

## Les facteurs de virulence chez les bactéries

Didier Hocquet - laboratoire de bactériologie  
M1 – BBCM 2006-2007

1

## Postulat de Koch - version moléculaire



un gène est un facteur de virulence si...

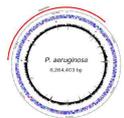
- Le **gène** (ou son produit) est **retrouvé dans les souches** qui entraîne la maladie, et pas dans les souches avirulentes.
- **L'inactivation du gène** dans une souche virulente entraîne une réduction de sa virulence.
- **L'introduction du gène** cloné dans une souche avirulente rend la celle-ci virulente.
- Le gène est **exprimé au moment de l'infection** chez l'animal et chez l'homme.

2

## Exemple préliminaire (1)



*P. aeruginosa*

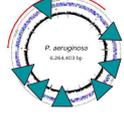


*C. elegans* mort

▲ = Transposon



Banque de mutants  
*P. aeruginosa*



*C. elegans* vivant

3

## Exemple préliminaire (2)

Tan *et al.* PNAS USA 1999, 96: 2408-2413

- *P. aeruginosa* est pathogène pour le ver *C. elegans*.
- Insertion aléatoire d'un transposon (TnPhoA) : obtention "banque" de *P. aeruginosa*:TnPhoA.
- 8 clones de la banque ne tuent plus le ver.
  - Insertion dans *lasR* : gène du *quorum-sensing* et expr virulence.
  - Insertion dans *pstP* : ↓ accumul. Poly-β-OH-butyrates
  - Insertion dans analogue de *mrtR* : ↑ d'un efflux inconnu ???
  - Insertion dans analogue d'*aeiA* : prot de mb, fonction inconnue
  - Insertion dans un **gène inconnu**.
  - Insertion dans un **gène inconnu**.
  - Insertion dans *gacA* : régulateur transcriptionnel inconnu.
  - Insertion dans *lemA* : prot mb cytoplasmique.

4

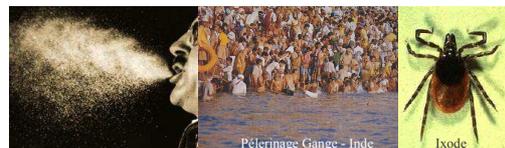
## Les déterminants du pouvoir pathogène

1. Etre **transmis** à l'hôte
2. Se fixer, coloniser ou **envahir** l'hôte
3. (Se multiplier dans l'hôte)
4. **Echapper** aux mécanismes de défenses de l'hôte
5. **Nuire** à l'hôte

5

## Etre transmis à l'hôte

- **Contact direct** : toux, éternuements, contact corps.
- **Indirect** : dispersion par l'hôte dans l'environnement, survie, transmission à un nouvel hôte (transmission oro-fécale).
- **Véhicule** : matière (sol, eau, nourriture...), organisme (insectes, animaux, plantes...)



Pèlerinage Gange - Inde

Ixode

6

## Facteurs d'adhésion à une surface

- Site stérile (rare) ou concurrence de flore normale.
- Une bactérie, un mécanisme d'adhérence, une niche.
- Stratégie générale : communauté Agque avec l'hôte.
- Gram négatif (ex : *E. coli*)
  - Pili (*Fimbriae*) : struct filamenteuses (attachement des bact aux surfaces solides, à rp des cellules hum).
  - Hémagglutinines : adhérence aux GR...
- Gram positif (ex : *Streptococcus pyogenes*)
  - Protéine M (fibrillaire).
  - Protéine F (non fibrillaire)
- Formation de biofilm : importance pour matériel étranger (cathéter, implant,...).



7

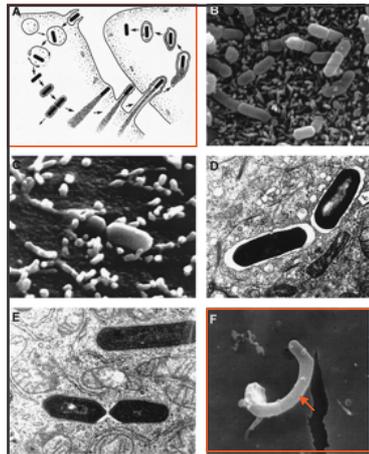
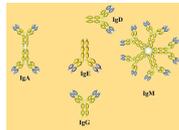


Dépôt de bacilles à la surface d'un catheter

8

## Facteurs d'invasion (1) Invasion cellulaire

- **Altération** des membranes basales et tissus intestinaux
  - Collagénase de *Clostridium*, élastase de *P. aeruginosa*
- **Dépolymérisation** des complexes glycoprotéiques cellulaires
  - Hyaluronidase des *Streptococcus* sp.
- **Désorganisation** de la surface cell.
  - Lécithinase de *Clostridium*
- **Polymérisation/dépolymérisation** de l'actine cell. au bénéfice de la bact
  - *Listeria*...
- **IgA protéase**
  - *P. aeruginosa*



- A : cycle parasitaire de *Listeria monocytogenes*
- B : nbses cell adhére à μvillosité 30 min après infection.
- C : 2 bactéries en phase d'invasion
- D : 2 bactéries dans phagosome
- E : 2 bactéries libres après échappement du phagosome
- F : Pseudopode d'actine (cellulaire)

10

## Facteurs d'invasion (2) Invasion de l'hôte entier

- Coagulase (*S. aureus*) : coagule le Fg du plasma, le caillot protège les bactéries de la réponse de l'hôte.
- Hémolysines (*Staph*, *Strepto*, *E. coli*, *P. aeruginosa*...) : lyse GR → anémie, apport de Fer à la bact.
- Streptokinase (*Streptococcus*) : lyse le caillot, libérant les bact.
- Enzymes détruisant les tissus (collagénase des *Clostridium*).
- Mobilité et chimiotactisme.
- Sidérophores (système d'acquisition du fer) : Molécules de bas PM sécrétées (pour pirater les transporteurs de l'hôte).



11

## Evitement de la réponse de l'hôte

- **Capsule** : inhibe phagocytose, masque activateur complément
  - Capsule K1 d'*E. coli* : réduit phago, opsonosation, R1 cellulaire, peu immunogène (A. polysialique : communauté Agq avec hôte).
- **Toxines et enzymes** agissant sur cell. immuno. et barrière immuno.
  - Porines de *S. typhimurium* : inhibe phagocytose par activation de l'adénylate cyclase.
- **Ig protéases**
  - IgA protéase de *P. aeruginosa* et *S. pneumoniae* lyse IgA.
  - Protéine A de *S. aureus* fixe Fe des IgG (inhibant ainsi interaction C<sup>3</sup>-Fe)
- **Séquestration du Fer**
- **Enveloppement** dans prot de l'hôte.
- **Variation antigénique**
- **Invasion intracellulaire**

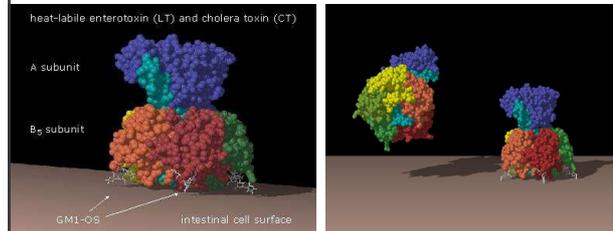
12

## Facteurs qui endommagent l'hôte (1)

- Exotoxines
  - Définition : protéines solubles, thermolabiles, libérées dans l'environnement pdt croissance bact.
  - Exotoxine A de *P. aeruginosa*, entérotoxines d'*E. coli*, toxines charbonneuses de *B. anthracis*, toxine tétanique de *C. tetani*...
  - Structure :
    - modèle AB (A resp de l'effet, B de la fixation sur rp spé),
    - A et B inactifs séparément,
    - Modes d'action variés
      - Inhibe synthèse prot : toxine A pyocyanique, toxine diphtérique,
      - Inhibe synapse nerveuse : toxine tétanique,
      - Altère transport mbinaire : toxine cholérique,
      - Endommage la cellule : toxine staphylococcique.

13

## Exemple de la toxine cholérique



14

## Facteurs qui endommagent l'hôte (2)

- Toxines agissant sur les membranes
  - Phospholipase, hémolysines
- Superantigènes
  - Active +++ les  $L_T$  après fixation sur TCR et CMH<sub>II</sub> des CPA (TSST des *S. aureus*).
  - Ag classique :  $1/10^5$   $L_T$  activé, superAg :  $1/10$  à  $1/100$ .
- Enzymes hydrolytiques
  - Collagénase, gélatinase, élastase, protéases, DNase...
- Produits bact induisant une réponse auto-immune
  - Inf à Strepto A, production d'AcS anti-protéine M, reconnaissant des protéines du myocarde et articulaire.
- Endotoxines et autres composants membranaires
  - Fragments de PG, a. téichoïques...

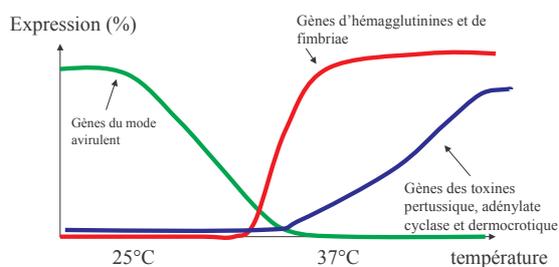
15

## Régulation des facteurs de virulence

- Expression variable des facteurs en fonction du stade de l'infection → régulation
  - coagulase et staphylokinase de SA, l'une coagule, l'autre lyse le caillot !
- Régulation en fonction :
  - Des conditions extérieures : pH, Fe, Ca, tempér...
  - De la densité bactérienne (*Quorum sensing*)
- Modes de régulation :
  - **Amplification de gène** (sous Pr de sélection)
  - **Réarrangement de gène** (ex : variation phase chez *Salmonella* sp.), **remplacement, mutations.**
  - **+++ Contrôle transcriptionnel** : syst à 2 composants (**senseur sensible aux stimuli ext qui phosphoryle un régulateur** agissant sur 1 ou plusieurs gènes).
  - **Contrôles post-transcriptionnel** (atténuation d'expr par structure II d'ARN), et **post-traductionnel** (modif de la prot).

16

Exemple : Contrôle de la virulence de *Bordetella pertussis* (agent de la coqueluche) par la température.



17

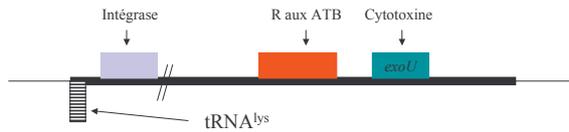
## Organisation génétique des F.V. (1)

- **Localisation**
  - +/- sur élément **transmissible** (Plasmide, Tn, bactériophage),
  - +/- sur élément particulier du chromo : **Ilôt de pathogénicité.**
- **Ilôt de pathogénicité**
  - **Au sein d'une esp.** : présent chez patho, pas chez non patho.
  - Contient **plusieurs gènes** de V. (> 30 Kb jusqu'à 200 Kb)
  - **G+C% différent** de la bactérie hôte.
  - Unité **compacte, distincte, flanquée** de séquences particulières (séqu d'insertion, gène ARNi) → **mobilité.**
  - Présence de **gènes de "mobilité"** (intégrase, transposase, origine de répllication plasmidiques...) → **mobilité.**
  - **Instable** → **mobilité (transfert horizontal participant à l'évolution bactérienne).**

18

## Mobilité des F.V (exemple : *P. aeruginosa*)

- La plupart des F.V. **commune** à ttes les souches
- Certaines souches (+ patho que les autres : pneumonies, choc septique) possède un F.V. supplémentaire : ExoU
  - ExoU : cytotoxine assoc. à syst. sécrétion de type III (aiguille)
  - Transfert rare à partir d'une souche ancestrale, via un plasmide, d'un îlot de pathogénicité contenant *exoU*, integration irréversible



Lulasekara JBact 188: 4037 <sup>19</sup>

## Etude des facteurs de virulence (1)

- **Pourquoi ?**
  - Améliorer traitement (nouvelles cibles)
  - Mieux connaître la biologie de l'hôte,
  - Evolution.
- **Outils pour identifier les FV**
  - Modèles animaux : **Lapin, souri.**
    - Coût, éthique, validité homme, screening génétique difficile.
  - Hôtes eucaryotes plus simples *Arabidopsis*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, *Dictyostelium*.
  - Culture de cellules de mammifères.
- **Quelles méthodes ?**
  - Introduction d'ADN (conjugaison, transduction, transformation)
  - Marqueurs génétiques (R aux ATB, β-gal, GFP).
  - Inactivation aléatoire de gène (Transposon...)
  - Création de banque dans des plasmides.
  - Mutations marquées sur le chromosome.

20

## Etude des facteurs de virulence (2)

- Test de pathogénicité chez l'animal ou dans modèle plus simple (voir exemple préliminaire).
- Mesure d'autres paramètres
  - LD50 (*lethal dose 50*),
  - Temps de survie,
  - Colonisation des organes,
  - Compétition avec les flores normales.
- Mesure d'expression des gènes *in vivo/in vitro*

21



22

## Etude des facteurs de virulence (3)

*In vitro* expression tag (**IVET**) : étude des promoteurs OFF *in vitro*, mais ON *in vivo*.

