

S. aureus et IOA chroniques : s'adapter pour récidiver !

Pr. Frédéric LAURENT

Laboratoire de bactériologie, Hôpital de la Croix Rousse Lyon, HCL, Lyon

Centre National de Référence des Staphylocoques, HCL, Lyon

Centre Internationale de Recherche en Infectiologie – INSERM U1111, CNRS UMR5308,
Université Lyon 1, ENS de Lyon - Equipe "*Pathogénèse des infections à staphylocoques*"

Physiopathologie des IOA

S. aureus et IOA

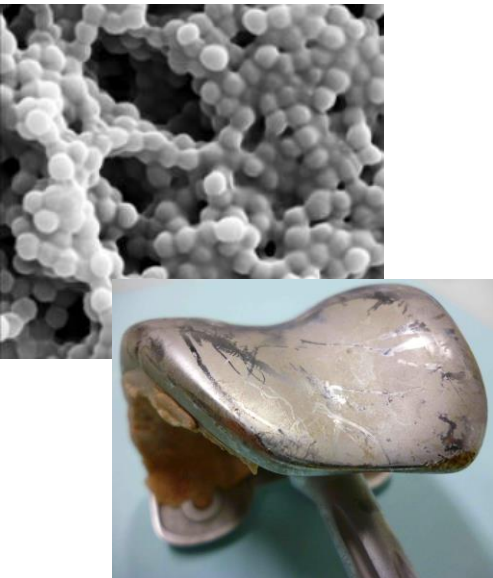


Infection aiguë

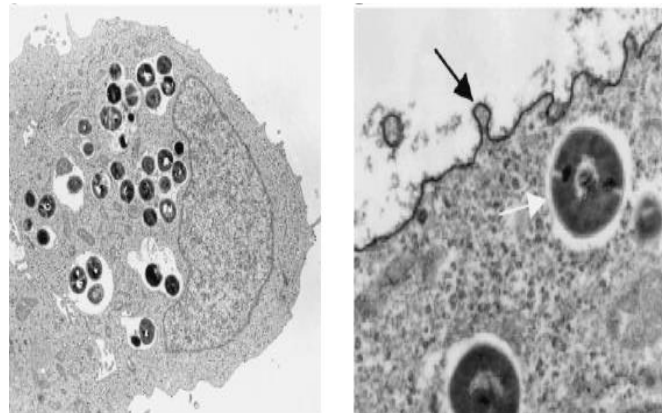
+

Infection récidivante/chronique

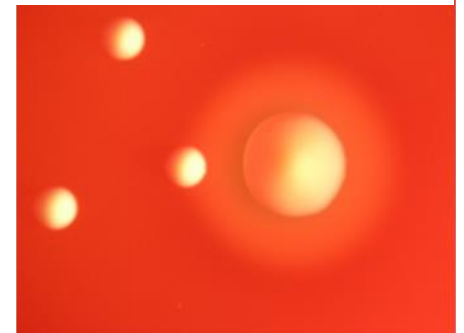
Biofilm



Internalisation



Small
Colony Variant
(SCV)



Objectifs

Déterminer si les mécanismes bactériens impliqués dans les récurrences d'IOA à *S. aureus* sont présents dès la primo-infection ou sont acquis secondairement, par adaptation des souches *in vivo*.

Absence d'études comparant souches isolées
lors de l'IOA aiguë **vs.** lors de la récurrence
chez le même patient

Matériel et méthodes

Patients avec **IOA récidivante** sur matériel

Trois couples de souches de *S. aureus* : souche initiale versus souche de récurrence

Patient	Sexe, age (années)	Site infecté	Ancienneté de l'IOA (jours)	Traitement chirurgical	Durée antibiothérapie	Date récurrence
1	H,26	Matériel ostéosynthèse de tibia	12	Ablation du matériel	82	J82
2	H,80	Prothèse totale de genou	3	Lavage articulaire	191	J201
3	F,82	Prothèse totale de hanche	3	Lavage articulaire	98	J134

Matériel et méthodes

Patients avec **IOA récidivante** sur matériel

Trois couples de souches de *S. aureus* : souche initiale versus souche de récurrence

Patient	Sexe, age (années)	Site infecté	Ancienneté de l'IOA (jours)	Traitement chirurgical	Durée antibiothérapie	Date récurrence
1	H,26	Matériel ostéosynthèse de tibia	12	Ablation du matériel	82	J82
2	H,80	Prothèse totale de genou	3	Lavage articulaire	191	J201
3	F,82	Prothèse totale de hanche	3	Lavage articulaire	98	J134



Malgré antibiothérapie longue, aucune différence dans l'antibiogramme des souches de récurrence !

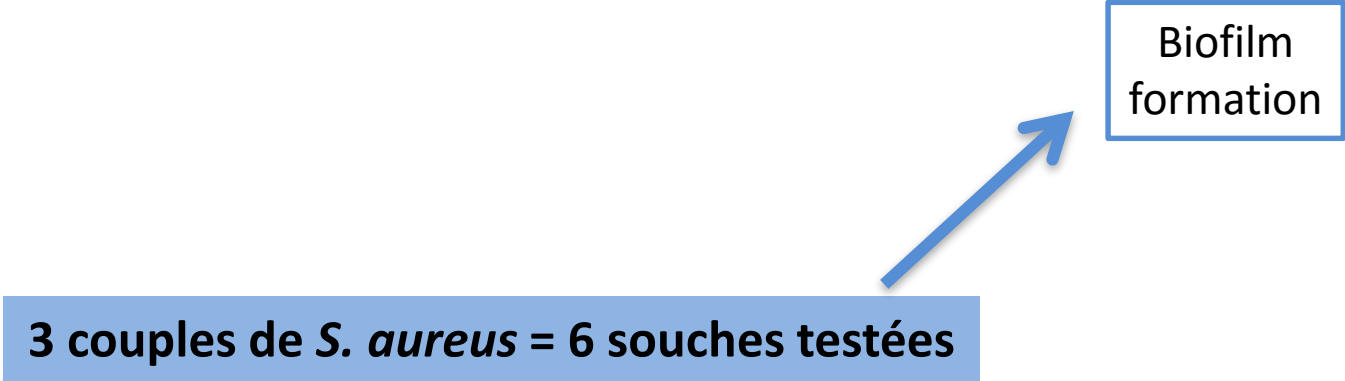
Matériel et méthodes

3 couples de *S. aureus* = 6 souches testées

Matériel et méthodes

3 couples de *S. aureus* = 6 souches testées

Biofilm
formation

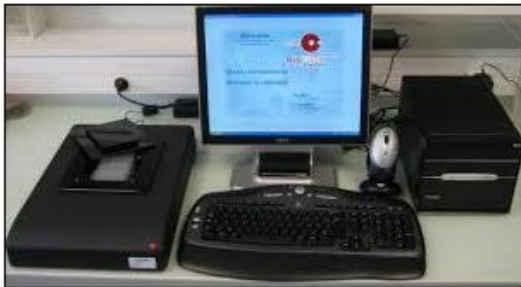
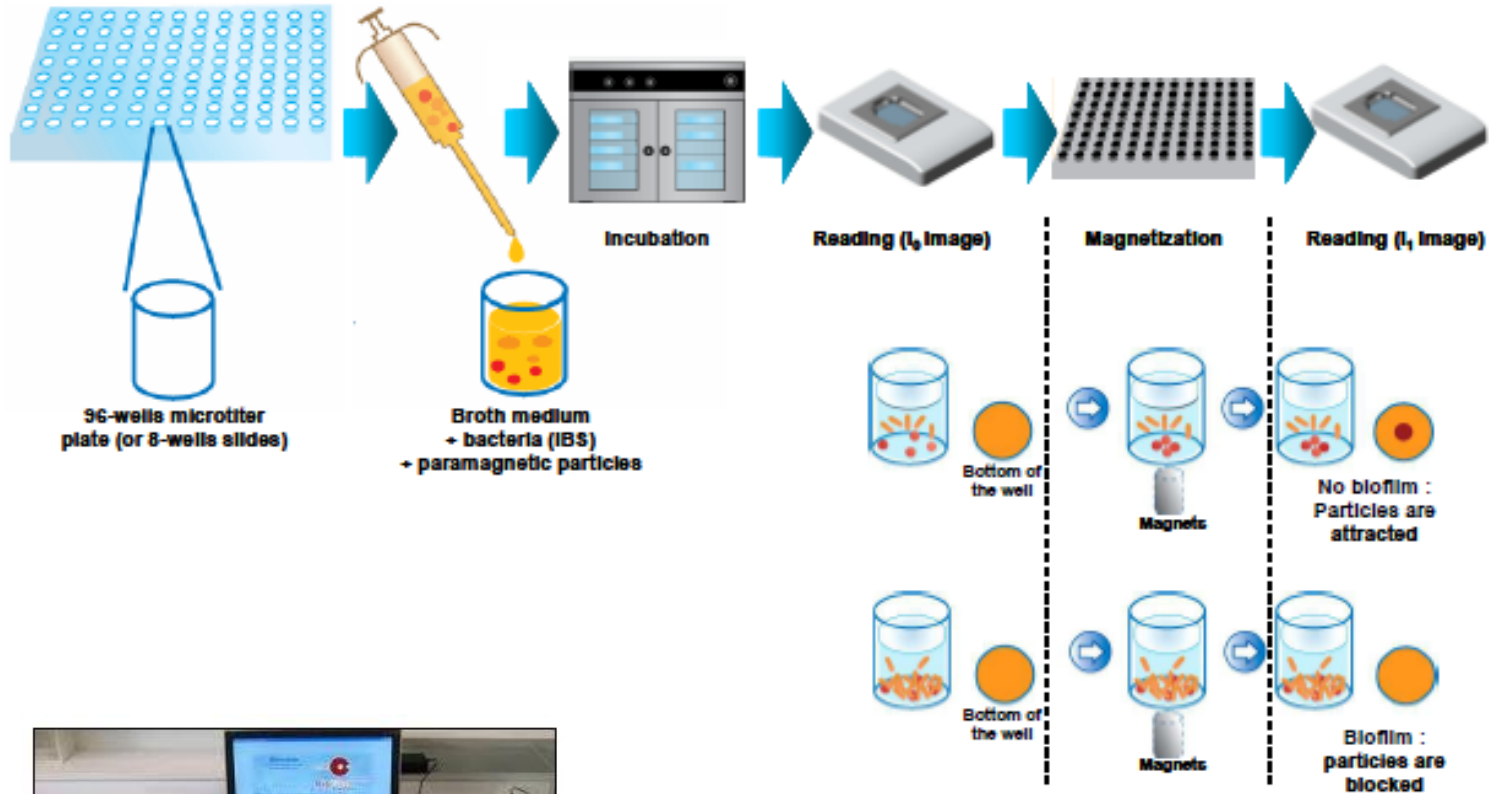


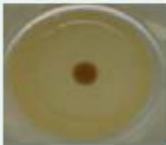
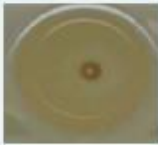
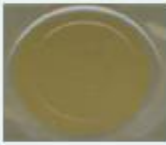
```
graph LR; A[3 couples de S. aureus = 6 souches testées] --> B[Biofilm formation]
```

The diagram consists of a blue rectangular box at the bottom left containing the text '3 couples de S. aureus = 6 souches testées'. A blue arrow points from the top right corner of this box to a white rectangular box with a blue border at the top right. This second box contains the text 'Biofilm formation'.

Souche initiale vs. chronique : Biofilm

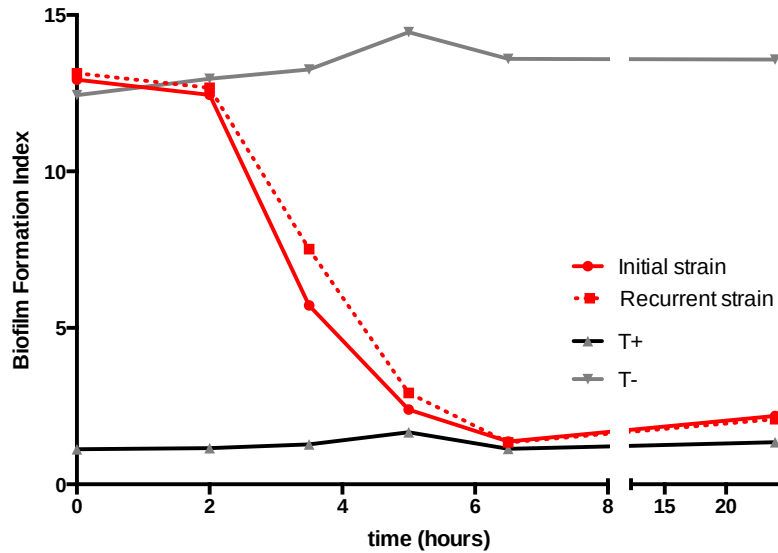
Biofilm ringtest[®] method: Evaluation of *early* biofilm formation



Pas de biofilm	Biofilm en formation (ring)	Biofilm formé complet
		

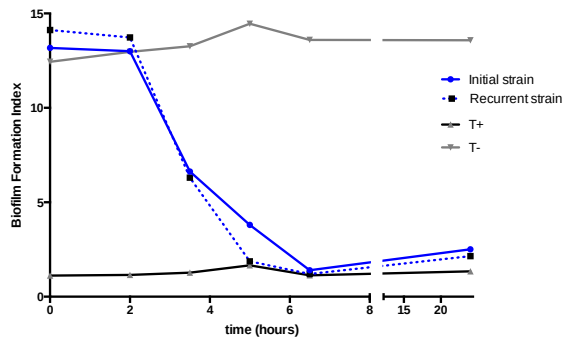
Souche initiale vs. chronique : Biofilm

All patients

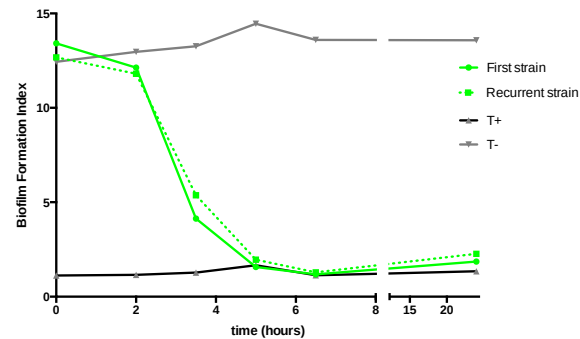


Biofilm ring Test (billes magnétiques)

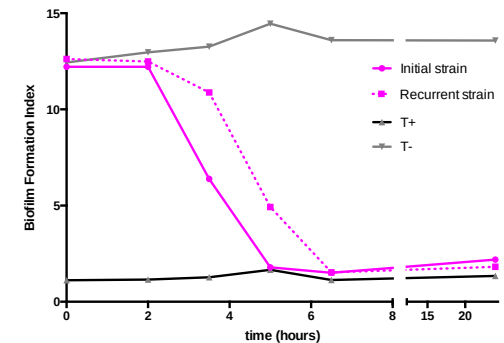
Patient 1



Patient 2

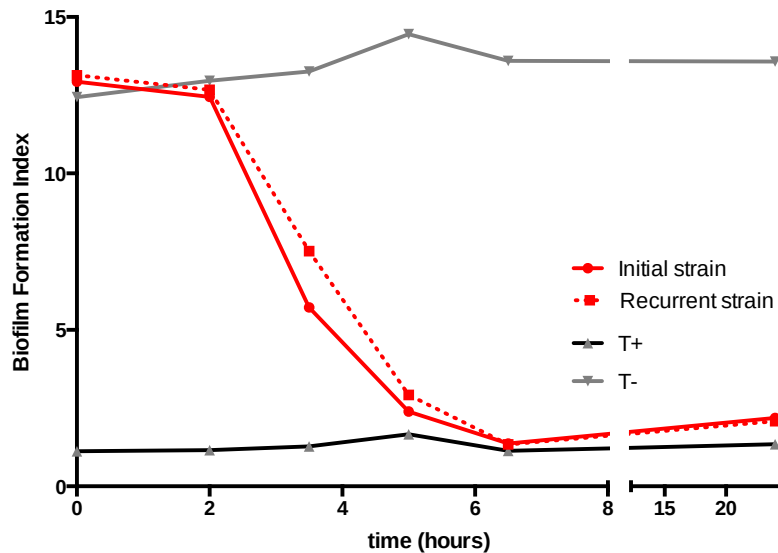


Patient 3



Souche initiale vs. chronique : Biofilm

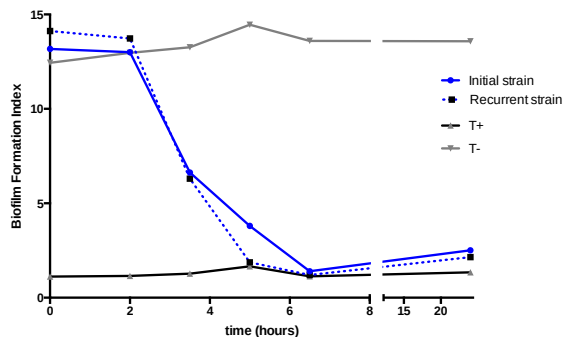
All patients



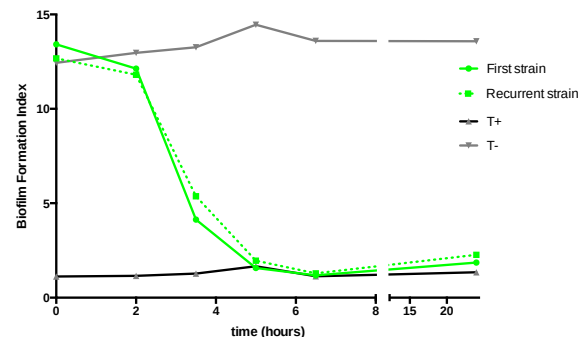
Même rapidité de formation de biofilm précoces des souches de récidence

Biofilm ring Test (billes magnétiques)

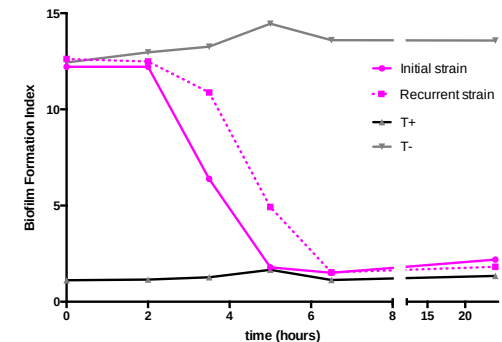
Patient 1



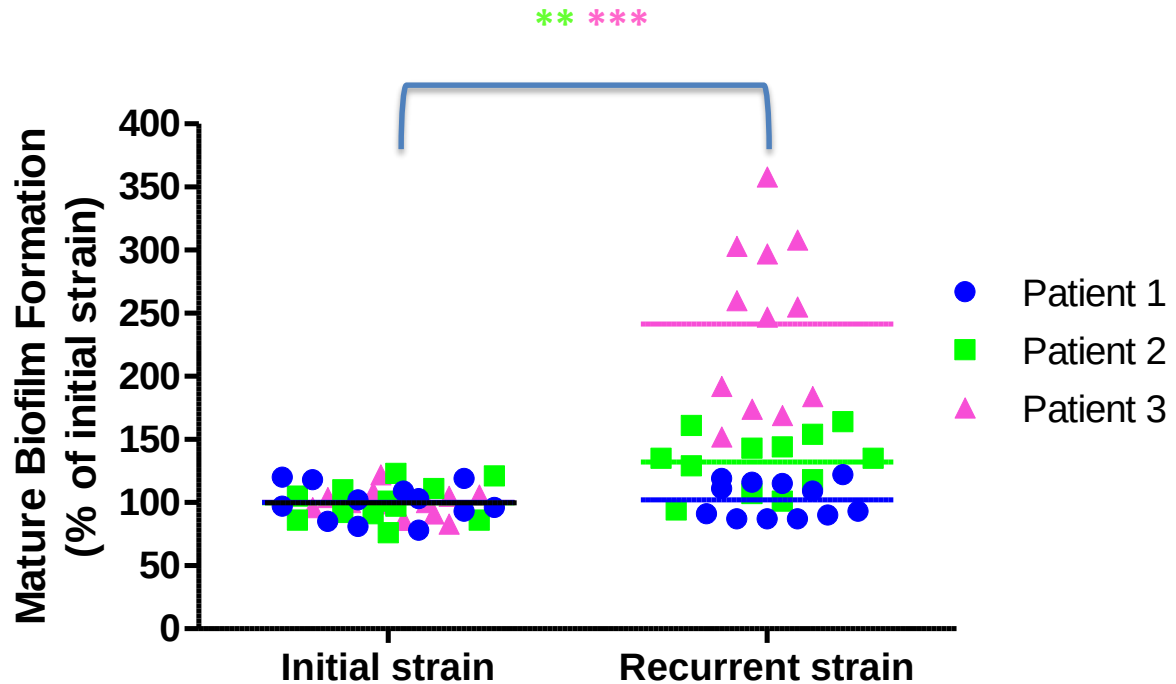
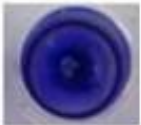
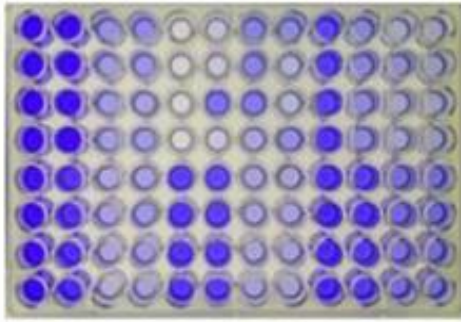
Patient 2



Patient 3



Souche initiale vs. chronique : Biofilm



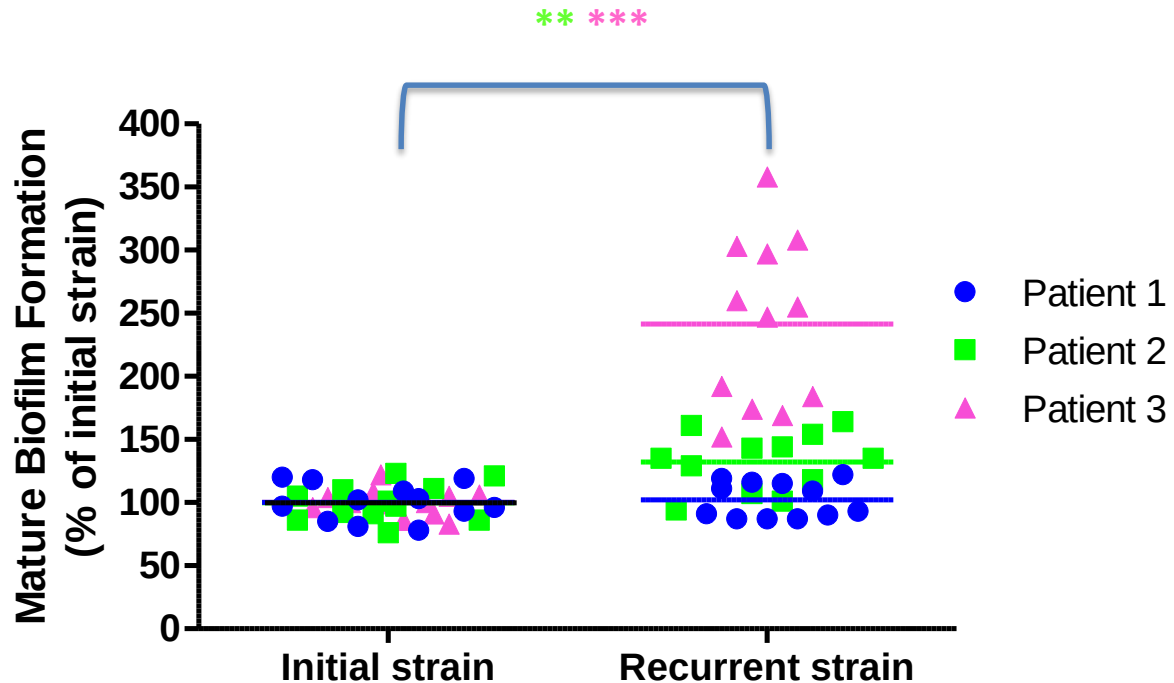
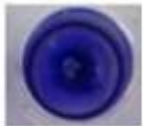
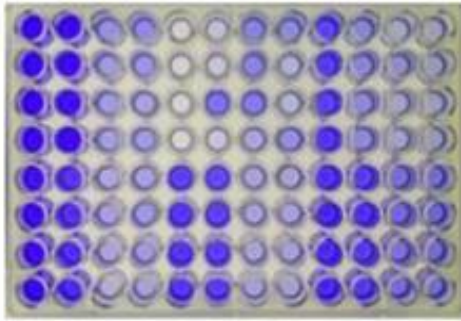
Souche initiale vs. chronique : Biofilm

Patients avec **IOA récidivante** sur matériel

Trois couples de souches de *S. aureus* : souche initiale versus souche de récurrence

Patient	Sexe, age (années)	Site infecté	Ancienneté de l'IOA (jours)	Traitement chirurgical	Durée antibiothérapie	Date récurrence
1	H,26	Matériel ostéosynthèse de tibia	12	Ablation du matériel	82	J82
2	H,80	Prothèse totale de genou	3	Lavage articulaire	191	J201
3	F,82	Prothèse totale de hanche	3	Lavage articulaire	98	J134

Souche initiale vs. chronique : Biofilm



Augmentation de la capacité de formation de biofilm des souches de récurrence (quand matériel laissé en place)

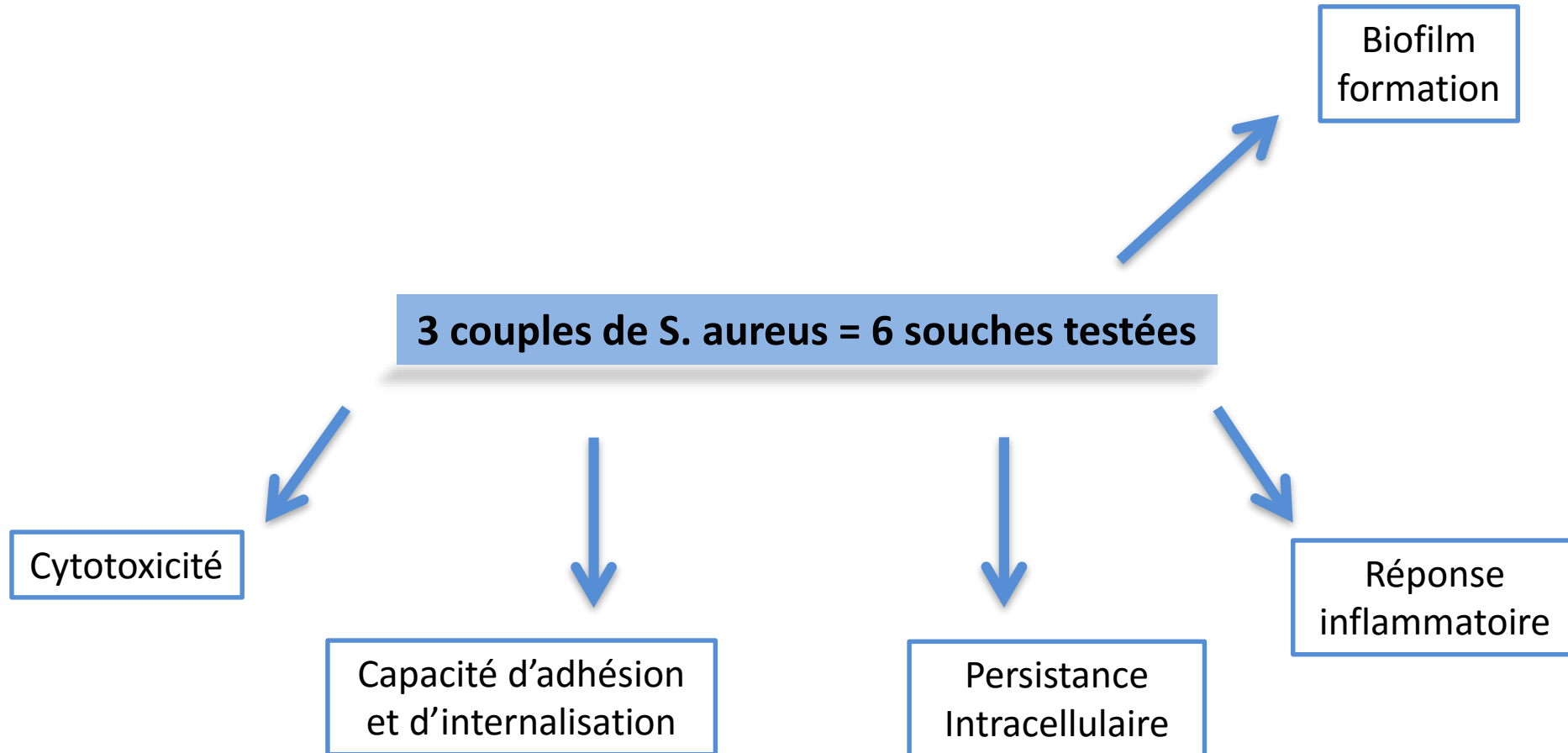
Matériel et méthodes

Biofilm
formation

3 couples de *S. aureus* = 6 souches testées



Matériel et méthodes



Matériel et méthodes

Osteoblasts

MC3T3 cells
MOI:50

Human primary
osteoblasts
MOI:250

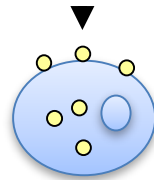
Bacteria culture

Infection



24h 37°C

Invasion (2h)



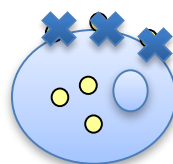
Cellular lysis



Adhesion

Agar plate counting of
extracellular bacteria

Gentamicine
(1h)



H3

Internalization

Agar plate counting of
intracellular bacteria

Cytotoxicity

Quantification of LDH
release

H24- H48

Immune response

Quantification of cytokine
concentrations in cellular
supernatant (Luminex)

H48

Cellular lysis

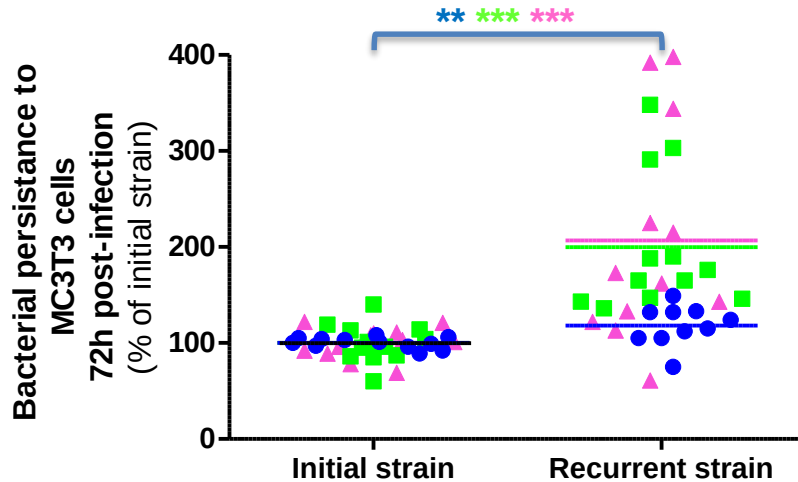
H24-H48-H72

Persistence

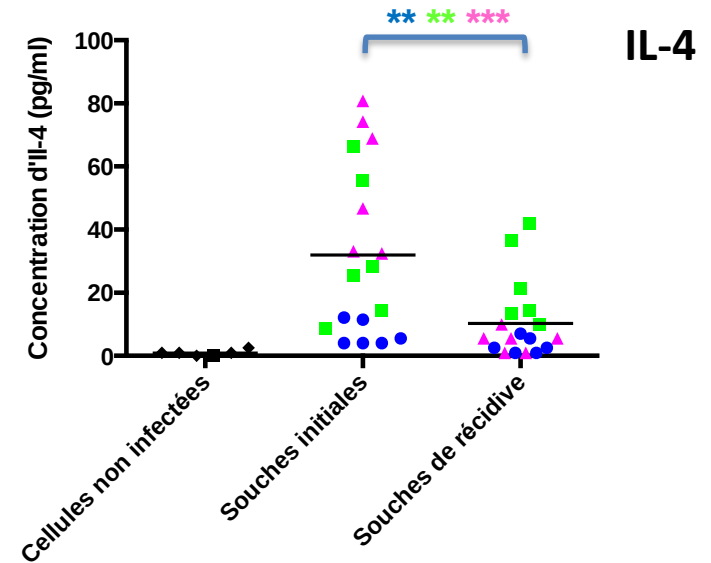
Agar plate counting of
intracellular bacteria

Souche initiale vs. chronique : impact de l'internalisation

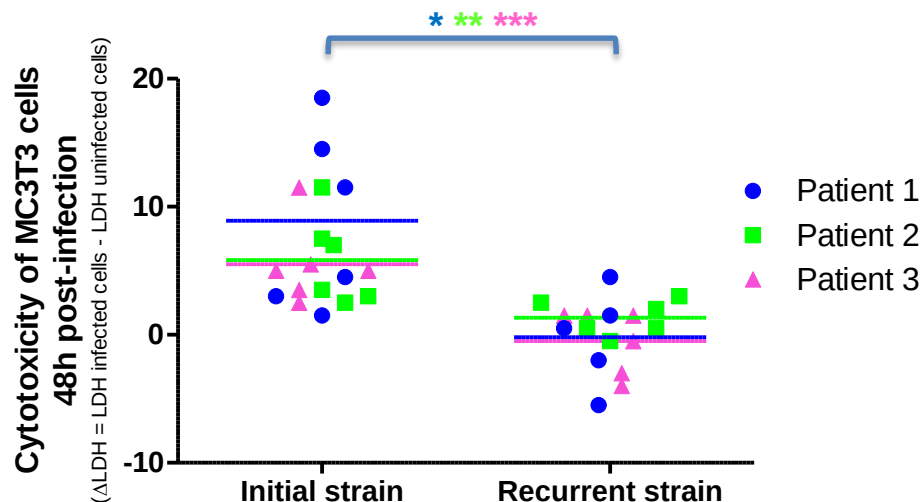
➤ Persistance intra-ostéoblastique



➤ Réponse inflammatoire



➤ Cytotoxicité

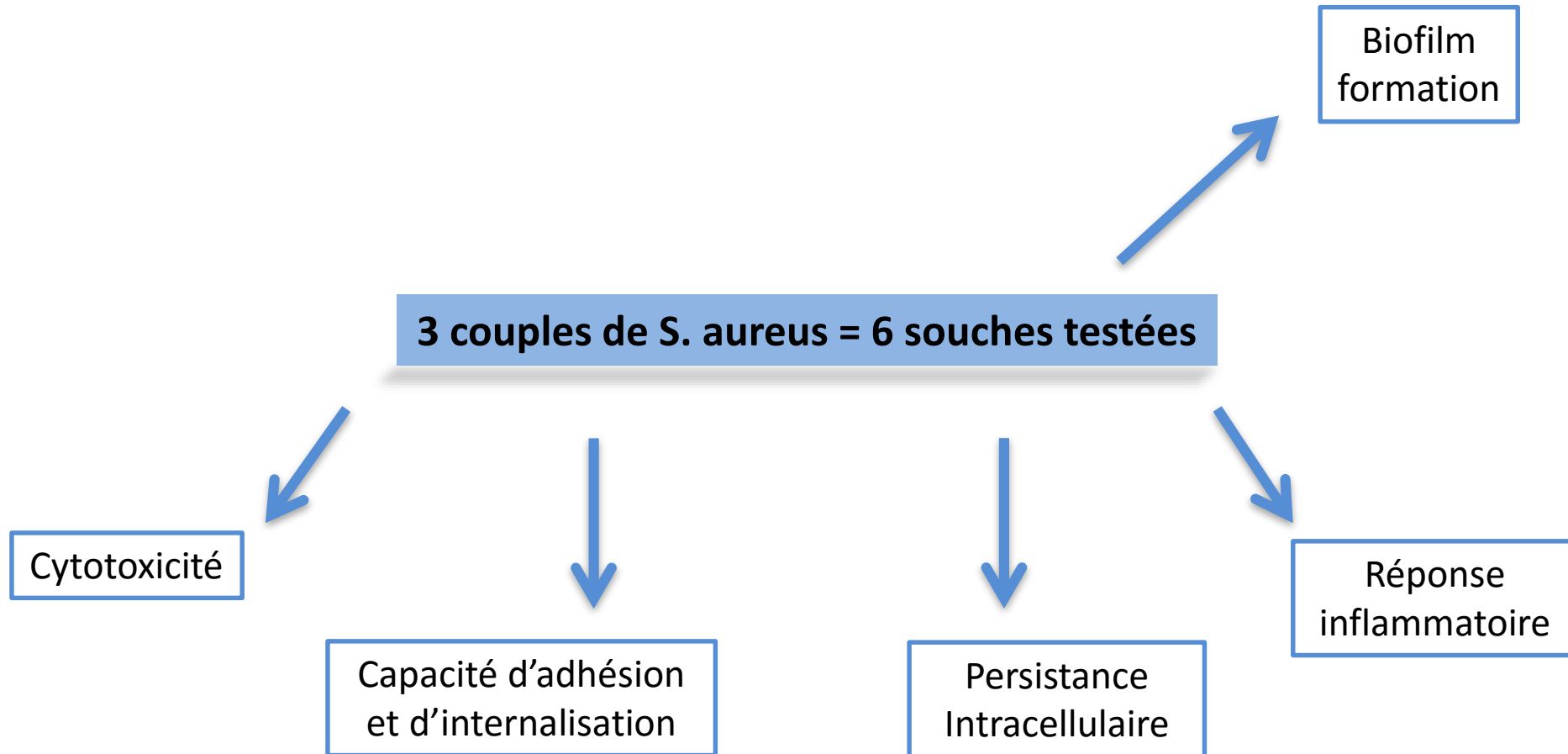


Idem pour IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ

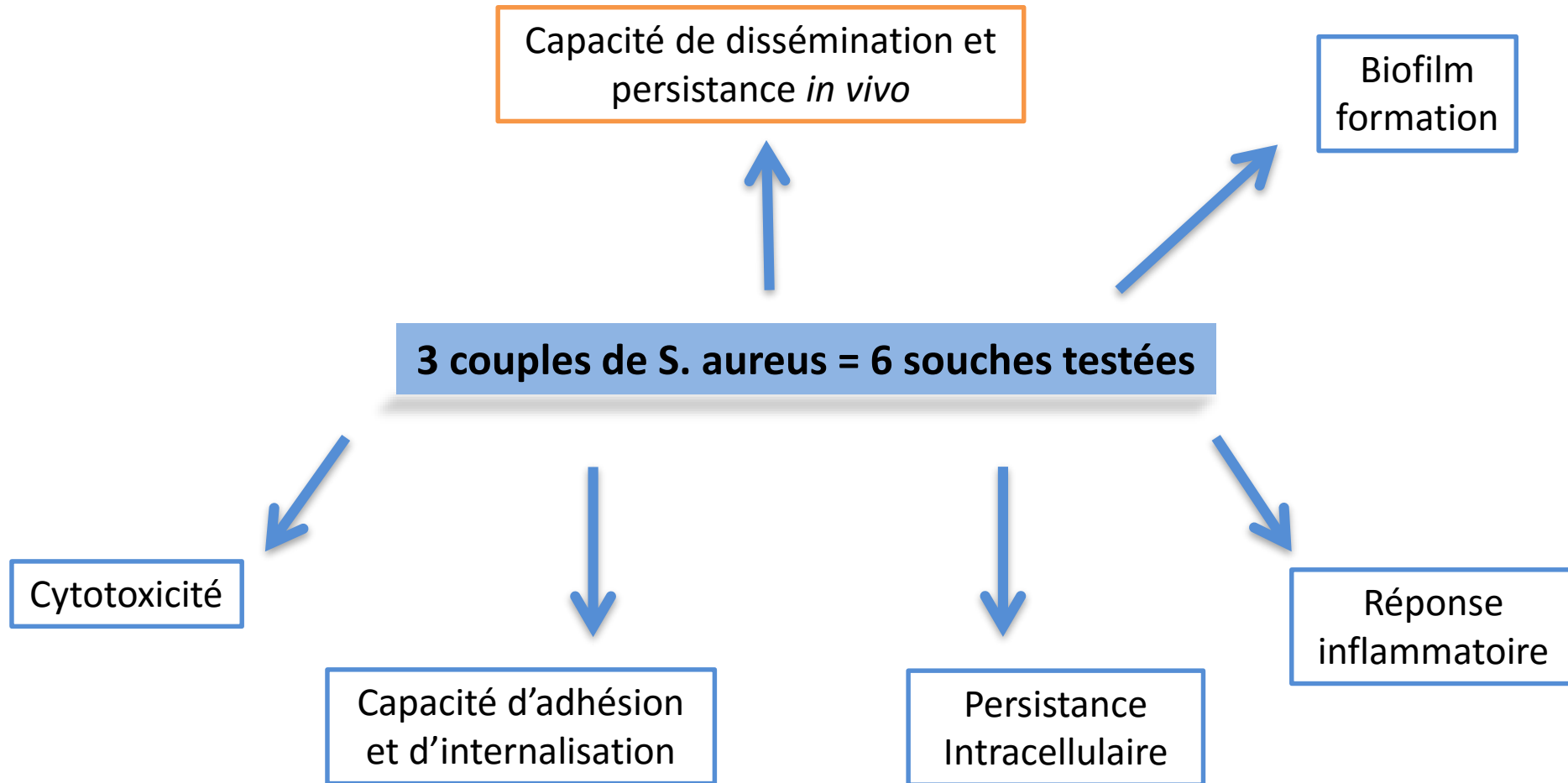
MC3T3 et OB primaires

Souches de récursive
adaptées à la vie
intracellulaire

Matériel et méthodes



Matériel et méthodes



Souche initiale vs. chronique : modèles *in vivo*

Evaluation capacité de persistance et dissémination bactérienne Modèle d'infection intra-péritonéale

48 Souris CD-1 swiss



Injection IP
 5.10^6 *S. aureus*

24 souris inoculées
avec **souche initiale**

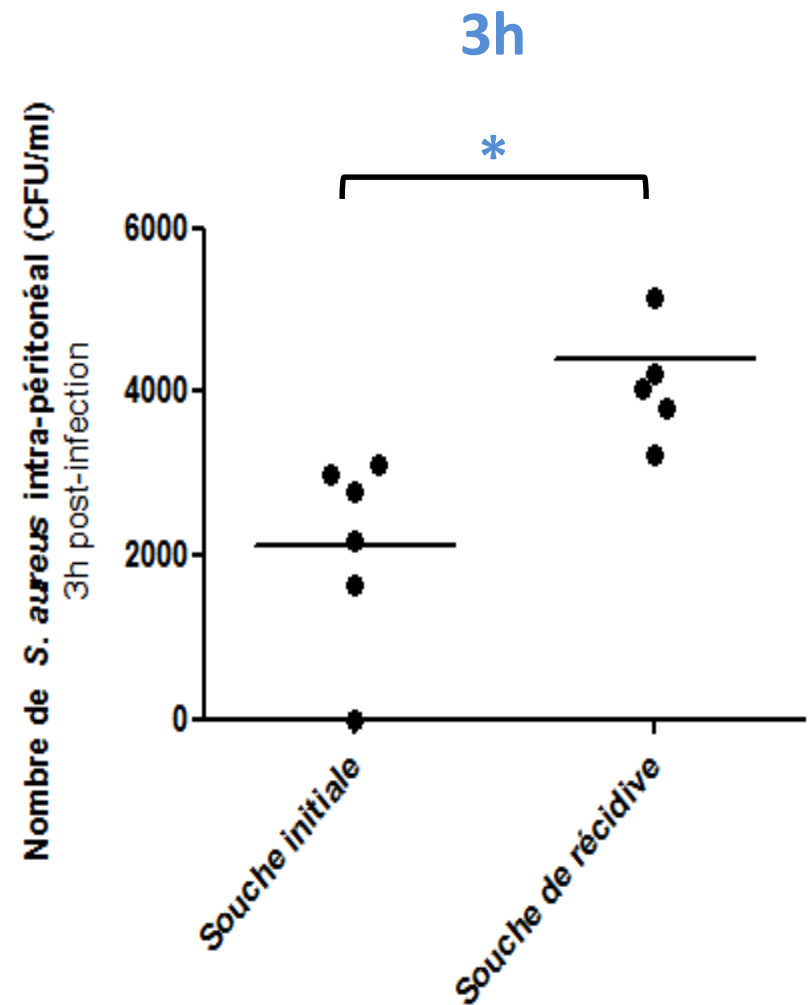
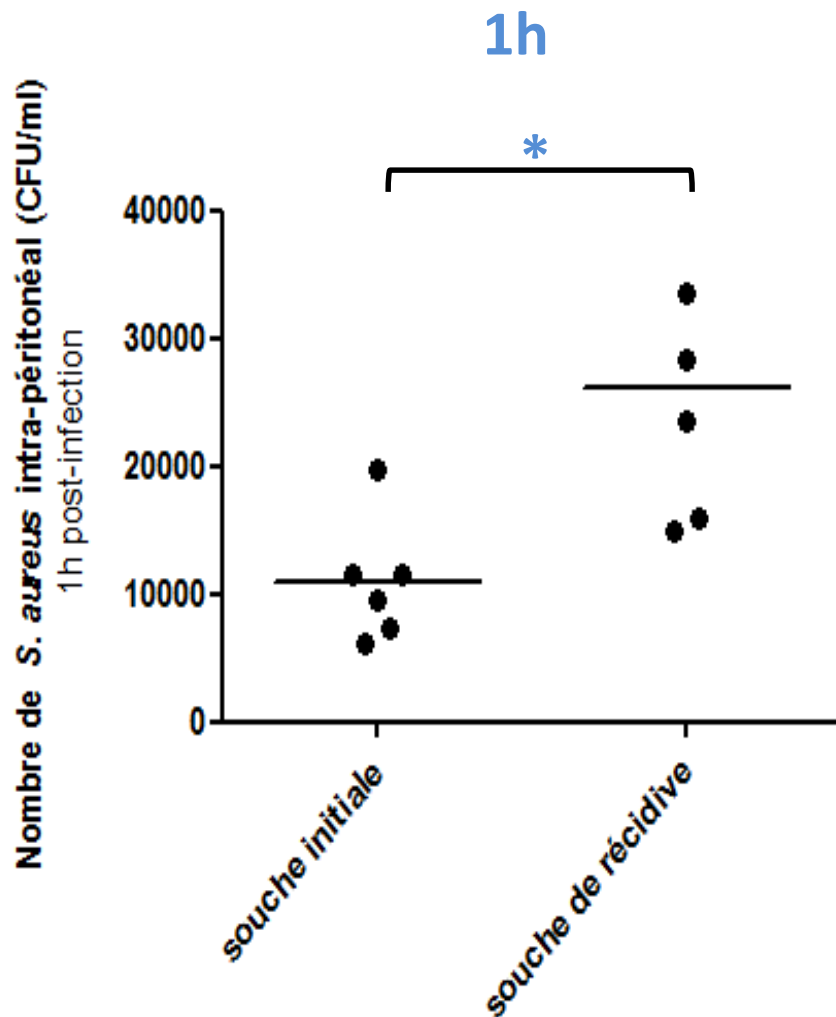
24 souris inoculées
avec **souche de
récidive**

Recueil des bactéries par
ponction intra-cardiaque et
ponction intra-péritonéale à
H1, H3, H24 et H48

Etalement et
dénombrement sur
gélose TSA



Souche initiale vs. chronique : modèles *in vivo*



Les souches de récurrence persistent plus longtemps dans le péritoine des souris infectées que les souches initiales

-> Moindre capacité à activer le système immunitaire des souches de récurrence

Souche initiale vs. chronique : modèles *in vivo*

Evaluation capacité de persistance et dissémination bactérienne :
Modèle de **pneumonie aigüe**

48 CD-1 swiss mice



24 souris inoculées
avec **souche initiale**

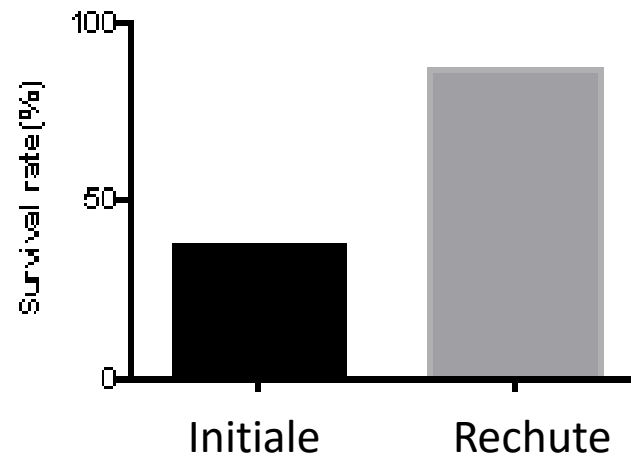
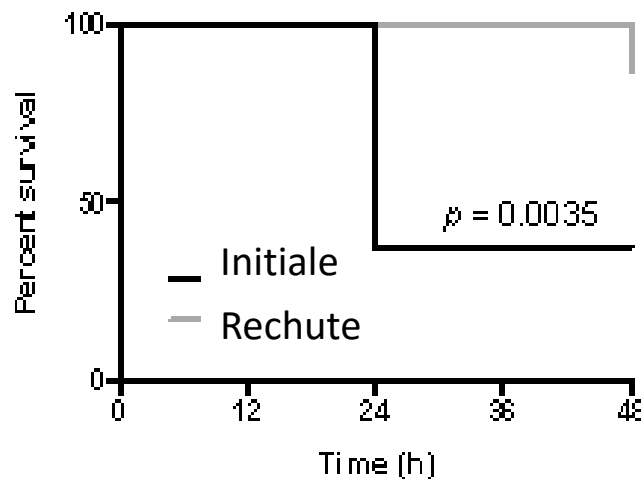
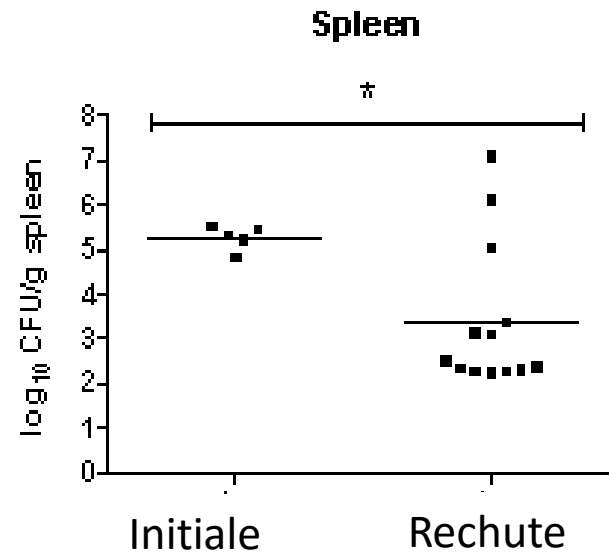
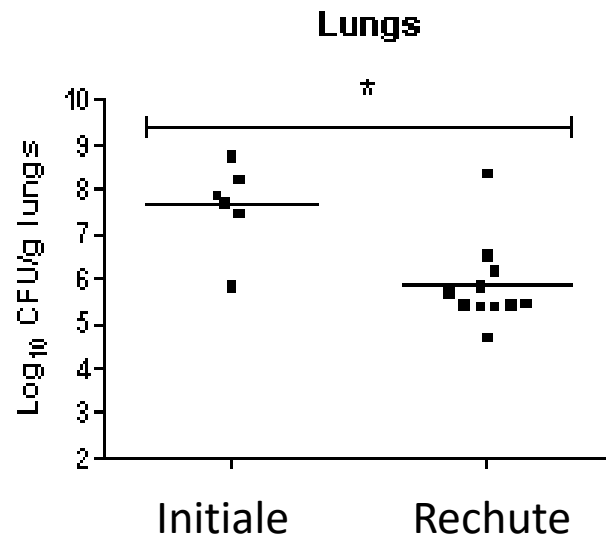
24 souris inoculées avec
souche récurrente

**Inoculum dans les
organes
+
Suivi de la mortalité**

**Injection nasale
 5.10^8 *S. aureus***

Souche initiale vs. chronique : modèles *in vivo*

48H



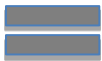
Moindre mortalité observée avec les souris infectées par la souche de récurrence

En résumé ...

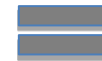
Souche initiale – Forme aiguë

Souche rechute – Forme chronique

Biofilm



Capacité Adhésion / Internalisation



Cytotoxicité



Persistence intracellulaire



Pathogénicité in vivo - Réponse immune

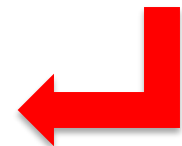


Modèles *in vivo*

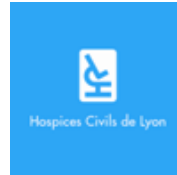
Séquençage des génomes complet

Patient	Isolate	Chromosome size (bp)	Plasmid size (bp)	% GC content chromosome	% GC content plasmid	Overall alignment rate (initial genome covered by recurrent isolate reads)	Total nb of SNPs (recurrent vs initial)	Nb of SNPS in coding regions
1	initial	2726238	20632	32,89	28,38	98,88	5	0
	recurrent	2726193	20633	32,89	28,38			
2	initial	2749852	17307	32,82	28,38	99,07	5	0
	recurrent	2749888	17307	32,82	28,38			
3	initial	2679642	20720	32,86	28,37	99,14	4	3
	recurrent	2678500	no plasmid	32,86	-			

Pas de convergence génétique entre les trois couples
Pas de gènes de fonction connue



Si ce n'est pas l'ADN... c'est l'ARN ??? Technique RNAseq en cours



Sophie ASSANT-TROUILLET



Pr. Tristan FERRY



Dr. Florent VALOUR



Pr Sébastien LUSTIG



Patricia SIMOES



Lucie LELIEVRE
Jason TASSE
Céline DUPIEUX
Jean-Philippe RASIGADE
Yousef MAALI
Sacha FLAMMIER
Virginie TAFANI
William MOUTON
Régis VILLET
Yann DUMONT

...



Jocelyne CAILLON
Cédric JACQUELINE

Guilherme Loss
Ana Tereza Vasconcelos

Pr. Francois VANDENESCH
Pr. Jérôme ETIENNE
Pr. Gérard LINA
Dr. Anne TRISTAN
Dr. Michèle BES
Dr. Olivier DAUWALDER
Dr. Oana DUMITRESCU
Dr. Hélène MEUGNIER
Yvonne BENITO
Cédric BADIOU

Christine COURTIER
Christine GARDON
Caroline BOUYEYRON
Roxane SCHNEL

Anne-Marie FREYDIERE
Michèle de MONTCLOS
Ghislaine DESCOURS
Anne-Gaelle RANC

Dr. Sylvestre TIGAUD
Dr. Chantal ROURE
Dr. Hélène SALORD
toutes les techniciennes du Nord !!!

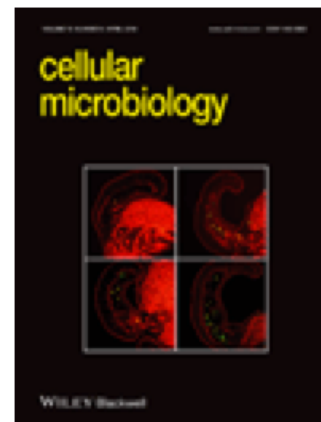
Research article

Adaptive processes of *Staphylococcus aureus* isolates during the progression from acute to chronic bone and joint infections in patients

Sophie Trouillet-Assant^{1,2,†,*}, Lucie Lelièvre^{1,†}, Patrícia Martins-Simões^{1,2}, Luiz Gonzaga⁶, Jason Tasse^{1,2}, Florent Valour^{1,4}, Jean-Philippe Rasigade^{1,2,3}, François Vandenesch^{1,2}, Rafael Lucas Muniz Guedes⁶, Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos⁶, Jocelyne Caillon⁵, Sebastien Lustig⁷, Tristan Ferry^{1,4}, Cédric Jacqueline^{5,†}, Guilherme Loss de Morais^{6,†} and Frédéric Laurent^{1,2,3,†}

DOI: 10.1111/cmi.12582

Issue



Cellular Microbiology

Accepted Article (Accepted, unedited articles published online and citable. The final edited and typeset version of record will appear in future.)