

Bactériologie 2003-2004

Antoine Andremont

1. La résistance dans tous les sens.

2. Défenses multi-faces

3. Les biofilms (de l'année).

Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance.

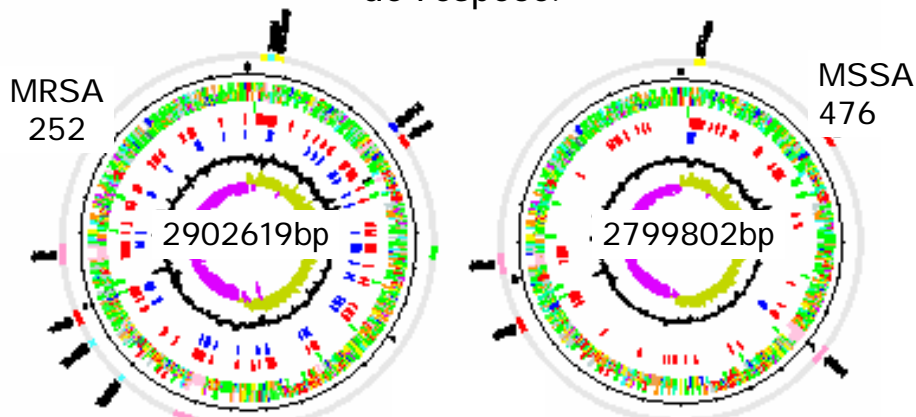
Holden M, *et al.* PNAS 2004 101: 9786

Ce travail démontre le haut potentiel de diversité génétique et de plasticité du génome de *S. aureus* et assied l'hypothèse que *S. aureus* est une espèce pathogène présentant beaucoup de diversité.

Comparaison de deux génomes des clones majeurs:

1. de MRSA hospitalière épidémique
2. de MSSA communautaire invasive

Les zones **bleus** sont uniques : l'importance des différences explique les différences phénotypiques importantes pour la clinique au sein de l'espèce.



Les zones **rouges** sont partagées avec d'autres souches de *S. aureus*

Genetic analysis of a high level vancomycin resistant isolate of *Staphylococcus aureus*.

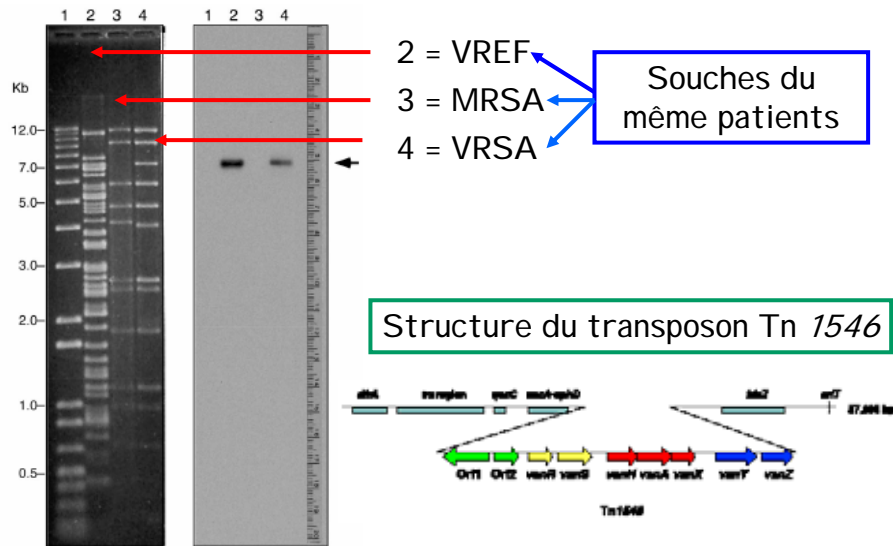
Weigel LM, Clewell DB, et al.

Science 2003 302 1569

En juin 2002 *S. aureus* est devenu résistant à la vancomycine, comme attendu chez un patient du Michigan. Ce travail décrit les bases moléculaires de la résistance et le mode d'acquisition probable de van A par cette souche

La CMI à la vancomycine était de 1024 mg/L et la souche portait un plasmide conjugatif de 597.9 kb, portant la résistance à la vancomycine (*vanA*), au trimetoprime (*dfpA*), aux bêta-lactamines (*blaZ*), aux aminosides (*aacA-aphD*) et aux désinfectants (*qacC*).

Le transfert plasmidique a probablement eut lieu à partir d'un co-isolat de *Enterococcus faecium*



Vancomycin-resistant *S. aureus* isolate from a patient in Pennsylvania.

Tenover F.C. et al.
Antimicrob. Agents and Chemother. 48, 275

En septembre 2002 une deuxième souche de VRSA est isolée en Pennsylvanie d'un ulcère de jambe d'un patient obèse de 70 ans.
La souche contient le gène vanA (Tn1546) et est co-résistante aux aminosides, aux bêta-lactamines, aux fluoroquinolones, aux macrolides et à la tétracycline.

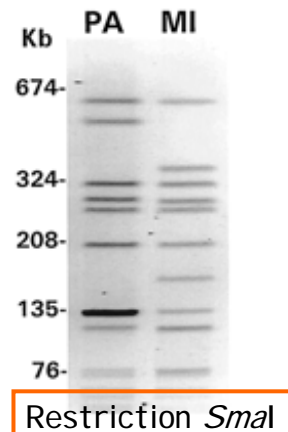
1. Mais la CMI à la vancomycine n'est que de 16-64 mg/L et à la teichoplanine de 4-8 mg/L.
2. La souche est détectée comme sensible par les automates en milieux liquides....

La résistance se caractérise in vitro par une double zone

Les souches PA et MI sont reliées à la souche USA1000, dite clone New-york/Japan



En Mars 2004 une troisième souche de VRSA est isolée d'un patient de New-York. Elle non plus ne fut pas détectée par les automates en milieu liquide....



Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class1 antibiotic resistance integrons in poultry litter.

Nandi S.. *et al.* ,PNAS. 101, 7118

Ce travail rapporte le fait inattendu que les **intégrons de résistance de classe 1 (intI1)**, jusqu'à présent connus surtout chez les entérobactéries, sont présents à haute fréquence chez les bactéries **Gram-positif** dans les élevages de volaille où l'utilisation des **antibiotiques prophylactiques est intense**.

Trois fermes de ~15000 poulets ont été prélevés pendant 13 semaines.

Quantification des gènes :

Eubacteries : 16S rDNA

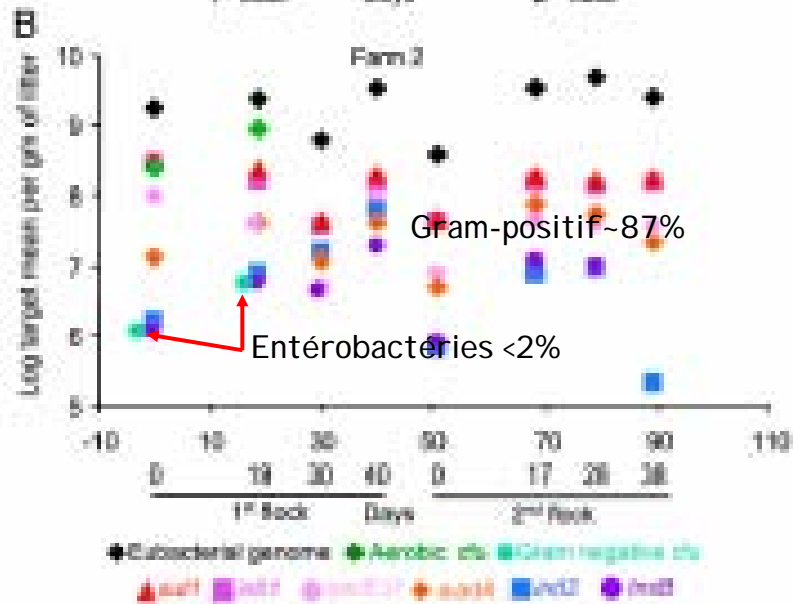
Class 1 intégrons : *intI1*, *sull* et *qacED1*

Class 2 intégrons : *intI2*, *tnsB*

Class 1 et 2 intégrons : *aadA1*

Identification des bactéries porteuses d'intégrons

Concentration des gènes cibles et des bactéries cultivables



Identification des Gram-positif aérobies *int1* positif

Isolate no.	16S rDNA identity	Insert identity
Farm 1		
693-7*	<i>Staphylococcus</i> sp.	ND
693-8*	<i>Staphylococcus lentus</i>	ND
693-9*	<i>Staphylococcus lentus</i>	ND
693-14	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	ND
693-17	<i>Aerococcus</i> sp.	rRNA methylase [†]
304-1	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	ND
693-2*	<i>C. ammoniagenes</i>	ND
693-10*	<i>Corynebacterium casei</i>	Lipid-A-synthase [†]
878-3	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ND
878-10	<i>Brevibacterium thiogenitalis</i>	ND
Farm 2		
555-4*	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Transketolase [†]
619-11	<i>Aerococcus</i> sp.	ND
776-5	<i>Staphylococcus</i> sp.	ND
384-1	<i>C. ammoniagenes</i>	<i>dfrA1, aadA1</i>
384-11	<i>C. ammoniagenes</i>	<i>aadA9</i>
555-9 [†]	<i>C. ammoniagenes</i>	ND
619-6	<i>C. ammoniagenes</i>	<i>aadA1</i>
619-12	<i>C. ammoniagenes</i>	<i>dfrA1, aadA1</i>
Farms 3 and 4		
L1-76-17	<i>C. casei</i>	<i>dfrA1, aadA1</i>
L2-07-09	<i>C. ammoniagenes</i>	<i>aadA2</i>
L2-64-11	<i>C. casei</i>	<i>aadA1</i>
L2-79-05	<i>C. ammoniagenes</i>	<i>aadA9</i>
L2-79-15	<i>C. ammoniagenes</i>	<i>aadA1</i>

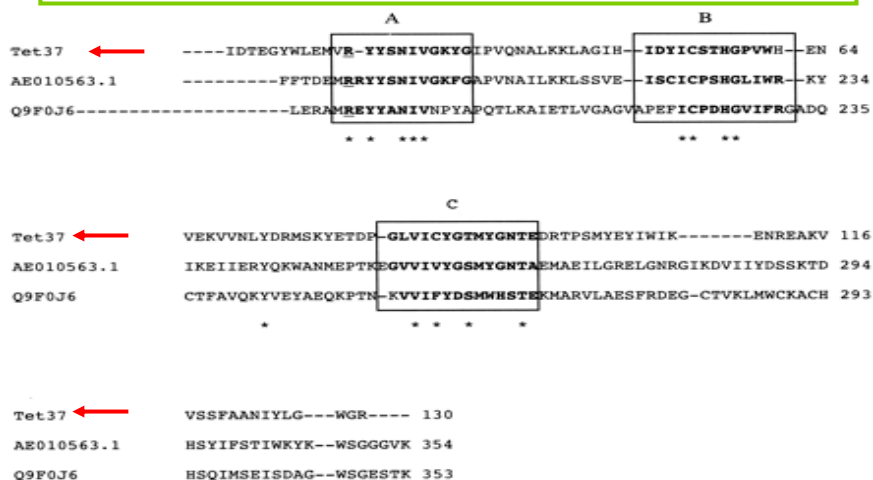
Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome.

Diaz-Torres, M.L. *et al.*
Antimicrob. Agents and Chemother. 47, 1430

En utilisant une approche moléculaire d'emblée, ce travail montre que la flore commensale, éventuellement non cultivable, est un réservoir important de nouveaux gènes de résistance, jusqu'à présent inaccessibles.

1. D'abord l'ADN de plaque dentaire a été cassé en fragments de 800-3000 bp et les fragments ont été purifiés.
2. Ensuite ces fragments ont été clonés chez *E. coli* et les clones isolés sur milieux contenant 5 mg/L de tétracycline.
3. Les gènes de résistance à la tétracycline ont été caractérisés chez les 18 clones résistants (soit 4% des transformants)

Le nouveau gène de résistance, dénommé *tet(37)* confère une CMI de 30mg/L en aérobiose mais de seulement 1mg/L en anaérobiose. Il est apparenté à des oxydoréductases et confère la résistance par protection du ribosome comme *tet(M)* de *Bacteroides*, mais n'y est pas apparenté.

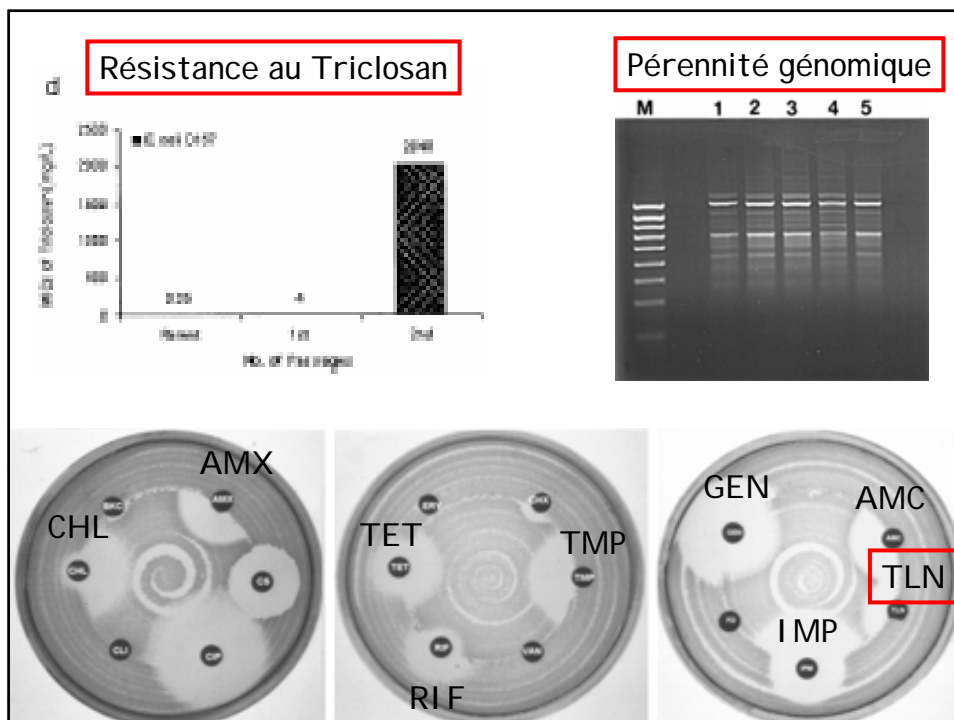


Adaptative résistance to biocides in [*Salmonella enterica* and] *E. coli* 0157 and cross résistance to Antimicrobial Agents.

Braoudaki M. *et al.* AAC. 42, 73, 2004.

Les biocides types triclosan sont largement utilisés dans les produits ménagers. La résistance croisée que les souches adaptées peuvent avoir vis à vis des antibiotiques est un sujet d'inquiétude. Ce travail montre que celle-ci est justifiée.

1. Des souches résistantes au Triclosan [de *Salmonella* et] de *E. coli* sont obtenus par passages successifs sur des concentrations croissantes.
2. La résistance de ces souches à de nombreux antibiotiques est augmentée.



Bactériologie 2003-2004

Antoine Andremont

1. La résistance dans tous les sens.
2. Défenses multi-faces
3. Les biofilms (de l'année).

Attenuation of *P. aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors.

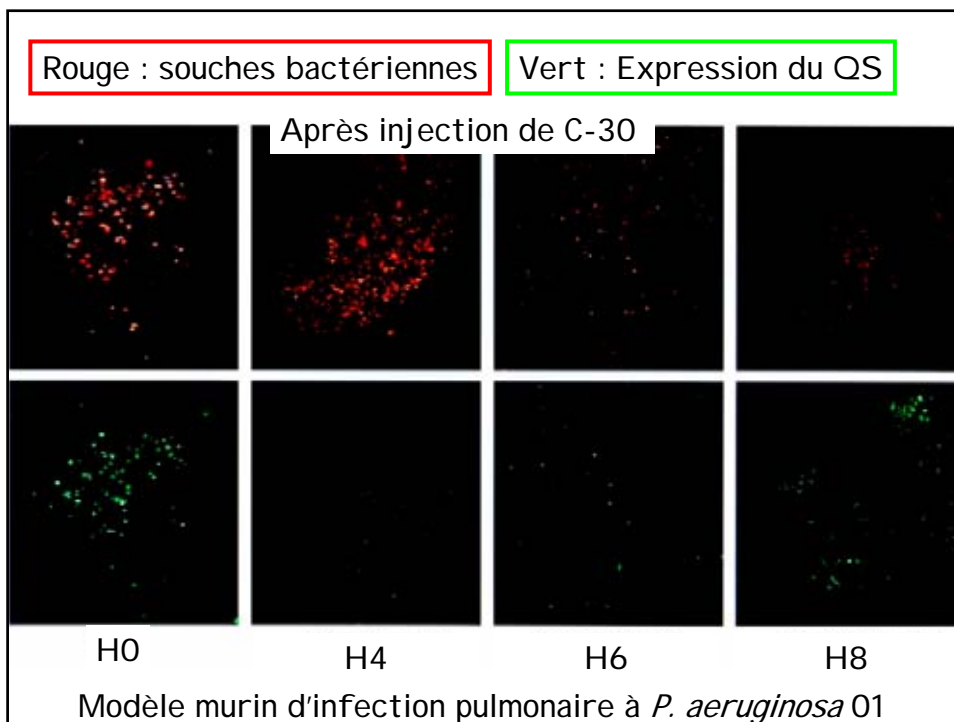
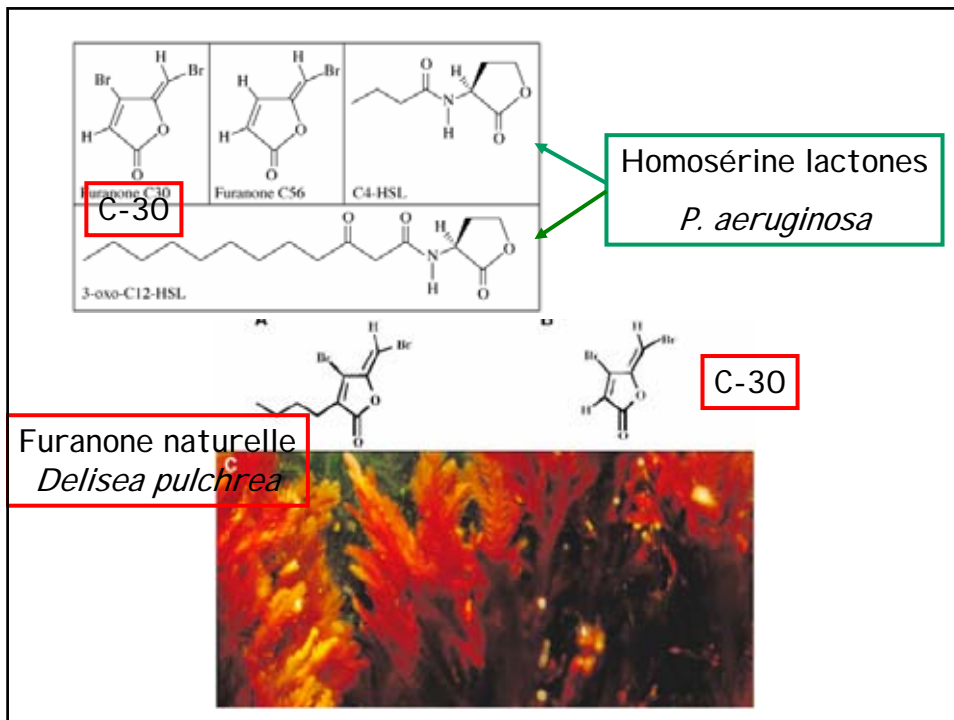
Hentzer M. *et al.*; *EMBO J.* , 22; 3803, 2003.

Synthetic furanones inhibit Quorum-sensing and Enhance bacterial clearance in *Pseudomonas* lung infection in mice

Wu H., *et al.* *JAC.* 53, 1054, 2004

Le quorum sensing semble être un facteur clef de la virulence pulmonaire de *P. aeruginosa* . Les inhibiteurs du QS pourraient être actifs et échapper à la sélection de mutants résistants.

1. Un dérivé synthétique (C-30) est produit à partir de l'inhibiteur naturel de QS chez *Delisea pulchra*
2. C-30 inhibe le QS in vivo et réduit la sévérité des infections pulmonaires à *P. aeruginosa* chez la souris



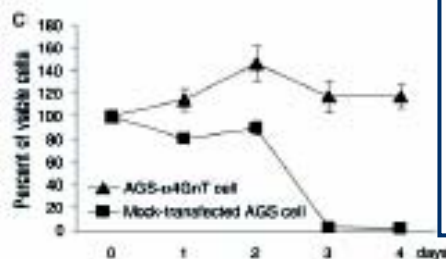
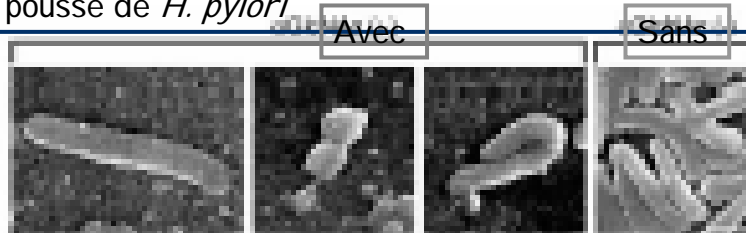
Natural Antibiotic Function of a Human Gastric Mucin Against *H. Pylori* Infection..

Kawakubo M *et al.* Science. 305, 1003, 2004.

Que l'infection à *H. pylori* soit asymptomatique chez la majorité des sujets infectés reste mystérieux. Ce travail montre que les O-glycanes de la mucine gastrique agissent comme un antibiotique naturel qui protège l'hôte contre l'infection.

L'effet sur *H. pylori* d'un glycanes retrouvé dans la partie profonde de la muqueuse gastrique a été testé in vitro sur des cellules productrices de ce glycanes après transfection.

Le 1-4 *N*-acétylglucosamine sous forme soluble altère la pousse de *H. pylori*



Sa production protège des cellules transfectées de l'infection par *H. pylori* (mais pas de l'adhésion)

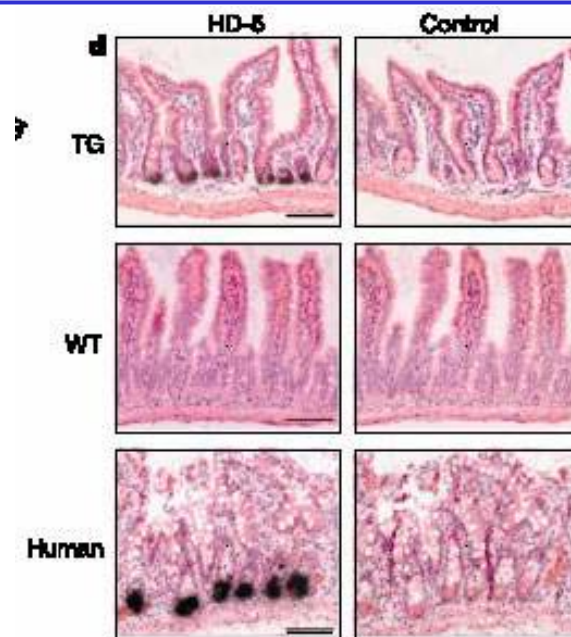
Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin

Salzman *et al.* Nature. 422, 522, 2003.

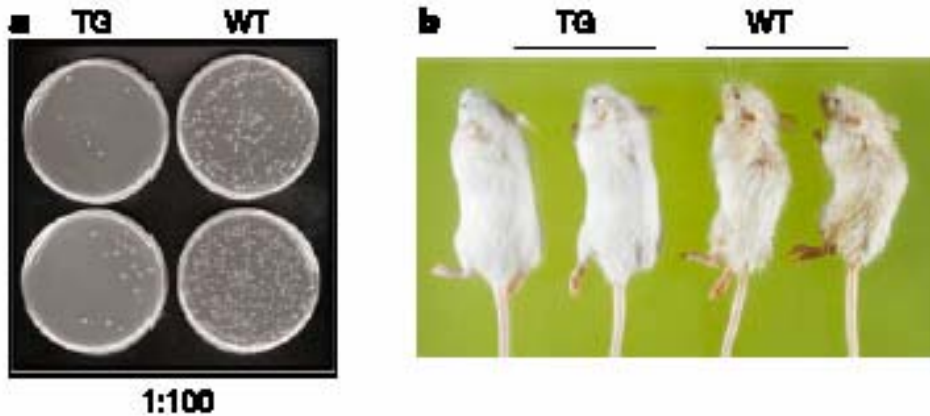
L'activité antibiotique des défensines (peptides) est un sujet majeur de recherche. Cette étude démontre pour la première fois le rôle des défensines intestinales humaines dans la protection contre une infection bactérienne intestinale.

1. Des souris transgéniques ont été construites qui sécrètent la défensine humaine HD-5 au niveau des cellules intestinales cryptiques (Paneth).
2. Ces souris sont résistantes à un challenge oral létal par *Salmonella* Typhimurium.

Sécrétion de HD-5 chez l'homme et les souris transgéniques



Aspect des souris et concentrations de *S. Typhimurium* dans l'iléon terminal à H12 post-inoculation



Bactériologie 2003-2004

Antoine Andremont

1. La résistance dans tous les sens.
2. Défenses multi-faces
3. Les biofilms (de l'année).

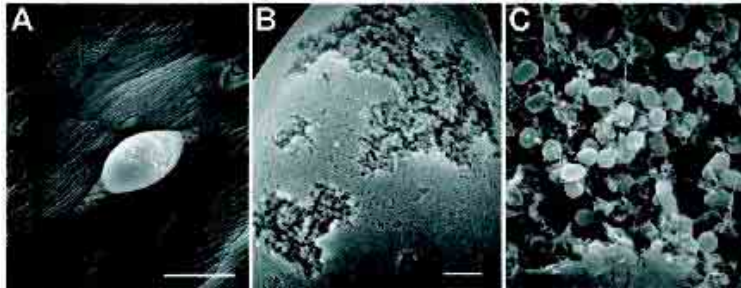
Intracellular Bacterial Biofilm-Like Pods in Urinary Tract Infections.

Anderson G.G. *et al.*
Science. 301, 105

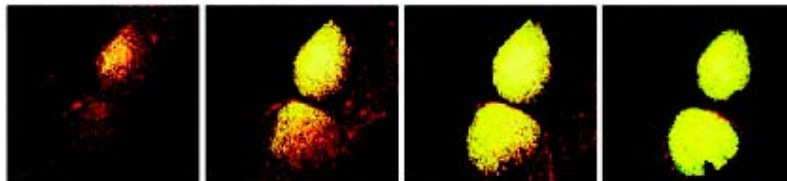
Ce travail montre que les *E. coli* uropathogènes peuvent échapper aux mécanismes de défense de l'hôte dans d'un biofilm interne aux cellules épithéliales. C'est le premier biofilm d'eucaryotes décrit.

1. La vessie de souris a été infectée par une souche d'*E. coli* uropathogène.
2. Des aspects de « cocons » sont observés en ME alors qu'ils n'existent pas avec *E. coli* K12 ou avec la souche uropathogène mutée dans le gène *fimH*.
3. Ces cocons subissent une processus de maturation visibles en vidéomicroscopie.

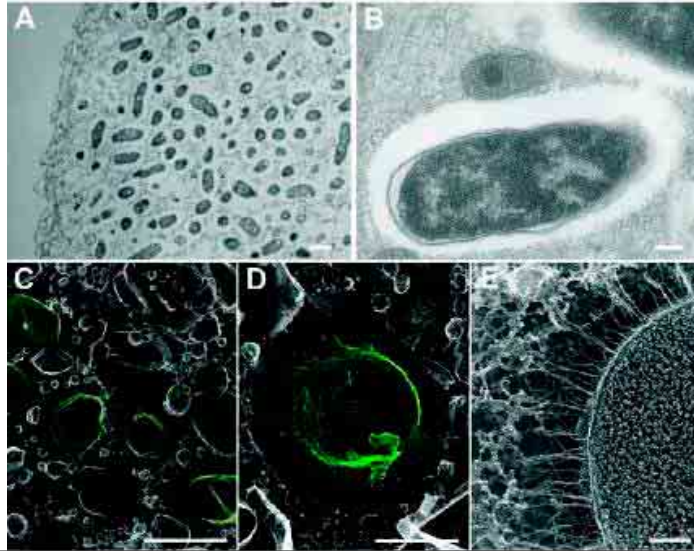
Les cocons sont visibles en microscopie optique ou à balayage



Leur recouvrement progressif par l'uroplakine est bien visible en microscopie confocale



Au sein des « cocons » les bactéries sont noyées dans une matrice au sein du cytoplasme cellulaire



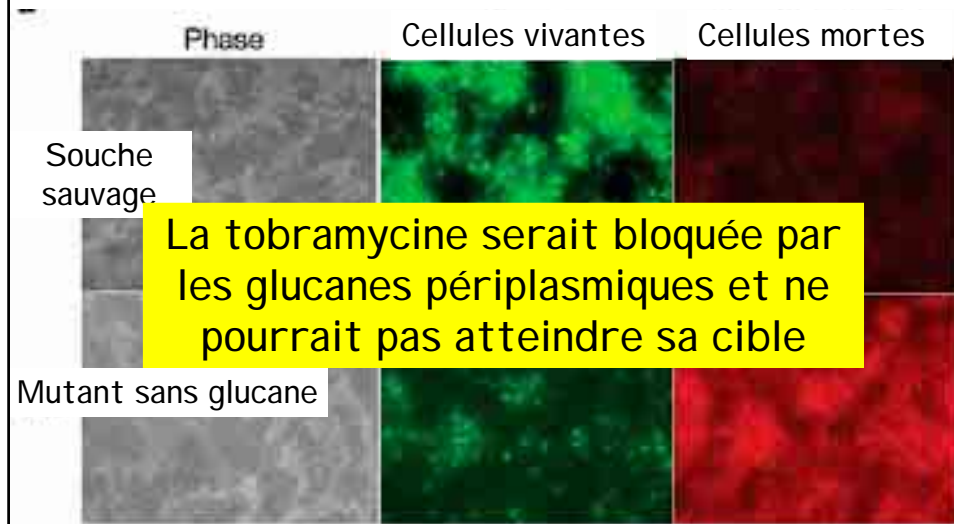
A genetic basis for *P. aeruginosa* biofilm antibiotic resistance.

Mah TF *et al.* Nature. 426, 306, 2003.

La constitution de biofilms bactériens diminue la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Ce travail démontre que cette résistance peut être due à un mécanisme génétique bien identifié (et non à une simple diminution de diffusion).

1. Des mutants (*ndvB*) de *P. aeruginosa* déficients pour la production de glucanes périplasmiques ont été isolés.
2. Ils sont beaucoup plus sensibles que les souches sauvages à la tobramycine dans un modèle de croissance en biofilms.
3. Le mécanisme pourrait être la séquestration de l'antibiotique dans le périplasme.

Effet de la mutation *ndvB* sur la sensibilité à la tobramycine de *P. aeruginosa* au sein de biofilms



Conclusion

1. La résistance est de plus en plus inquiétante
2. La recherche de nouveaux antibactériens est complexe
3. Le pouvoir résolutif de l'alliance de la biologie moléculaire et de l'imagerie est impressionnant.