

# *Clostridium difficile*: virulence des souches

Pr. Anne Collignon

Faculté de Pharmacie - Université Paris Sud 11  
Hôpital Jean Verdier - AP-HP  
France

# Facteurs de colonisation:adhésines

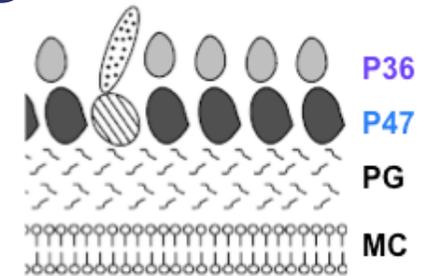
- Protéines de S layer :  
LMW P36, HMW P47

Calabi *et al.*, Infect Immun, 2002.  
Cerquetti *et al.*, 2002



HEp-2

Matrice extracellulaire,  
epithelium digestif

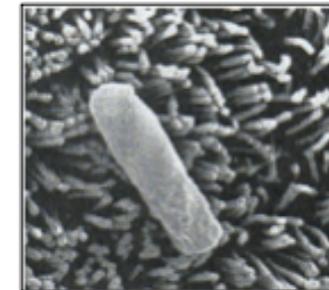


- Cwp66

Waligora *et al.*, Infect Immun, 2001



Caco2,  
Vero



- Fbp68

Hennequin *et al.*, Microbiology, 2003



Fibronectine,  
Vero



- GroEL

Hennequin *et al.*, Microbiology, 2001



Vero

- FliD, FliC

Tasteyre *et al.*, Infect Immun, 2002



Vero,  
Mucus intestinal



# Facteurs de colonisation:enzymes hydrolytiques

## ■ Cwp84

- Cystéine protéase

Savariau-Lacomme *et al.* J Bacteriol 2003

- Dégradation des composants de la MEC

- Fibronectine
- Laminine
- Vitronectine

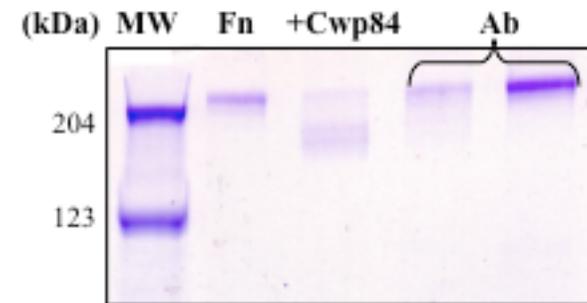
- Role dans le pouvoir pathogène

- Diffusion de la bactérie et de ses toxines

Janoir *et al.* J Bacteriol, 2007

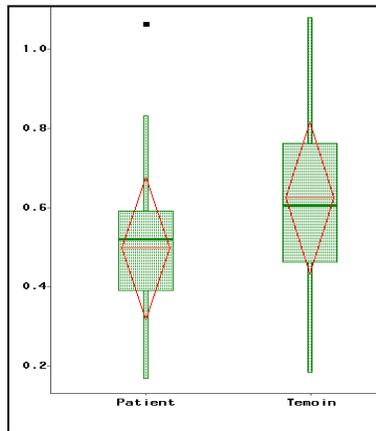
- Maturation du précurseur SlpA des protéines de S-layer: Mutants  $\Delta$  *cwp84* *C. difficile* 630

Kirby JM J. Biol. Chem. 2009

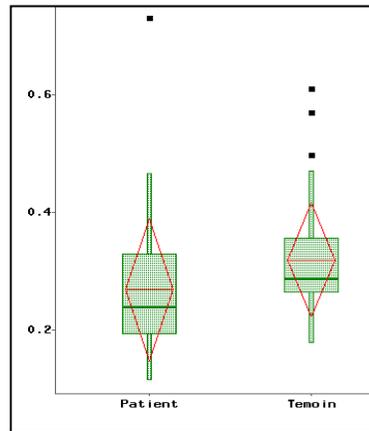


# Réponse anticorps chez des patients ICD versus contrôles

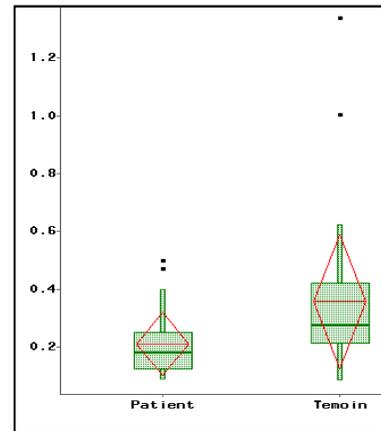
- Corrélation entre réponse immune et ICD



**FliD**  
**p = 0,0034**



**Cwp66 N-ter**  
**p = 0,0043**



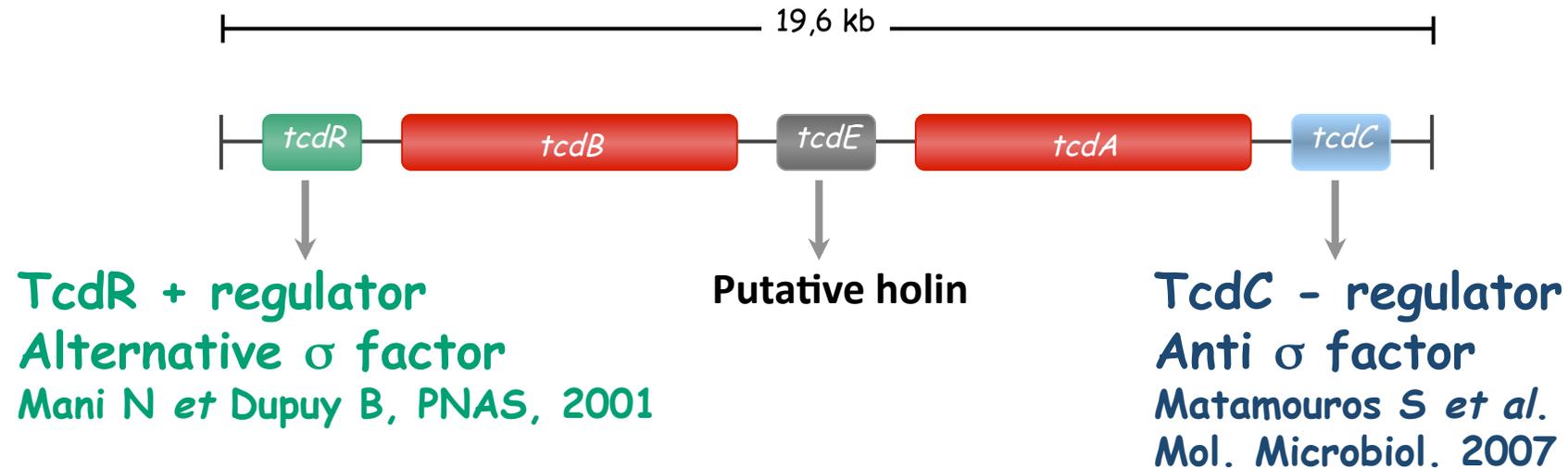
**FliC**  
**p = 0,0001**

**Taux d'AC faible**



**Infection**

# Locus de pathogénécité: PaLoc

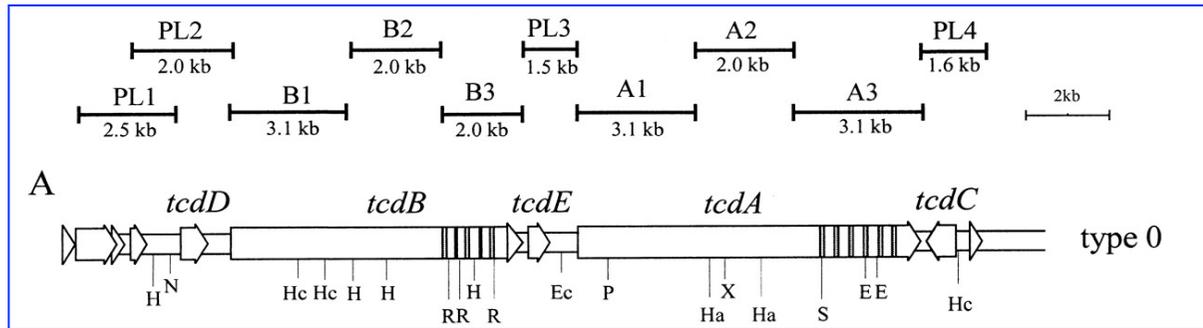


- La transcription des gènes des toxines est contrôlée par des signaux environnementaux tels que:

- Source de carbone, cystéine
- Phase de croissance
- Température

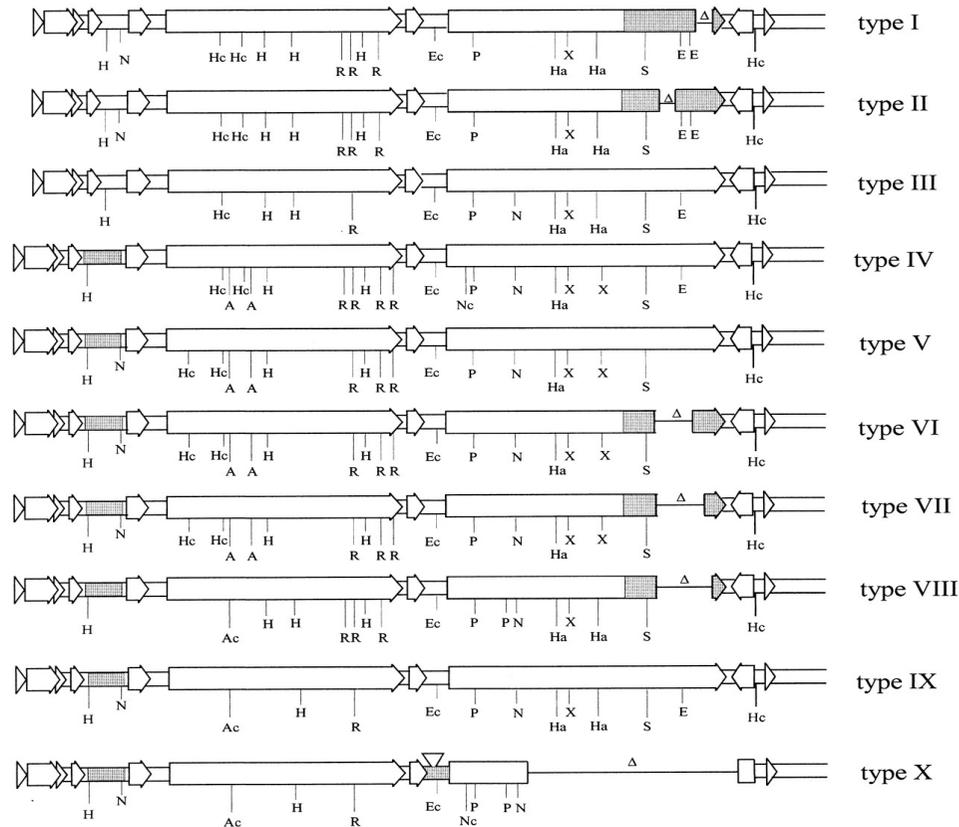
Dupuy et Sonenshein, 1998, Mol Microbiol; Karlsson et Dupuy, 2003, Infect. Immun; Karlsson et al., 2000, Microbiology

# Variabilité du PaLoc



> 25 toxinotypes  
Rupnik et al. JCM 1998

VPI 10463 = toxinotype 0

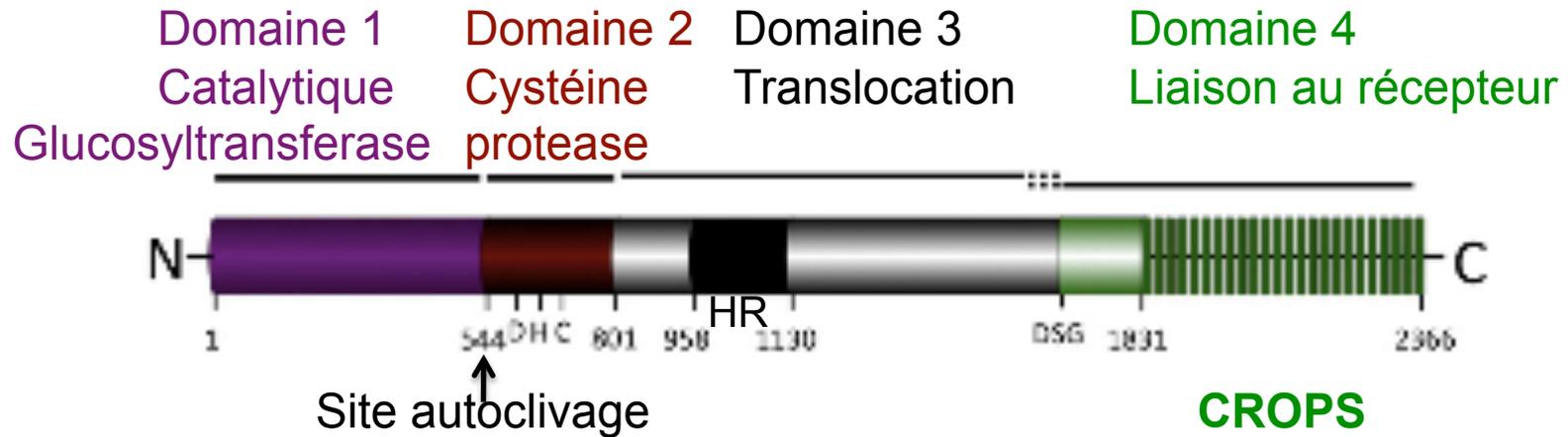


→ Toxinotype III  
PCR-ribotype 027

→ Toxinotype V  
PCR-ribotype 078

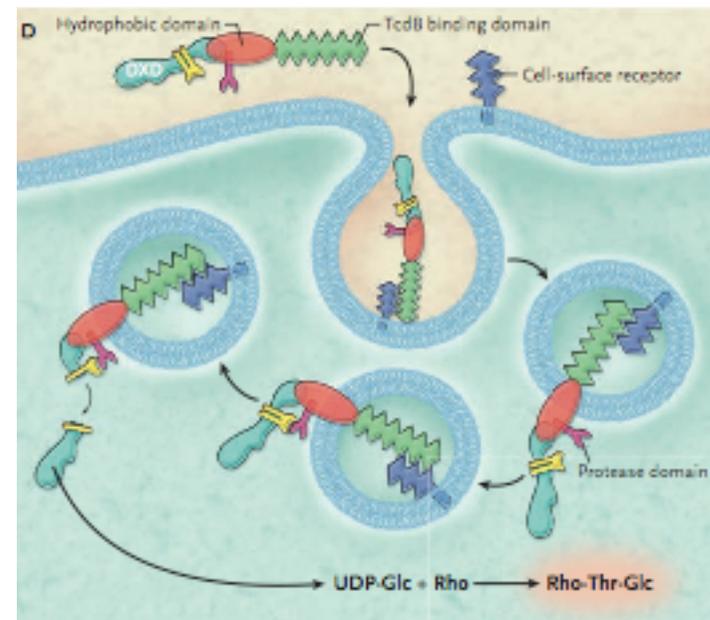
→ Toxinotype VIII  
souches A- B+

# TcdA et TcdB: domaines structuraux



Reineke J *et al.* Nature 2007

Priutt RN *et al.* J Biol Chem 2009



# TcdA et TcdB: rôle dans la pathogénèse

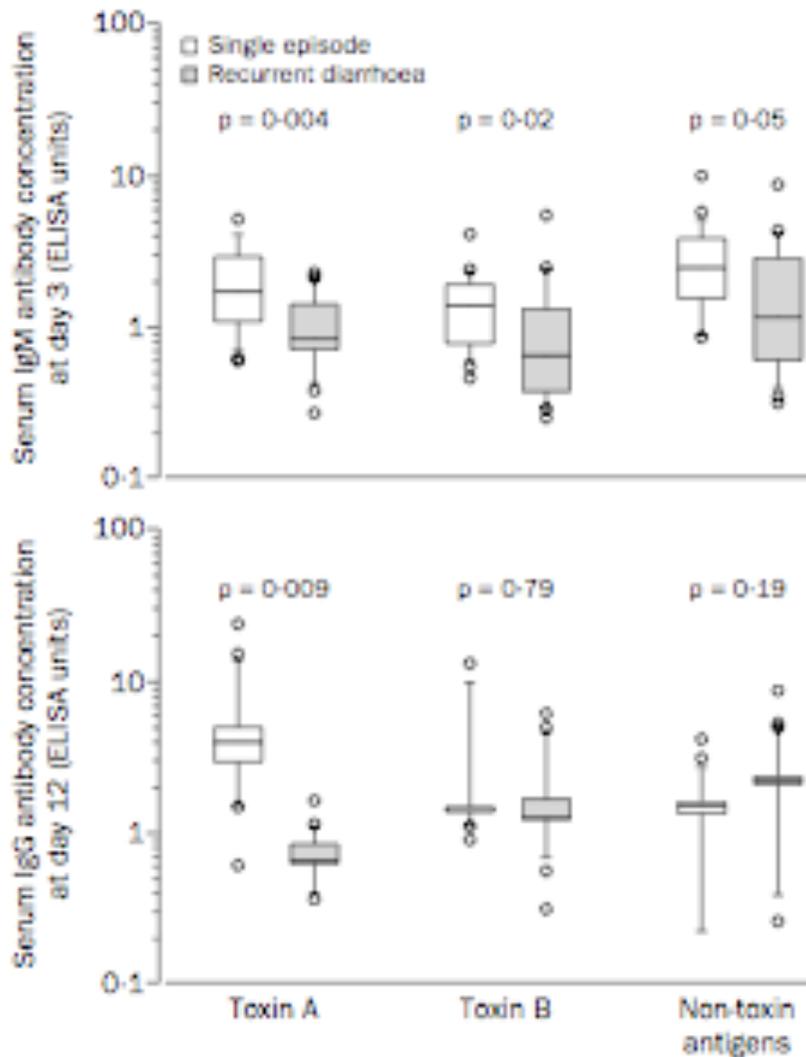
- Glucosylation des petites GTPases des familles Rho et Ras
- Cytotoxique, destruction du cytosquelette d'actine et de l'épithélium
- Pro-inflammatoire par libération de médiateurs inflammatoires

*Just et al. Nature, 1995*

*Voth DE et Ballard JD Clinical Microbiol Rev 2005*

*Rupnik M. et al. Nature Review 2009*

# Réponse anticorps chez des patients ICD



Kyne L *et al.* The Lancet 2001

# Rôle respectif de TcdA et TcdB dans la pathogénèse ?

## TcdA

- TcdA, plus puissante enterotoxine
- TcdA IG aux hamsters: dommages intestinaux  
*Lyerly DM et al. Inf Immun 1985*
- Souches TcdA+TcdB- jamais caractérisées
- AC neutralisant anti TcdA protègent les hamsters vis à vis CDI  
*Kyne L et al. Lancet 2001*

## TcdB

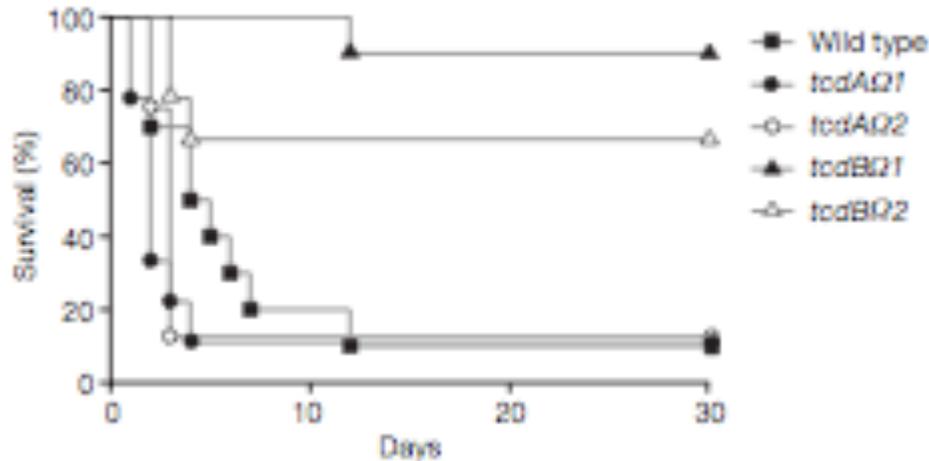
- TcdB, plus puissante cytotoxine
- TcdB IG aux hamsters seule: pas d'effet  
*Lyerly DM et al. Inf Immun 1985*
- Souches TcdA-TcdB+ responsables de CDI  
*Johnson S et al. Ann Inter Med 2001*
- Une association d'AC anti TcdA et TcdB est plus protectrice  
*Babcock GJ et al. Infect Immun 2006*

# Etudes de mutants isogéniques

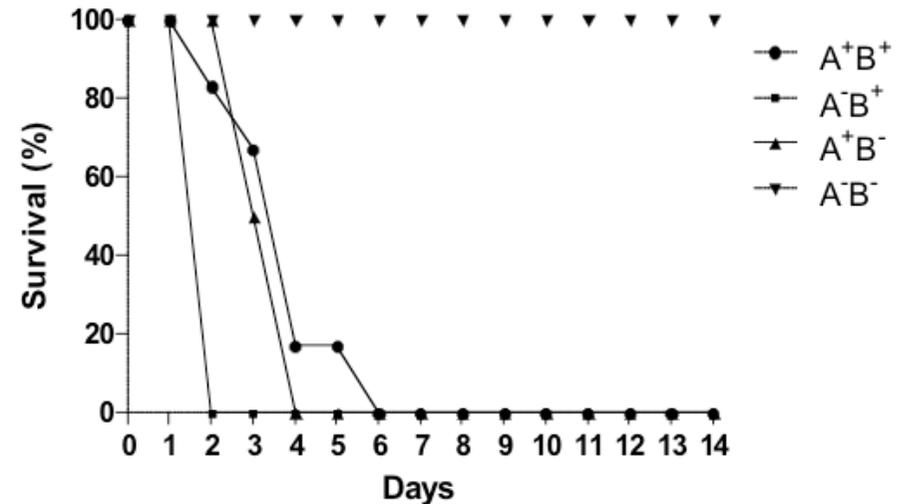
	Lyras D <i>et al.</i> Nature 2009	Kuehne S <i>et al.</i> Nature Sept 2010
Méthodes	Recombinaison homologue avec un vecteur instable pJIR1456	ClosTron pMT 007
Souche	<i>C. difficile</i> JIR8094 (dérivé $\Delta$ erm CD630)	<i>C. difficile</i> 630 $\Delta$ erm (UK)
Cytotoxicité Vero cells	<ul style="list-style-type: none"><li>• Mutants tcdB étaient significativement moins cytotoxiques sur Vero comparés WT</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Chaque mutant tcdA et tcdB était cytotoxique sur cellules Vero et HT29</li></ul>
HT29	<ul style="list-style-type: none"><li>• Mutants tcdA étaient significativement moins cytotoxiques sur HT29 comparés WT</li></ul>	

# Infection chez le hamster

Lyras D *et al.* Nature 2009



Kuehne S *et al.*  
Nature September 2010



- TcdB est un facteur de virulence essentiel car l'inactivation du gène *tcdB* seul entraîne une diminution de la virulence

- TcdA ou TcdB est responsable d'une infection fatale chez le hamster

- Les discordances pourraient être dues aux différences entre les souches et la méthodologie d'inactivation

Différentes conditions de subcultures pourraient être à l'origine de mutations secondaires qui pourraient affecter la production des toxines.

# Toxine binaire CDT

- **Production : Souche 027 historique CD 196**

Popoff MR *et al.* Inf immun, 1988

Perelle S *et al.*, Infect. Immun. 1997

- **Activité actin ADP ribosyl transférase**

- Désorganisation du cytosquelette
- Redistribution des microtubules
- Formation de protusions qui augmentent l'adhérence

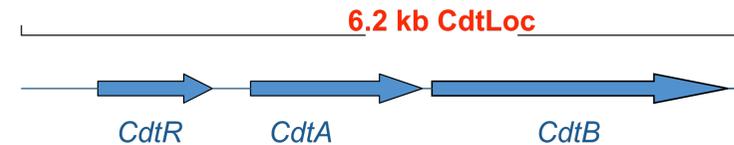
Schwan C *et al.* PlosPathogens, 2009

- **Produites par 0,5 à 5% des souches: 027, 078 ...**

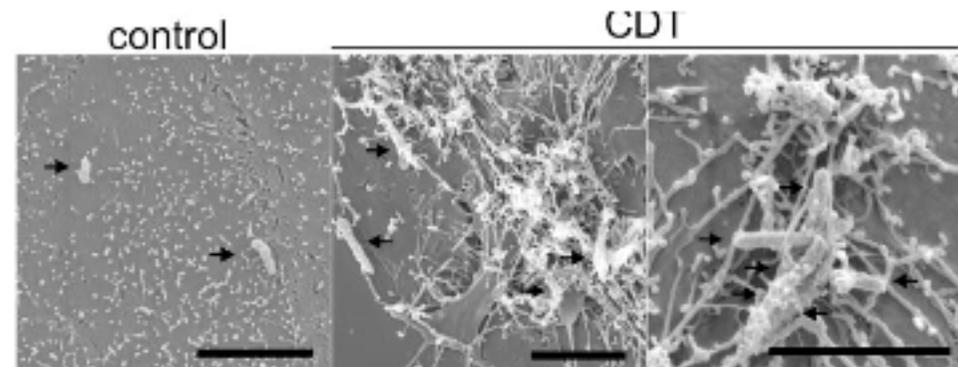
- **Cette toxine potentialiserait la toxicité de TcdA et TcdB et conduirait à des ICD plus sévères.**

Geric B *et al.*, J. Med. Microbiol. 2004

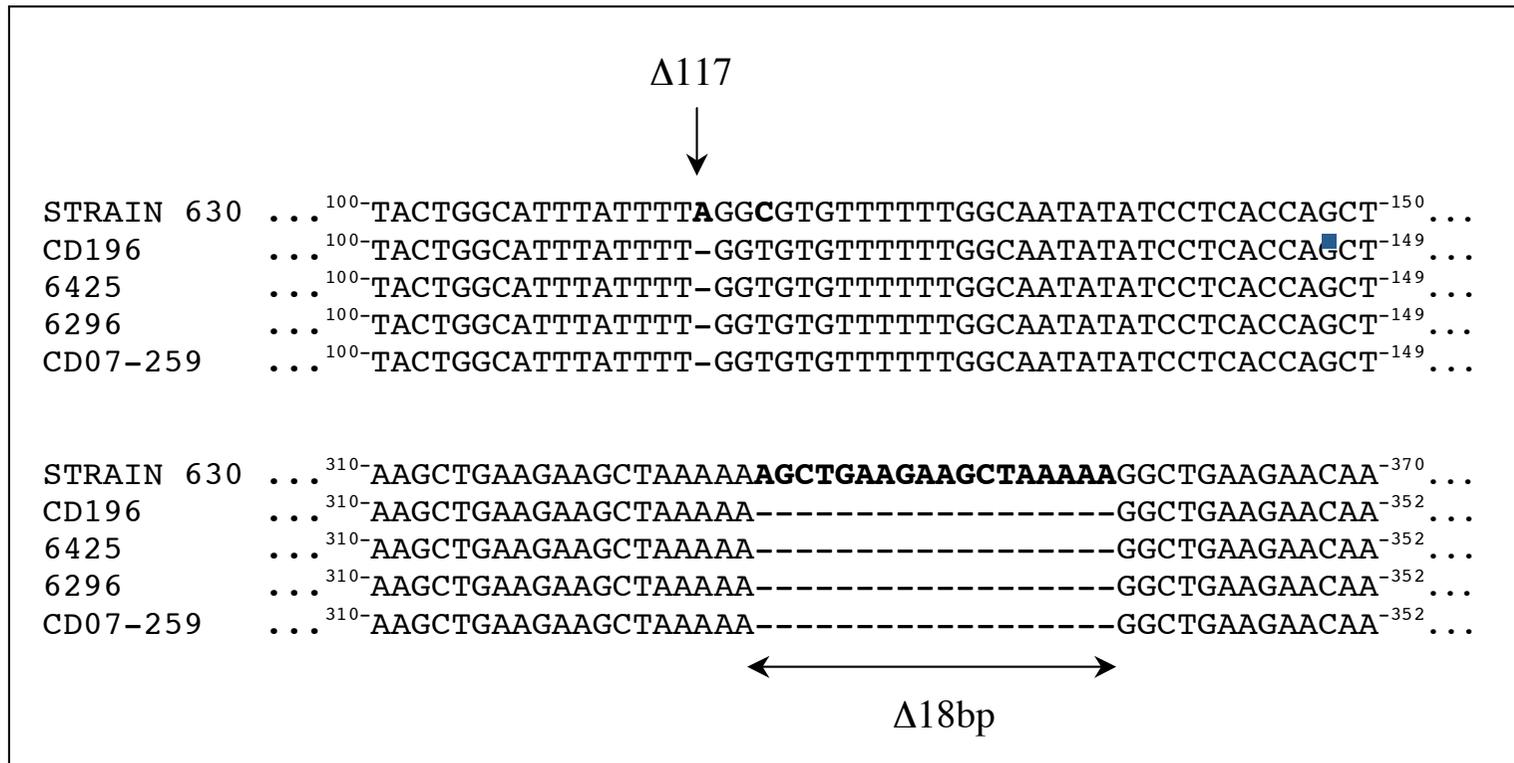
Barbut F *et al.* Inf Control Hosp epidemiol, 2007



Carter GP *et al.*, J Bac, 2007



# La souche 027 est-elle hypervirulente ?



- Délétion 18 bp dans *tcdC*
- Délétion ponctuelle 117: *codon STOP* conduisant à une protéine TcdC tronquée et inactive
- Nombreux allèles parmi les souches toxigènes

Spigaglia P et Mastrantonio P, J Clin Microbiol 2002; MacCannell DR *et al.*, J Clin Microbiol, 2006; Curry SR *et al.*, J Clin Microbiol, 2007; Matamouros S *et al.* Mol Microbiol, 2007

# La souche 027 est-elle hypervirulente ?

## ■ TcdC inactif ou tronqué

- Hyperproduction de Tcd A et TcdB

*Warny M et al. Lancet, 2005; Akerlund T et al. J Clinical Microbiol 2008*

- Cinétique accélérée et production soutenue

*Dupuy B et al. J Med Microbiol, 2008*

*Freeman J et al. J Antimicrobiol Chemother, 2007*

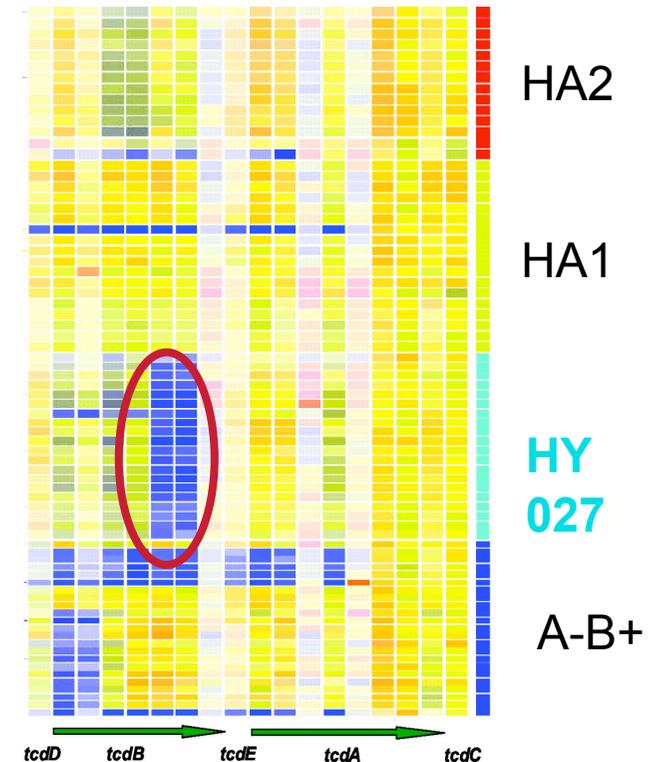
- Production des toxines non significativement différente chez des souches 027 HV comparée à des souches non HV

*Merrigan M et al. J Bacteriol 2010*

# La souche 027 est-elle hypervirulente ?

- Augmentation de toxicité de TcdB chez les souches 027
  - Extrémité -3' *tcdB* différente
  - Domaine C-ter pourrait affecter sa capacité de liaison

Stabler RA et al. J Med Microbiol 2008



- Une meilleure capacité de liaison au récepteur et une capacité à pénétrer plus rapidement dans les cellules cibles

Lanis JM et al. PLoS Pathogens 2010

# Autres raisons pour l'hypervirulence

- Production de la toxine binaire
- Augmentation de l'adhérence aux cellules épithéliales décrites pour quelques souches O27

*Akerlund T et al. J Clin Microbiol 2008*

- Augmentation du taux de sporulation: meilleures survie et dissémination

*Akerlund T et al. J Clin Microbiol 2008*

*Fawley WN et al. Infect Control Hosp Epidemiol 2007*

*Merrigan M et al. J Bacteriol 2010*

- Une combinaison de facteurs de virulence
  - Confirmé par la génomique comparative

*Stabler RA et al. Genome Biology 2009*

*Marsden GL et al. BMC Genomics 2010*

# Pourquoi la souche 027 est-elle épidémique ?

## ■ Profil de résistance aux antibiotiques

- Souche CD 196 historique: Fluoroquinolone S
- Souche épidémique : Fluoroquinolone R
  - CMI Moxifloxacine, Gatifloxacine > 32mg/L
  - Mutations dans *gyrA*, *gyrB*
- Erythromycine et clindamycine R
  - CMI > 256 mg/L

McDonald LC *et al.* N Engl J Med 2005

Spigaglia P *et al.* J Med Microbiol 2008

Drudy D *et al.* Emerg Inf Dis 2008

## ■ Mais d'autres souches ont le même phénotype

# Comparaison des souches 027 et 078

## PCR Ribotype 027

- TcdC tronqué
- Diarrhée sévère
- Toxinotype III
- Isolats humains
- ICD nosocomial
- Patients âgés

## PCR Ribotype 078

- TcdC tronqué
- Diarrhée sévère
- Toxinotype V
- Isolats animaux et humains
- ICD communautaire
- Patients jeunes

*Goorhuis A et al. Clin Inf Dis 2008*

*Rupnik M et al. J Clin Microbiol 2008*

*Jhungh MA et al. Emerg Infect Dis 2008*

# Quels rôles jouent les antibiotiques dans l'émergence des ICD ?

- Destruction du microbiote intestinal et son effet barrière
- Sélection de souches résistantes
- Induction de croissance et de la production de facteurs de virulence
  - Des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques (MTR, Van, LZD) induisent la transcription des gènes *tcdA* and *tcdB* et la production des toxines *Gerber M et al., J Med Microbiol, 2008*
  - Fluoroquinolones à large spectre (gatifloxacine, moxifloxacine) favorisent la germination des spores de *C. difficile*, la croissance bactérienne et la production des toxines A et B
    - **Modèle de souris « ex vivo »**  
*Adams DA et al., Antimicrob Agents Chemother, 2007*
    - **Modèle « in vitro » d'intestin humain**  
*Saxton K et al., Antimicrob Agents Chemother, 2008*



# Modulation environnementale des facteurs de colonisation

- Les fluoroquinolones favoriseraient l'adaptation des souches FQ-R à l'environnement de l'hôte
- Avantage sélectif pour les souches épidémiques NAP1/027 qui favoriserait leur dissémination
- Les antibiotiques faciliteraient les ICD non seulement en perturbant le microbiote intestinal mais aussi en induisant une réponse au stress et une meilleure adaptation des souches

# Conclusion: diffusion et succès des souches épidémiques hypervirulentes

- **Caractéristiques des souches**
  - Facteurs de virulence
  - Profil de résistance aux antibiotiques
  - Avantages écologiques
- **Une rencontre avec un hôte sensible**
  - Dysbiose du microbiote intestinal
  - Réponse immunitaire insuffisante
- **Conditions environnementales favorables**
  - Pression antibiotique
  - Pression de contamination: environnement contaminé par des spores

# Remerciements

EA 4043

Faculté de Pharmacie  
Université Paris Sud-11

C. Janoir, S. Péchiné,  
S. Bouttier, A. Le Monnier,  
I. Kansau

Service de Microbiologie  
Hôpital Jean Verdier  
I. Poilane  
C. Rousseau