Kielan. 2012. *Frontiers in Cell and Infect Microbiol*)

Régulation effecteurs virulence *S. aureus*: quorum sensing



Réalité environnement dictant régulations dans biofilms plus complexe que seul QS
 Hétérogénéité état bactéries temps et espace
 Autres conditions environnementales:
 aéro/anaérobiose, dispo nutriments, etc...



S. aureus et reconnaissance immunitaire innée

1 - Staphylocoques présentent une paroi complexe contenant PAMPs essentiellement candidats à reconnaissance par TLR2 =

Acides lipoteichoïques (LTA) et peptidoglycane (PGN)

(Morath et coll. 2002. J Exp Med; Dziarski et coll. 2003. Cell Mol Life Sci; Weber et coll. 2003. Curr Opin Immunol)

Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) et Phenol-soluble modulín (PSD) – particulièrement *S. epidermidis* - stimulent production biofilm (Hajar et coll. 2001. J Immunol; Stevens et coll. 2009. Cell Microbiol)

Lipoprotéines staphylococciques (Lpp) = grande famille lipoprotéines ancrées dans la membrane cytoplasmique

(Hashimoto et coll. 2006. Int Immunol.; Kurokawa et coll. 2009. J Biol Chem)

Controverse persistante sur fait que seuls agonistes *bona fide* de TLR2 = Lpp

Autres PAMPs = très dépendants conditions expérimentales, voire contamination par Lpp...

Seuls lipopeptides synthétiques activent clairement TLR2 (Aliprantis et coll. Science. 1999)

PGN semble essentiellement agoniste *bona fide* des récepteurs cytosoliques Nod1 et Nod2 (Girardin et coll. 2003. Science; Girardin et coll. 2003. J Biol Chem)

2 - Reconnaissance par TLR9 = îlots ADN CpG (séquences ADN procaryotes/virales non-méthylées) (Martinez-Campos et coll. 2017. Viral Immunol)

S. aureus et reconnaissance immunitaire innée

Macrophages, PNNs, cellules dendritiques expriment TLR9 = reconnaissent motifs ADN CpG non-méthylés (eDNA)

de staphylocoques présent en grande quantité dans matrice biofilms
(Whitchurch et coll. 2002. Science ; Allesen-Holm et coll. 2006. Mol Microbiol;
Rice et coll. 2007. PNAS)

« Plate forme » TLR2/TLR9 = reconnaissance innée de staphylocoques à état planctonique entraînant expression large spectre chimiokines, cytokines proinflammatoires et molécules microbicides

Régulation dans biofilms ?

S. aureus cause infections persistantes/sans induire immunité protectrice significative

Curr Opin Microbiol. 2012 February ; 15(1): 92–99. doi:10.1016/j.mib.2011.10.012.

Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*

Hwan Keun Kim, Vilasack Thammavongsa, Olaf Schneewind^{*}, and Dominique Missiakas
Department of Microbiology, University of Chicago, 920 East 58th Street, Chicago, IL 60637

frontiers in
CELLULAR AND INFECTION MICROBIOLOGY

REVIEW ARTICLE
published: 08 May 2012
doi: 10.3389/fcimb.2012.00062



Deciphering mechanisms of staphylococcal biofilm evasion of host immunity

Mark L. Hanke and Tammy Kielian*

Department of Pathology and Microbiology, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, USA

Nat Rev Immunol. 2011 March ; 11(3): 187–200. doi:10.1038/nri2918.

Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity

George Hajishengallis¹ and John D. Lambris²

¹University of Louisville, Microbiology and Immunology & Oral Health and Systemic Disease Research Group, 501 South Preston Street, Louisville, KY 40292, USA.

²University of Pennsylvania School of Medicine, Department of Pathology and Laboratory Medicine, 422 Curie Boulevard, Philadelphia, PA 19104, USA.

J Cell Physiol. 2013 July ; 228(7): 1413–1422. doi:10.1002/jcp.24299.

Disruption of Immune Regulation by Microbial Pathogens and Resulting Chronic Inflammation

Kenneth Barth¹, Daniel G. Remick², and Caroline A. Genco^{1,*}

¹Department of Medicine Section of Infectious Disease, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts

²Department of Pathology and Laboratory Medicine, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts

Nat Rev Microbiol. 2015 September ; 13(9): 529–543. doi:10.1038/nrmicro3521.

Staphylococcal manipulation of host immune responses

Vilasack Thammavongsa^{*}, Hwan Keun Kim, Dominique Missiakas, and Olaf Schneewind
Department of Microbiology, University of Chicago, 920 East 58th Street, Chicago, Illinois 60637, USA

Annu Rev Microbiol. 2014 ; 68: 439–458. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155711.

Subterfuge and Sabotage:

Evasion of Host Innate Defenses by Invasive Gram-Positive Bacterial Pathogens

Cheryl Y.M. Okumura¹ and Victor Nizet²

¹Department of Biology, Occidental College, Los Angeles, California 90041; okumura@oxy.edu

²Department of Pediatrics and Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of California, San Diego, La Jolla, California 92093; vnizet@ucsd.edu

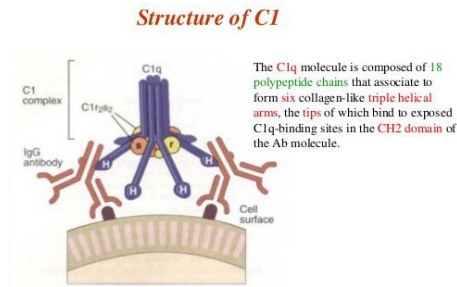
Stratégies subversion défenses immunitaires innées/adaptatives par *S. aureus*

- Evasion dépôt et activation du complément
- Inhibition opsono-phagocytose médiée par les anticorps
- Délétion lymphocytes B & T (superantigènes)
- Empêche recrutement/activation cellules phagocytaires
- Résiste aux peptides antimicrobiens de l'hôte = cellules épithéliales (kératinocytes)/phagocytaires)
- Résiste aux espèces réactives de l'oxygène (ROS)
- Echappe aux NETs (« neutrophil extracellular traps »)
- Entraîne mort cellules phagocytaires par sécrétion cytolysines (leucocidines) formant des pores membranaires

- Protection dans biofilms (*S. aureus* & *S. epidermidis*)

Evasion dépôt et activation complément surface bactérie

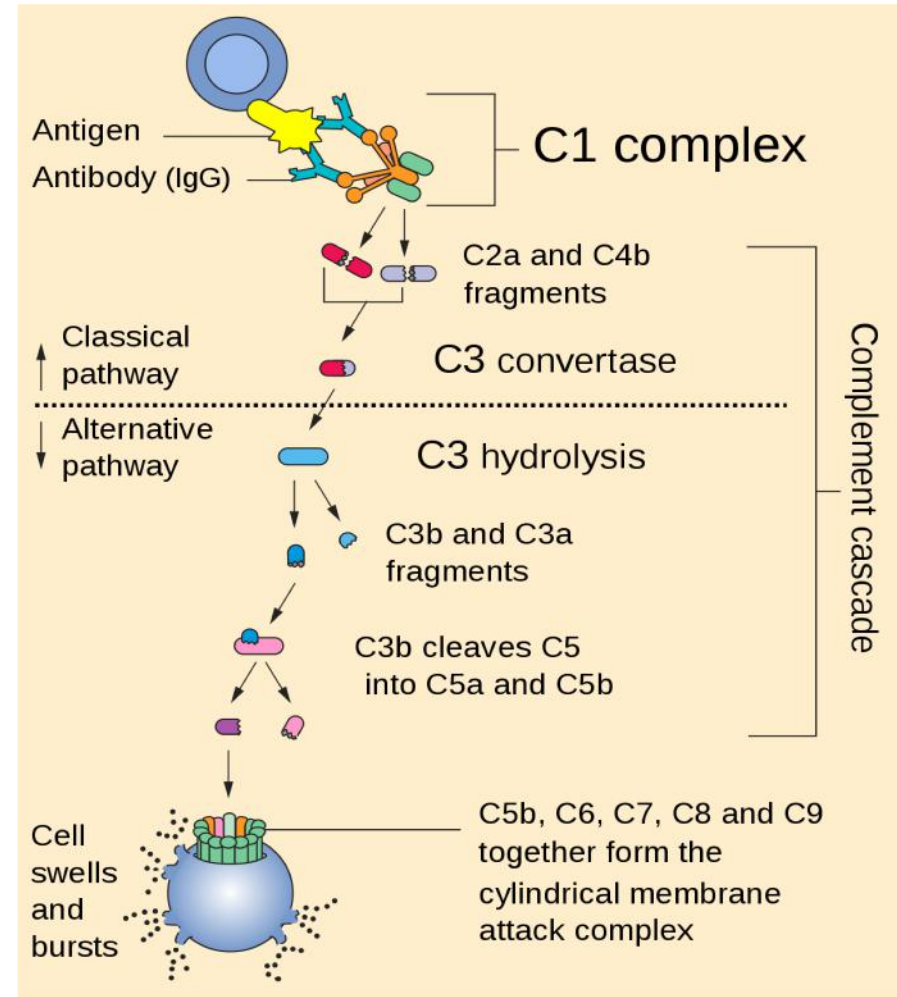
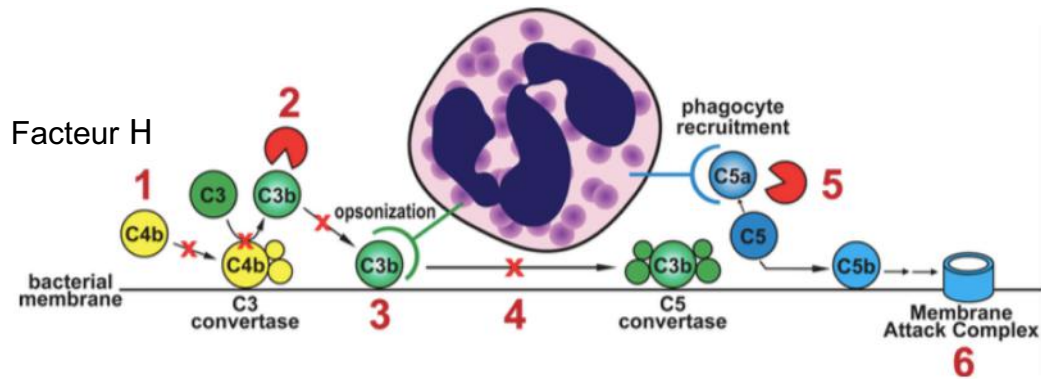
Activation cascade du complément



Abbas AK & Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology 5th ed. 2003.

Voie classique

Voie alterne



Evasion dépôt et activation complément surface bactérie

Dépôt et activation du complément surface bactérienne = composants essentiels de défense innée =

2 conséquences:

Oponisation bactéries facilitant phagocytose

Destruction directe bactérie par altération membrane par complexe attaque membranaire (MAC)

(Brown et coll. 2013. Annu Rev Microbiol)

Chez bactéries à Gram+ comme *S. aureus*, MAC semble avoir une faible activité membranolytique (accessibilité du fait paroi ?)

Rôle dominant opsonine C3b et anaphylatoxine C5a (Berends et coll. 2013. Cell Microbiol)

Régulation cascade activation par régulateurs endogènes évitant lésions tissulaires (Facteur H lie C4b)

***S. aureus* (pathogènes G+) produisent molécules qui acquièrent Facteur H = inhibiteur C3 convertase (Dave et coll. 2001. Infect Immun; Ermert et coll. 2013. J Biol Chem)**

Inhibition C3 convertase = 0 production C3b et C5a (Rooijackers et coll. 2005. Nature Immunol)

S. aureus = molécules non liées à la surface bactérienne mais sécrétées (Rooijackers et van Strijp. 2007. Mol Immunol)

Autres mécanismes = *S. aureus* « Clumping Factor A » lie fibrinogène surface bactérienne, forme écran empêchant liaison C3B = bloque opsonisation (Hare et coll. 2010. Infect Immun)

Inhibition opsono-phagocytose médiée par les anticorps

Phagocytose bactéries par polynucléaires neutrophiles (PNN) et par les macrophages stimulée par liaison à surface bactérienne anticorps spécifiques facilitant phagocytose par liaison domaine Fc des anticorps au Fc –récepteur exprimé à la surface des phagocytes

Liaison anticorps à surface microbe permet aussi activation voie classique complément par liaison C1q au domaine Fc immunoglobuline fixée

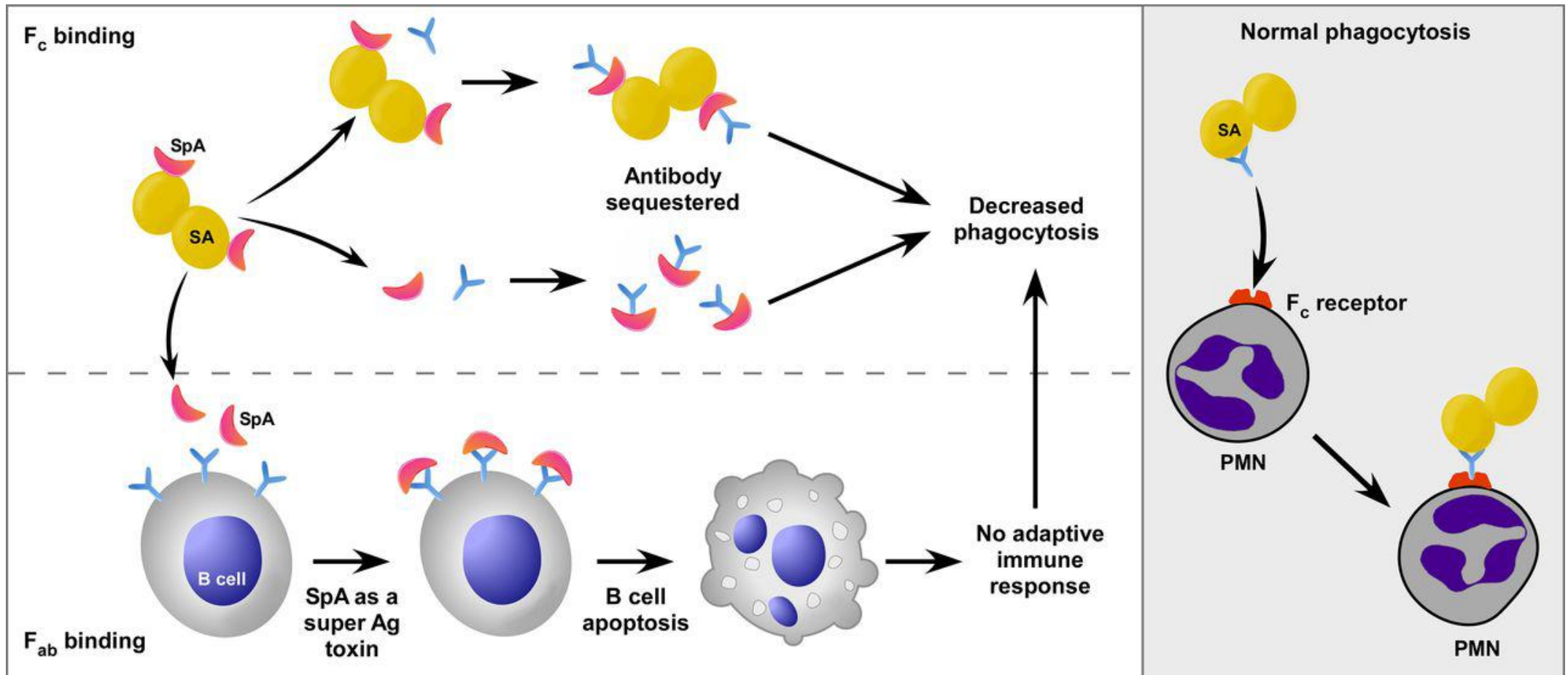
S. aureus assure subversion fonction anticorps par deux grandes stratégies:

1 - Liaison anticorps non génératrice opsonisation = Protéine A (SpA): inhibiteur compétitif Fc-récepteur phagocytes et C1q liant domaine Fc des IgG et inversant leur position = bloquant opsonisation directe ou via activation voie classique complément (Kim et coll. 2010. Curr Opin Microbiol)

2 - Dégradation anticorps par protéases = Protéase V8 de *S. aureus* (Prokesova et coll. 1992. Immunol Lett)

Importance et rôle dans inhibition opsono-phagocytose reste à démontrer. Doute chez *Streptococcus* (Okumura et coll. 2013. Mbio)

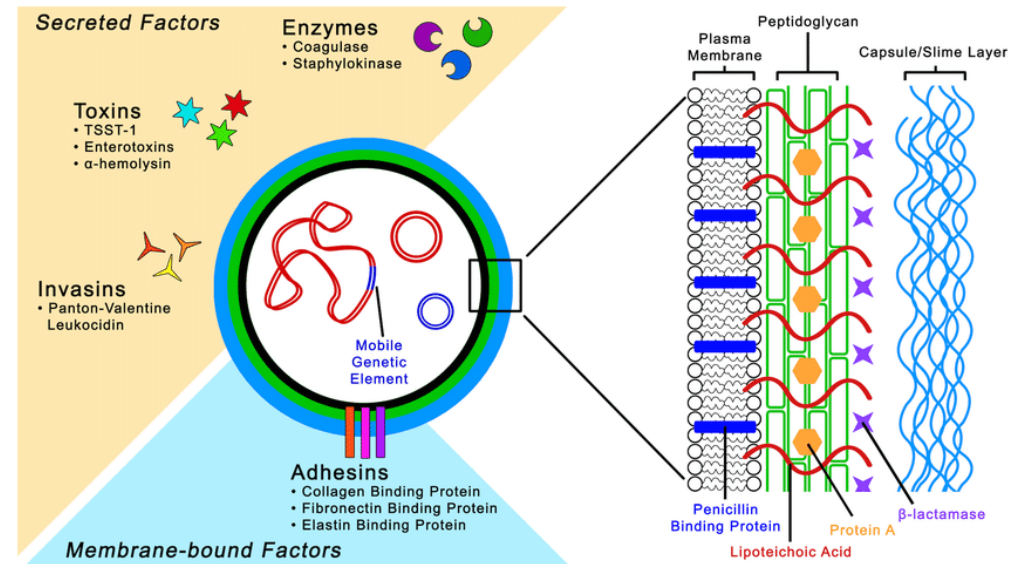
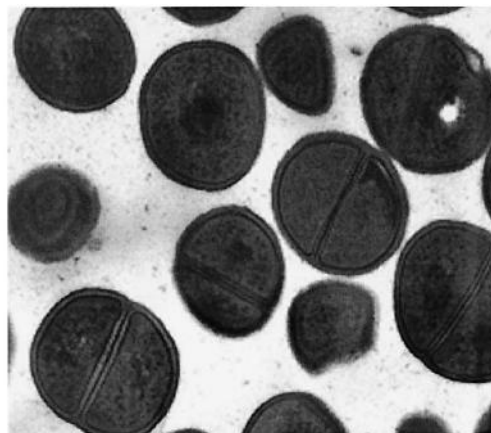
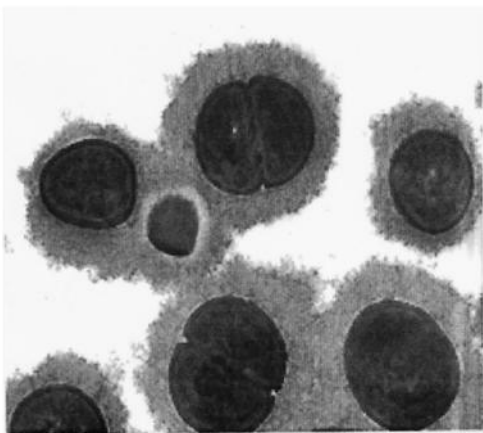
Inhibition opsono-phagocytose médiée par les anticorps



Inhibition opsono-phagocytose médiée par complément et anticorps: capsule polysaccharidique de *S. aureus*

S. aureus exprime une capsule polysaccharidique masquant la surface bactérienne et lui permettant d'échapper aux défenses immunitaires humorales et cellulaires particulièrement opsono-phagocytose (Lowy. 1998. N Engl J Med)

Addition et synergie avec »extracellular fibrinogen binding protein (Efb) sécrétée et formant un écran s'appuyant sur la matrice capsulaire (Kuipers et coll. 2016. Microbiology)



Microbiology (2016), 162, 1185–1194

DOI 10.1099/mic.0.000293

The *Staphylococcus aureus* polysaccharide capsule and Efb-dependent fibrinogen shield act in concert to protect against phagocytosis

Annemarie Kuipers,¹ Daphne A. C. Stapels,¹† Lieroy T. Weerwind,¹ Ya-Ping Ko,² Maartje Ruyken,¹ Jean C. Lee,³ Kok P. M. van Kessel¹ and Suzan H. M. Rooijackers¹

Correspondence
Suzan H. M. Rooijackers
s.h.m.rooijackers@umcutrecht.nl

¹Medical Microbiology, University Medical Center Utrecht, 3584 CX Utrecht, The Netherlands

²Center for Infectious and Inflammatory Disease, Institute of Bioscience and Technology, Texas A&M University Health Science Center, Houston, TX 77030, USA

³Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

Inhibition opsono-phagocytose médiée par les anticorps et au-delà...

3 effecteurs de *S. aureus* sécrétés:

Protéine A (SpA) = capable capturer portion FcG des immunoglobulines
Mais aussi forme complexe avec IgM type V_H3 surface cellules B et exerce rôle **superantigène** modulant les réponses anticorps à *S. aureus* en cours d'infection

Protéine liant immunoglobulines (Sbi) = aussi capable de capturer la portion FcG des
S'associe aux fragments 3d et H assurant la déplétion du complément

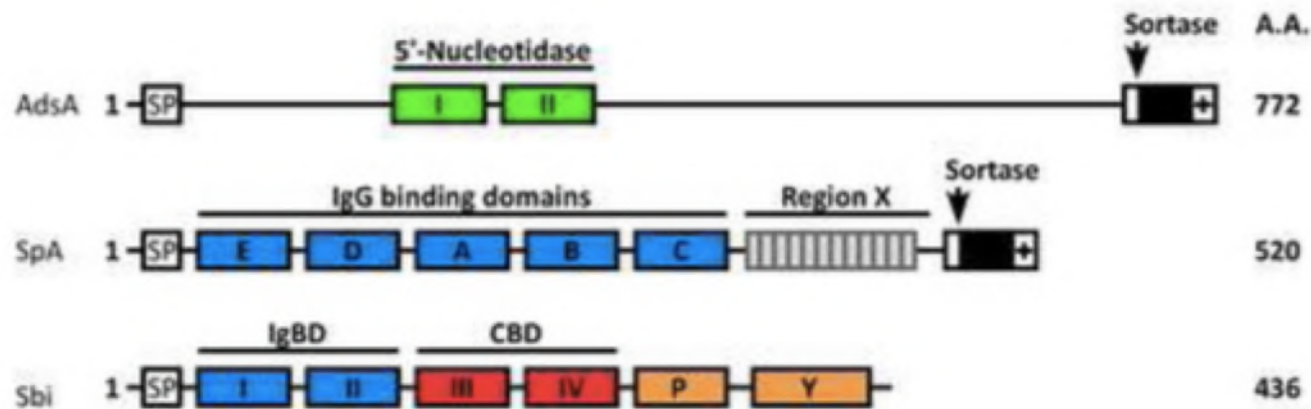
Adénosine-synthase A (AdsA) = synthétise l'adénosine essentielle à inhibition
réponse immunitaire

« Cluster » génétique d'évasion système immunitaire

Immune Evasion Cluster (IEC)

Effecteurs *S. aureus* spécifiques espèce humaine

Portés par prophage codant beta-hémolysine



Van Wamel et coll. 2006. J Bacteriol
Patel et coll. 2010. J Immunol
Langley et coll. 2010. Crit Rev Immunol

Adénosine-synthétase, nouveau venu dans immunosuppression

Mutant *adsA* de *S. aureus* ne survit pas dans cellules phagocytaires contrairement à souche sauvage (Thammavongsa et coll. 2009. J Exp Med)

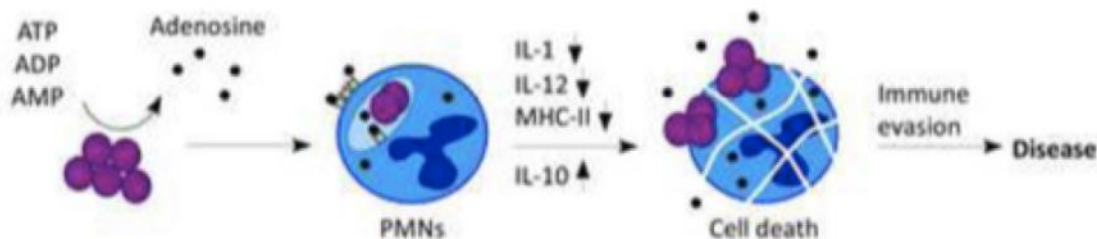
AdsA a deux séquences 5'-nucléotidase entraînant après libération dans les tissus infectés une augmentation massive concentration adénosine (Thammavongsa et coll. 2009. J Exp Med)

Expression induite par hypoxie, exposition à radicaux oxygène (ROS) et aux cellules endommagées (Cronstein et coll. 1986. J Clin Invest; Thiel et al. 2003. Microb Infect)

Interaction adénosine avec récepteurs A1, A2A, A2B, A3 (récepteurs couplés à protéines G) (Panther et coll. 2001. FASEB J)

Engagement récepteurs par adénosine = puissant effet antiinflammatoire + inhibition agrégation plaquettaire (Kitakaze et coll. 1993. Cardiovasc Res) + effondrement explosion oxydative et dégranulation PNNs (Kaufmann et coll. 2007. Shock)

= diminution expression cytokines proinflammatoires (IL-1) et augmentation expression IL-10 (Csoka et coll. 2007. Blood; Voyich et coll. 2005. J Immunol)



Thammavongsa et coll. 2009. J Exp Med

Superantigènes...

2 grandes classes d'immunomodulateurs produites par *S. aureus* inhibant réponse humorale et cellulaire = « entérotoxines » = superantigènes cellules T (McCormick et coll. 2001. Annu Rev Microbiol) et superantigène cellules B (SpA) (Silvermann et coll. 2006. Nat Rev Immunol)

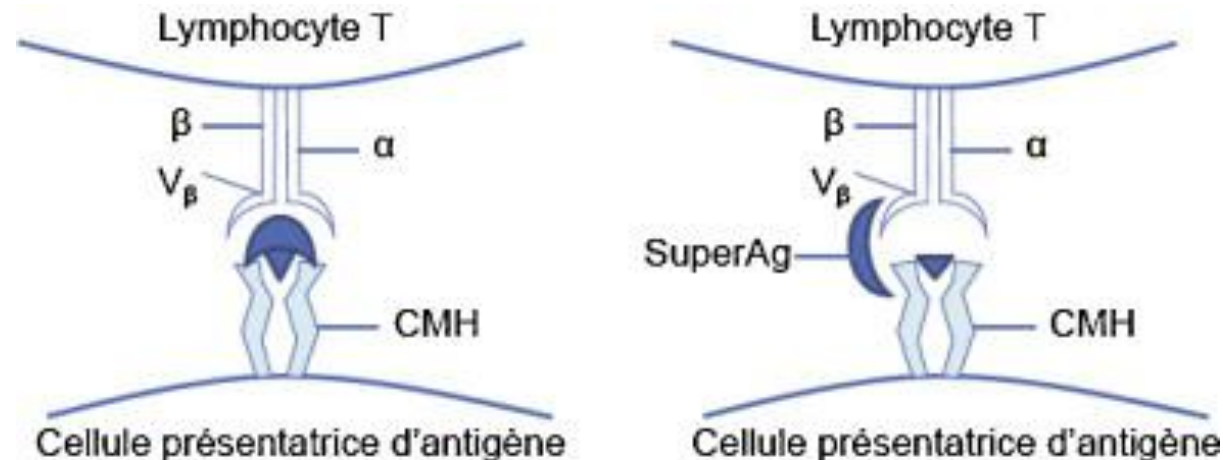
Injection superantigènes à animal expérience entraine respectivement déplétion cellules B et T

Superantigène cellules T lie les antigènes MHC de Classe II des cellules présentatrices antigène (APC), même en absence antigène chargé (Jardetzki et coll. 1994. Nature)

Liaison entraine association TCR à la surface des cellules T « helper »

Superantigènes codés par éléments génétiques mobiles (Proft et Fraser. 2003. Clin Exp Immunol)

Chaque type d'entérotoxine lie/reconnait un groupe de chaînes V-beta variables de TCR par son domaine superantigène (Llewelyn et coll. 2002. Lancet Infect Dis)



Résistance à la bactéricidie due à la production de radicaux superoxydes (Stress oxydatif)

Phagocytose bactéries induit réponse oxydative microbicide massive

Consommation O₂ entraîne formation radicaux (anions) superoxydes (ROS)

1 – Première réaction = Activation + translocation complexe NADPH oxydase (NOX) au phagosome et production massive de O₂⁻ (ROS)

Rapide dismutation en H₂O₂ par superoxyde-dismutase (SOD).

O₂⁻ et H₂O₂ altèrent groupements Fer-Soufre déshydratases libérant Fer libre = **réaction de Fenton**

Fer libre + H₂O₂ génère radicaux hydroxyles bactéricides (Winterboum et coll. 2013. Signal)

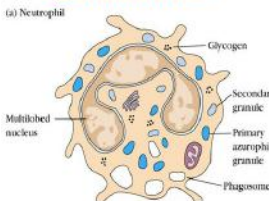
2 - Seconde réaction = conversion de O₂⁻ et H₂O₂ par myéloperoxydase (MPO) granules azurophiles

PNN, générant **hypochlorite (HOCL)** (Winterboum et coll. 2013. Signal)

HOCL = composé le plus bactéricide

Granulations:

(a) Neutrophil



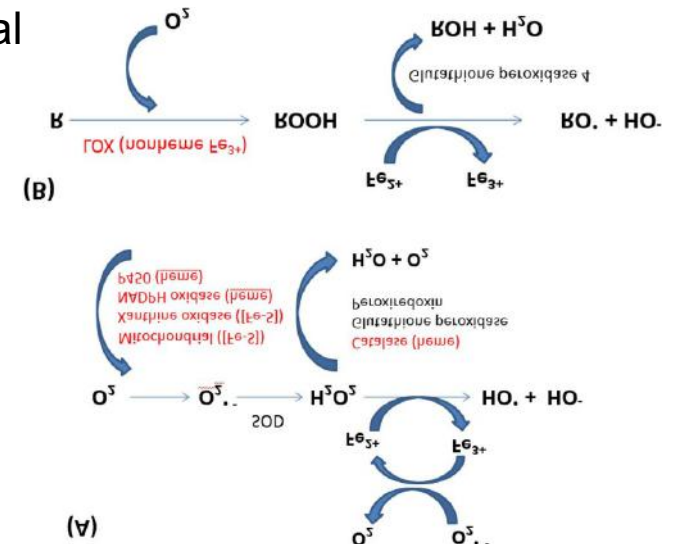
Granulations primaires Azurophiles (gros et denses)	Granulations secondaires (plus petits)
-Myéloperoxydase	-Collagénase
-Défensines	-Gélatinase
-Lysozyme	-Lactoferrine
-Hydrolases acides	-Lysozyme
-Protéase neutres	-Vit B12



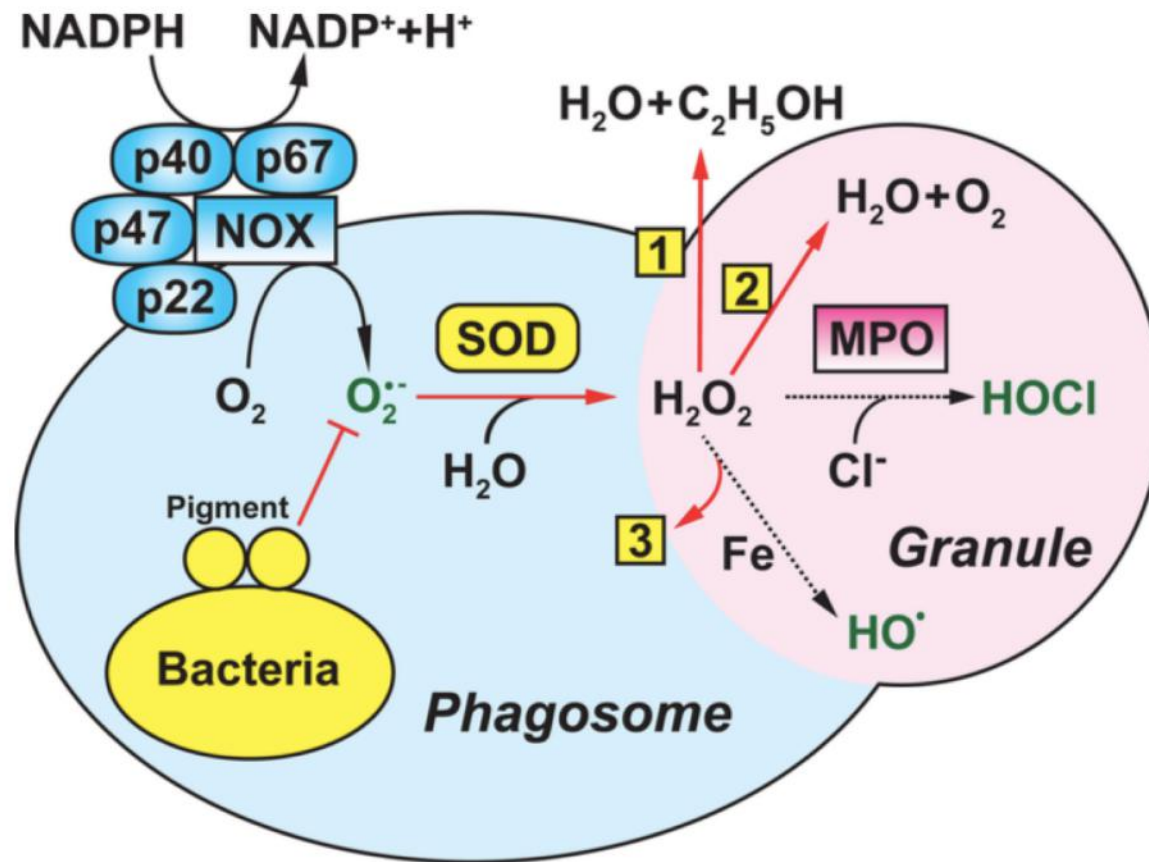
Récepteurs:

- Récepteur pour le fragment Fc des IgG (Fcγ RIII et Fcγ RII)
- Récepteurs pour les composants du complément:
 - C3b (CR1, CR3)
 - C3a (C3aR)
 - C5a (C5aR)

14



Résistance à la bactéricidie due à la production de radicaux superoxydes (Stress oxydatif)



Résistance à la bactéricidie due à la production de radicaux superoxydes (Stress oxydatif)

S. aureus et nombreuses espèces pathogènes Gram + possèdent mécanismes permettant prévention / éliminant ROS (Yesilkaya et coll. 2013. Trends Microbiol)
Superoxyde dismutase bactérienne (SOD) accélère conversion O_2^- en H_2O_2
 H_2O_2 convertie en molécules moins réactives par **catalase** oxydant H_2O_2 en O_2 et H_2O (Karavolos. 2003. Microbiology; Yesilkaya et coll. 2000. Infect Immun)



Catalase

S. aureus peut former écran protecteur de surface assurant le piégeage ROS par pigment jaune-doré (éponyme) caroténoïde (4',4'-diaponeurosporène) et à staphyloxanthine = « ROS scavenging »
= résistance bactéricidie PNNs (Liu et coll. 2005. J Exp Med)

Clones *S. aureus* catalase – doivent utiliser systèmes annexes pour éliminer H_2O_2 (Yesilkaya et coll. 2013. Trends Microbiol):

- Thiorédoxine = voie réductrice fournit électrons à petites molécules réagissant avec H_2O_2
- Glutathione-tripeptide réduit directement H_2O_2 (Farshchi et coll. 2012. Infect Immun)
- NO produit par NO synthétase bactérienne inhibe réaction de Fenton (Gusarov et coll. 2009. Science)



Caroténoïde

Résistance composants contenus dans granules phagocytes

Composants des granules PNN =

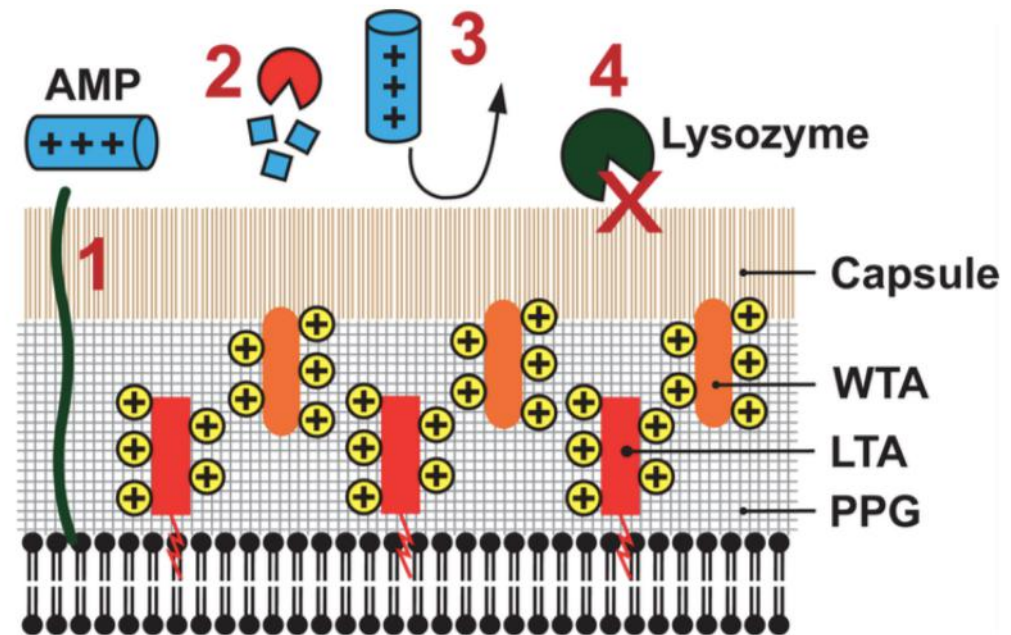
Lysozyme (dégradation mur bactérien)

Sérine protéases (cathepsine G, élastase, azurocine, protéinase 3)

Peptides antimicrobiens (AMPs = défensines et cathélicidine) actifs sur cocci Gram + pathogènes (Standish et coll. 2009. J. Immunol)

Composés déversés dans compartiment lysosomal dans lequel bactéries phagocytées sont stockées

Rôle des protéases dans maturation AMPs produits sous forme promolécules inactives



Résistance composants contenus dans granules phagocytes

Surface cocci Gram + épaisse et complexe = peptidoglycane (PGN), acides teichoïques (TA/LTA) et protéines = résistance naturelle à contenu granules

Besoin cependant mécanismes résistance dédiés:

- Lysozyme = muramidase hydrolysant PGN entre beta-1,4-N acétyl glucosamine et (GlcNAc) et acide N-acétyl muramique (MurNAc)

Dégradation PGN fournit fragments pro-inflammatoires via Nod2 (Girardin et coll. 2003. J Biol Chem)

Résistance au lysozyme = diminution reconnaissance par enzyme = O-acétylation chez *S. aureus* (Bera et coll. 2006. J Bacteriol) et masquage par excès LTA (Atilano et coll. 2011. PLoS Pathog)

Diminution parallèle capacités pro-inflammatoires fragments PGN

(Kaplan et coll. 2012. J. Immunol; Shimada et coll. 2010. Cell Host Microbe)

- Résistance aux AMPs (alpha-défensines et cathélicidine) =

Changement charge surface bactérienne empêchant accès peptides cationiques = essentiellement réduction charge négative LTA et TA

par addition D-alanyl ester codée par opéron *dlt* (Peschel. 1999. J Biol Chem)

Protéases = auréolysine *S. aureus* (Sieprawska-Lupa et coll. 2004. Antimicrob Agents Chemother)

Contrôle recrutement et activation cellules phagocytaires

Régulation négative recrutement et activation des phagocytes

S. aureus sécrète « **chemotaxis inhibitory protein (CHIP)** » se fixant et antagonisant récepteur

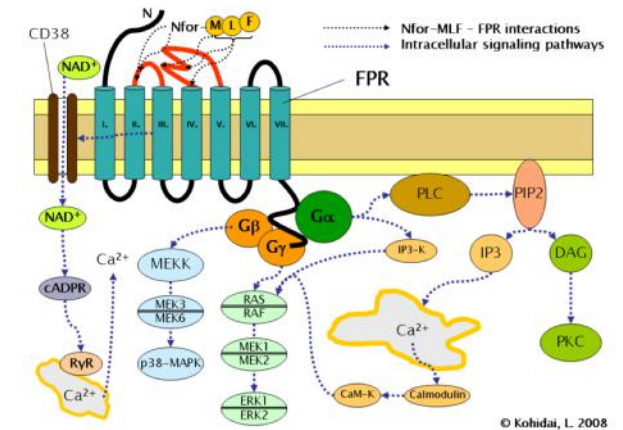
phagocytes pour deux puissants chimioattractants:

Formyl-méthionil-leucyl-phénylalanine (fMLP) et C5a

(Rooijackers et van Strijp. 2007. Mol Immunol)

FLIPr = autre antagoniste de fMLP sécrété par *S. aureus*

(Prat et coll. 2006. J Immunol)



Bactéricidie intracellulaire cocci Gram+ pathogènes = fusion phagolysosomale

Capacité *S. aureus* de limiter acidification phagosome et fusion phagolysosomale

par sécrétion **leucocidine** (DuMont et coll. 2013. Infect Immun)

S. aureus sécrète **TirS** = « **Toll/IL-1 receptor (TIR)-domain-containing protein** » interférant avec

signalisation TLR2 (NF-κB activation, c-Jun N-terminal kinase phosphorylation (JNK) et

sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Askariana et coll. 2014. J Innate Immun)

REPORT

Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria

Volker Brinkmann¹, Ulrike Reichard^{1,2}, Christian Goosmann^{1,2}, Beatrix Fauler¹, Yvonne Uhlemann², David S. Weiss², Yvette Weinrauch³, Arturo Zychlinsky^{2,*}

¹ Microscopy Core Facility, Max Planck Institute for Infection Biology, Schumannstrasse 21/22, 10117 Berlin, Germany.

² Department of Cellular Microbiology, Max Planck Institute for Infection Biology, Schumannstrasse 21/22, 10117 Berlin, Germany.

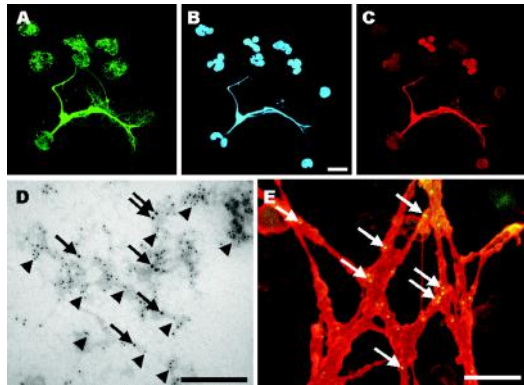
³ Department of Microbiology, New York University School of Medicine, 540 First Avenue, New York, NY 10016, USA.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: zychlinsky@mpiib-berlin.mpg.de

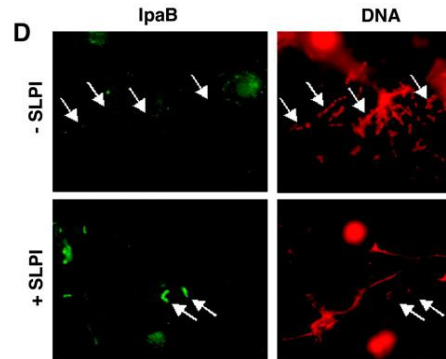
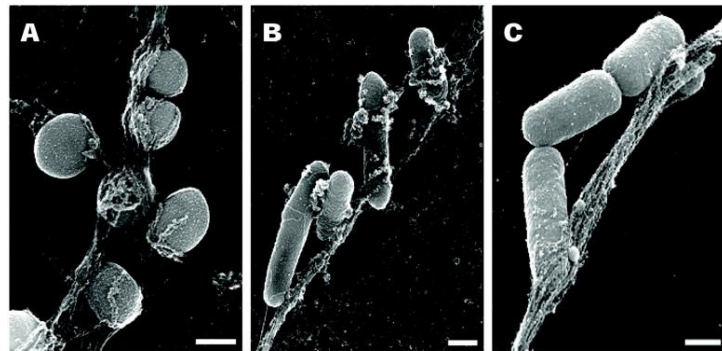
- Hide authors and affiliations



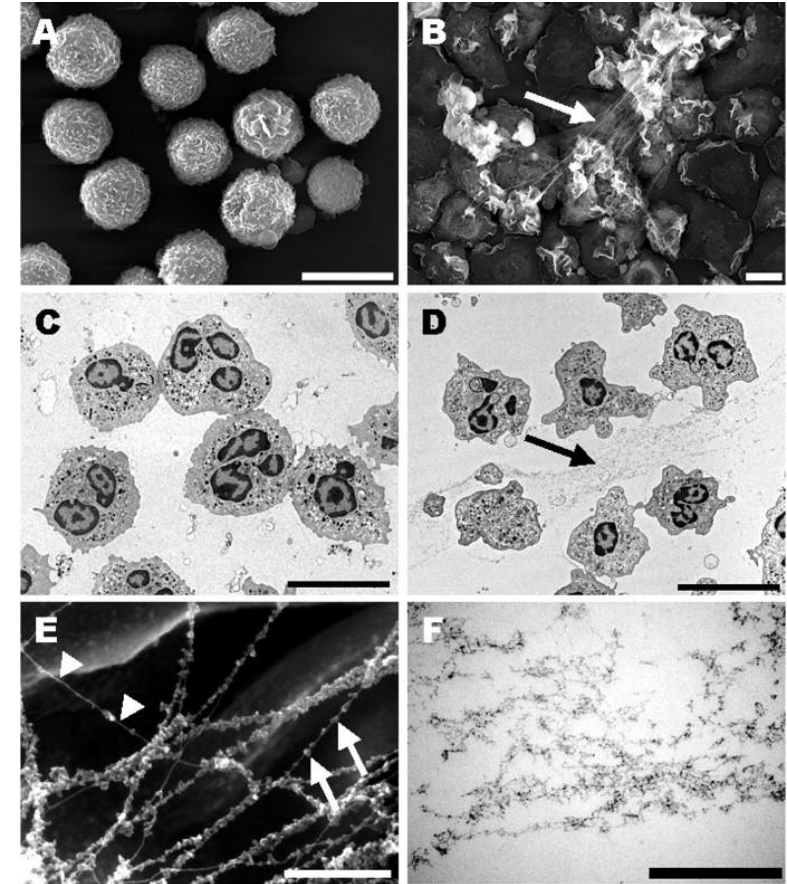
Volker Brinkmann et al. Science 2004;303:1532-1535



Immunostaining of NETs. Neutrophils were activated with 10 ng of IL-8 for 30 min and stained for neutrophil elastase (A), DNA (B), and the complex formed by H2A-H2B-DNA (C)

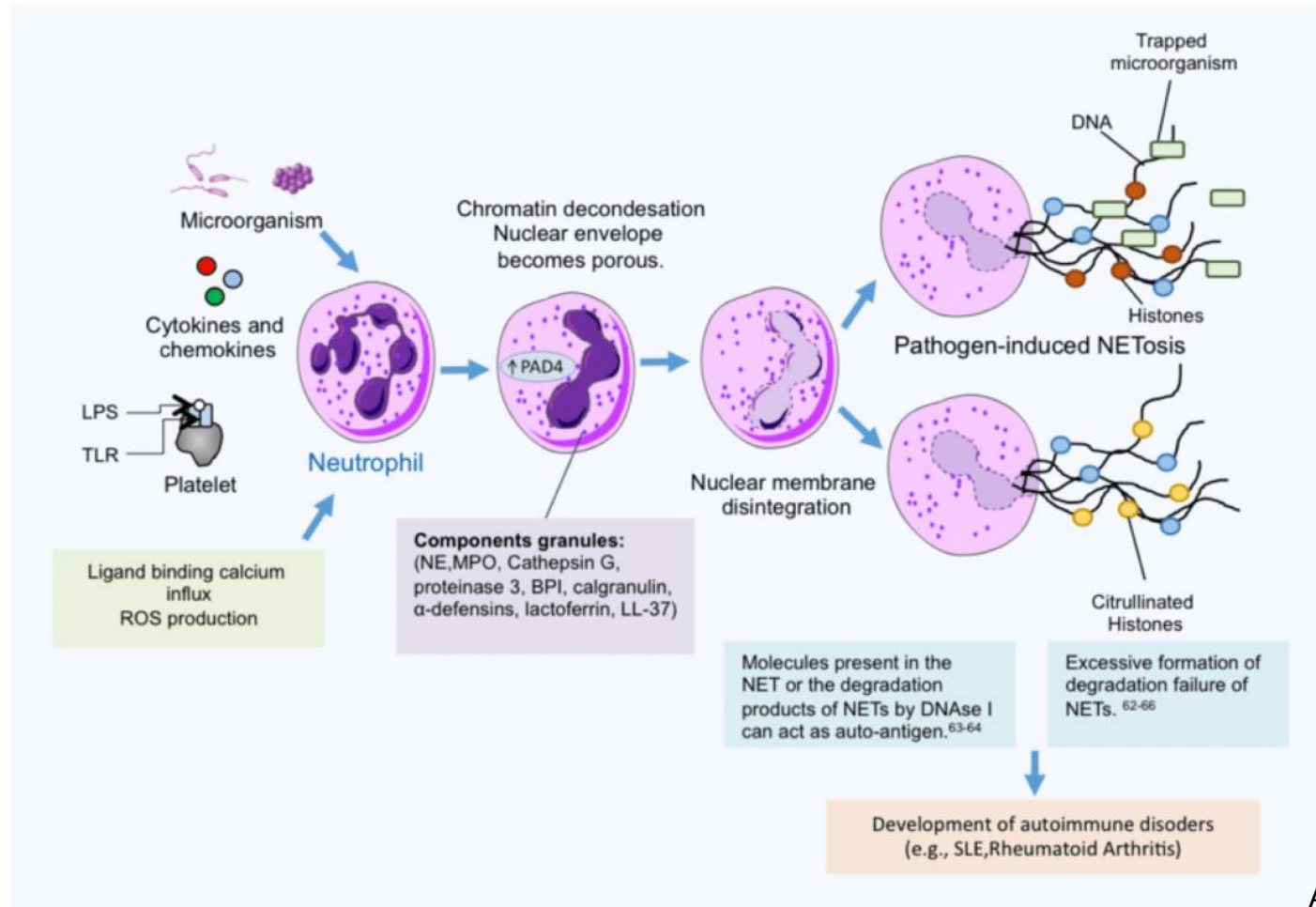


Gram-positive and Gram-negative bacteria associate with neutrophil fibers



Electron microscopical analysis of resting and activated neutrophils

Fonctions bactéricides des « Neutrophil Extracellular Traps (NETs) »



Echappement des « Neutrophil Extracellular Traps (NETs)»

NETs représentent forme très particulière défense immunitaire innée où PNN subissent un mécanisme particulier de mort cellulaire (Netose) au sein des foyers infectieux marqué par libération chromatine hautement Décondensée contenant histones (protéines cationiques puissamment bactéricides), protéases de granules et AMPs (Amulic et coll. 2012. Annu Rev Immunol)

PNNs produisent NETs en présence de nombreuses espèces bactériennes et fongiques, y compris *S. aureus* (Amulic et coll. 2012. Annu Rev Immunol)
Bactéricidie extracellulaire largement liée à la libération massive de molécules antimicrobiennes (von Köckritz-Blickwede et coll. 2009. J Mol Med)

S. aureus dégrade NETs par sécrétion Dnase (Berends et coll. 2010. J Innate Immun)

Mort accélérée des phagocytes causées par toxines cytolytiques de *S. aureus*

S. aureus cause nécrose rapide PNNs après phagocytose par **leucocidines**

(Kobayashi et coll. 2010. J Innate Immun) =

gamma-hémolysine, leucotoxine ED, leucotoxine GH, leucocidine de Panton-Valentine (PVL) codée par bactériophage

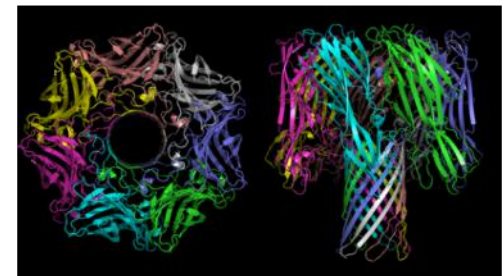
Famille toxines hétéroheptamériques à deux composants oligomérisant dans membranes phagocytes, formant pores et causant lyse cellulaire hypoosmotique

Modulines Phénol-solubles (PSMs) = petits peptides produits par *S. aureus* = rôle important dans évaison PNNs et virulence (Wang et coll. 2007. Nat Med)

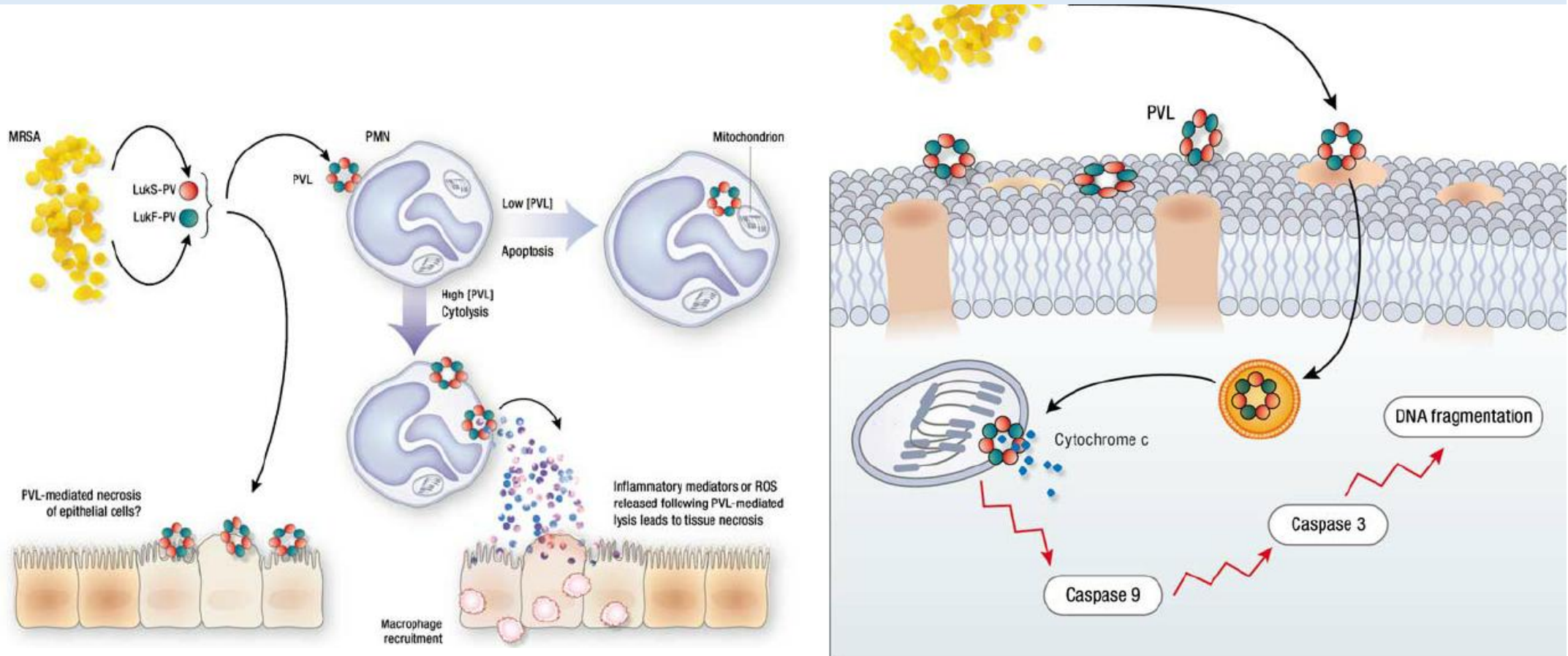
Structure PSMs = alpha-hélice amphipatique à activité membranolytique = recrutement, activation et lyse des PNNs (Kretschmer et coll. 2010. Cell Host Microbe) induisant inflammation mais facilitant survie bactérienne par arrêt fusion phagolysosomale et croissance microbienne intracellulaire

(Grosz et coll. 2014. Cell Microbiol)

PVL et PSM exercent activité synergique (Hongo et coll. 2009. J Infect Dis)



Mort accélérée des phagocytes causées par toxines cytolytiques de *S. aureus*



Mécanismes évation immunité de *S. aureus* en biofilms

Biofilms représentent communautés bactériennes adhérentes organisées dans matrices complexes

Mécanismes échappement aux défenses immunitaires staphylocoques en mode « planctonique » relativement bien caractérisés...

Moins bonne connaissance

- 1 – Expression/régulation mécanismes défense anti-immunité staphylocoques organisés en biofilms
- 2 – Mécanismes anti-immunité offerts par structure/composition biofilm staphylococcique

Globalement, organisation en biofilm semble orienter infection staphylococcique d'un profil d'infection aiguë puissamment inflammatoire vers infection persistante faiblement inflammatoire

Pas vraiment échappement à reconnaissance immunitaire

Plutôt réorientation réponse immunitaire vers programme tolérance microbienne, anti-inflammatoire, pro-fibrotique

Résistance aux défenses immunitaires bactéries en biofilms

Lorsque des bactéries s'engagent en mode de croissance en biofilm, elles acquièrent aussi des capacités de résistance aux défenses immunitaires de l'hôte. Mécanismes mal connus (moins bien que ceux de la récalcitrance aux antibiotiques)

Résistance aux défenses immunitaires de l'hôte

- 1- Pénétration limitée des cellules phagocytaires (PNN) au sein des biofilms et diffusion médiocre de leurs molécules bactéricides
- 2 - Rôle des senseurs à deux composants et des autoinducteurs du Quorum « Sensing » dans la mise en place d'un programme de résistance aux phagocytes et leurs effecteurs bactéricides
- 3 - Inhibition des propriétés phagocytaires des cellules recrutées par les composants du biofilm (matrice polyosidique)
- 4 - Inhibition des propriétés bactéricides des effecteurs des PNN par des molécules concentrées dans la matrice du biofilm
- 5 - Blocage de l'accès des anticorps aux bactéries présentes dans le biofilm

Matrice biofilm largement constituée d'exopolysides (EPS)

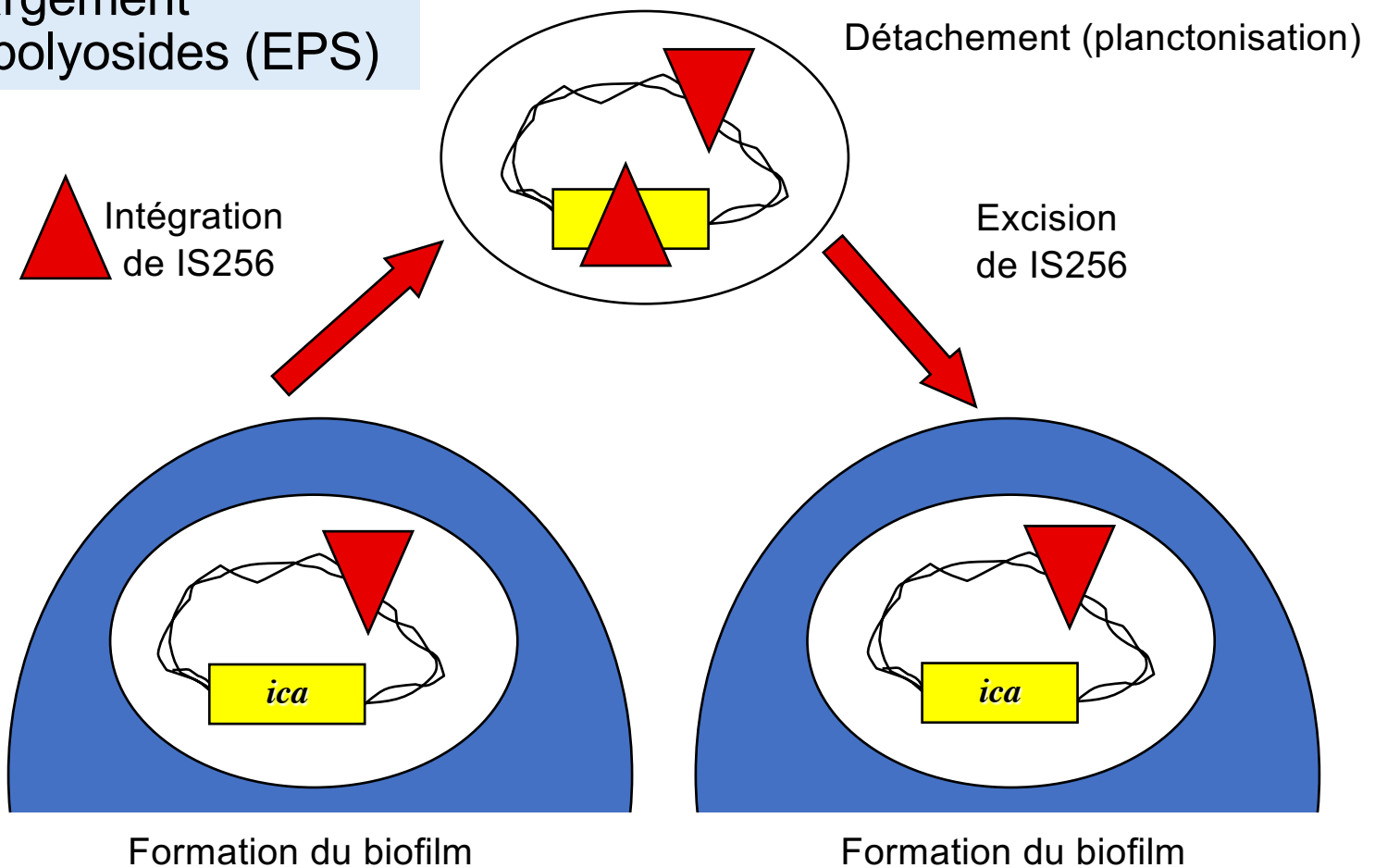
Chez les bactéries à Gram + les EPS sont essentiellement cationiques (Sutherland BW. 2001. Trends Microbiol.,9:222-227)

S. aureus et *S. epidermidis* produisent une matrice composée d'un polymère de β -1,6 N-acétylglucosamine (polysaccharide intercellular adhesin ou PIA) dont la synthèse est sous le contrôle de l'opéron *ica* (Costerton et coll. 2004. Int.J.Artif.Organs,28:1062-1068).

Chez les bactéries à Gram -, les EPS sont neutres ou polyanioniques. *E. coli* et *S. typhimurium* produisent de la cellulose comme composant essentiel de leurs biofilms (Zogaj X et coll. 2001. Mol.Microbiol.,39:1452-1463)

Elle est aussi constituée de protéines (pili de type IV) et d'acides nucléiques (ADN) dont le rôle structurant et protecteur a sans doute été jusqu'à présent sous-évalué.

Matrice biofilm largement constituée d'exopolysides (EPS)



Formation d'un biofilm sur une surface plastique par *S. aureus* (rare) et *S. epidermidis* (fréquent) par le polyside PIA dont la synthèse est codée par l'opéron *icaADBC* (Heilmann C et coll. 1996. Mol.Microbiol.,20:1083-1091)

Tolérisation des macrophages par environnement biofilms

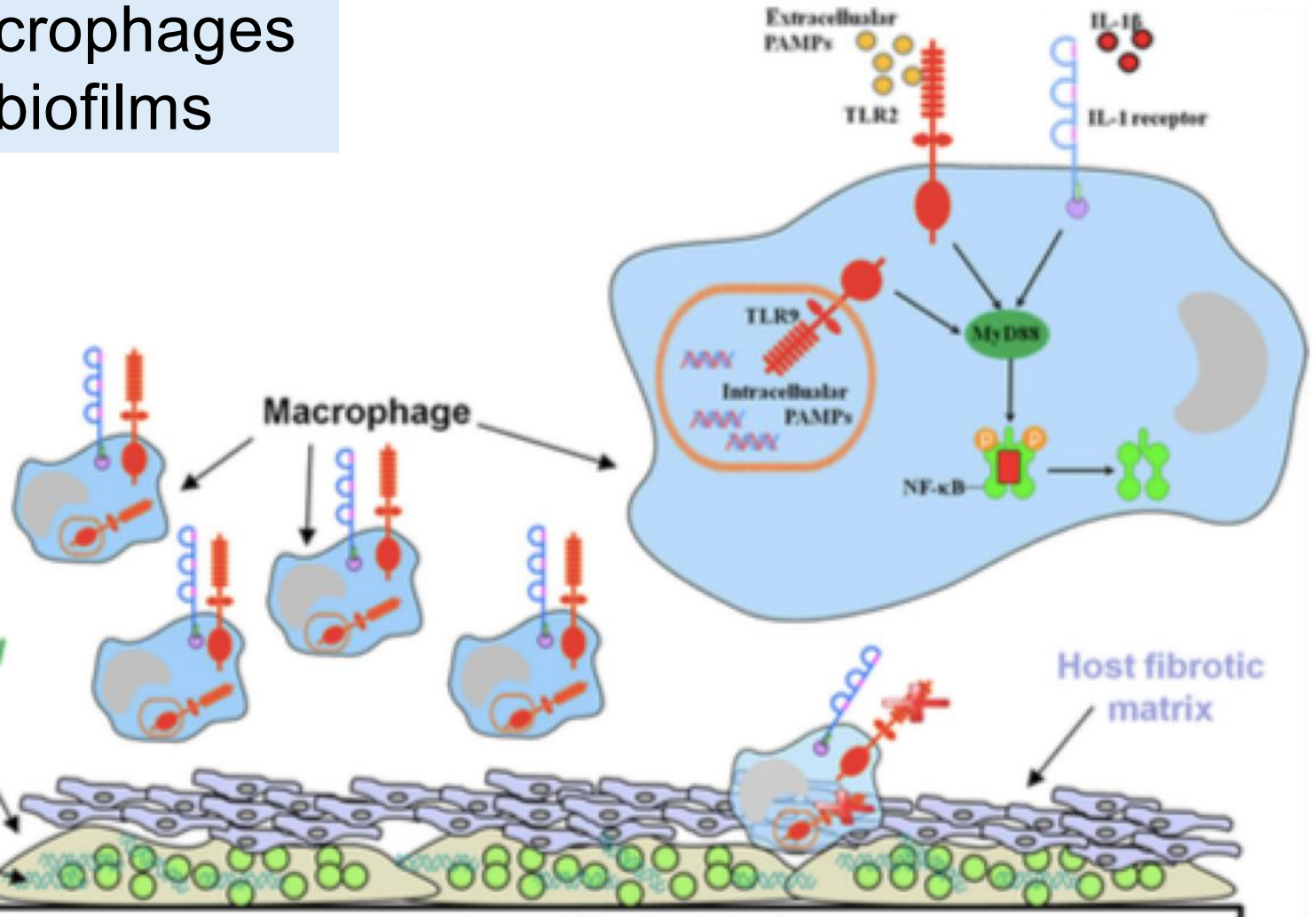
Macrophages = composants cellulaires essentiels de l'infiltrat associé aux biofilms

- Mécanismes bactéricides macrophages dépendant TLR2/9 inhibés par biofilms
- Rôle crucial de IL-1beta et cascade MyD88 dans contrôle charge *S. aureus* dans biofilm

(Benthal et coll. 2011. J Orthop Res
Thurlow et coll. J Immunol)

Rôle de Nod2 ?

(Girardin et coll. 2003. J Biol Chem)



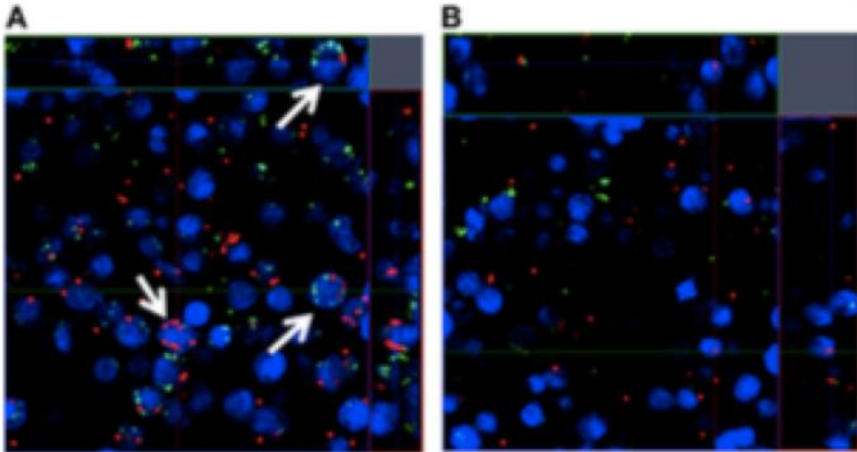
Dispositif médical implanté

FIGURE 1 | The signaling adaptor myD88 is pivotal for regulating biofilm development. Recent studies have revealed important roles for

recognition. The macrophage is a major cellular infiltrate during device-associated biofilm infections; however, current evidence

Limitation phagocytose macrophages dans biofilms

Altération fonctions phagocytaires macrophages par milieu conditionné biofilm *S. aureus*
Macrophages dérivés de moelle
Marquage par Cell Tracker Blue



Incubés 1h avec
S. aureus-GFP (vert)
Microbilles latex (rouge)

En:

A – milieu frais

B – milieu conditionné de biofilms *S. aureus* (2h)

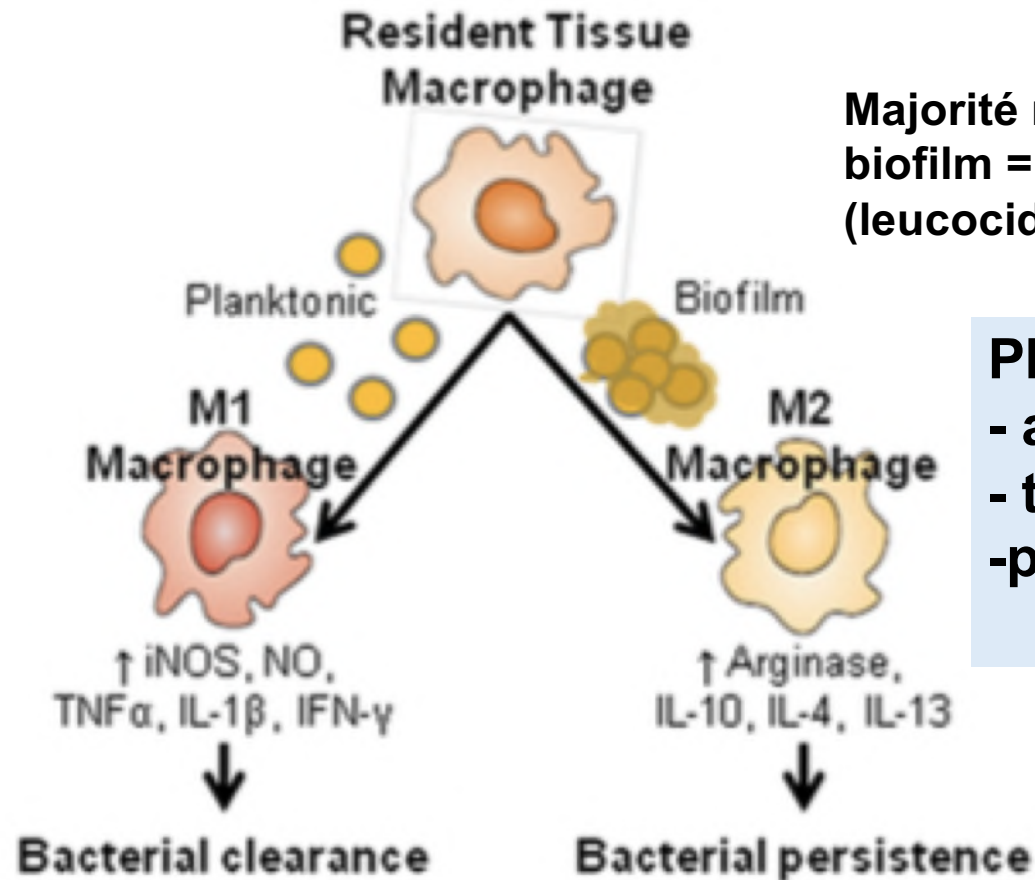
Flèches = macrophages phagocytaires

Thurlow et coll. 2011. J Immunol

Hanke et Kielian. 2012. Frontiers in Cell Mol Microbiol

Tolérisation des macrophages par environnement biofilms

Phénotype
- inflammatoire
- bactéricide

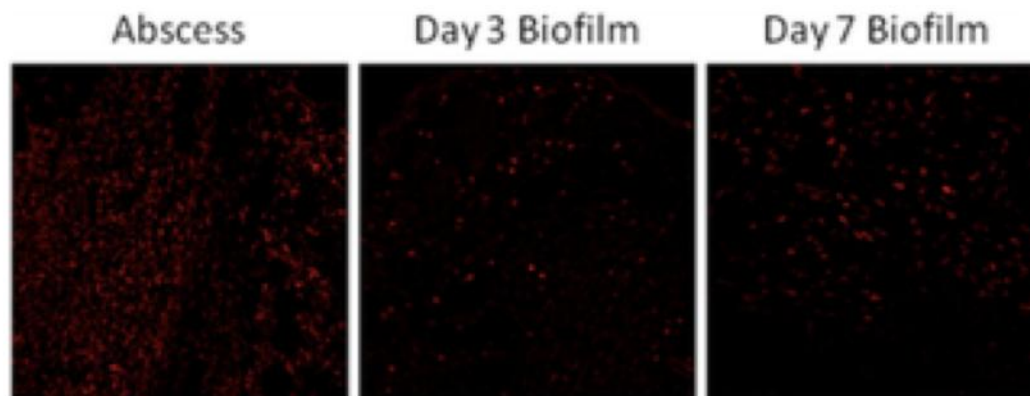


Majorité macrophages envahissant biofilm = macrophages morts (leucocidines ?)

Phénotype
- anti-inflammatoire
- tolérogène
- pro-fibrotique

Benoit et coll. 2008. J Immunol
Hanke et Kielian. 2012. Frontiers in Cell Mol Microbiol

Limitation recrutement PNNs dans biofilm - *S. aureus*

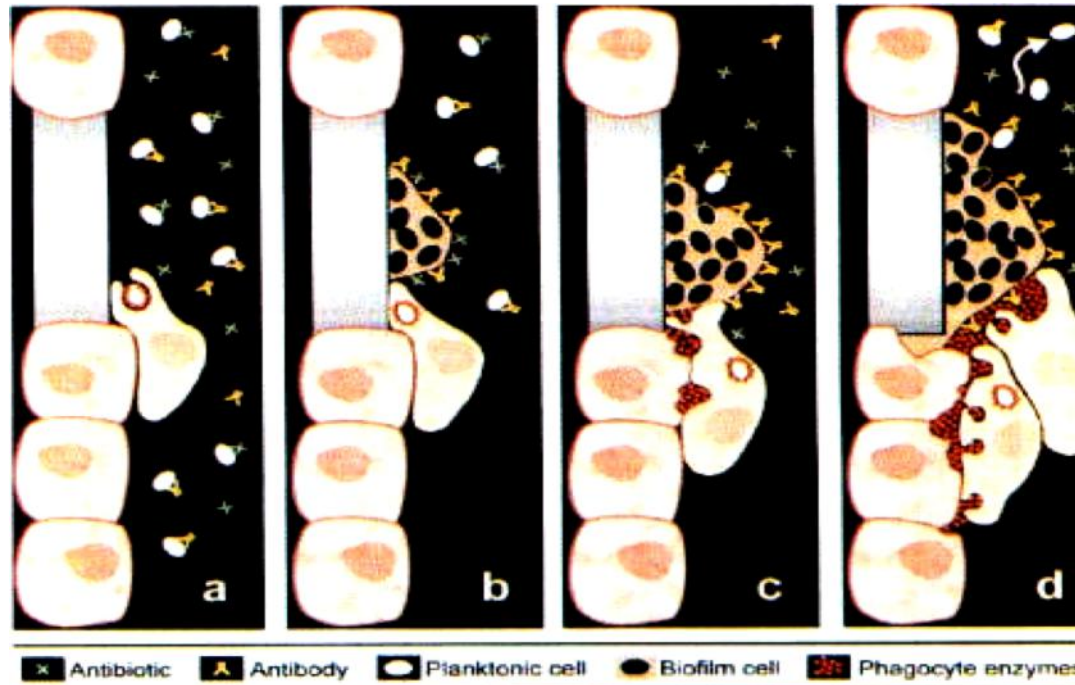


Recrutement limité PNNs dans modèles infection sur cathéter implanté vs abcès sous-cutané à *S. aureus*

Souris C57BL/6

IF (rouge) par anticorps anti-Ly-6G (spécifique PNN)

Phagocytose frustrée



Bactéries planctoniques en général efficacement phagocytées et tuées par les phagocytes (PNN et macrophages)

Bactéries associées à biofilms = « phagocytose frustrée » = inefficace, y compris par inaccessibilité anticorps opsonisants

Phagocytes sécrètent néanmoins facteurs microbicides, y compris enzymes délétères pour tissus adjacents = destruction

(Costerton et coll. 1999. Science)