



24-septembre-2006

Implication des hémolysines de *Staphylococcus aureus* dans le développement de l'infection intracellulaire dans une lignée de cellules phagocytaires

Aurélie OLIVIER

Université Catholique de Louvain

Unité de pharmacologie cellulaire et moléculaire

Introduction

Staphylococcus aureus



- Cocci Gram +
- Coagulase + (vs. coagulase - : *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*)
- Réservoir : homme et animaux à sang chaud
 - colonise les muqueuses nasales et la peau
(colonisation permanente ~ 20% de la population; intermittente 60%)

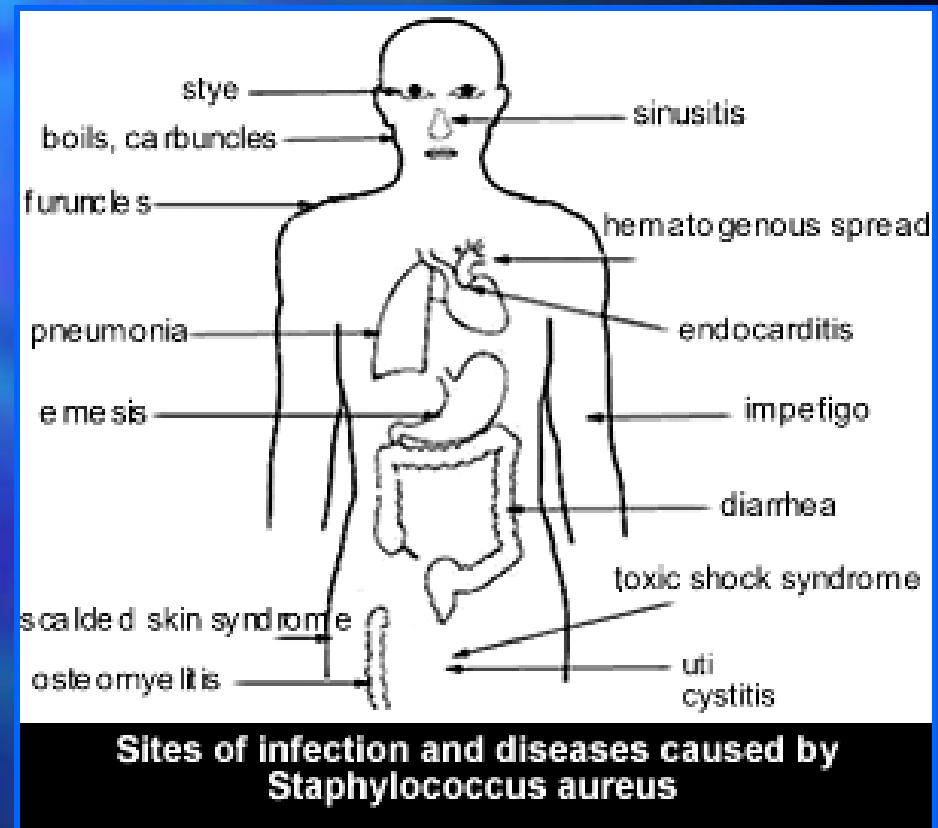


Infections à Staphylocoques

- Infection de la peau et des tissus mous (furoncle, impétigo,...)
- Ostéomyélites
- Endocardites
- Syndrome du choc toxique
- Empoisonnement alimentaire
- ...



Infections récurrentes
et difficiles à traiter



Introduction

S. aureus intracellulaires

Scandinavian Journal of Immunology. Volume 61 Issue 6 Page 536 - June 2005

Infection of Human Endothelial Cells with *Staphylococcus aureus* Induces Transcription of Genes Encoding an Innate Immunity Response.

A. Matussek, J. Strindhall, L. Stark, M. Rohde, R. Geffers, J. Buer, E. Kihlström, P.-E. Lindgren & S. Löfgren

Clin Infect Dis. 2001 Jun 1;32(11):1643-7. Epub 2001 Apr 30.

Intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants within keratinocytes: a cause for antibiotic treatment failure in a patient with Darier's disease.

von Eiff C., Becker K., Metze D., Lubritz G., Hockmann J., Schwarz T., Peter G.

Molecular Microbiology. Volume 49 Issue 4 Page 919 - August 2003

Biphasic intracellular expression of *Staphylococcus aureus* virulence factors and evidence for Agr-mediated diffusion sensing

Sankale Shompole, Kim T. Henon, Linda E. Liou, Katarzyna Dziewanowska, Gregory A. Bohach and Kenneth W. Bayles*

FEMS Microbiology letter. Vol. 193 Issue 1 Pages 57-62 - December 2000

Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk

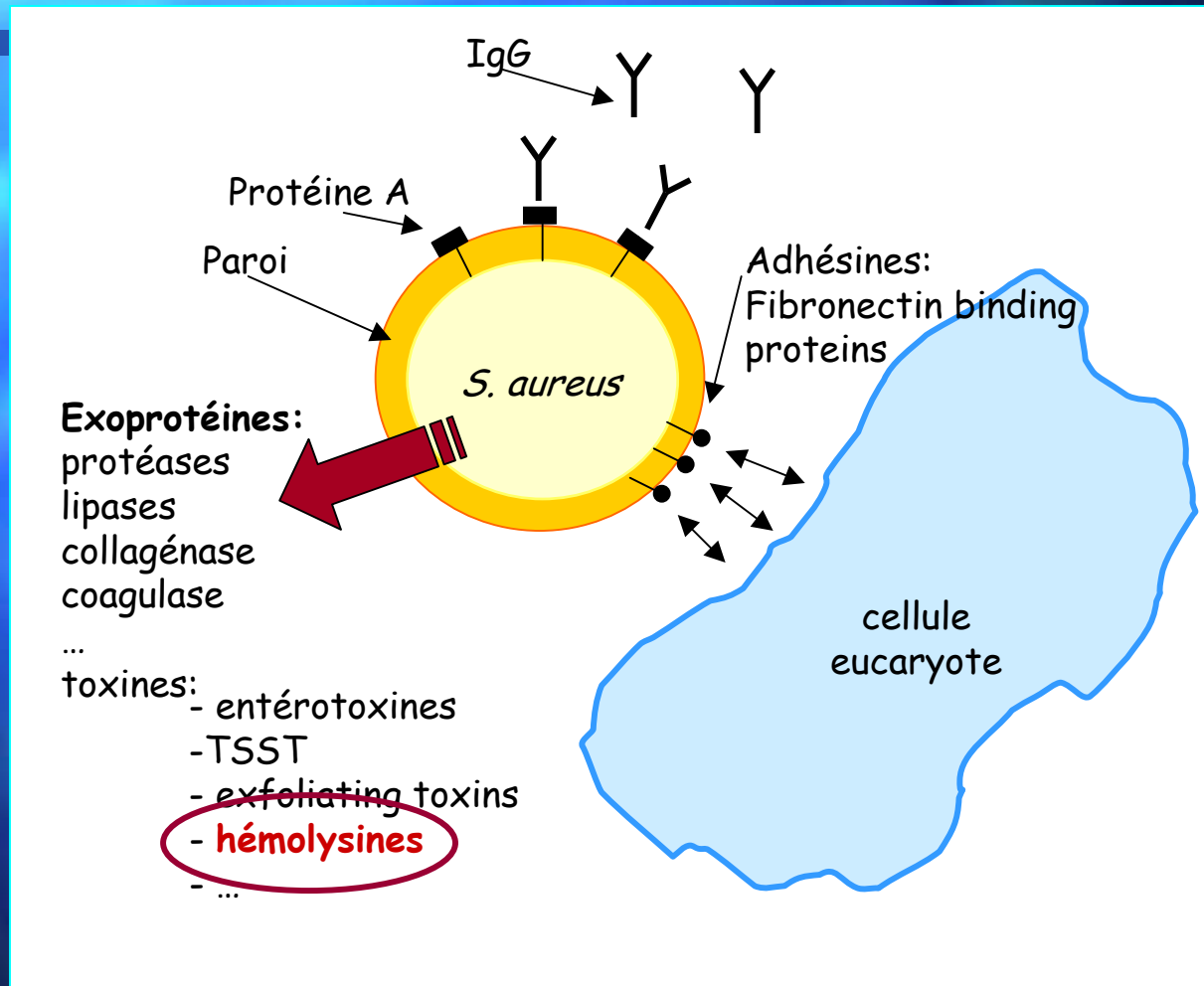
Alexandre Hébert, Khampoune Sayasith, Serge Sénéchal, Pascal Dubreuil and Jacqueline Lagacé

Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2005 55(6):897-904

Activity of three β -lactams (ertapenem, meropenem and ampicillin) against intraphagocytic *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*

Sandrine Lemaire, Françoise Van Bambeke, Marie-Paule Mingeot-Leclercq and Paul M. Tulkens*

Facteurs de virulences



Hémolysines

Hémolysine- α

- 293 aa \rightarrow heptamère
- Forme des pores dans les membranes
- GR, LyC., cell. épithéliales, plaquettes, ...

Hémolysine- β

- 330 aa
- Sphingomyélinase
- Monocytes, (GR)

Hémolysine- γ

- HlgA (281 aa) + HlgB (300 aa)
ou HlgB + HlgC (286 aa)
- Forme des pores
- M Φ , monocytes, lyC., (GR),...

Hémolysine- δ

- 26 aa
- Perturbe les membranes

Objectifs

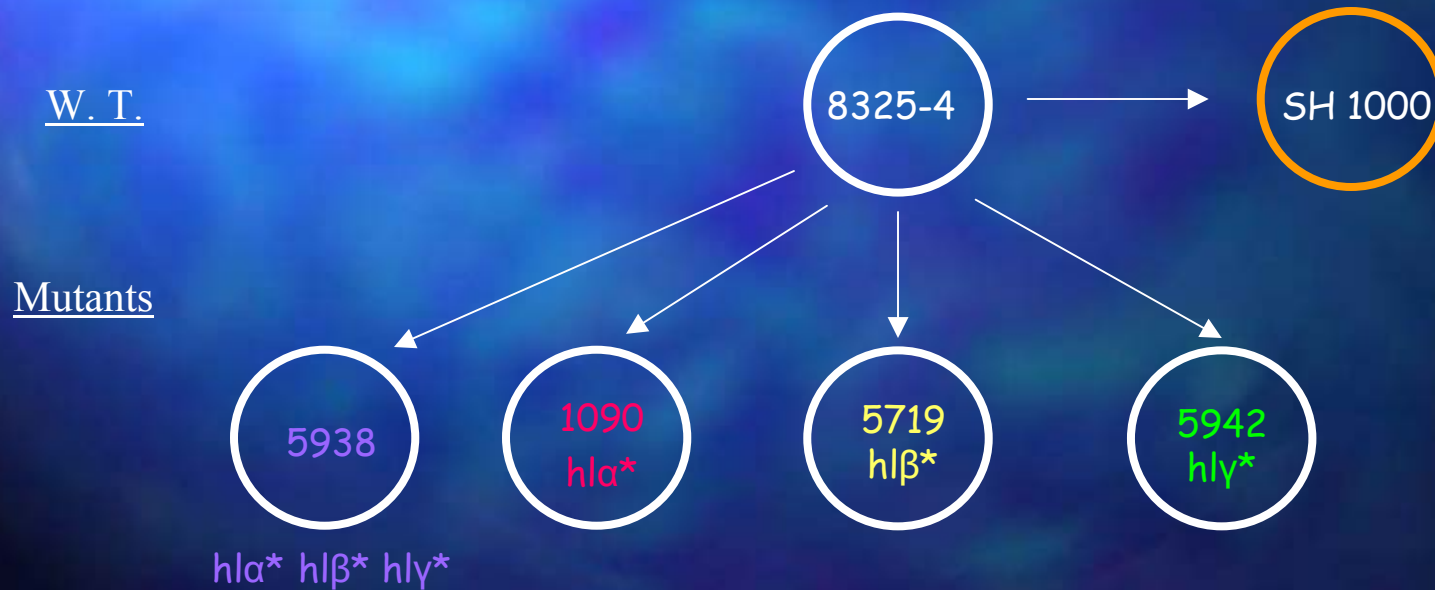


Etudier l'implication des hémolysines de *S. aureus* dans le développement de l'infection intracellulaire dans un modèle de cellules phagocytaires

- Cinétique de multiplication intracellulaire de mutants *S. aureus*
- Localisation des *S. aureus* intracellulaires

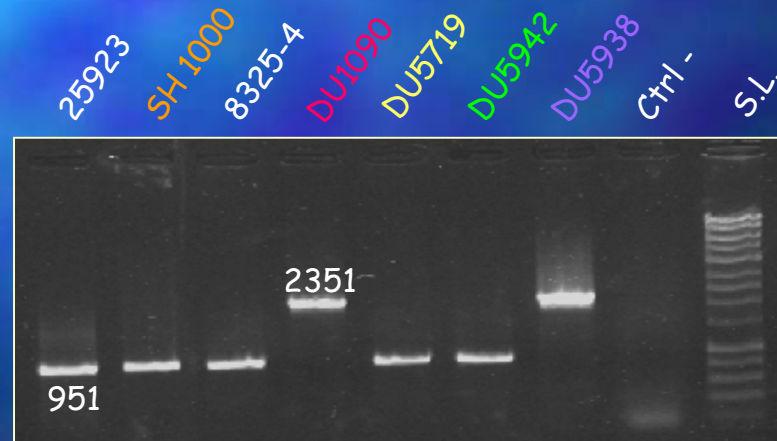
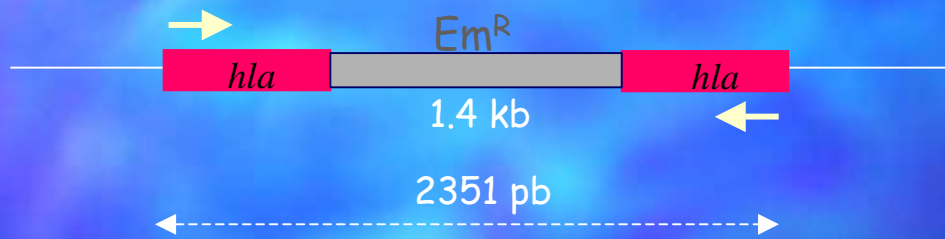
Souches WT et mutants hémolysines

- 8325-4: - souche de laboratoire dérivée de NCTC 8325
 - séquencée, souche de référence pour les études génétiques
 - hla α +, h1 β +, hly γ +, h1 δ +, rsbU-

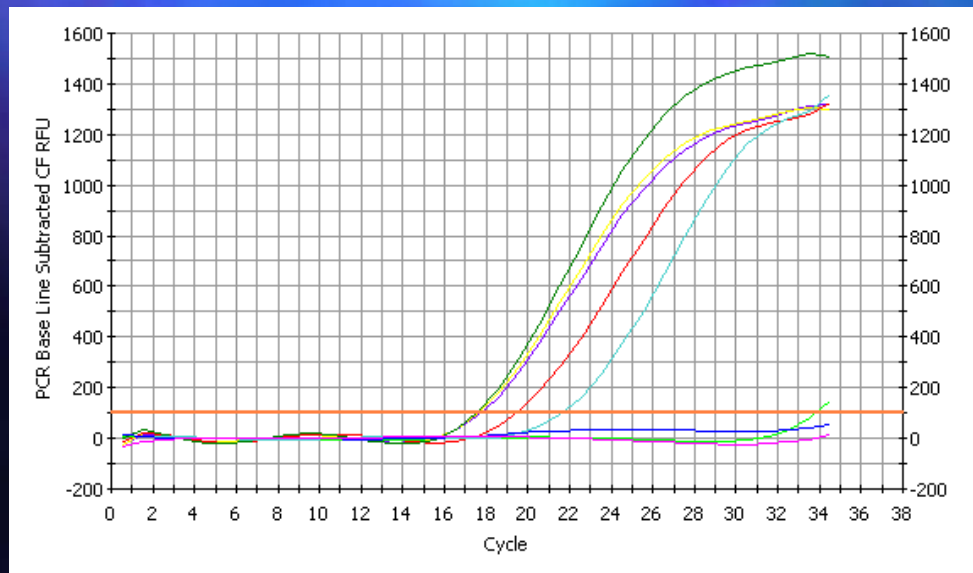
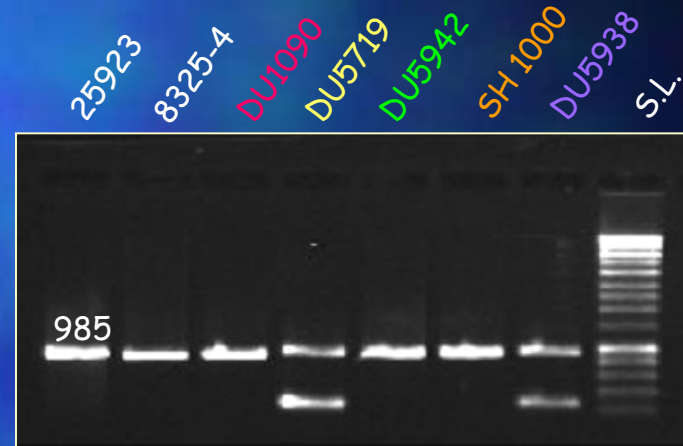
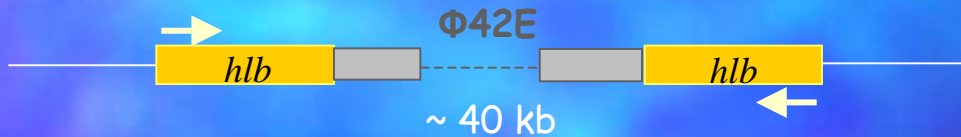


Résultats

Vérification des souches – hémolysine α



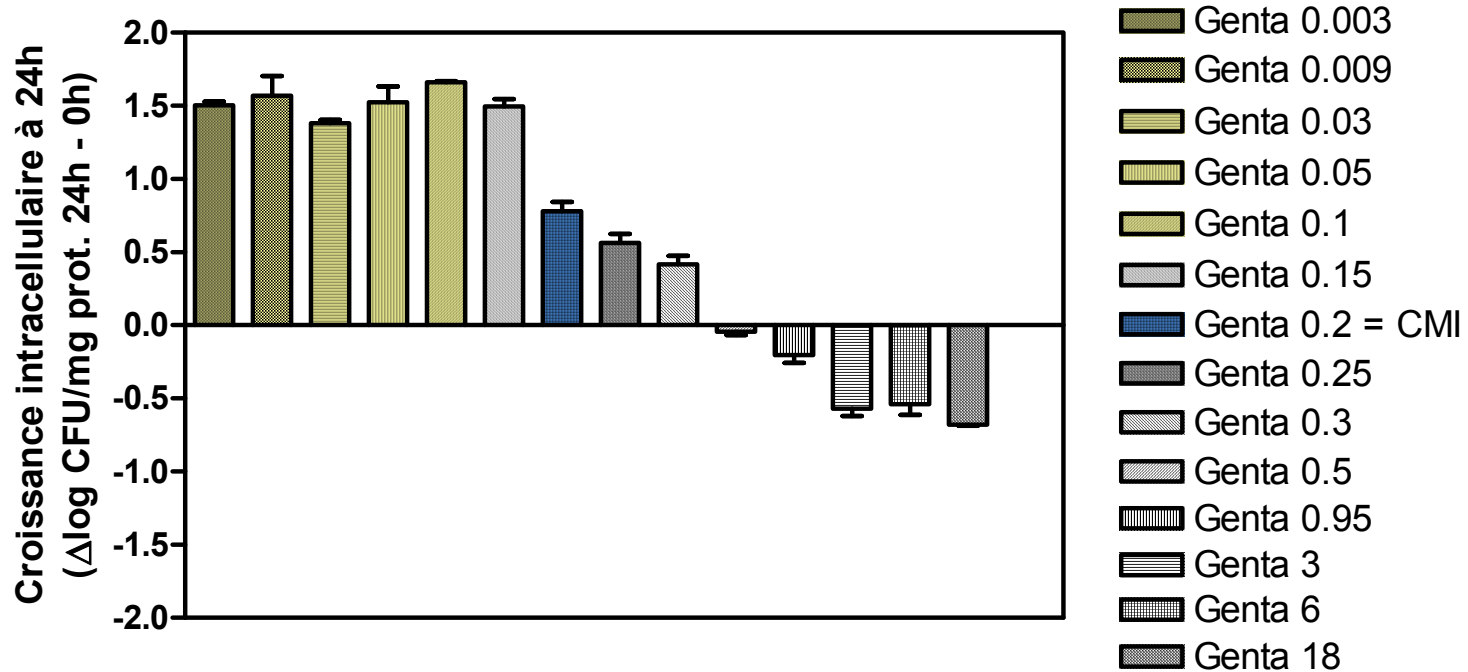
Vérification des souches - hémolysine β



- DU5942 (γ -)
- 8325-4
- 25923
- DU1090 (α -)
- SH1000
- DU5719 (β -)
- DU5938 (α -, β -, γ -)
- H₂O (ctrl -)

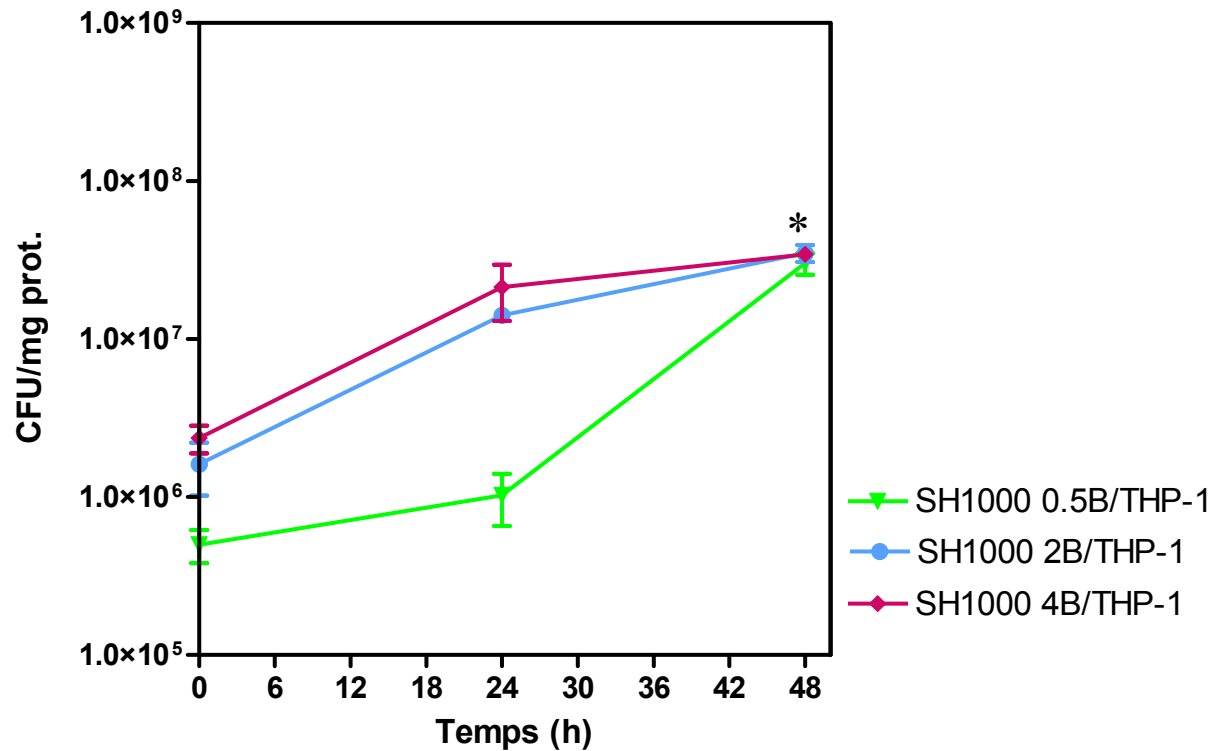
Mise au point de l'infection

Infection *S. aureus*/THP-1: variations de la conc. en gentamicine



Mise au point de l'infection

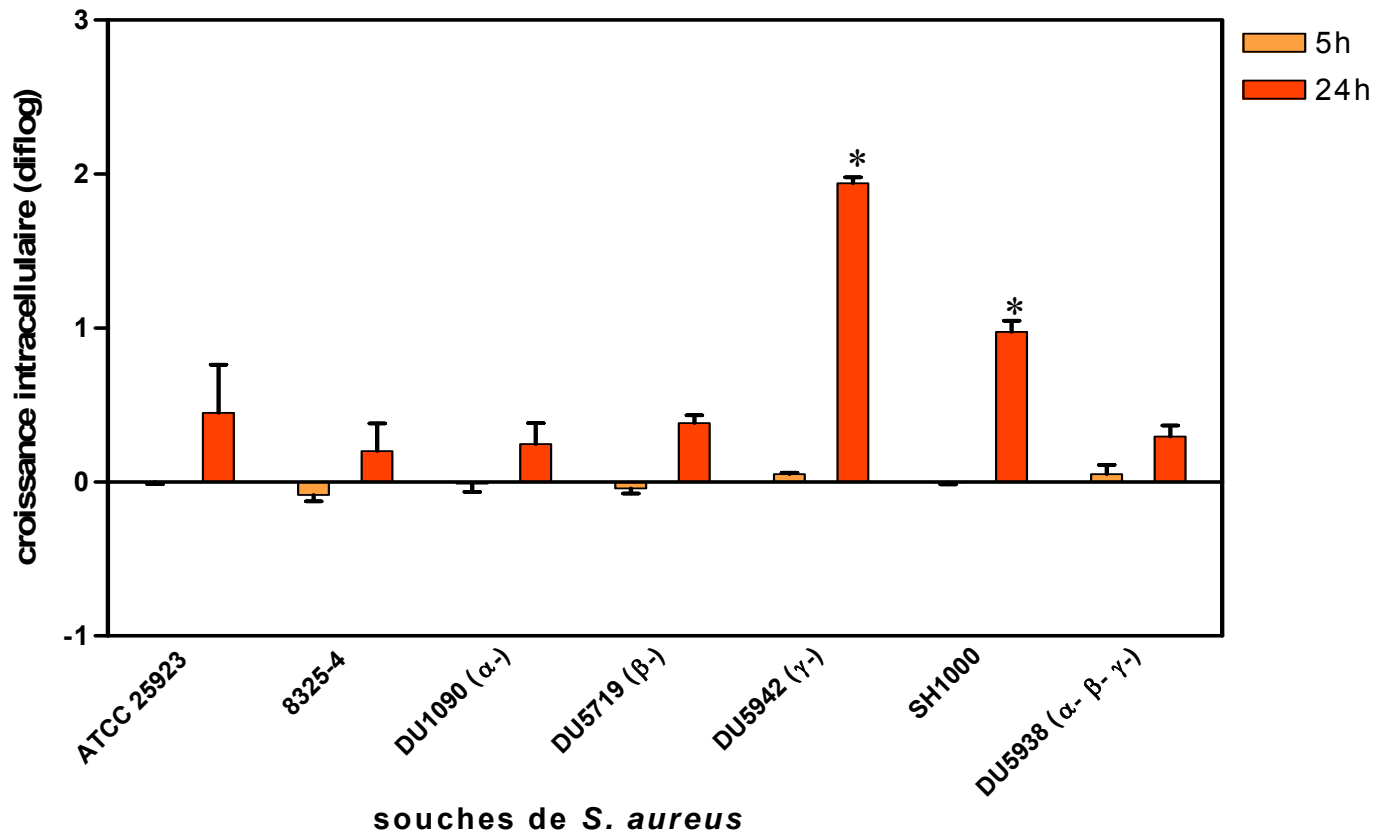
Infection *S. aureus*/THP-1: Effet du nombre de bactéries par macrophage



* Acidification des milieux de culture à 48h

Croissance intracellulaire des mutants

Infection intracellulaire de macrophages THP-1 par *S. aureus* (24h)

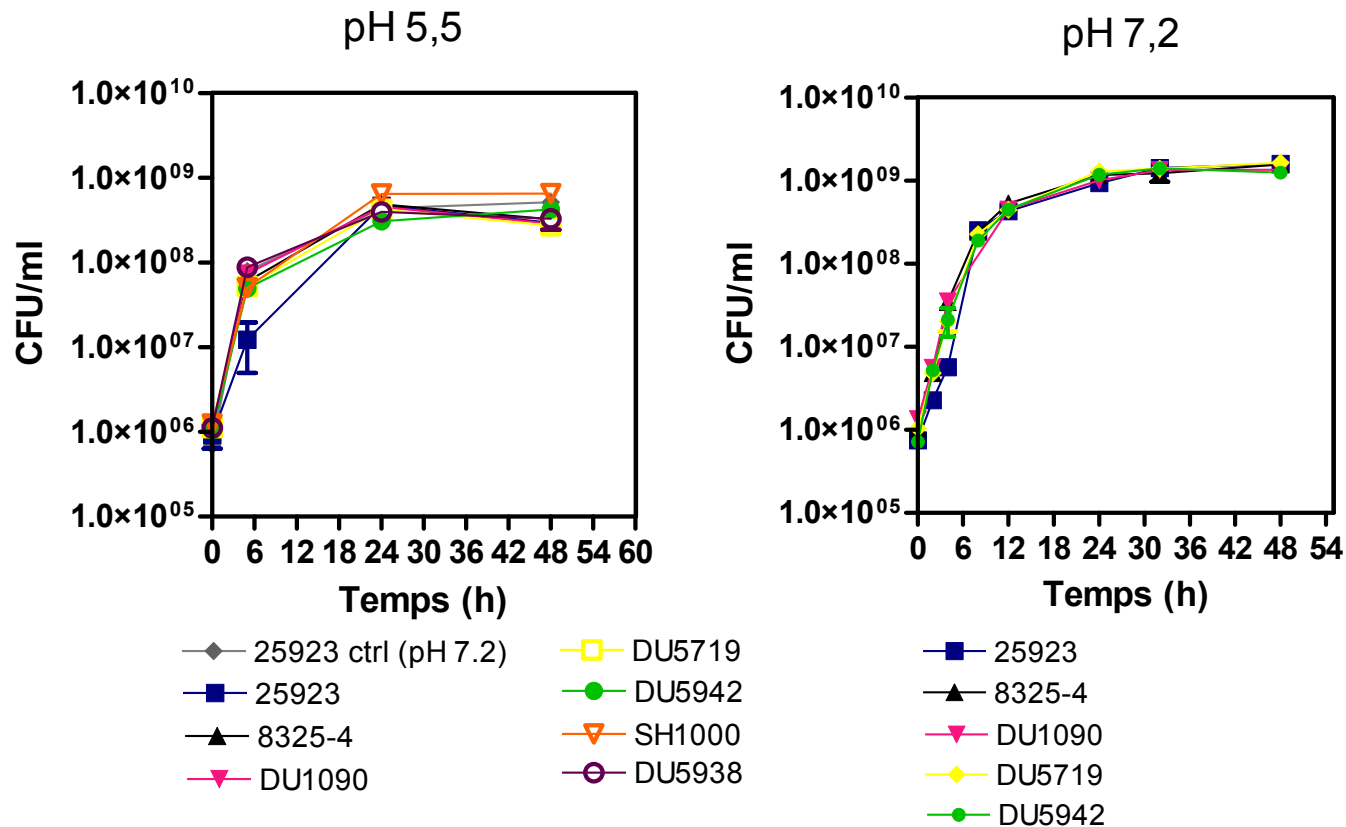


log [CFU/mg à 24h / CFU à 0h] avec n=3

Analyse statistique (ANOVA par rapport à la souche parent 8325-4): * p < 0.001

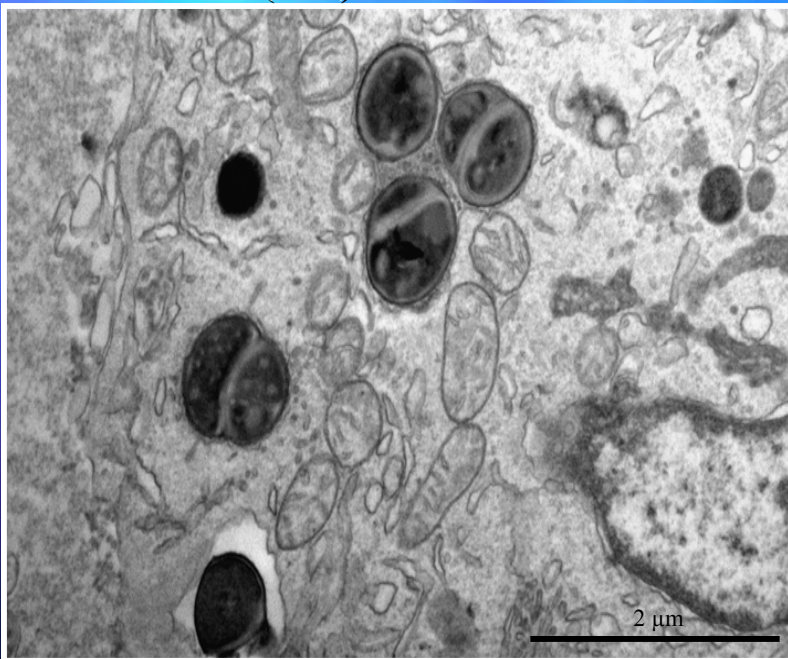
Influence du pH sur la croissance

Croissance de *S. aureus* en milieu Mueller-Hinton

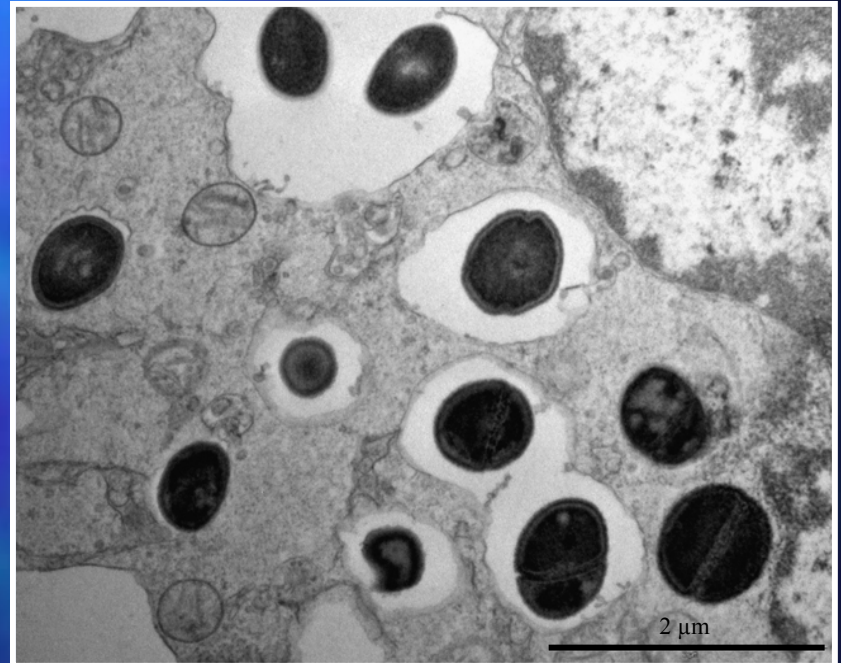


Localisation subcellulaire

ATCC 25923 (24h)



DU5942 (24h)



Conclusion et perspectives

Conclusions

- *S. aureus* capable de se multiplier dans des cellules phagocytaires
- *S. aureus* confiné dans des vacuoles à 24h
- Croissance intracellulaire:
- À 5h : pas de variation de l'inoculum intracellulaire
- À 24h: croissance identique pour les souches ATCC 25923, 8325-4,
DU1090 (α -) et DU5719 (β -)
DU5942 (γ -) (2 log) >>> 8325-4 (0.2 log)
SH1000 (1 log) >> 8325-4 (0.2 log)

Conclusions

- Impact de rsbU dans l'infection intracellulaire ...
... lié à la production du pigment?

SH1000



8325-4

Perspectives

- Endosomes larges?
 - ➔ Microscopie électronique avec 8325-4 et microscopie confocale
- Croissance SH1000?
 - ➔ Expression du pigment chez 8325-4 et ATCC25923
- Implications des hémolysines *in vivo*?
 - ➔ souches cliniques : présence des gènes des hémolysines; production des hémolysines, croissance intracellulaire
- Infection intracellulaire dans des cellules endothéliales?
 - ➔ implication des hémolysines, localisation subcellulaire



- 3^{ème} Colloque Francophone de Bactériologie Vétérinaire
(Liège 11/07/06 – 13/07/06)



12th International Symposium on Staphylococci
& Staphylococcal infections (Maastricht
03/09/06 – 06/09/06)

Merci à

- P. Tulkens, F. Van Bambeke, B. Hallet, M-P Mingeot

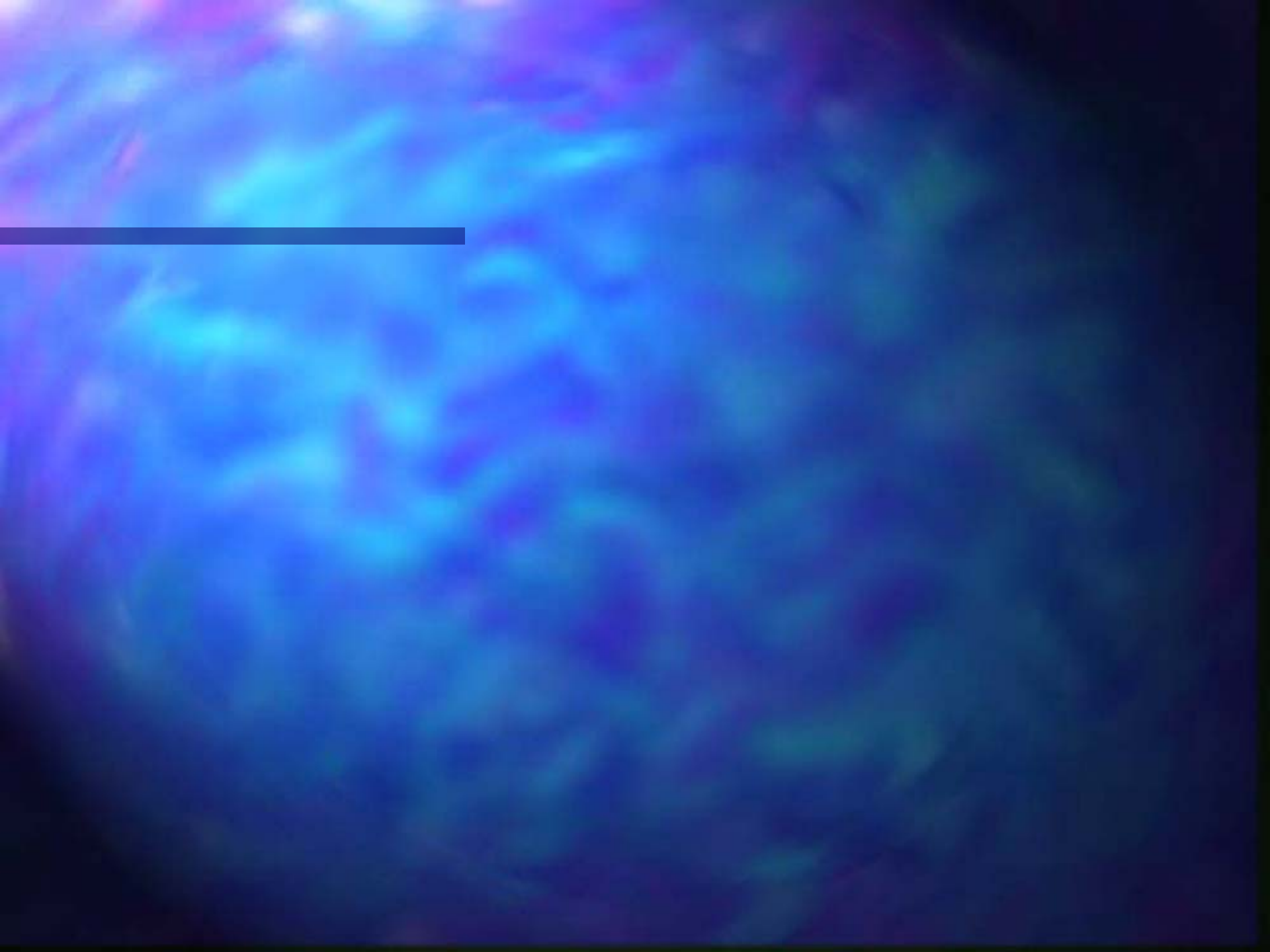


Dr T. Foster (Moyne Insitute, Trinity College, Dublin, Ireland) et Dr. S. Foster (University of Sheffield, Sheffield, England) pour les souches de *S. aureus*



Pr. P. Courtoy et P. Van Der Smissen (CELL) microscopie

- F. Renoird, M.C. Cambier, M. Vergauwen
- Tous les FACMistes...

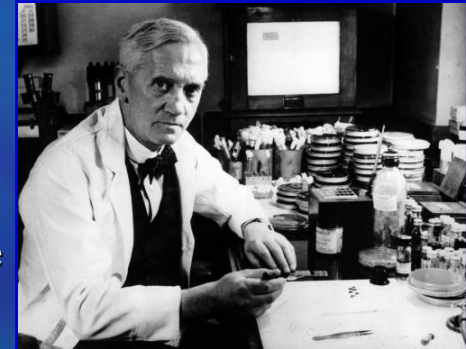


Résistance aux antibiotiques

1940s: utilisation de la pénicilline

↳ 1942 *S. aureus* résistant à la pénicilline

Aujourd'hui 90% des souches produisent une β -lactamase



1960s: penicillines semi-synthétiques : méthicilline

↳ **MRSA** (methicillin resistant *S. aureus*)

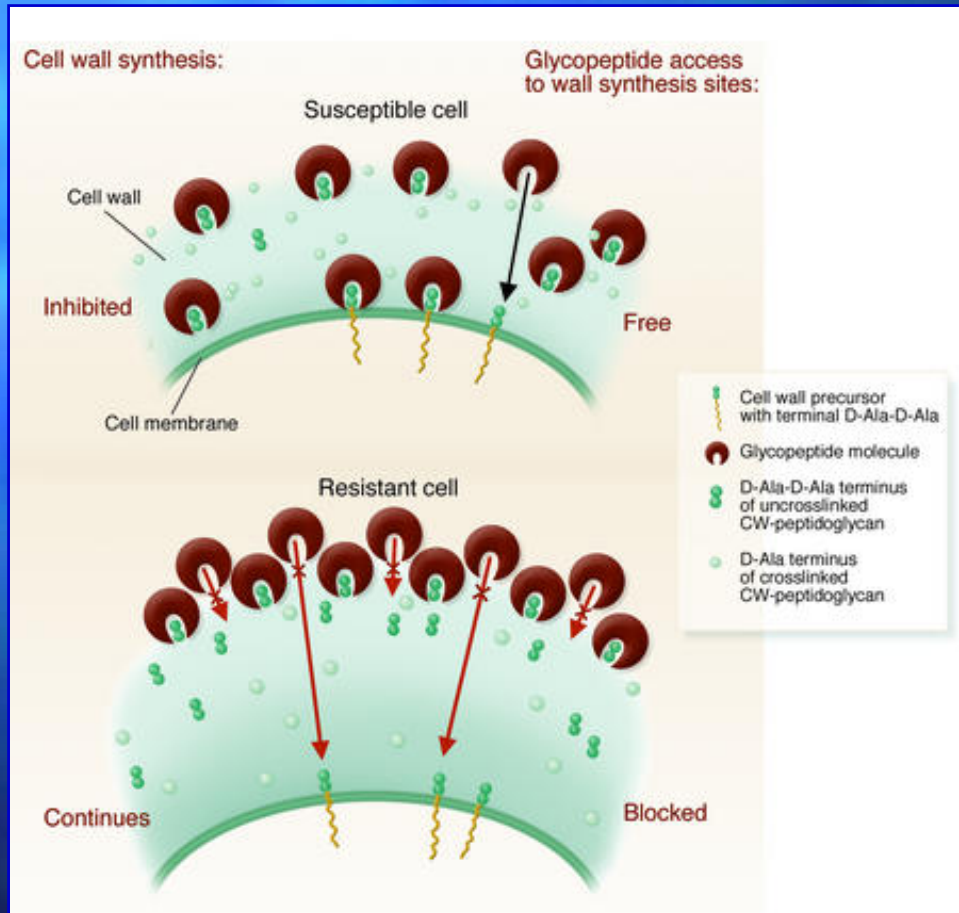
Traitement des glycopeptides

↳ 1997 : **VISA** et **VRSA** (2002)

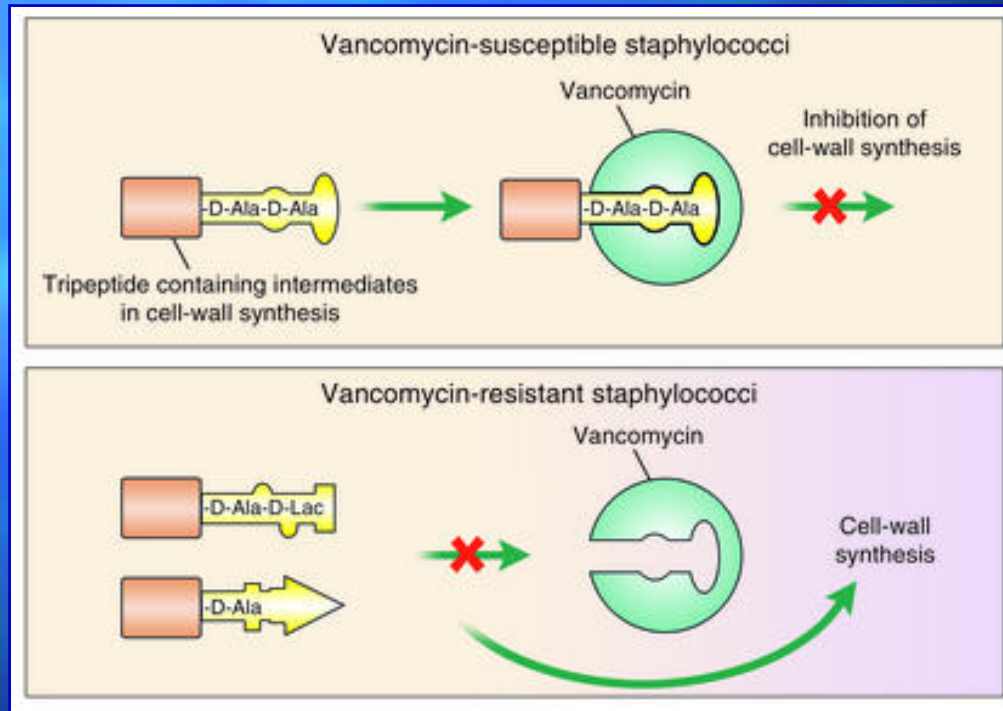
↳ 2003 : **CA-MRSA**
isolé chez des joueurs de football



VISA

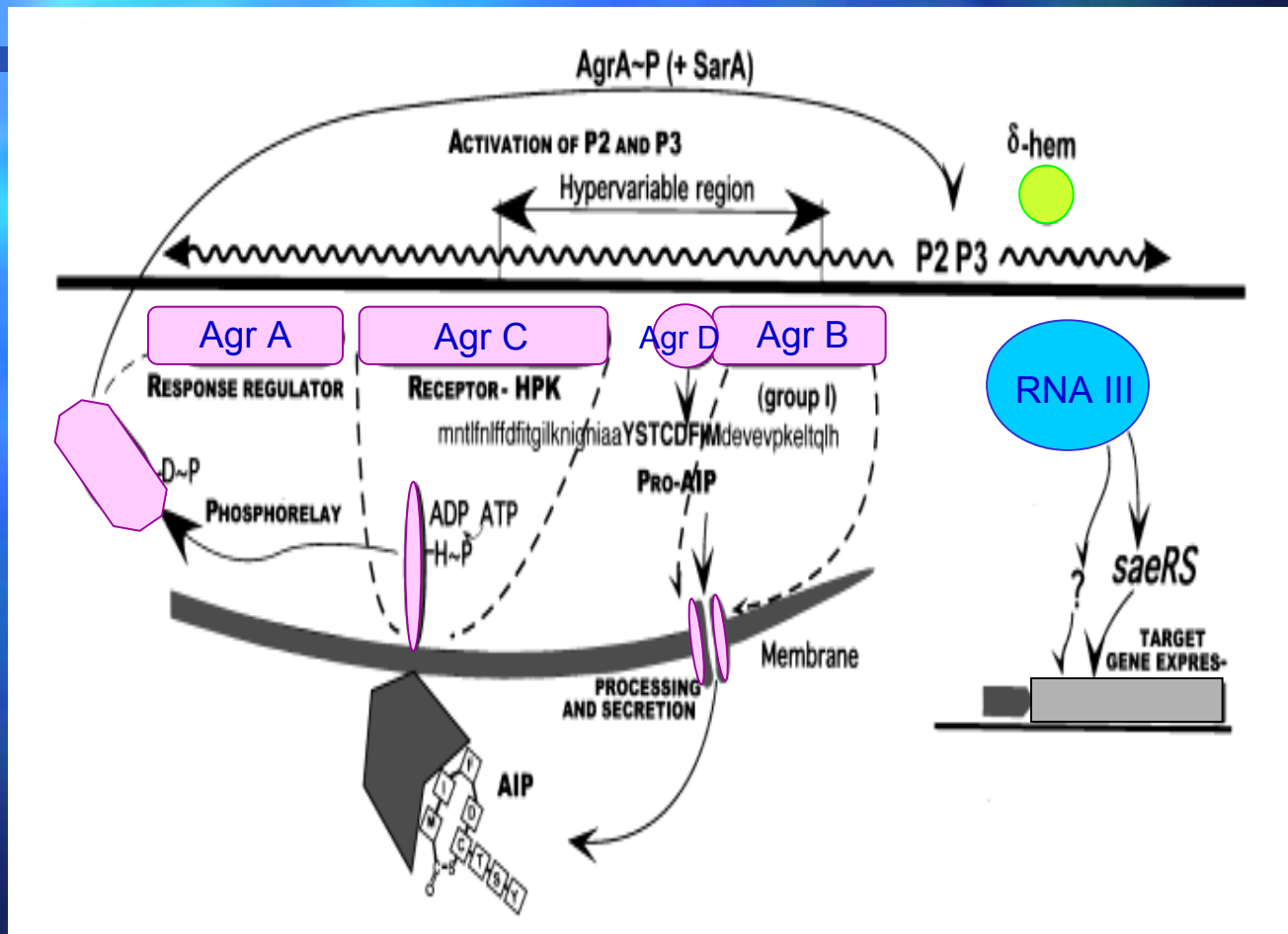


VRSA

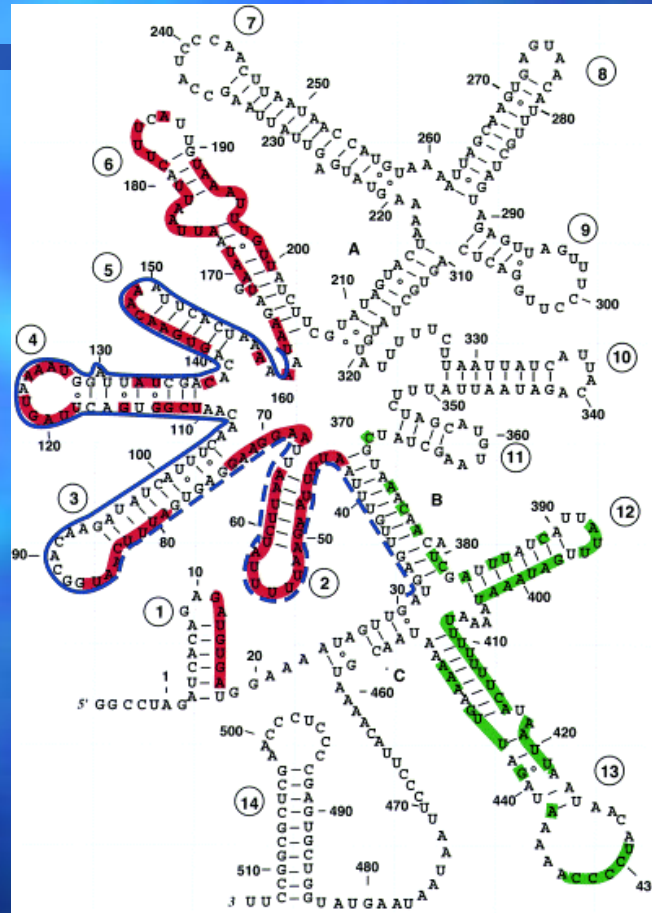


F.D. Lowy, 2003

Locus *agr*

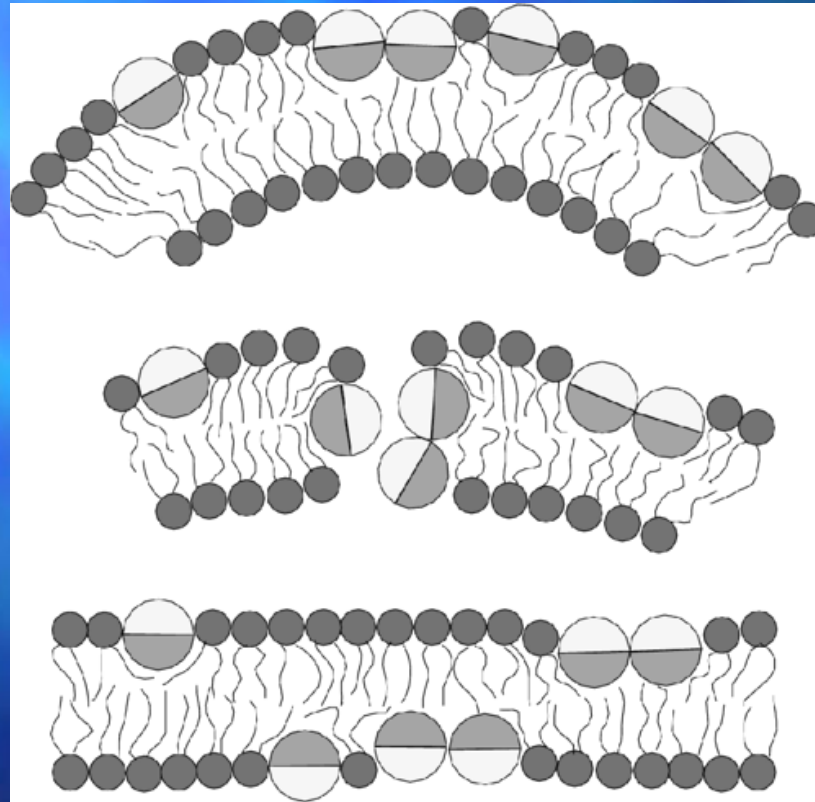


Structure RNA III



R.P. Novick , 2003

Hémolysine- δ



A. Pokorny, 2004

Souches WT et mutants hémolysines

- 8325-4 porte une délétion dans le gène *rsbU*



rsbU = régulateur positif du facteur σ^B

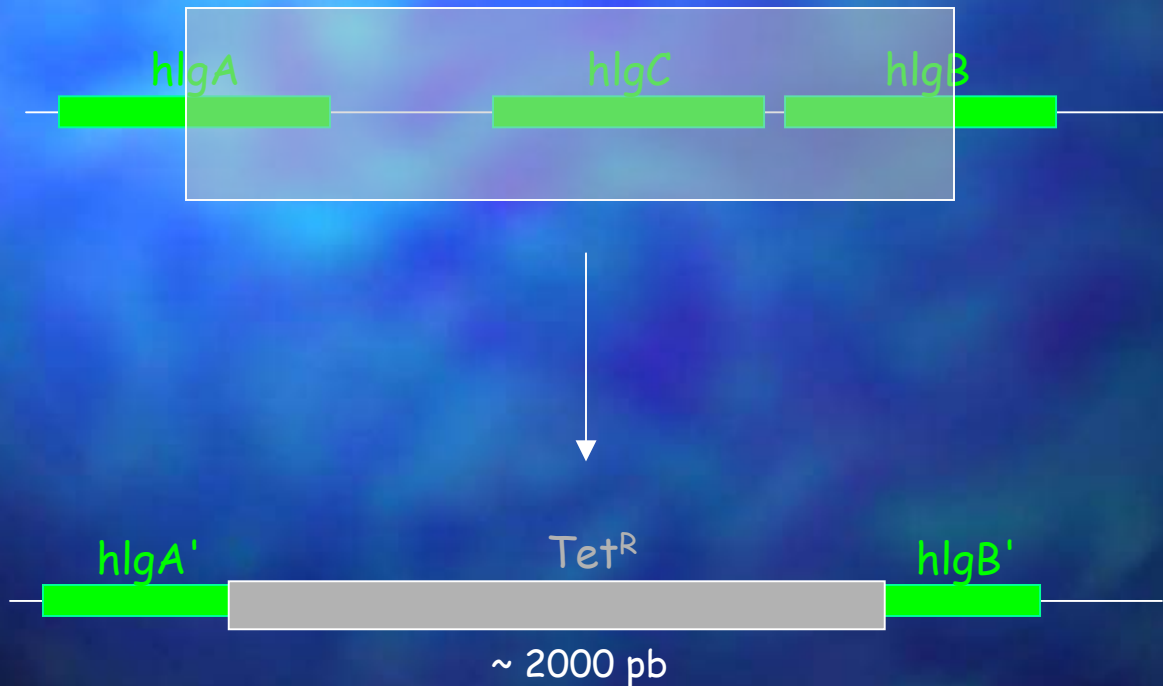
σ^B = facteur de transcription

- Module l'expression des facteurs de virulence et la réponse au stress
 - Influence la production de staphyloxantine (pigment)
-
- SH 1000 = 8325-4 *rsbU*⁺ (2002)

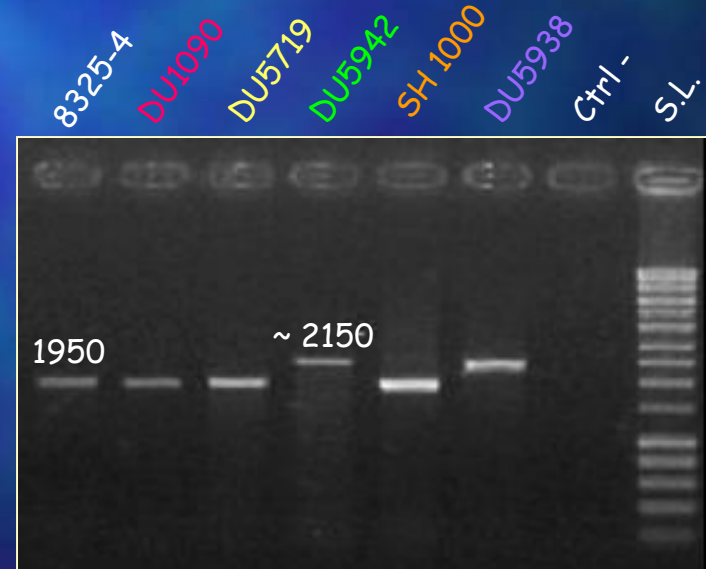
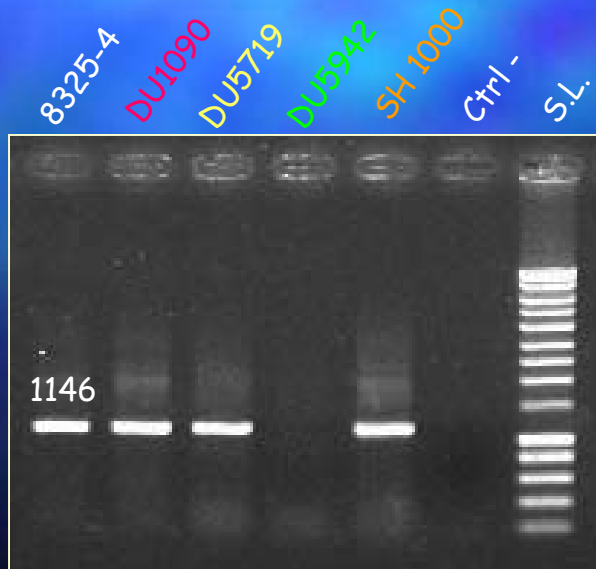
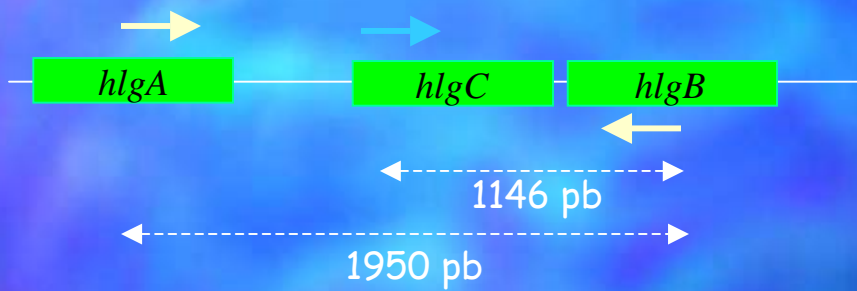
Vérification des souches - hémolysine γ

DU5942 = h1 α +, h1 β +, **h1 γ +**, h1 δ +, rsbU- (1998)

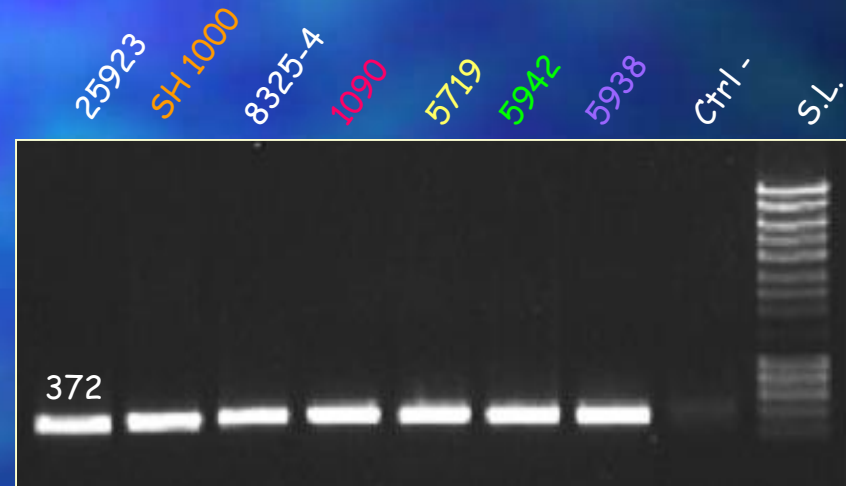
Tetracycline resistant



Vérification des souches - hémolysine γ



Vérification des souches - hémolysine δ



Modèle d'infection intracellulaire

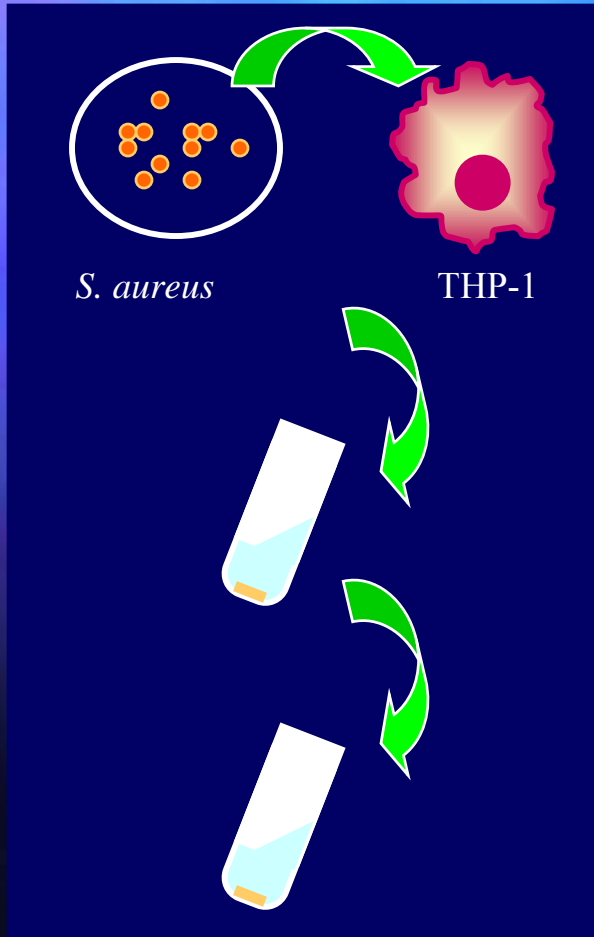
- Macrophages THP-1 :
 - Lignée cellulaire immortelle
 - Macrophages humains



Barcia-Macay M., Seral C., Mingot-Leclercq M.P., Tulkens P.M. and Van Bambeke F. (2006). Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a model of THP-1 macrophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**(3):841-851

Lemaire S., Van Bambeke F., Mingot-Leclercq M.P. and Tulkens P.M. (2005). Activity of 3 beta-lactams (ertapenem, meropenem, and ampicillin) against intraphagocytic *L. monocytogenes* and *S. aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55**:897–904

Modèle d'infection intracellulaire



1. Phagocytose

1h à 37°C 5% CO₂



2. Elimination des bactéries extracellulaires

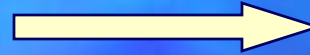
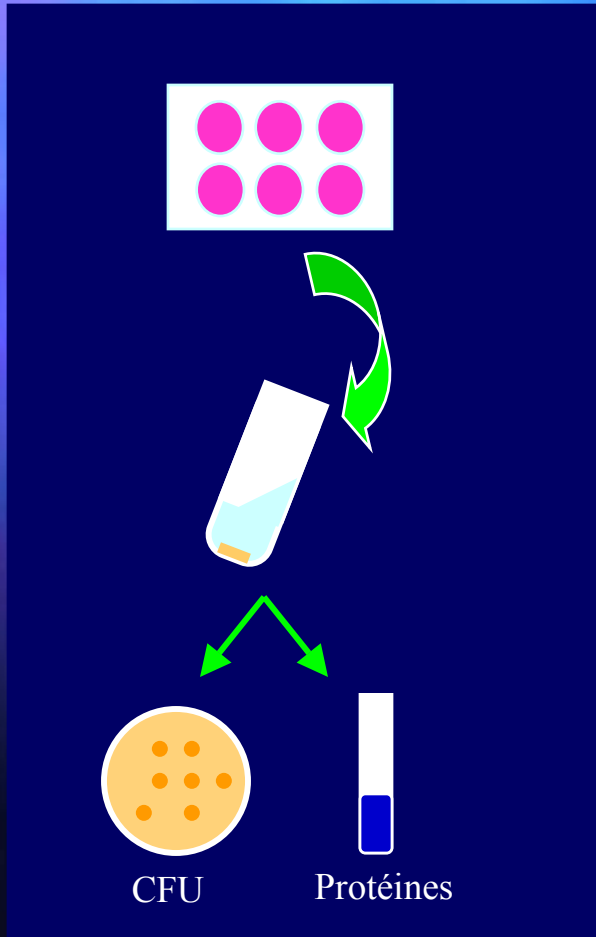
PBS + gentamicine 100 xCMI

45 min à 37°C



3. Lavages PBS

Modèle d'infection intracellulaire



4. Incubation

24h à 37°C, 5% CO₂
+ gentamicine 1x CMI



5. Lavage PBS et lyse



6. CFU + dosage de protéines

Cc de gentamicine – bactéries dans le dernier lavage

