

# Recherche Microbiologique :

## Qu'est-ce que c'est ? Pourquoi moi ?

- Jeudi 4 avril 2019 -

David Lebeaux



**Institut Pasteur**

Unité de Génétique des biofilms  
Jean-Marc GHIGO  
Christophe BELOIN



Hôpital européen Georges-Pompidou

Unité Mobile de  
Microbiologie Clinique

INSERM  
UMRS 1138



CENTRE DE RECHERCHE  
DES CORDELIERS



UNIVERSITÉ  
PARIS DESCARTES

# Le programme aujourd'hui

Jeudi 4 Avril – Thématique N° 27 – Recherche en Infectiologie, Ethique

Coordination : O. LAUNAY – T. FERRY – O. BOUCHAUD –

*Amphithéâtre LUTON – Site de Cochin –(Ateliers salles )*

8h30- 9h00	<b>Pré-Test</b>
9h00 – 9h30	<b>Paysage de la recherche en infectiologie en France. Implication au niveau international (ITMO I3M, ANRS, PHRC, H2020, IMI)</b>
9h30 – 10h00	Recherche translationnelle
10h00 – 10h30	Recherche microbiologique
10h30 – 11h00	Recherche épidémiologique ; modélisation
11h00 – 11h30	Recherche clinique

Oui, mais :

- La recherche translationnelle microbiologique ?
- La recherche épidémiologique microbiologique ?
- La recherche microbio-clinique ?

→ C'est quoi la recherche microbiologique ?

→ A quoi peut vous servir cette présentation ?

# Quelques exemples

---

- David
- Victoire
- Matthieu
- Julien

# Le point de départ...



DL : « j'aimerais faire un M2 chez vous »  
BF : « ça peut être en novembre »  
DL : « OK »  
BF : « t'aimes les staph blancs ? »  
DL : « ... »



# Epidemiology of bacterial resistance (Master 2)

## Dynamic and Biodiversity of Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci Nasal Carriage in the Community



Service de Microbiologie  
Hôpital Bichat  
Raymond Ruimy  
Antoine Andremont

- Bourse SPILF junior
- Bourse ESCMID
- Année recherche
- FRM
- FERCM
- AAIHP
- Année médaille

→ Gardes de réa (5/mois)



UNIVERSITÉ  
**PARIS-SUD 11**

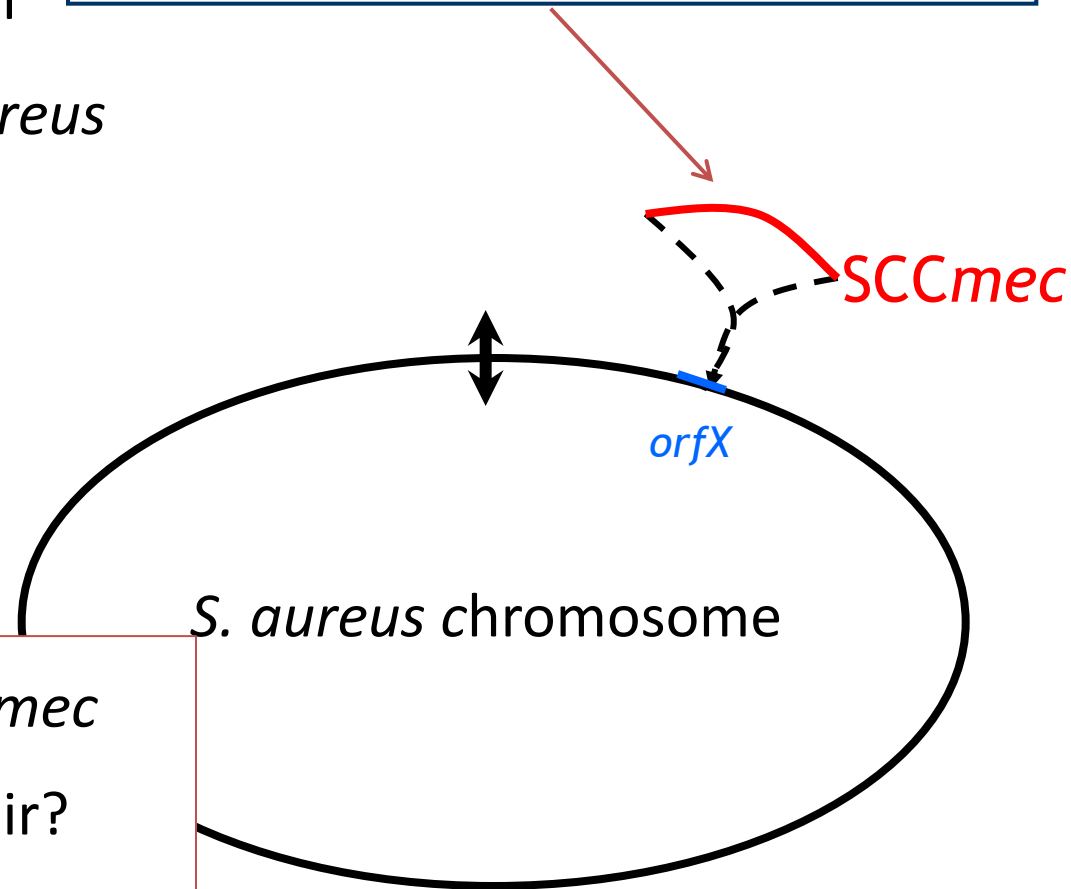
# Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Coagulase negative staphylococci

- Leading nosocomial pathogen
- Methicillin resistance in *S. aureus*
  - Acquisition of SCCmec
- Therapeutic concerns
  - Nosocomial setting
  - Outpatients

MR-CoNS = reservoir of SCCmec

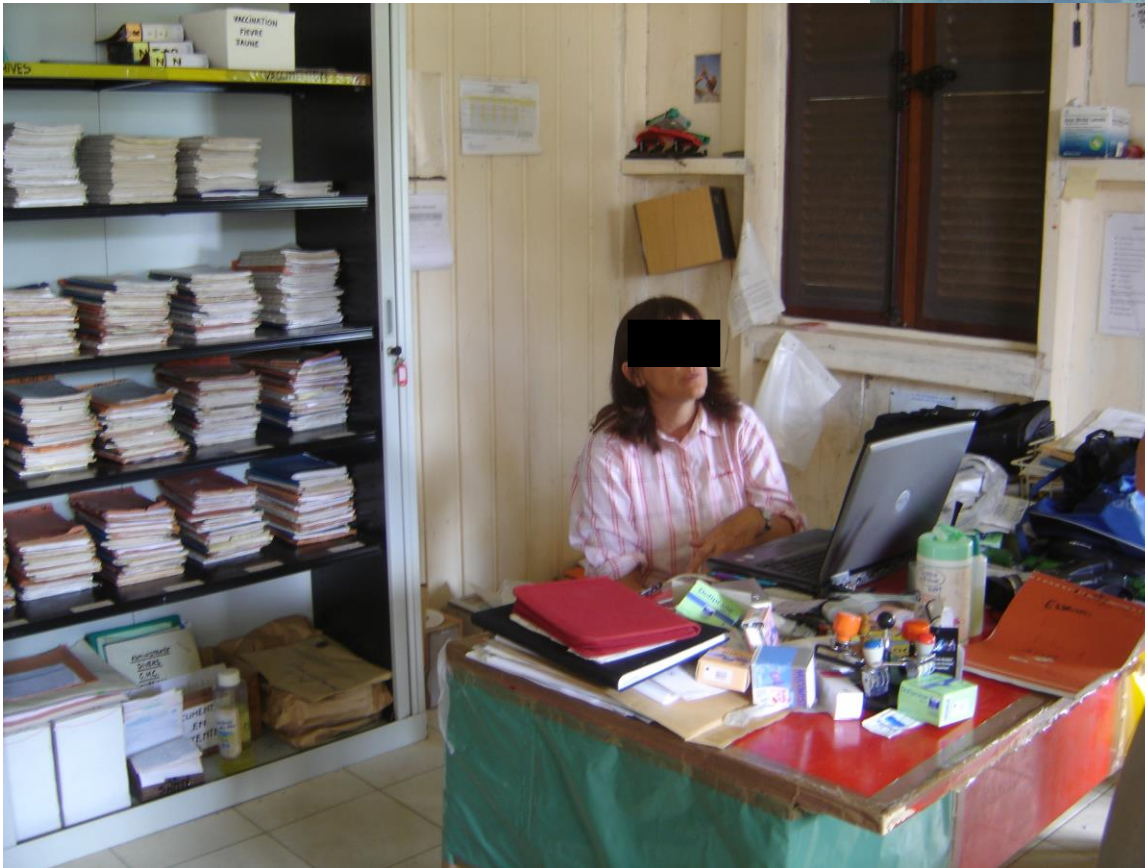
- Importance of this reservoir?
- Diversity?
- Dynamic?





# Materials and methods: an isolated population

Project « Ecologie de la Résistance aux Antibiotiques de *E. coli* et *S. aureus* »

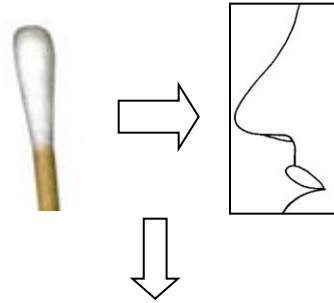


Isolated  
Single source of antibiotic

# Materials and methods

---

2 prevalence surveys: Octobre 2006 and June 2008  
Standardized methodology



Mannitol salt agar slants in screw-capped tubes



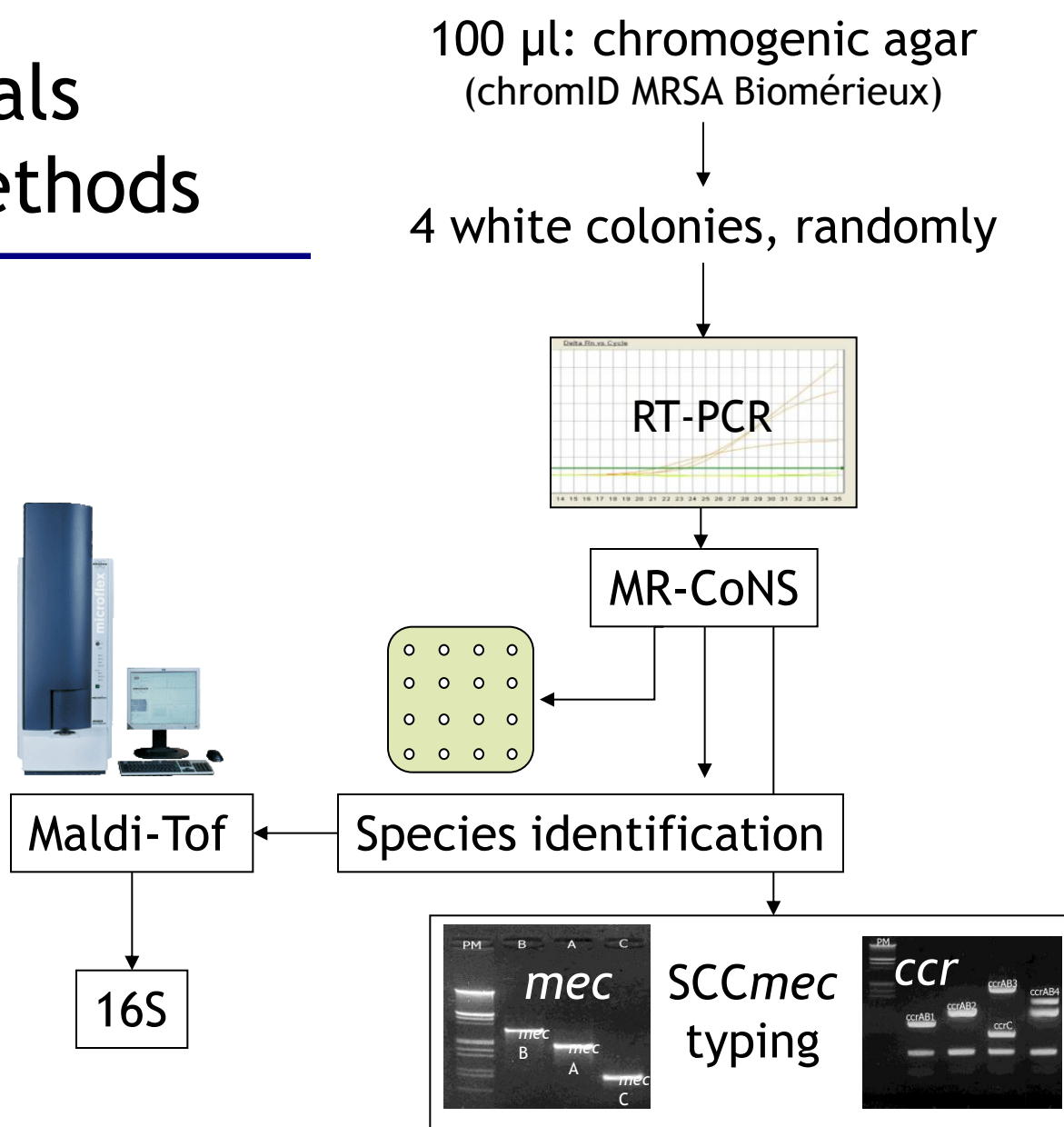
BHI with 10% glycerol  
-80° C

Cohort of 154 individuals sampled in 2006 and 2008

*Projet ERAES*



# Materials and Methods



MR *S. epidermidis* typing with Multi Locus VNTR Analysis

# Results (cohort of 154 adults)

---

## ➤ Prevalence of MR-CoNS nasal carriage

- 2006 → 50,6%

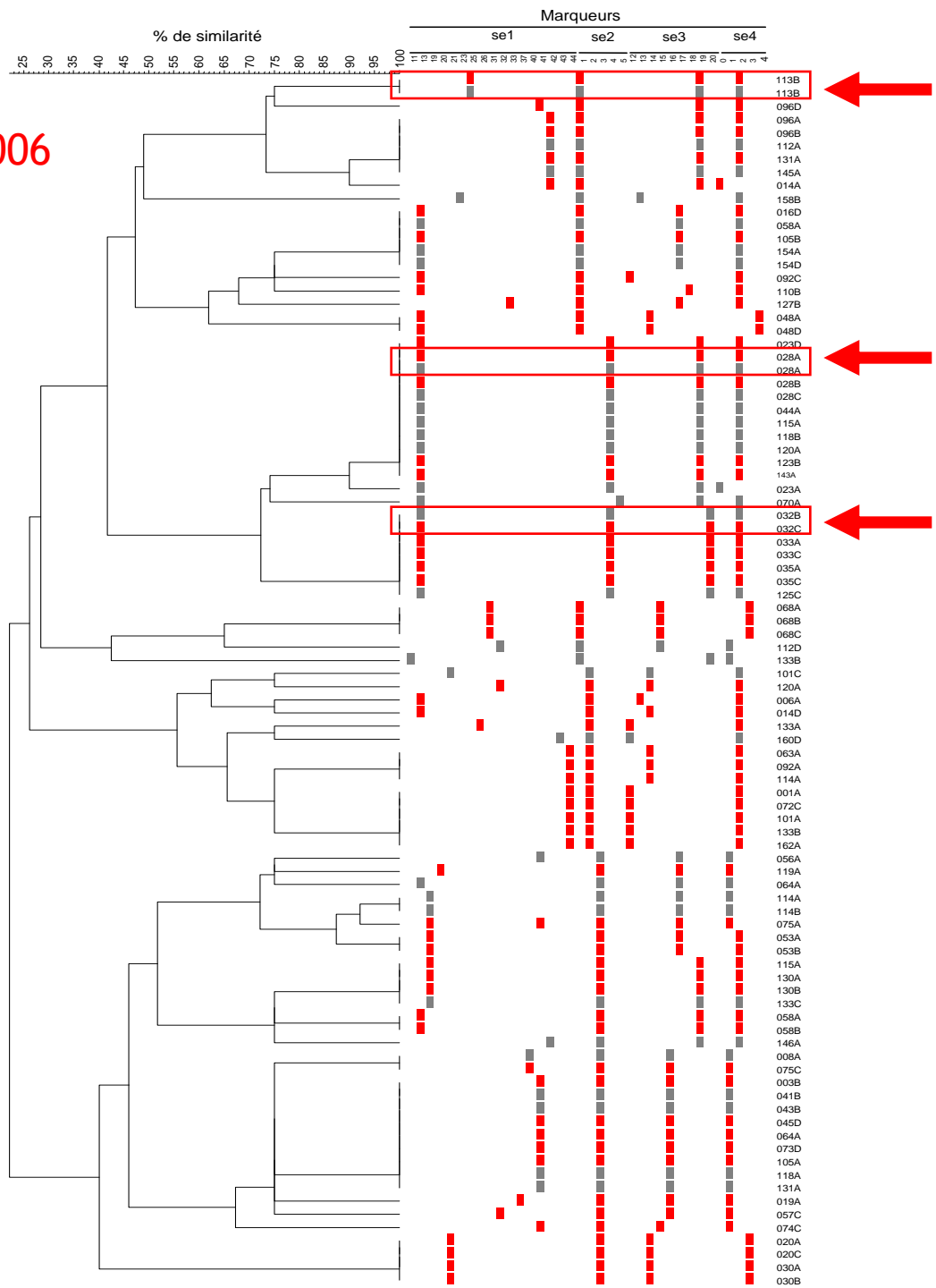
- 2008 → 46,9%

# Dynamic by species

---

Type of carrier	No. (%) of methicillin resistant strains				
	CoNS	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Persistent carriers	39 (25)				
Intermittent carriers	73 (47)				
Noncarriers	42 (27)				

---



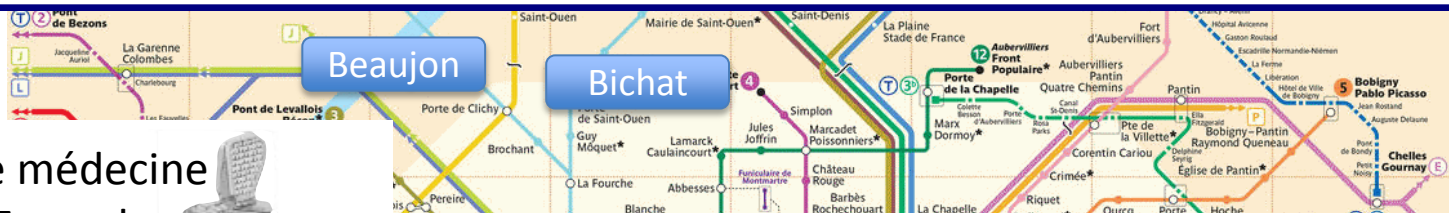
Phylogenetic tree  
 61 strains of *S. epidermidis* in 2006  
 31 strains *S. epidermidis* in 2008

38 different genotypes

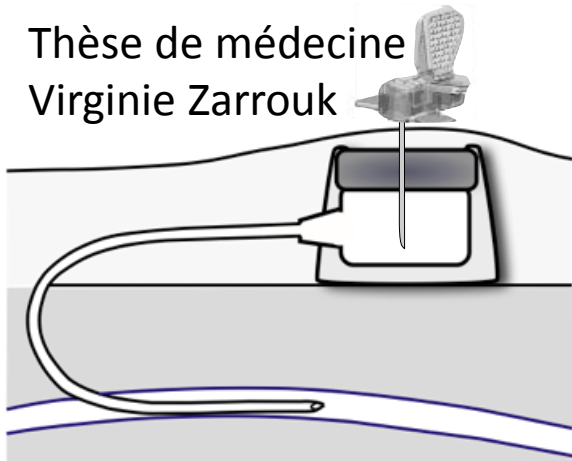
Same genotype  
 in 2006 and 2008  
 1.9% (3/154)

Continuous mixing  
 of MR-CoNS

# La suite : pourquoi pas une thèse ?



Thèse de médecine  
Virginie Zarrouk



DL : « j'aimerais bien faire une thèse »  
OL : « va voir des gens à Pasteur »  
DL : « OK »



Picture: C. Dreyer, Beaujon





# Unité de Génétique des Biofilms



- Bourse AXA
- FRM
- Ecoles doctorales
- AAIHP
- Bourse ESCMID
- Groupama
- Académie de Médecine
- Médaille de l'AP-HP
- Groupe Pasteur Mutualité
- Postes d'accueil INSERM/Pasteur



**Institut Pasteur**

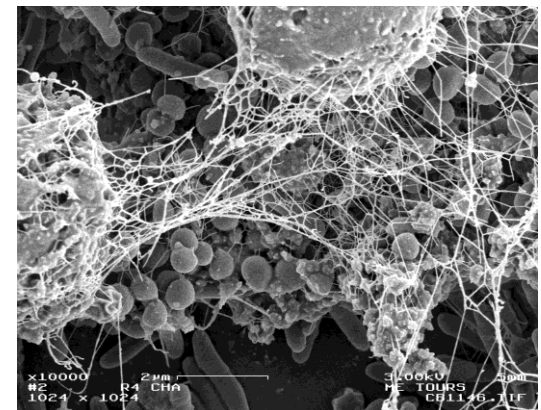
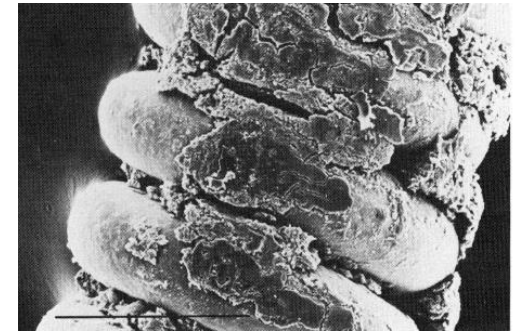
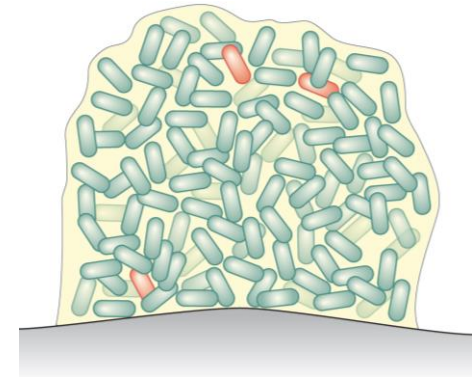
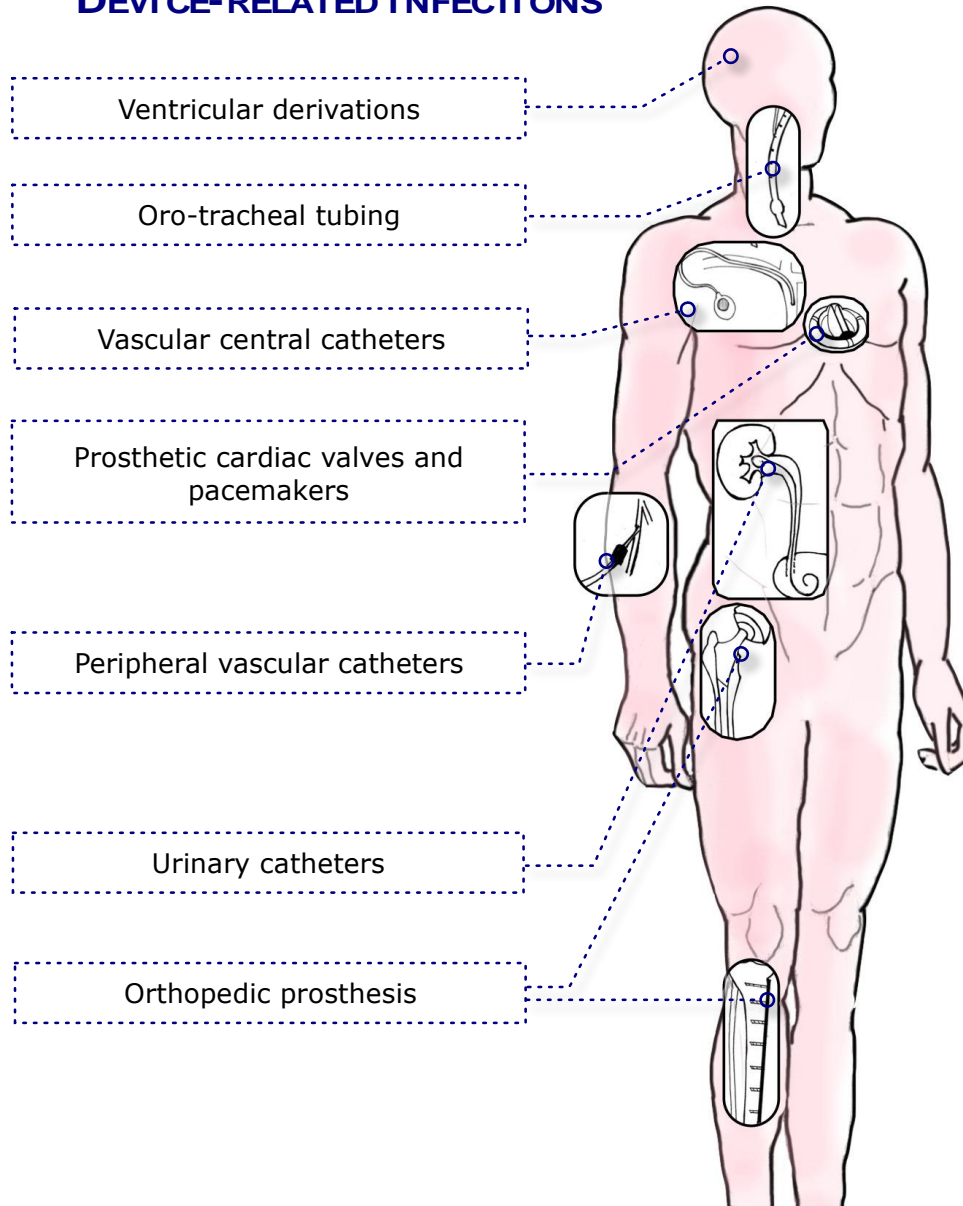
Unité de Génétique des biofilms

Jean-Marc GHIGO

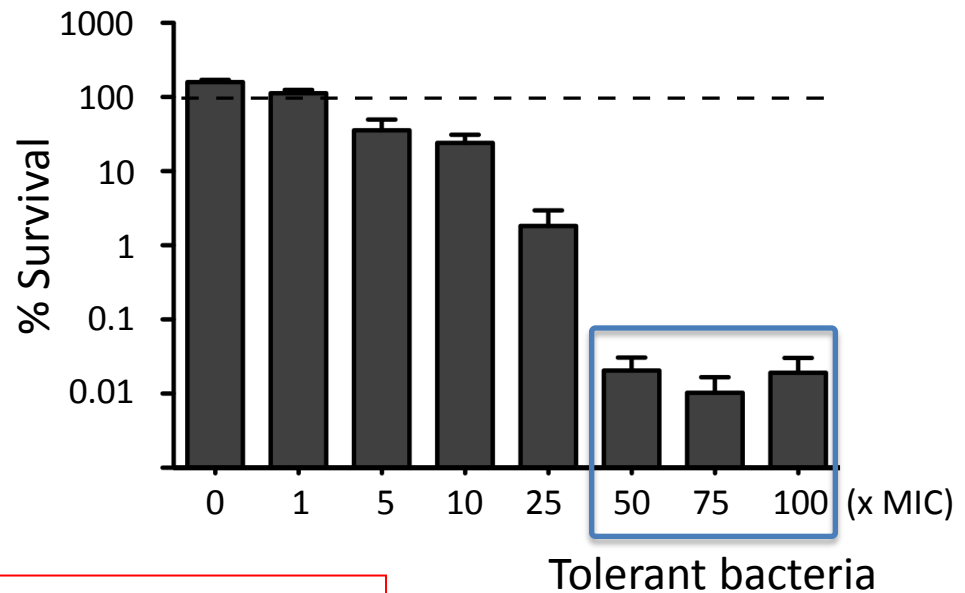
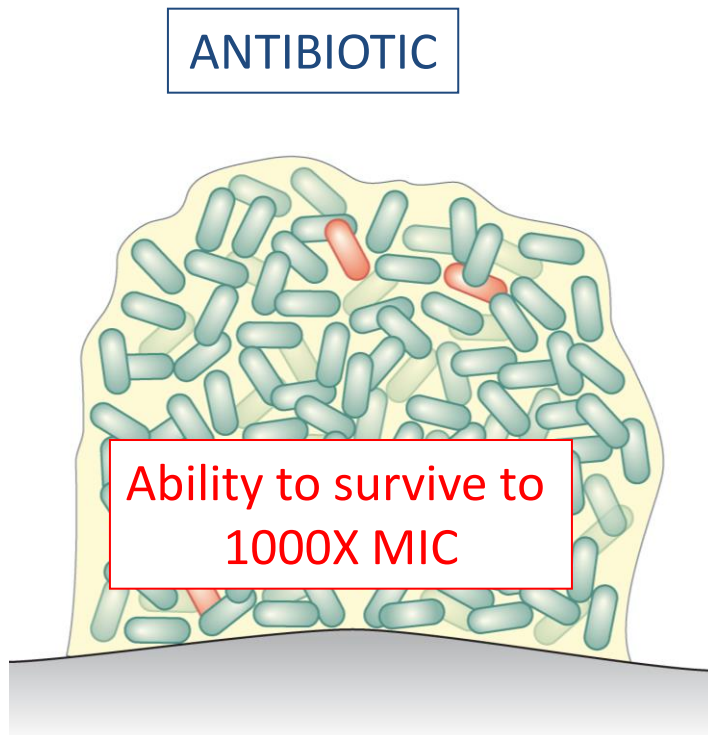
Christophe BELOIN

# Medical complications of biofilm lifestyle

## DEVICE-RELATED INFECTIONS



# Biofilms are tolerant towards antibiotics

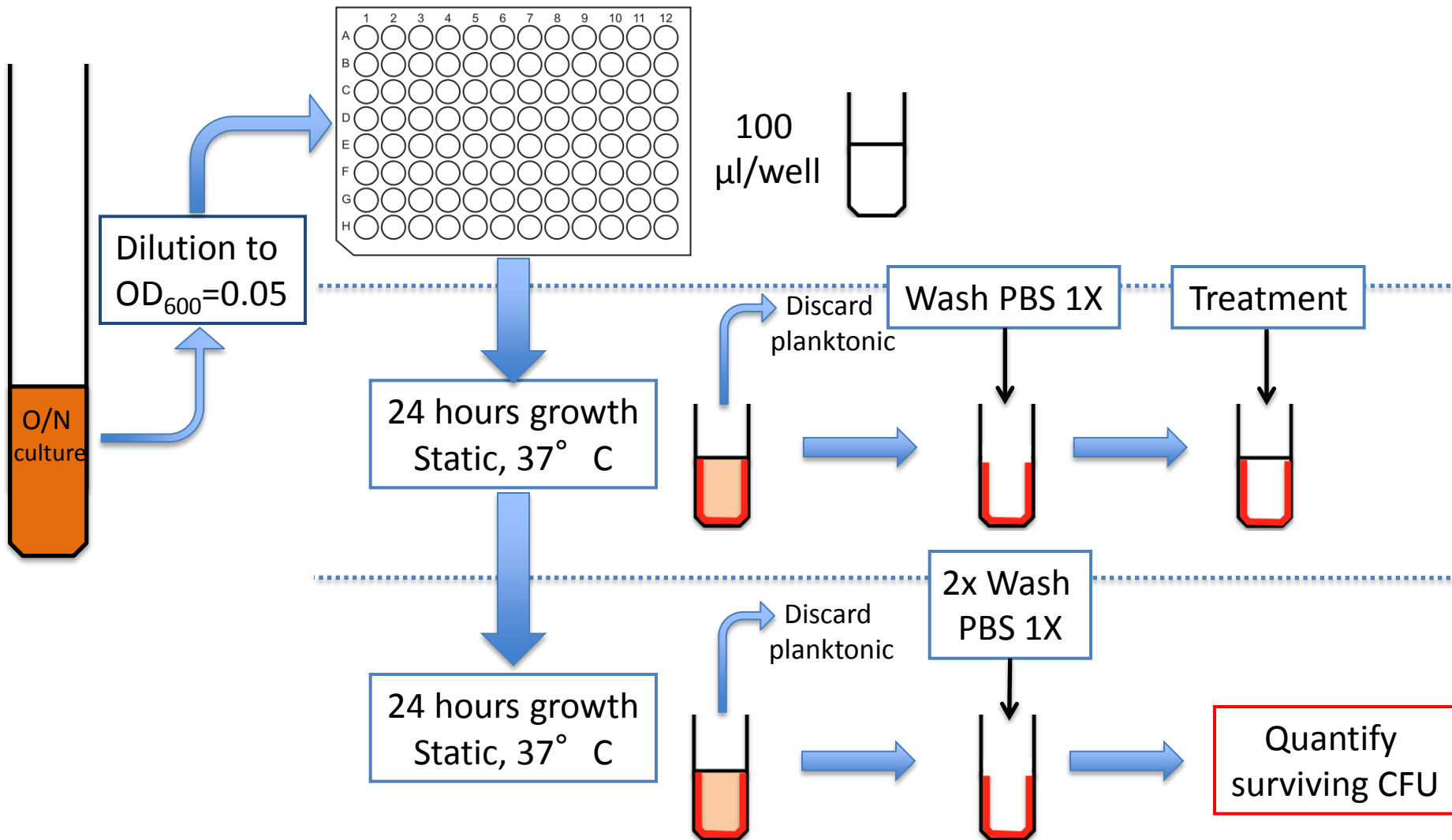


Why are biofilm tolerant?  
How can we eradicate them?

Lewis, K. 2007 Nat Rev Microbiol  
Lebeaux, D. *et al* 2014 MMBR

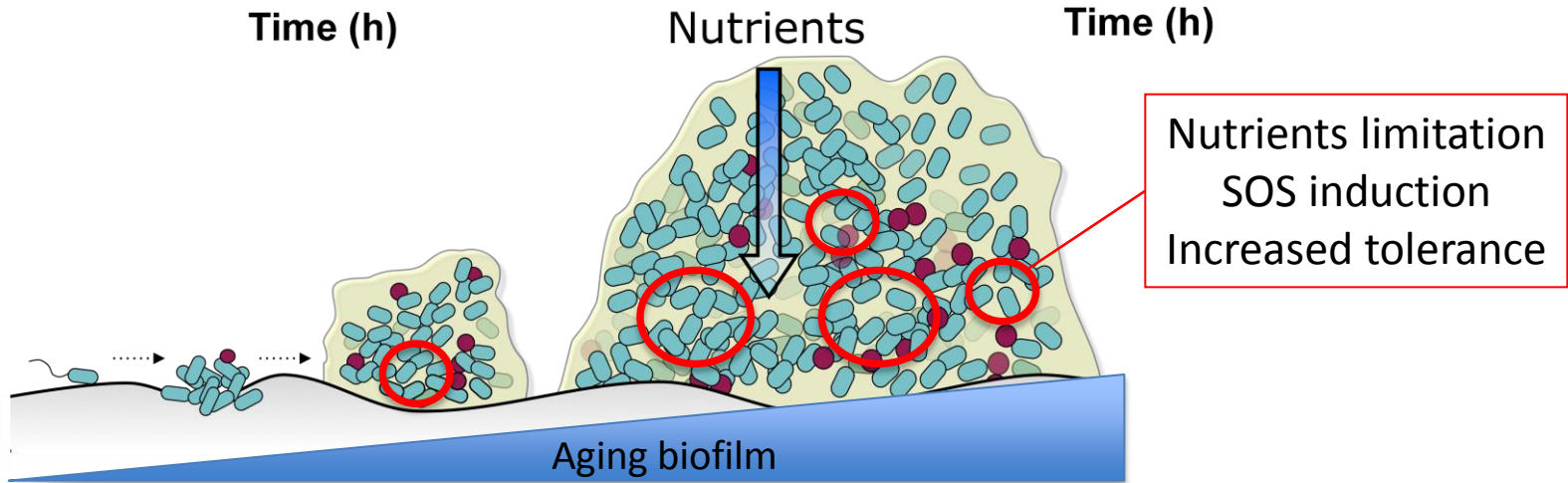
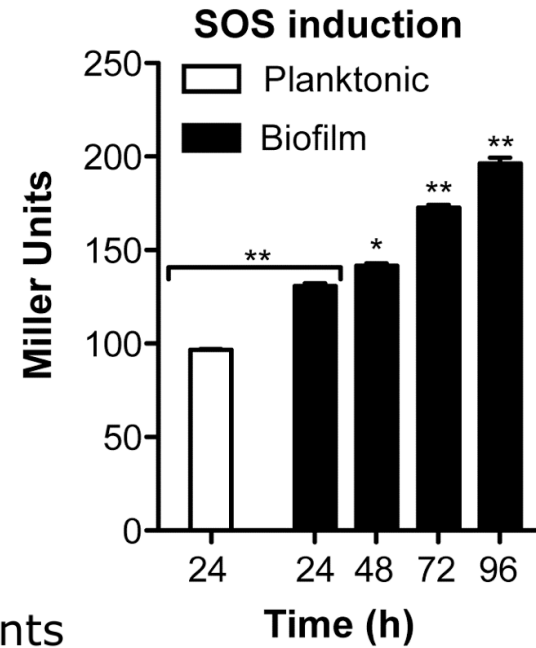
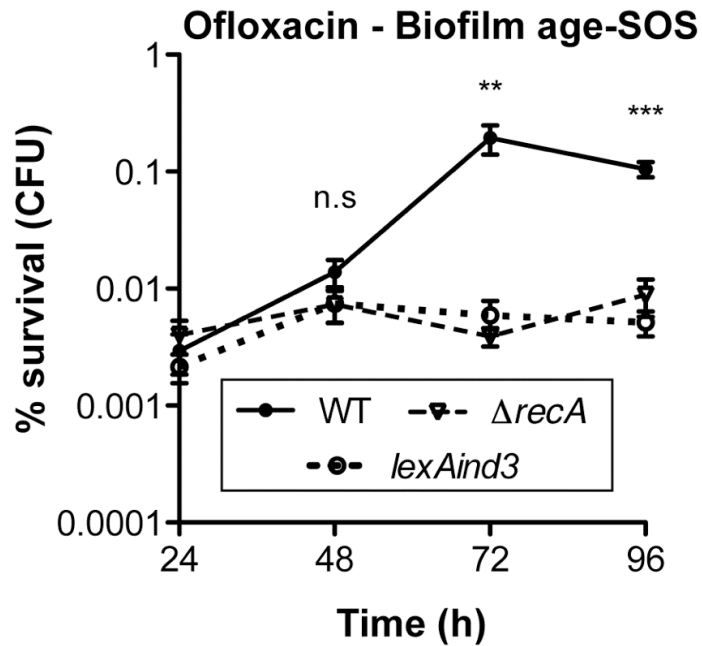
# *In vitro* study of biofilm antibiotic tolerance

## 96-well PVC plate biofilm model



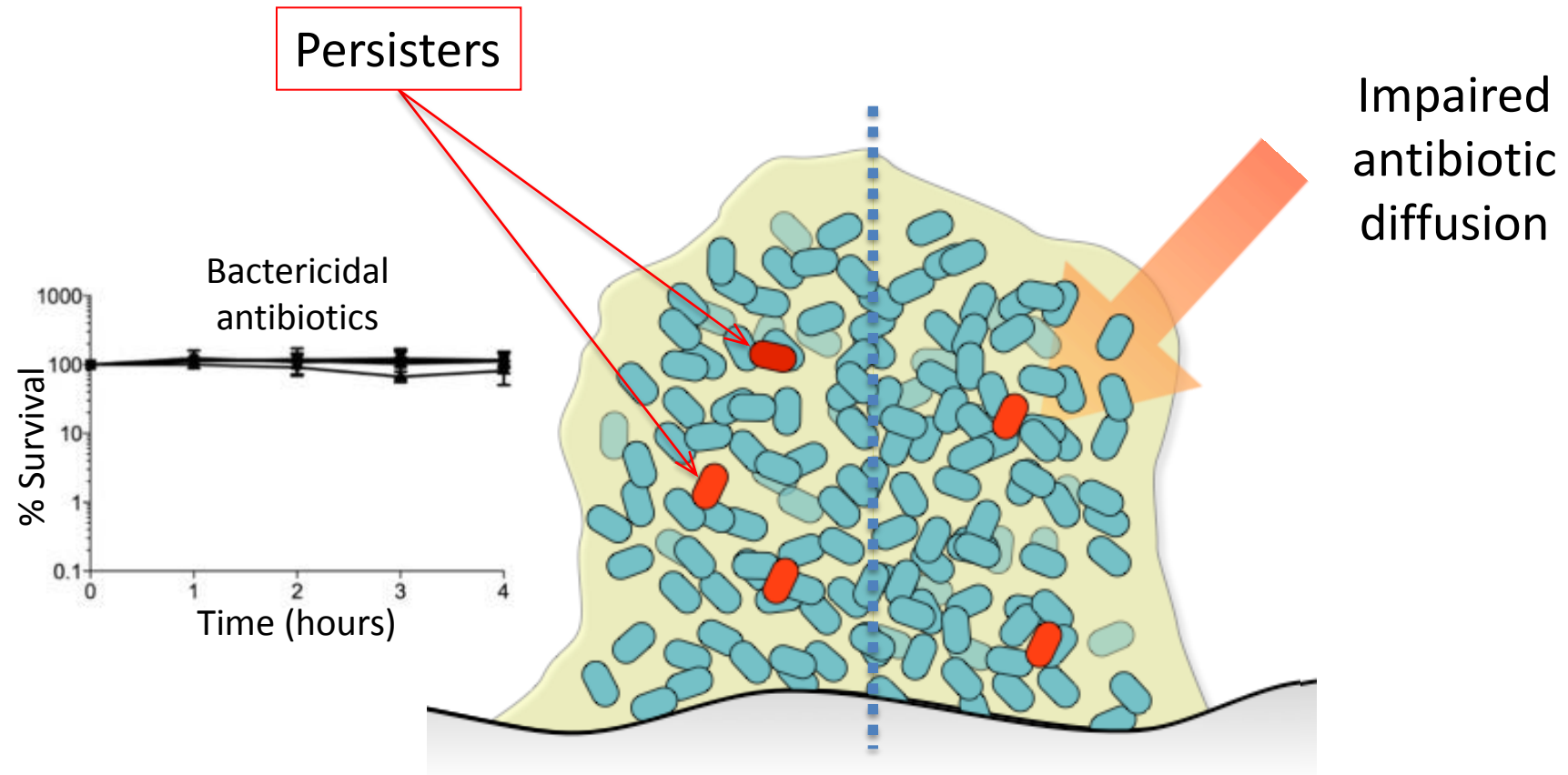


# Ofloxacin tolerance in aging biofilms





# Biofilms are tolerant towards antibiotics



Lebeaux, D. *et al* 2015 *J Antimicrob Chemother*

Lebeaux, D. *et al* 2014 *J Infect Dis*

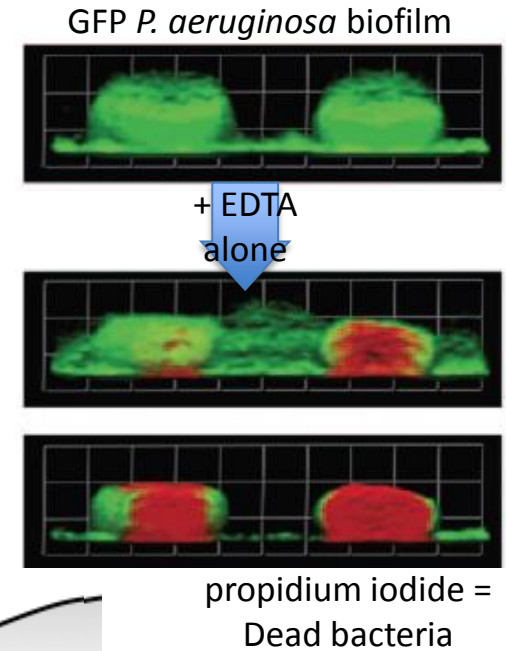
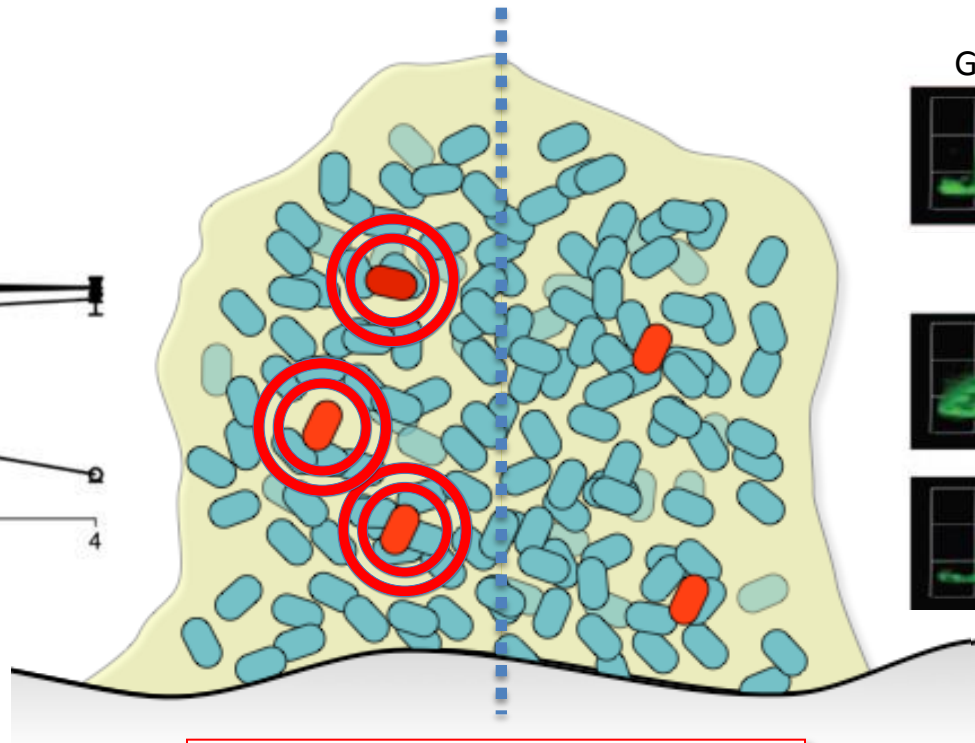
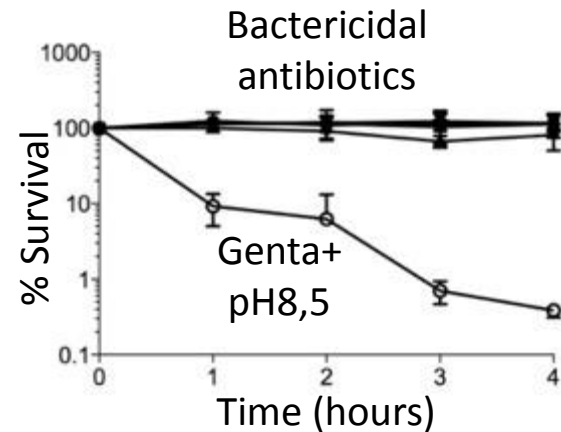
Chauhan A., Lebeaux, D. *et al* 2012 *Antimicrob Agents Chemother*

Chauhan A., Lebeaux, D. *et al* 2012 *PLoS One*

# How can we eradicate biofilms?

Anti-persister compounds?

Anti-matrix + antibiotics?



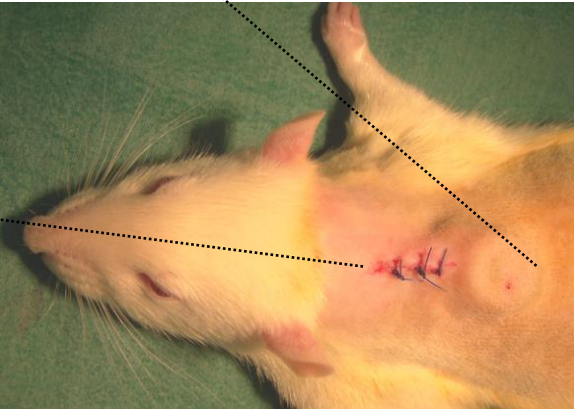
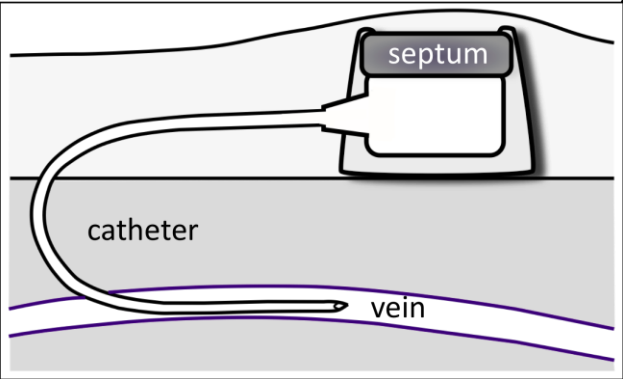
**Gentamicin + EDTA**

Lebeaux, D. *et al* 2015 J Antimicrob Chemother  
Chauhan A., Lebeaux, D. *et al* 2012 Antimicrob Agents Chemother  
Chauhan A., Lebeaux, D. *et al* 2012 PLoS One

Banin, E. *et al* AEM 2006  
Turakhia, M.H. *et al* AEM 1983

# An *in vivo* model of biofilm-related infection

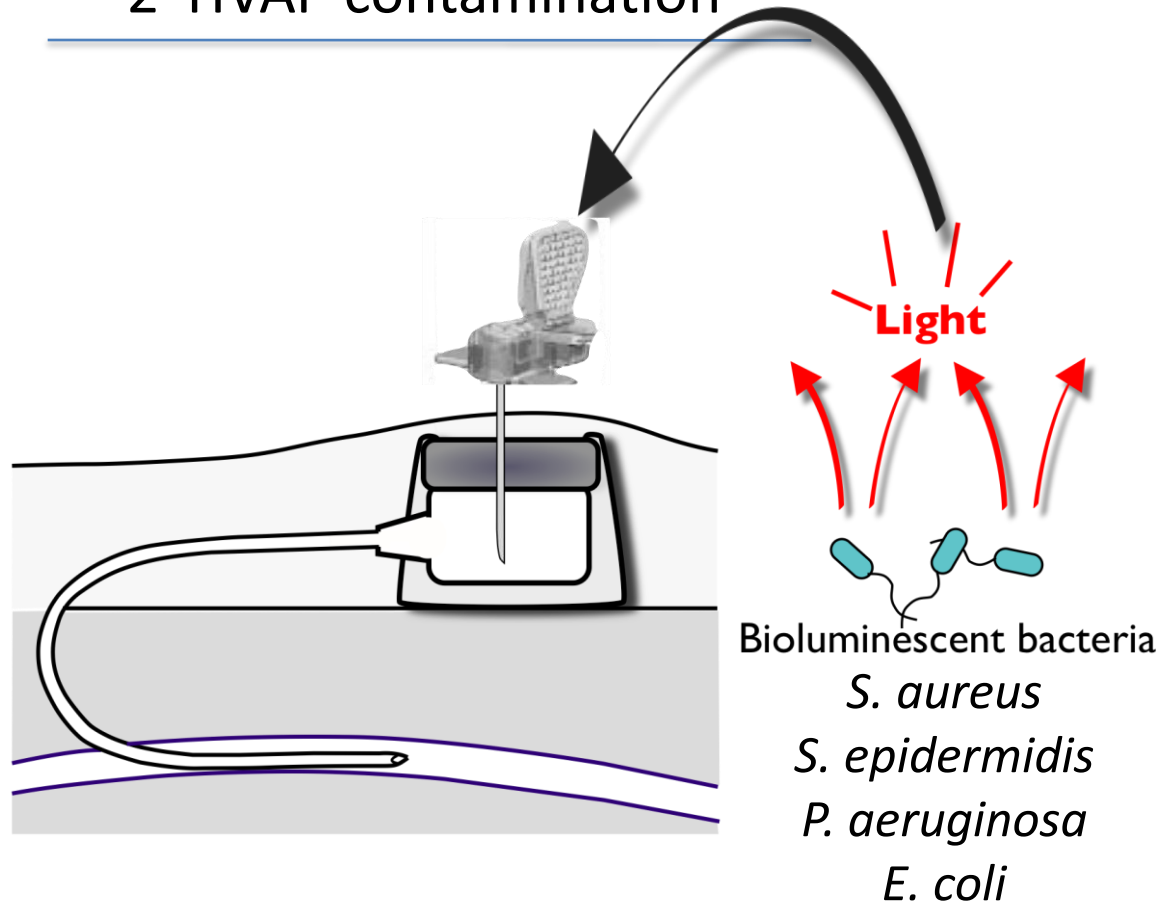
## 1-TIVAP surgical insertion



Ashwini Chauhan

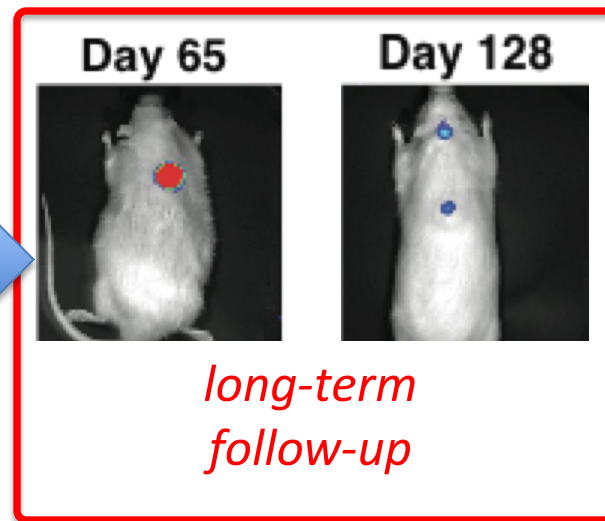
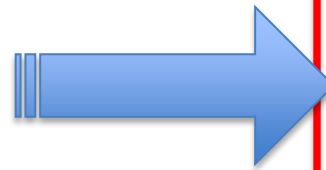
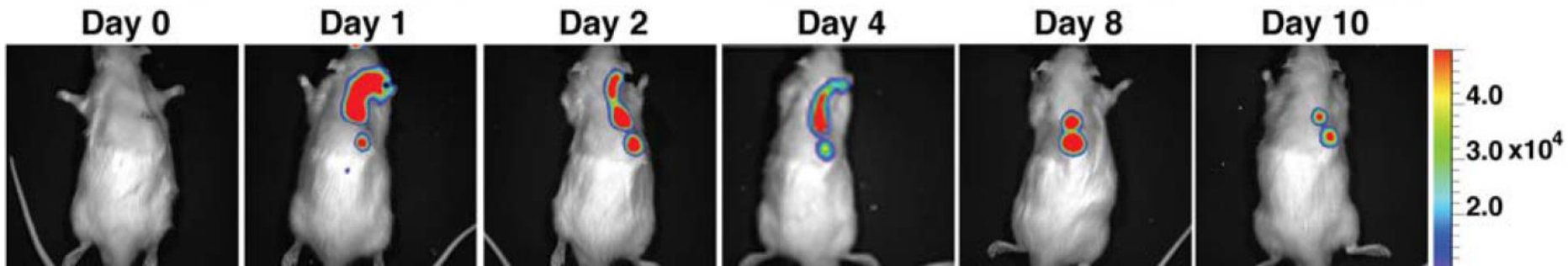
# An *in vivo* model of biofilm-related infection

## 2-TIVAP contamination



# An *in vivo* model of biofilm-related infection

## 3-*in vivo* bioluminescence monitoring

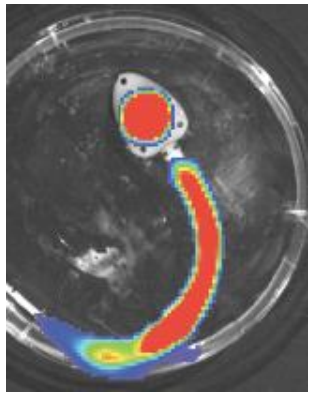


*P. aeruginosa*  
IVIS-100 imaging system



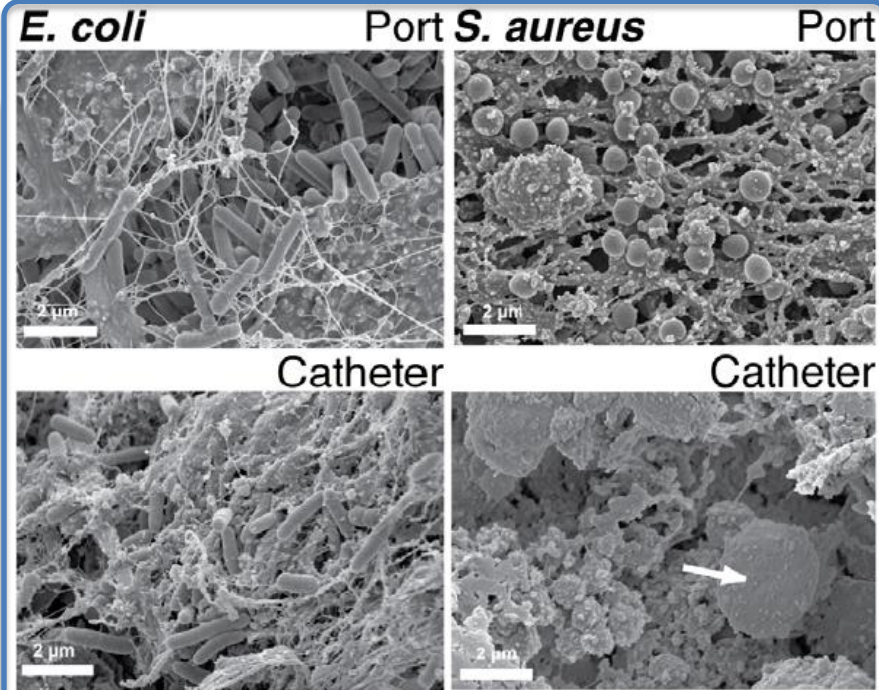
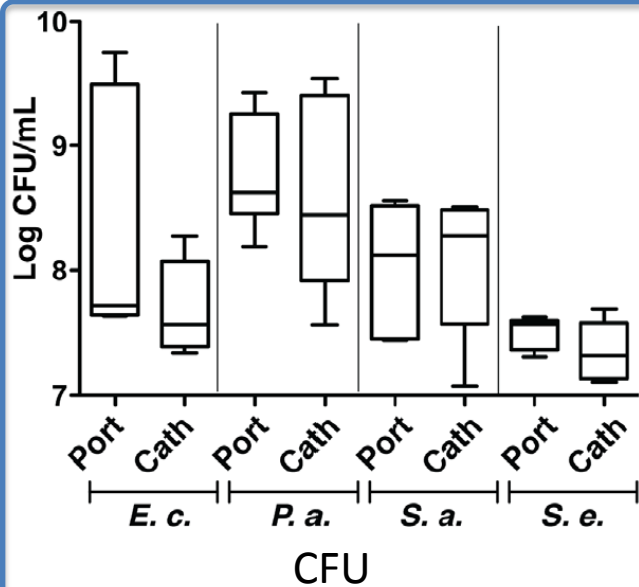
# An *in vivo* model of biofilm-related infection

4-sacrifice



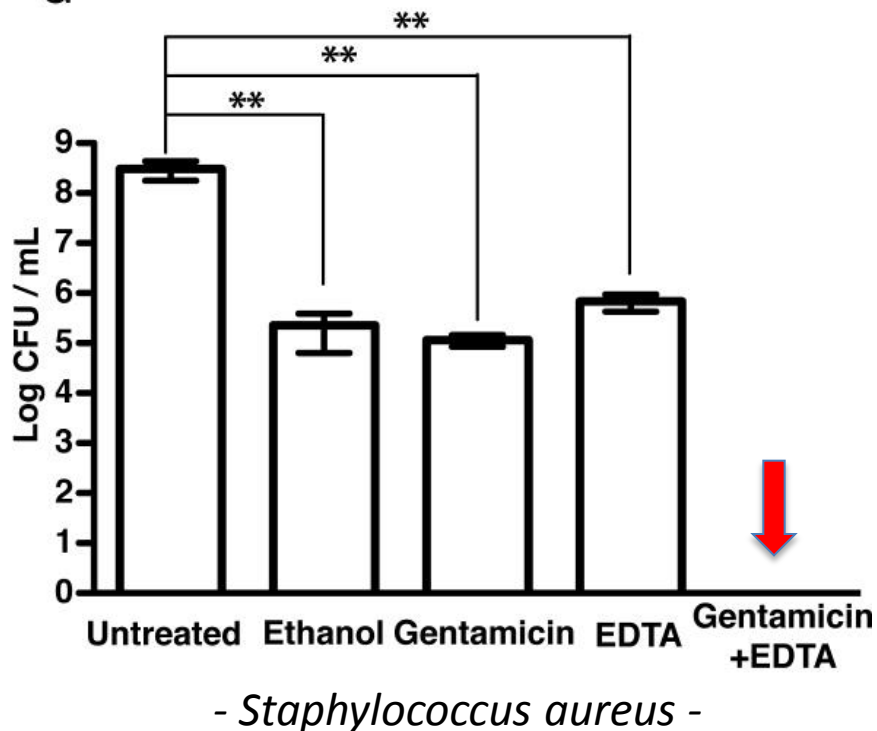
TIVAP

bioluminescence



Electron microscopy:  
Typical biofilm structure

# Anti-biofilm strategy: gentamicin + EDTA



*in vivo*

- *S. aureus*
- *S. epidermidis*
- *E. coli*
- *P. aeruginosa*

*in vitro*

- 18 clinical strains

# Toward a clinical study: a steeplechase run

Microbiology

Is it strain specific ?

Pharmacy

Genta/EDTA

*S. aureus*  
*S. epidermidis*  
*E. coli*  
*P. aeruginosa*

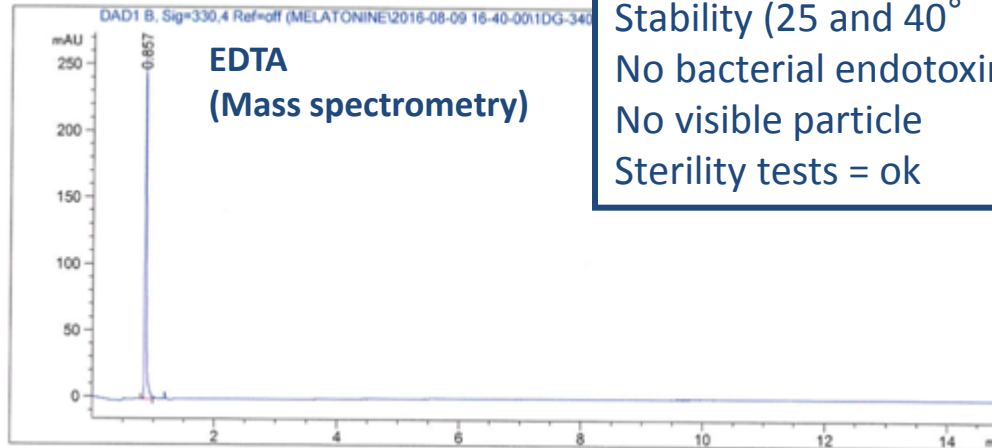
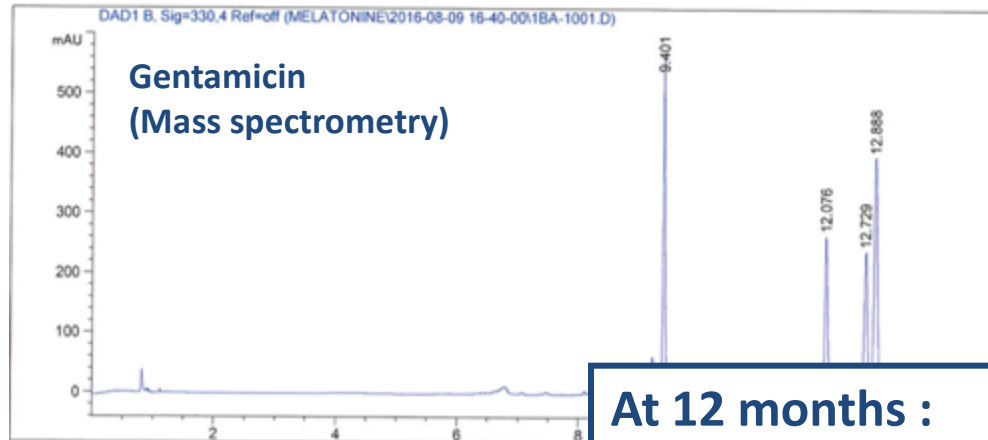
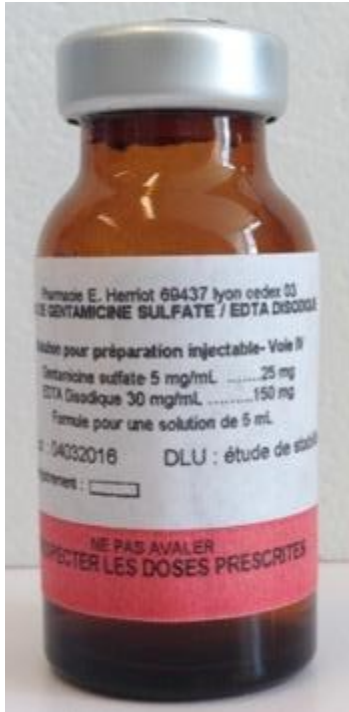
18 clinical strains  
C-RBSI, Beaujon

EDTA + AB  
Stability ?

Pharmacie hôpital E. Herriot,  
Hospices Civils de Lyon,  
Plateforme FRIPHARM

Fabrice Pirot  
Elise Jandot  
Pauline Doucet  
Anne-Sophie Fiolet

# Toward a clinical study: pharmacology

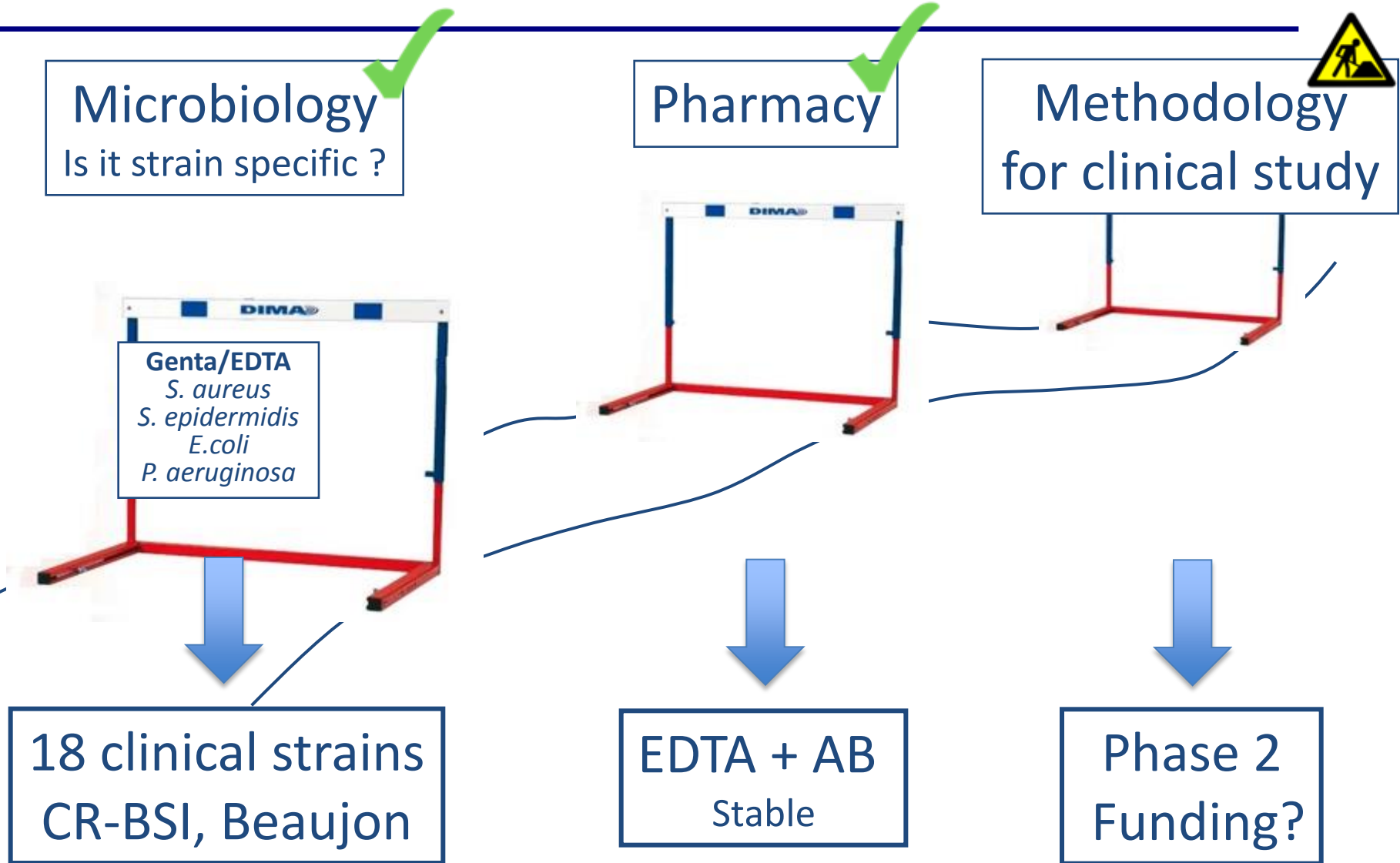


**At 12 months :**

Stability (25 and 40° ) (Mass-spec and UHPLC)  
No bacterial endotoxin  
No visible particle  
Sterility tests = ok



# Toward a clinical study: a steeplechase run





# Quelques exemples

---

- David
- Victoire
- Matthieu
- Julien



Financements possibles recherche  
microbiologie clinique  
exemple:  
Année médaille 2007

Année médaille payée par l'APHP

Affiliation obligatoire avec un service de l'APHP

Recherche clinique ou translationnelle

# Independent Behavior of Commensal Flora for Carriage of Fluoroquinolone-Resistant Bacteria in Patients at Admission<sup>∇</sup>

Victoire de Lastours,<sup>1,2</sup> Françoise Chau,<sup>2</sup> Florence Tubach,<sup>3</sup> Blandine Pasquet,<sup>3</sup> Etienne Ruppé,<sup>2</sup> and Bruno Fantin<sup>1,2\*</sup>

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Dec. 2010, p. 5193–5200

## Objectifs

- Déterminer la prévalence du portage de souches résistantes aux fluoroquinolones dans 3 microbiotes (intestinal, nasal, oropharyngé) à l'admission dans services de Médecine
- Déterminer les facteurs de risque de portage de souches résistantes en fonction du microbiote

# Méthodes

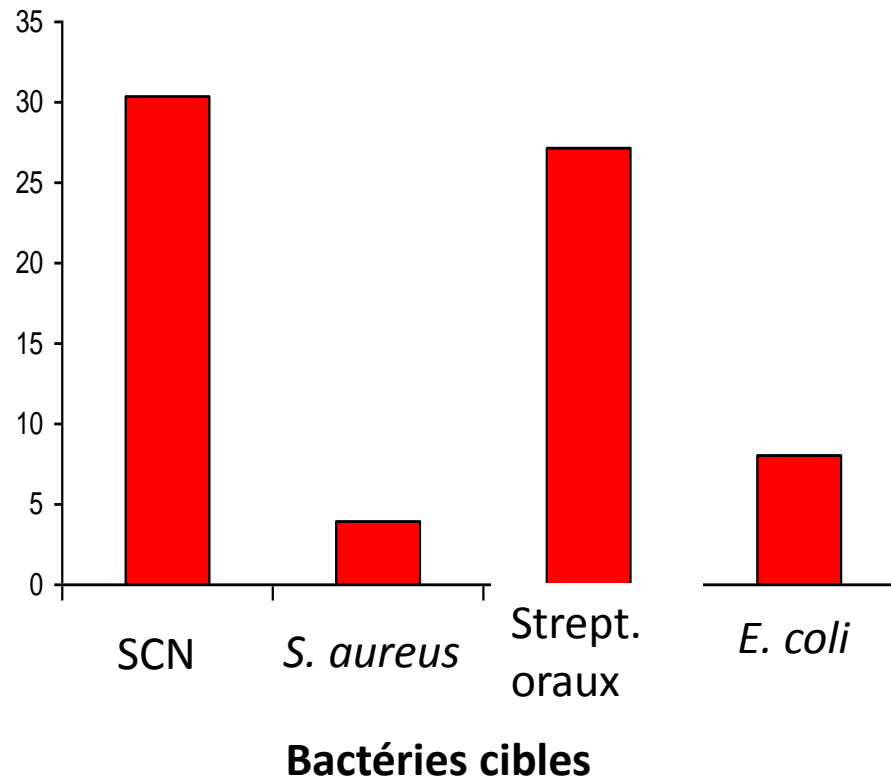
## Étude prospective (555 patients inclus)

- Hôpital Beaujon, de Mai à Octobre 2007
- Écouvillons nasal, rectal et oropharyngé à l'entrée
- Recueil données cliniques
  - démographiques, comorbidités,
  - prise d'antibiotiques et hospitalisations précédentes etc.

Écouvillon	Microbiote	Bactérie cible
Nasal	nasal	<ul style="list-style-type: none"><li>• Staphylocoques à coagulase négative (SCN)</li><li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li></ul>
Gorge	oropharyngé	Streptocoques oraux
Rectal	intestinal	<i>Escherichia coli</i>

# Prévalence de résistance aux quinolones


% résistance aux fluoroquinolones



Bactérie cible	Facteurs de risque de R.
SCN	<ul style="list-style-type: none"><li>• âge</li><li>• vie en collectivité</li><li>• exposition aux antibiotiques &gt;8j dans les 3 derniers mois</li></ul>
<i>S. aureus</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• âge</li><li>• ATCD de traitement par FQ</li></ul>
Strep. oraux	ne pas avoir reçu d'antibiotiques dans les 3 mois
<i>E. coli</i>	portage de bactéries multi-résistantes



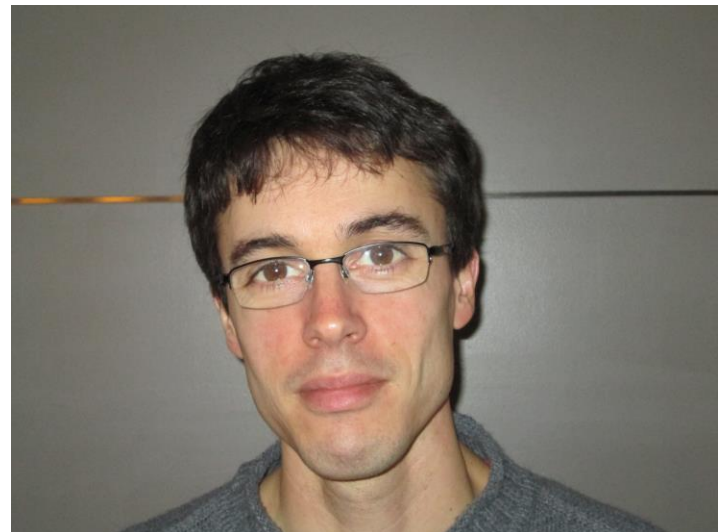
# Conclusion

- Prévalence élevée de la résistance aux fluoroquinolones dans les microbiotes à l'admission
  - Bien que soumis aux mêmes pressions de sélection chaque microbiote se comporte de façon indépendante
  - Hypothèses:
    - Concentrations locales variables d'antibiotiques
    - Espèces bactériennes différentes
    - Effet barrière différent selon microbiote ?
- 
- Obtention en 2009 d'un PHRC national pour étudier l'incidence et les facteurs associés à l'émergence de la résistance aux Fq chez des patients traités en hospitalisation. 150k€
  - Inclusion de 450 patients en 2 ans
  - Publication dans le Journal of Antimicrobial Chem. 2014.

# Quelques exemples

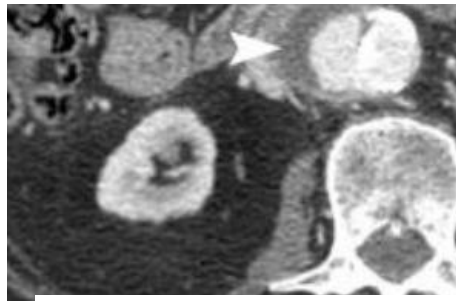
---

- David
- Victoire
- Matthieu
- Julien



# Les infections sur prothèses vasculaires

- Graves (mortalité 10-25% à J30)
- Peu de données thérapeutiques → Intérêt d'un modèle *in vivo* ?



## Thèse d'Université

Praticien hospitalier :

Mise à disposition : 3 mois  
+ RTT

=

18 mois temps-plein

18 mois temps-partiel



Inte  
journ

nts  
cag



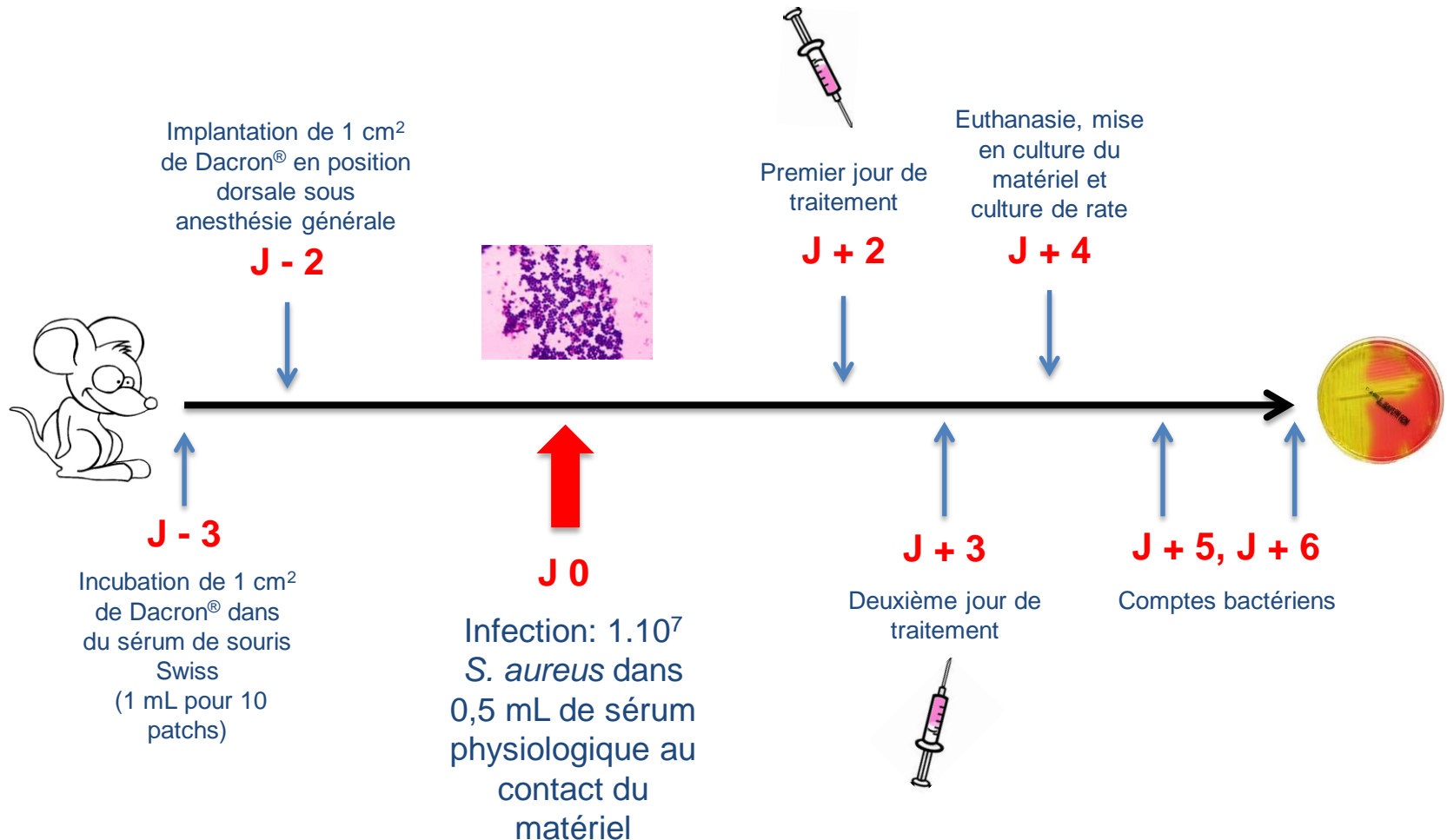
Review

Medical treatment of prosthetic vascular graft infections: Review of the literature and proposals of a Working Group



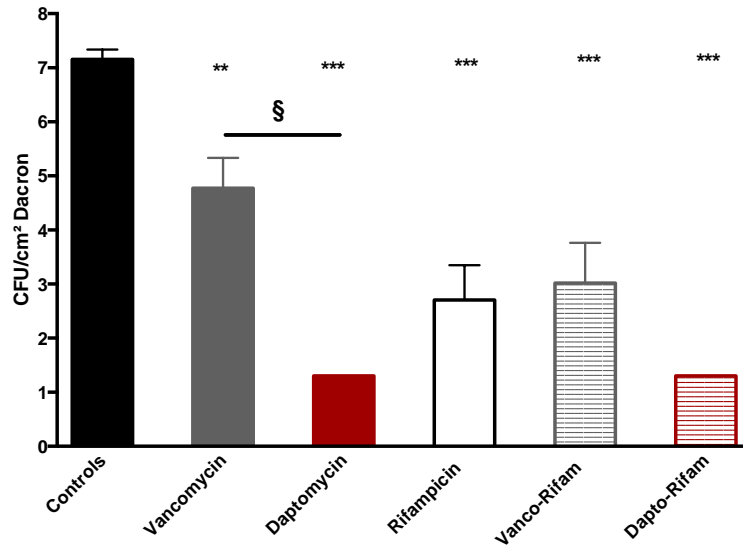
M. Revest<sup>a,b</sup>, F. Camou<sup>c</sup>, E. Senneville<sup>d</sup>, J. Caillon<sup>e</sup>, F. Laurent<sup>f</sup>, B. Calvet<sup>g</sup>, P. Feugier<sup>h</sup>, M. Batt<sup>i</sup>, C. Chidiac<sup>j,\*</sup>, Groupe de Réflexion sur les Infections de Prothèses vasculaires (GRIP)<sup>1</sup>

# Recherche fondamentale: infections de prothèse vasculaire à *S. aureus*

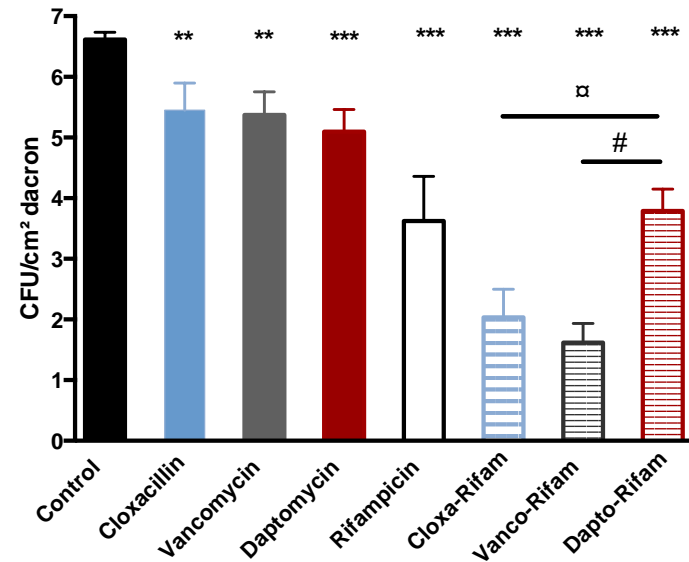


# Recherche fondamentale: infections de prothèse vasculaire à *S. aureus*

## SARM BCB8



## SAMS 27217



\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ . §  $P < 0.001$

α  $P < 0.01$ , #  $P < 0.001$



# New Insight into Daptomycin Bioavailability and Localization in *Staphylococcus aureus* Biofilms by Dynamic Fluorescence Imaging

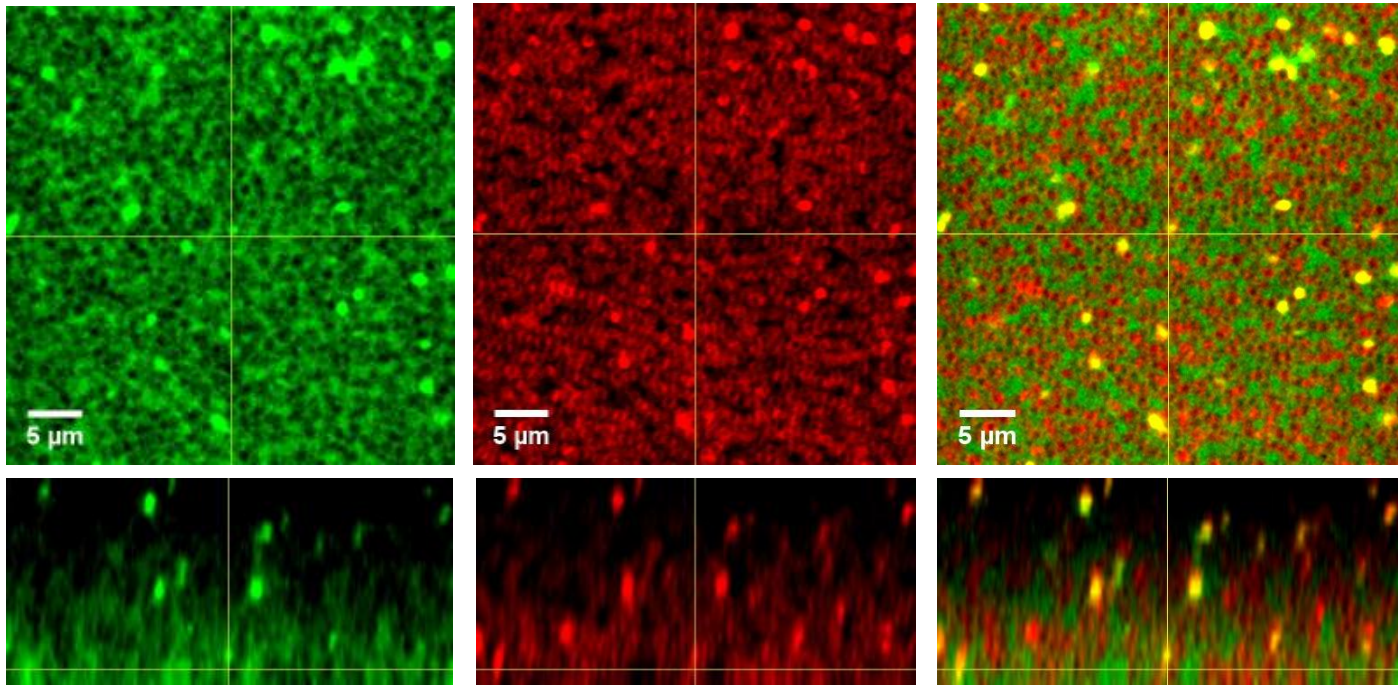
August 2016 Volume 60 Number 8

Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Rym Boudjema<sup>a</sup>, Romain Briandet<sup>b</sup>, Matthieu Revest<sup>c,d</sup>, Cédric Jacqueline<sup>d</sup>, Jocelyne Caillon<sup>d</sup>, Marie-Pierre Fontaine-Aupart<sup>a</sup>,  
Karine Steenkeste<sup>a</sup>

Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay (ISMO), CNRS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Orsay, France<sup>a</sup>; Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France<sup>b</sup>; CHU Rennes, Rennes, France<sup>c</sup>; Université de Nantes, Faculté de Médecine, UPRES EA 3826, Nantes, France<sup>d</sup>

Dapto  
SAMS



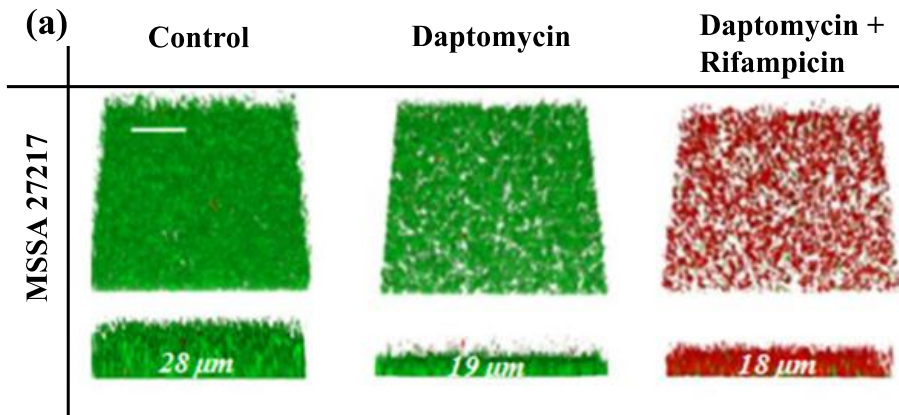
# New Insight into Daptomycin Bioavailability and Localization in *Staphylococcus aureus* Biofilms by Dynamic Fluorescence Imaging

August 2016 Volume 60 Number 8

Antimicrobial Agents and Chemotherapy

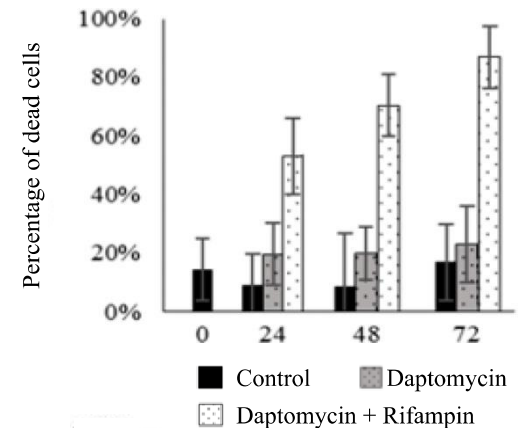
Rym Boudjemaa,<sup>a</sup> Romain Briandet,<sup>b</sup> Matthieu Revest,<sup>c,d</sup> Cédric Jacqueline,<sup>d</sup> Jocelyne Caillon,<sup>d</sup> Marie-Pierre Fontaine-Aupart,<sup>a</sup> Karine Steenkeste<sup>a</sup>

Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay (ISMO), CNRS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Orsay, France<sup>a</sup>; Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France<sup>b</sup>; CHU Rennes, Rennes, France<sup>c</sup>; Université de Nantes, Faculté de Médecine, UPRES EA 3826, Nantes, France<sup>d</sup>



Live (Syto 9)

Dead (iodure propidium)



# Quelques exemples

---

- David
- Victoire
- Matthieu
- Julien



# La question

**Pourquoi certains greffés du rein ayant une bactériurie à *E. coli*:**

- Sont asymptomatiques...
- ... tandis que d'autres ont une pyélonéphrite aigüe (fièvre, insuffisance rénale aigüe, hospitalisation...)?

**Quels facteurs conditionnent le tableau (pyélonéphrite vs. bactériurie asymptomatique), une fois qu'*E. coli* parvient à s'établir dans les urines ?**

- Facteurs microbiens?
- Facteurs de l'hôte?

# Matériel & Méthodes

Hôpital Erasme, Belgique (2012-2015)

Collection prospective systématique de tous les *E. coli* responsables soit de bactériurie asymptomatique, soit de pyélonéphrite post-greffe rénale:

- Analyse génétique des bactéries par whole-genome sequencing (WGS)
- Mesure des paramètres de l'hôte





# Whole genome sequencing

## Préparation de la librairie (Nextera XT DNA Library Preparation Kit):

Extraction de l'ADN

Fragmentation de l'ADN (par tagmentation)

Mise en place d'« adapters » sur les fragments

Amplification

## Séquençage (Illumina MiSeq):

Couverture  $\pm 50$  (chaque nucléotide est séquencé 50 fois)

Obtention de reads (200 - 250 bp)

## Assemblage *de novo* des reads via SPAdes -> contigs

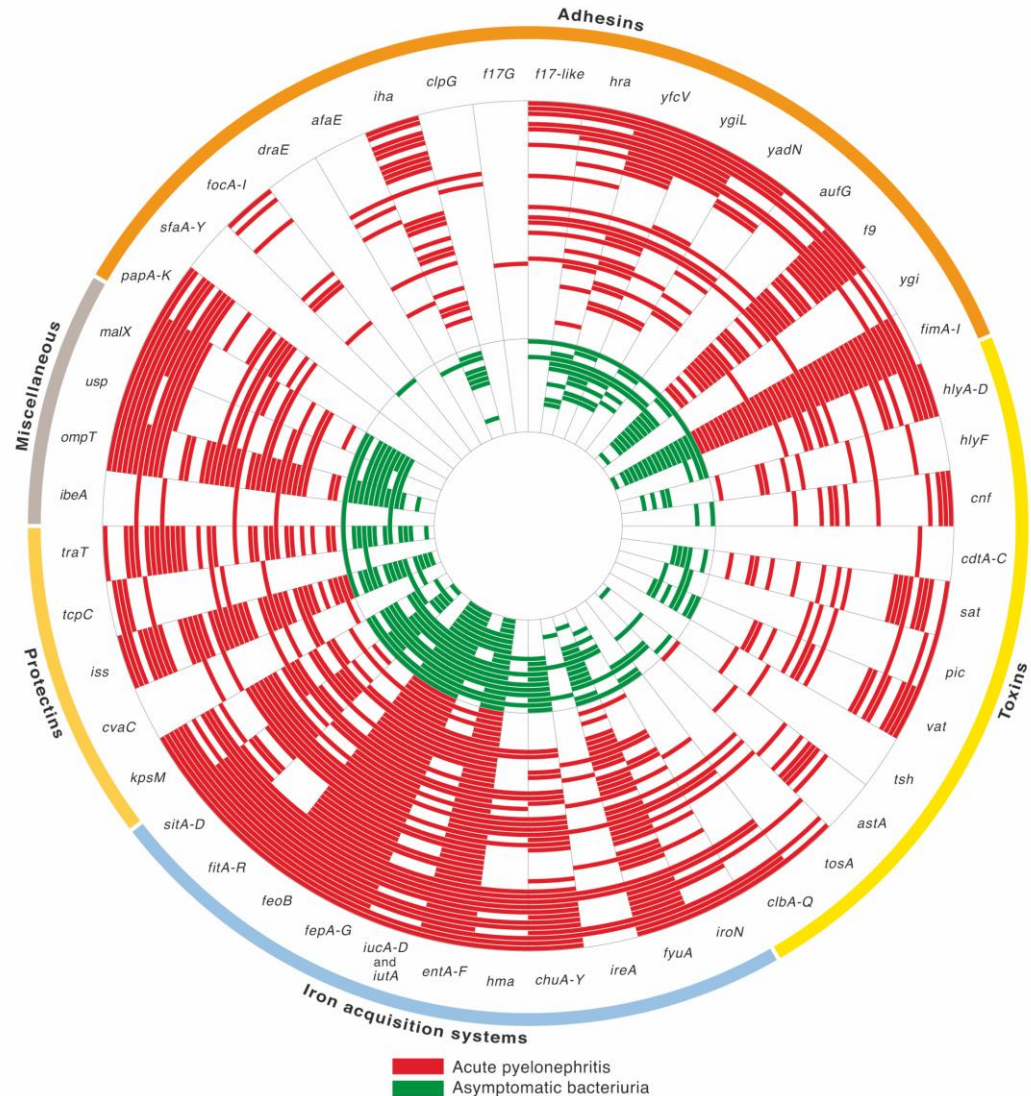
**Analyse des contigs:** notamment recherche des gènes de virulence (« virulome »)

# Résultats: VIRULOME

Concernant le nombre **TOTAL** de gènes de virulence/souche, pas de différence entre :

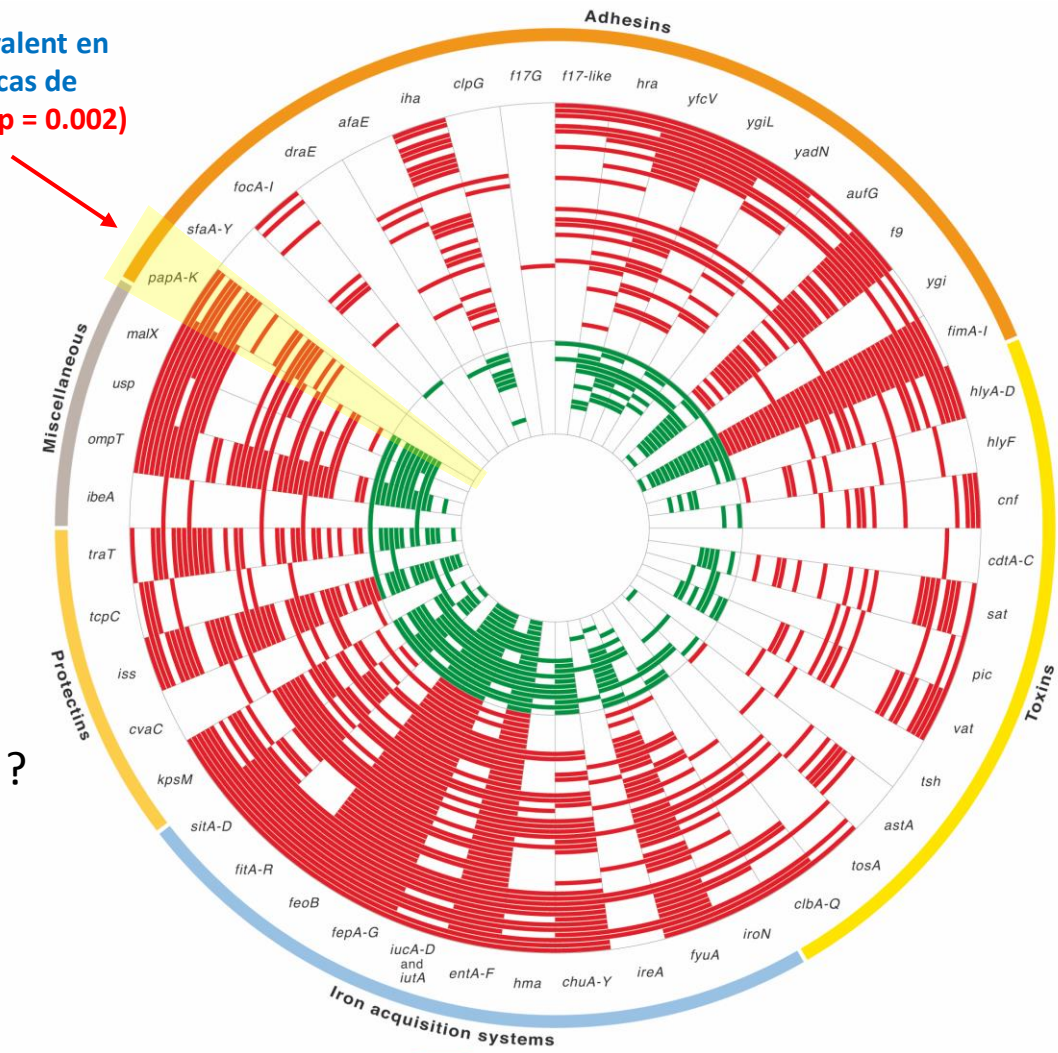
- souches de pyélonéphrite
- et souches de bactériurie asymptomatique

(médianes respectives: 18 (range: 5-33) vs 18 (5-30),  $p = 0.57$ )



# Résultats: VIRULOME

Opéron *pap* (P-fimbriae) plus prévalent en cas de pyélonéphrite (39%) qu'en cas de bactériurie asymptomatique (0%,  $p = 0.002$ )



Pistes vaccinales préventives ?  
Outil de screening : qui traiter ?

■ Acute pyelonephritis  
■ Asymptomatic bacteriuria



# Host and microbial factors in kidney transplant recipients with *Escherichia coli* acute pyelonephritis or asymptomatic bacteriuria: a prospective study using whole-genome sequencing

Julien Coussement <sup>1,2</sup>, Maria Angeles Argudín<sup>1</sup>, Amélie Heinrichs<sup>1</sup>, Judith Racapé<sup>3,4</sup>, Ricardo de Mendonça<sup>1</sup>, Louise Nienhaus<sup>1</sup>, Alain Le Moine<sup>4</sup>, Sandrine Roisin<sup>1</sup>, Magali Dodémont<sup>1</sup>, Frédérique Jacobs<sup>2</sup>, Daniel Abramowicz<sup>5</sup>, Brian D. Johnston<sup>6</sup> **James R. Johnson<sup>6,\*</sup>** and Olivier Denis<sup>1,7,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, CUB-Hôpital Erasme, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium, <sup>2</sup>Division of Infectious Diseases, CUB-Hôpital Erasme, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium, <sup>3</sup>Research Center “Biostatistiques, Epidémiologie et Recherche Clinique”, École de Santé Publique, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium, <sup>4</sup>Department of Nephrology, CUB-Hôpital Erasme, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium, <sup>5</sup>Department of Nephrology-Hypertension, Universitair Ziekenhuis Antwerpen, Antwerp University, Antwerpen, Belgium, <sup>6</sup>Minneapolis Veterans Health Care System, Minneapolis, MN, USA and <sup>7</sup>École de Santé Publique, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium



# Et le RéJIF ?

## Le RéJIF, c'est aussi

**SPILF**

SOCIÉTÉ DE PATHOLOGIE INFECTIEUSE  
DE LANGUE FRANÇAISE

**CMIT**

COLLÈGE DES UNIVERSITAIRES  
DE MALADIES INFECTIEUSES ET TROPICALES

**SNMInf**

SYNDICAT NATIONAL  
DES MÉDECINS INFECTIOLOGUES

**RéJIF**

Actualités

Bureau

Bourses

Mobilité

Europe

Toolbox

Vaccination et Prévention >

COREB >

Recherche >

Infectio-gériatrie >

Bon usage ATB >

**RéJIF** v

Actualités

## RéJIF

### Qu'est ce que le RéJIF ?

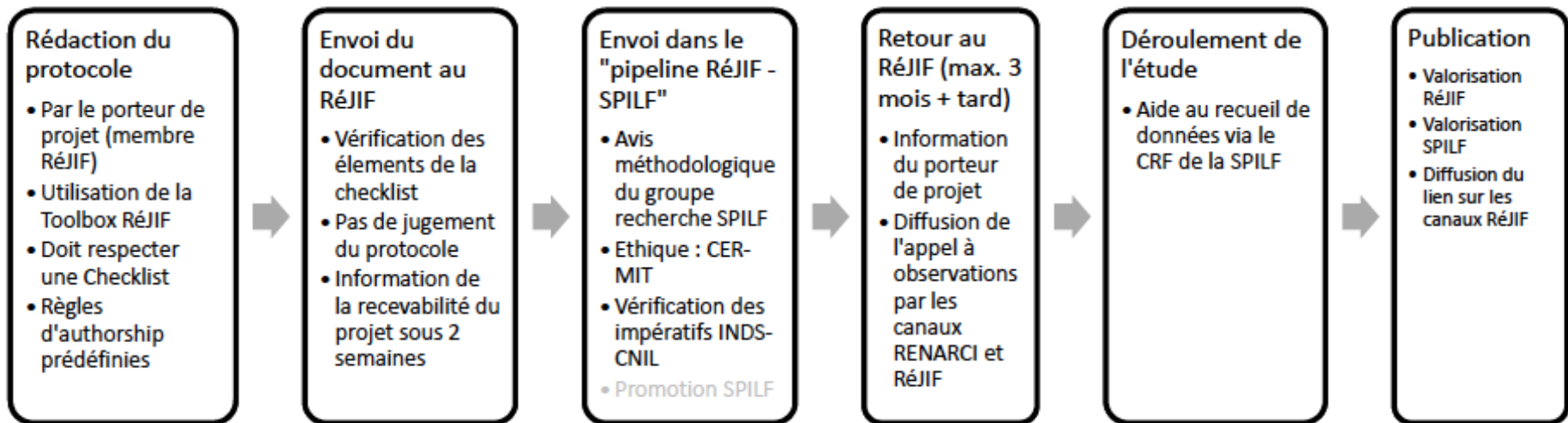
Le Réseau des Jeunes Infectiologues Français est un groupe de travail de la SPILF créé en juin 2016 à la demande des internes. Nous comptons plus de 300 membres et recevons un soutien fort de la part de la SPILF et du CMIT. Un renouvellement partiel du comité de pilotage a lieu tous les 2 ans et le dernier comité de pilotage a été élu en mai 2018.

### Objectifs

- Édérer les infectiologues en formation
- Favoriser et communiquer sur les offres de formation et de recherche
- Favoriser l'accès aux JNI et organiser une session spécifique pour les jeunes
- Favoriser la mobilité des jeunes infectiologues à travers des échanges internationaux

# Et le RÉJIF ?

## Le Pipeline RÉJIF





# Et le RéJIF ?

## Toolbox RéJIF

Infectio-gériatrie >

Bon usage ATB >

**RéJIF** v

Actualités

Bureau

Bourses

Mobilité

Europe

**Toolbox**



ORGANISER SA PROPRE VEILLE BIBLIOGRAPHIQUE



LA THESE DE SCIENCES AVANT LE CLINICAT : COMMENT FAIRE ?

Guides recherche clinique



LES DÉMARCHES RÉGLEMENTAIRES POUR LA RECHERCHE



GUIDE D'AIDE À LA SOUMISSION D'UN ARTICLE SCIENTIFIQUE

Guides de la BIU Santé de l'Université Paris Descartes



GÉRER SES RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES AVEC ZOTERO



EVIDENCE BASED MEDICINE ET UTILISATION DE LA COCHRANE LIBRARY



UTILISER PUBMED - NIVEAU 1

# La recherche en microbiologie...

---

- Partir d'une question pertinente et bien formulée (protocole +++)
- Choix de l'équipe : via un service clinique ? Profiter du stage de labo ? Via une question spécifique posée ?
- Le droit de changer de direction
- Associer vos questions cliniques et fondamentales +++
- Financement... S'y prendre à l'avance !
- Ne pas hésiter à contacter des « experts » : co-encadrements ? séjour de formation ? Conseils ?
- Le droit/devoir à la trans-disciplinarité : microbio, infectieux, épidémiologiste, transplantateurs, hémato, bioinformaticien, pharmacien, .....
- Pensez au RÉJIF +++

# Whole genome sequencing

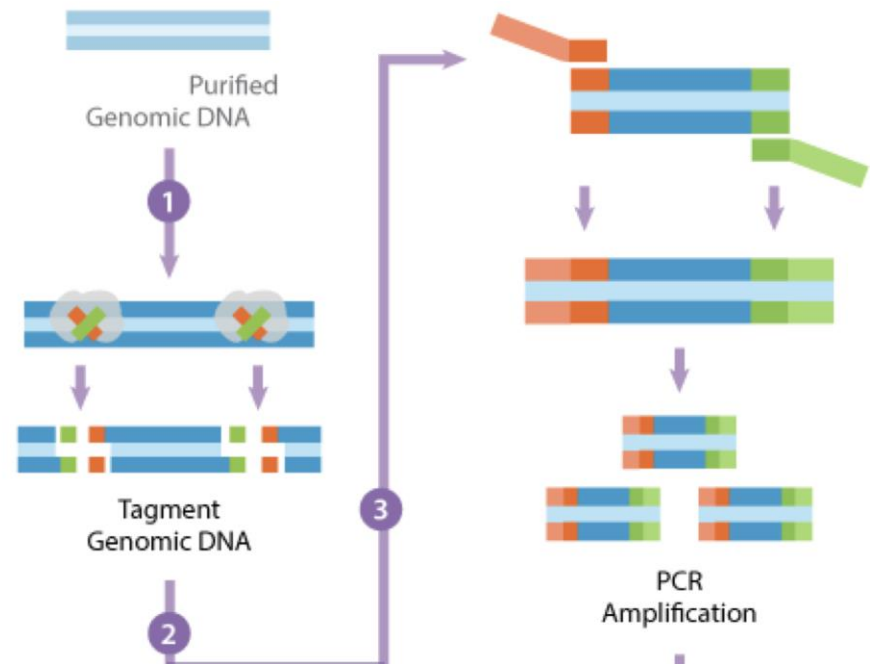
## Préparation de la librairie (Nextera XT DNA Library Preparation Kit):

Extraction de l'ADN

Fragmentation de l'ADN (par tagmentation)

Mise en place d'« adapters » sur les fragments

Amplification



# Whole genome sequencing

## Préparation de la librairie (Nextera XT DNA Library Preparation Kit):

Extraction de l'ADN

Fragmentation de l'ADN (par tagmentation)

Mise en place d'« adapters » sur les fragments

Amplification

## Séquençage (Illumina MiSeq):

Couverture  $\pm 50$  (chaque nucléotide est séquencé 50 fois)

Obtention de reads (200 - 250 bp)



# Whole genome sequencing

## Préparation de la librairie (Nextera XT DNA Library Preparation Kit):

Extraction de l'ADN

Fragmentation de l'ADN (par tagmentation)

Mise en place d'« adaptors » sur les fragments

Amplification

## Séquençage (Illumina MiSeq):

Couverture  $\pm 50$  (chaque nucléotide est séquencé 50 fois)

Obtention de reads (200 - 250 bp)

## Assemblage *de novo* des reads via SPAdes -> contigs:

