

**Rôle du quorum sensing dans les  
pneumonies à  
*Pseudomonas aeruginosa*  
acquises sous ventilation mécanique**

Christian Van Delden  
Médecin adjoint agrégé  
Service des Maladies Infectieuses  
Hôpitaux Universitaires de Genève, Suisse  
[Christian.vandelden@hcuge.ch](mailto:Christian.vandelden@hcuge.ch)

# Pneumonies à *P. aeruginosa* acquises sous ventilation mécanique

- Les faits:
  - Une colonisation respiratoire précède une pneumonie dans la plupart des cas
  - Le taux de colonisation des patients sous ventilation mécanique par *P. aeruginosa* est variable selon les institutions
  - Le risque de colonisation augmente avec :
    - Durée de la ventilation mécanique
    - Exposition à des traitements antibiotiques

Abstract MoP187, *ECCMID 2000*, Stockholm  
*Intensive Care Med*, 1999;25: 1072  
*Am J Respir Crit Care Med*, 2002;165:867

# Pneumonies à *P. aeruginosa* acquises sous ventilation mécanique

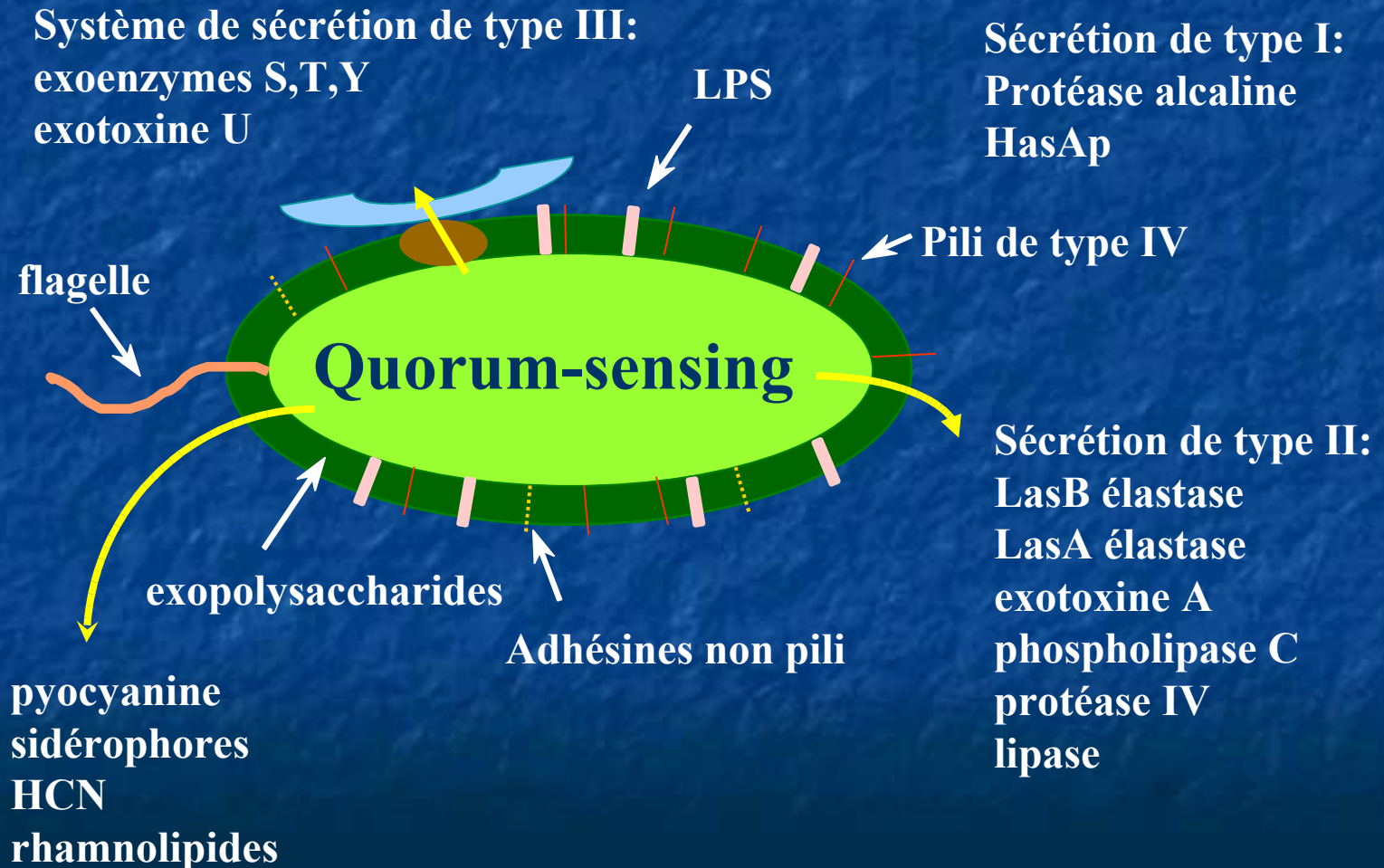
- Les faits:
  - Restent fréquentes (3ème cause des VAP à Gram -)
  - Compliquent entre 10-15% des colonisations
  - Traitement difficile en raison des résistances intrinsèques et acquises
  - Mortalité élevée (30-40%)

*JAMA*, 1995;274:639

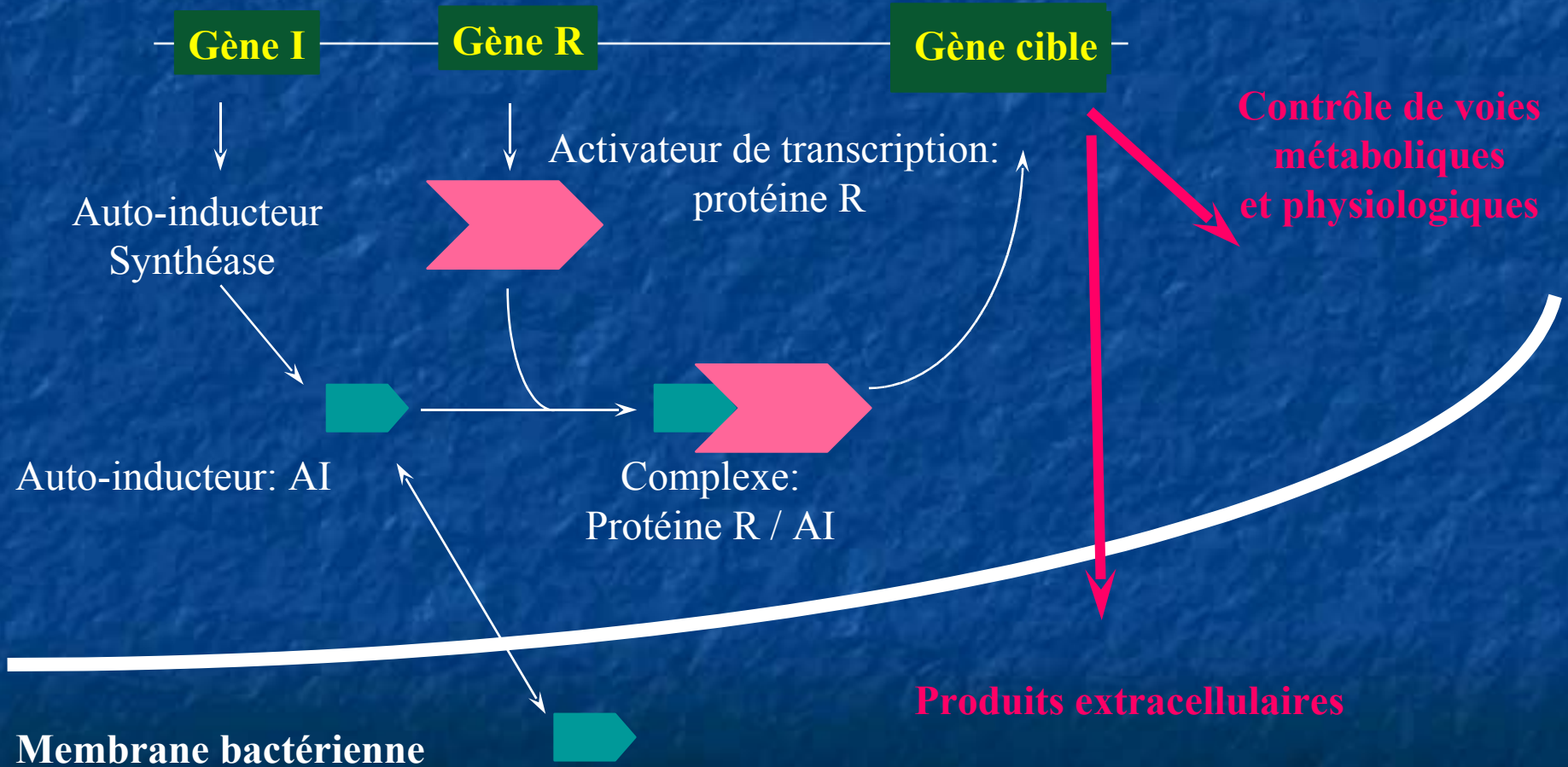
# Pathogénèse des pneumonies à *P. aeruginosa* acquises sous ventilation mécanique

- Beaucoup de questions ouvertes:
  - Facteurs favorisant l'évolution de la colonisation à la pneumonie ?
    - Facteurs de l'hôte ?
    - Facteurs microbiologiques ?
      - Rôle du quorum-sensing ?
      - Rôle du système de sécrétion de type III ?

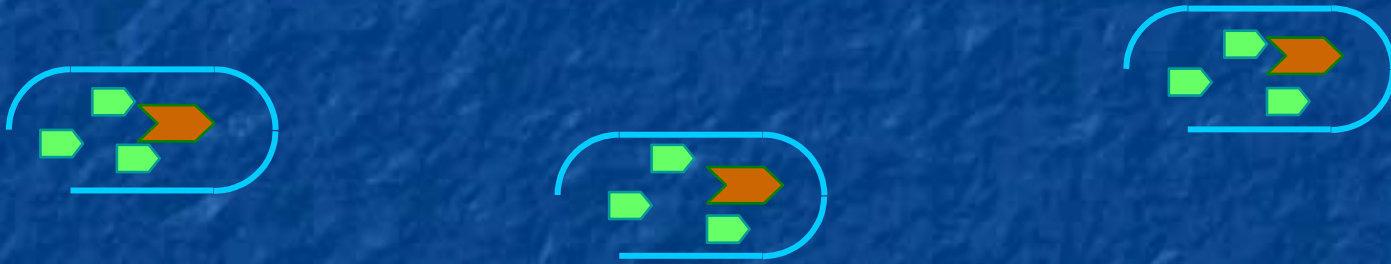
# Facteurs de virulence de *P. aeruginosa*



# Quorum-sensing: un mécanisme de contrôle de la transcription



# Quorum-sensing: un système de coordination entre bactéries



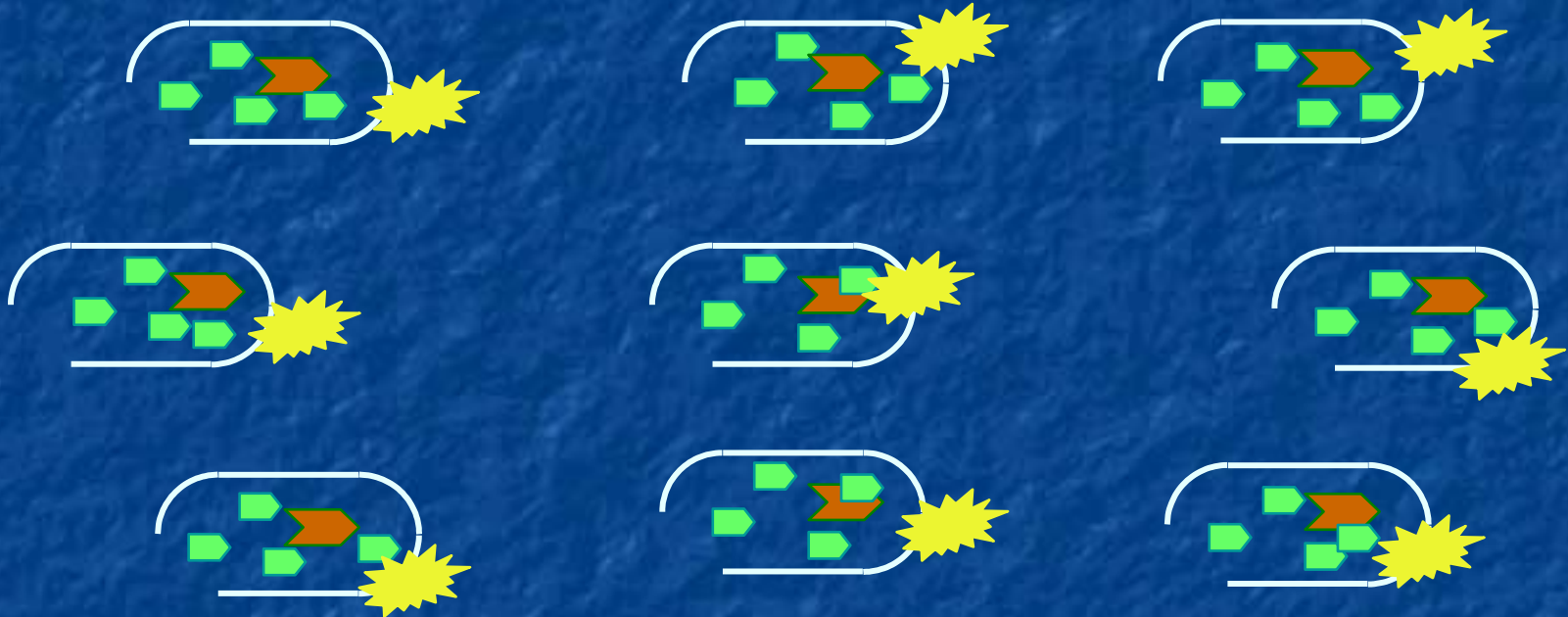
**Production d'auto-inducteur basale**

**Diffusion des auto-inducteurs dans l'espace extracellulaire**



**Pas d'activation de la transcription**

# Quorum-sensing: un système de coordination entre bactéries



Augmentation de la concentration d'auto-inducteurs

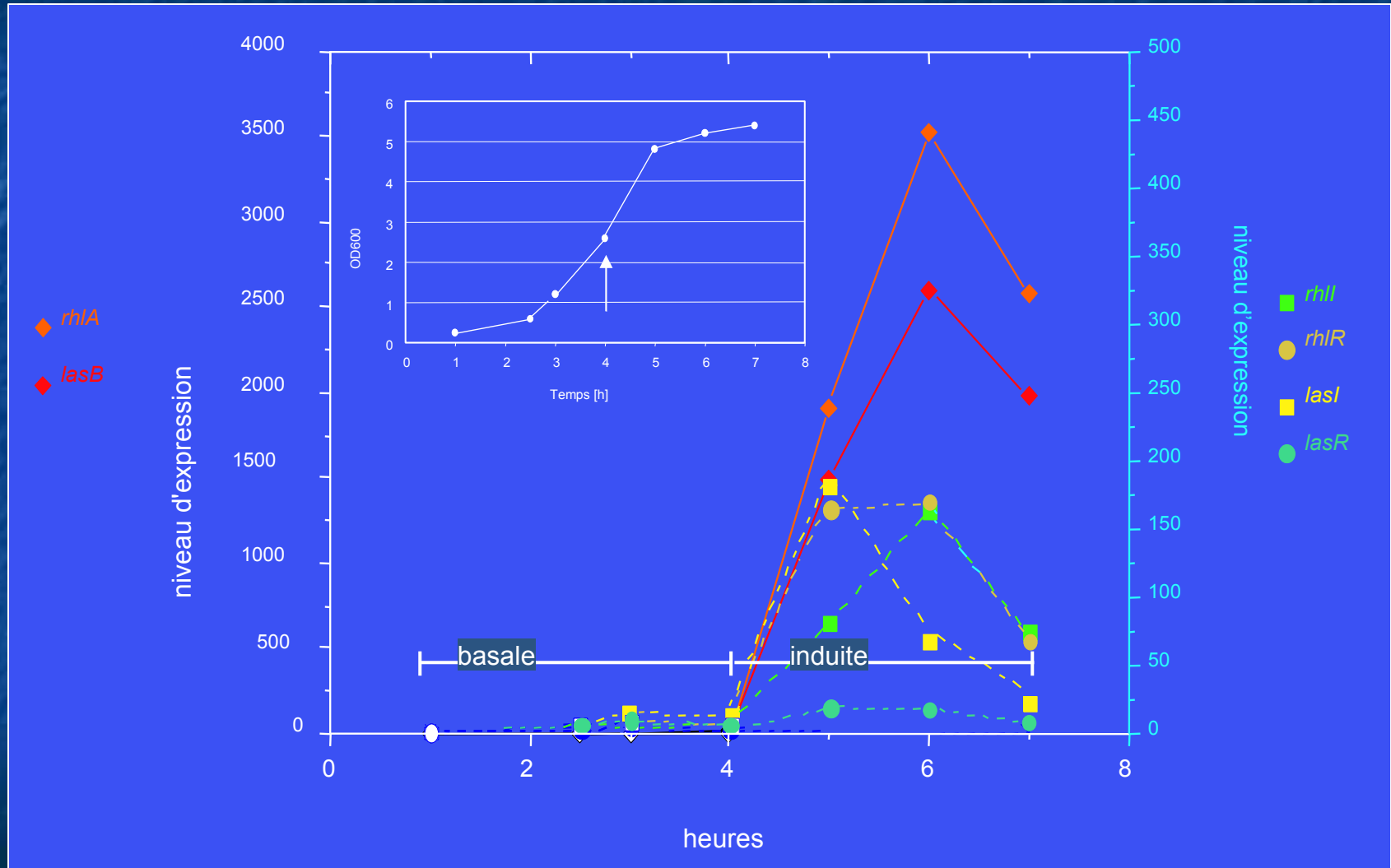
Liaison de l'auto-inducteur à la protéine R



**Transcription coordonnée des gènes cibles**



# L'induction de l'expression par le quorum-sensing



# La régulation par le quorum-sensing chez *P. aeruginosa*

- Analyses par micro-array montrent que le quorum-sensing:
  - Régule entre 6 à 10% du génome de *P. aeruginosa*
  - Contrôle non seulement des gènes de virulence mais également des gènes essentiels au métabolisme bactérien (réplication ADN, transcription et traduction, division cellulaire, biosynthèse des acides aminés...)
  - Contrôle des gènes essentiels au comportement de groupe (formation de biofilm)

# Le quorum-sensing est requis pour la virulence de *P. aeruginosa*

- Les mutants du quorum-sensing sont moins virulents dans :
  - Modèle de pneumonie aïgue chez souris
  - Modèle de pneumonie chronique chez rats
  - Modèle de brûlure chez souris

*Infect. Imm*, 2000;68:4331, *J. Bacteriol* 2002; 184:1132

*Microbiology*, 2001;147:1105, *Am J Respir Crit Care Med*, 2003; 167:1478

# Comparaison de phénotypes de virulence dépendants du quorum-sensing entre 270 souches bactériémiques et 50 souches colonisatrices

Virulence factor	Bacteremic	Colonizing	OR (95% CI)	P
Protease	248 (96%)	42 (76%)	7.0 (2.7-18.1)	<0.05
Elastase	240 (93%)	37 (67%)	6.2 (2.8-13.6)	<0.05
Rhamnolipid	232 (90%)	28 (51%)	8.3 (4.1-17)	<0.05
Pyocyanin	37 (14%)	5 (9%)	1.7 (0.6-5.1)	0.42

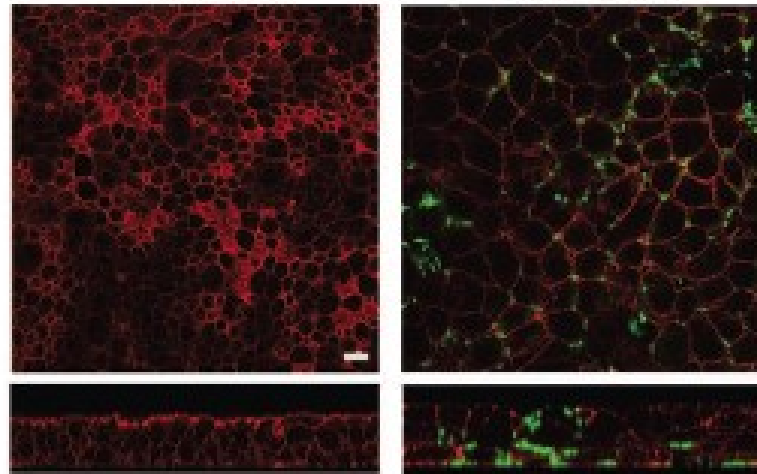
**Les souches invasives sont capables de quorum-sensing**

# Les rhamnolipides permettent l'invasion de l'épithélium respiratoire

A

PAO1 8 hr

PAO1 16 hr



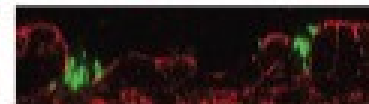
Infection 16 hr

PT531



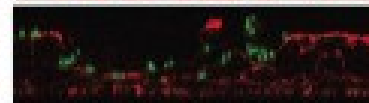
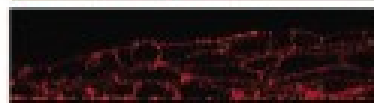
PT498

PT712



CHA

PAK



CHAexsA

*lasR/rhlR*  
*rhlA*

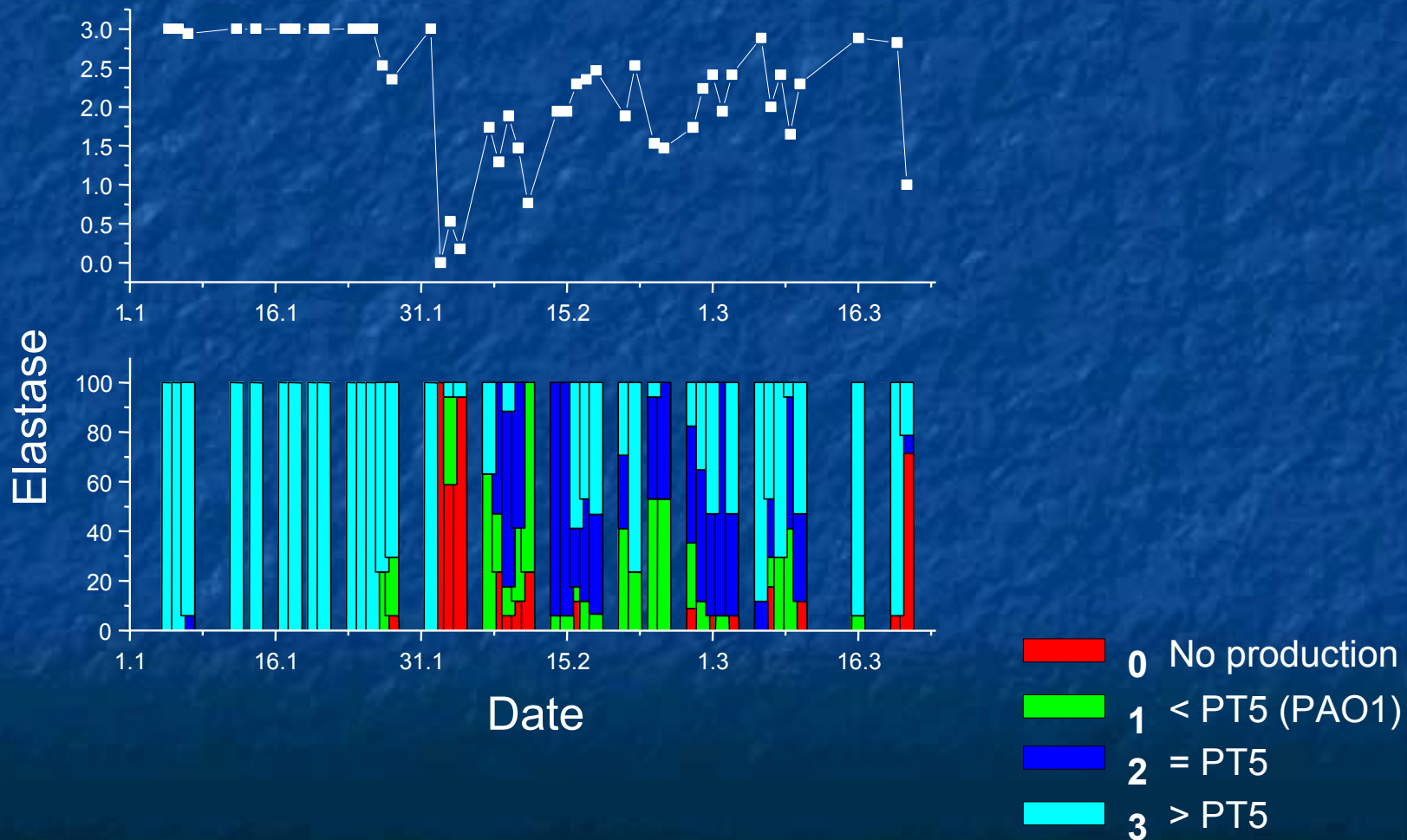
*lasR*

# Caractérisation de 442 souches de *P. aeruginosa* de 13 patients en phase précoce de colonisation (48 heures)

- 89 % produisent de l'élastase
- 82 % produisent des rhamnolipides
- 9 génotypes
- les souches quorum-sensing déficientes sont des mutants *lasR*

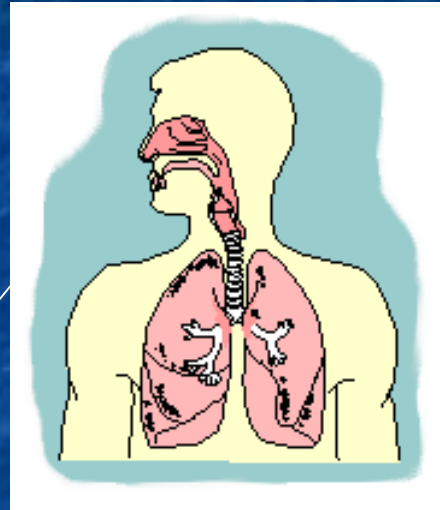
**La majorité des souches colonisant initialement des patients intubés sont capables de quorum-sensing**

# En cours de colonisation des mutants du quorum-sensing apparaissent



# Analyses « *in patient* » versus *in vitro* sur des aspirations trachéales de patients intubés

*In patient*



Isolation directe des ARNm et  
des auto-inducteurs

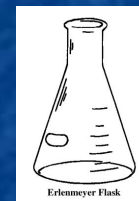
Expression des gènes et  
quantification des auto-inducteurs

*In vitro*



Bactéries  
isolées

Croissance *in vitro* dans un  
milieu de culture



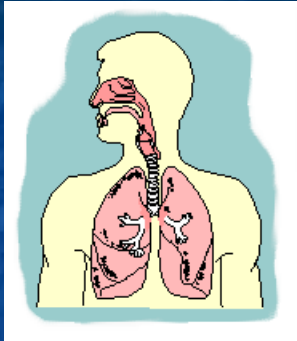
Phénotypes

Extraction ARNm

Expression des gènes



# Analyses « *in patient* » dans les aspirations trachéales



Aspirations trachéales d'un patient intubé colonisé par *P. aeruginosa*



homogénéisation

ADN génomique

ARN total

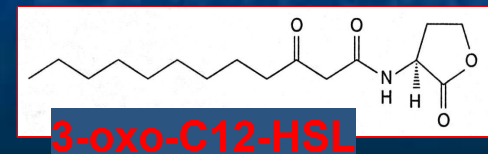
Extraction par acétate d'éthyle

ADNc

PCR quantitative

CFU

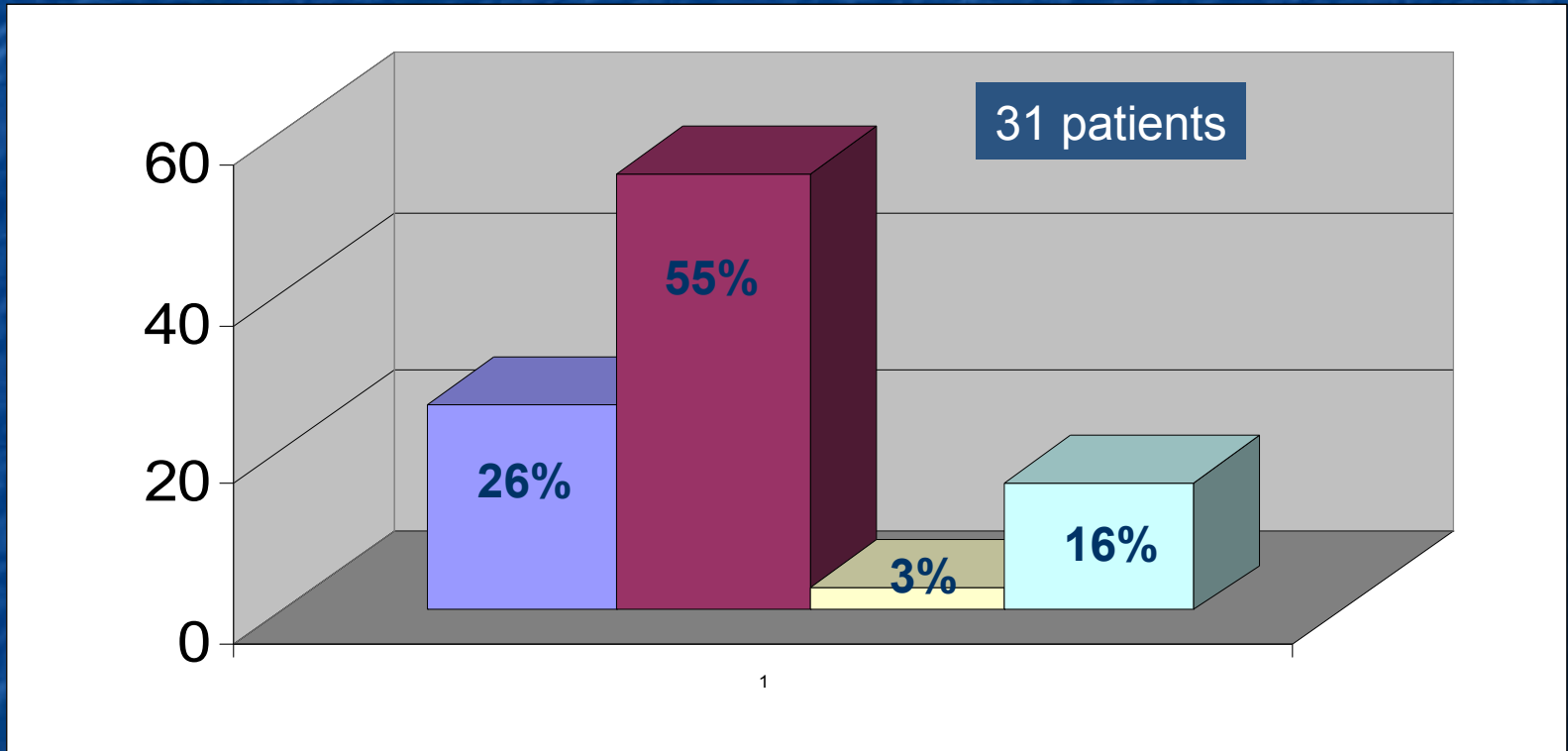
Expression des gènes



# Etude longitudinale de suivi de patients

- 31 patients intubés colonisés par *P. aeruginosa*
  - temps d'observation moyens: 6 jours (3 à 20 jours)
  - aspirations trachéales journalières
    - Isolement d'une souche de *P. aeruginosa*
      - Génotypes et phénotypes de virulence
      - Total de 300 souches
    - Congélation sur place à -80°C
      - Extraction ADN génomique et ARNm

# Distribution des mutants quorum-sensing



*lasR*  
*rhIR*

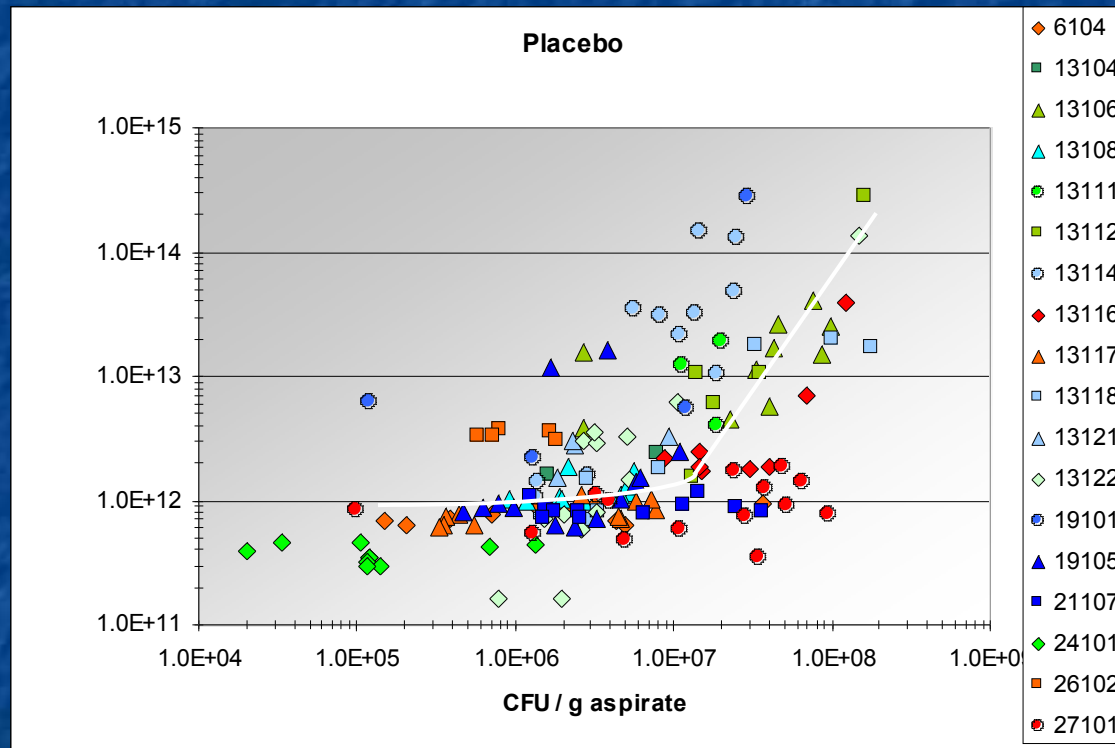
wt  
wt

mut  
wt

wt  
mut

mut  
mut

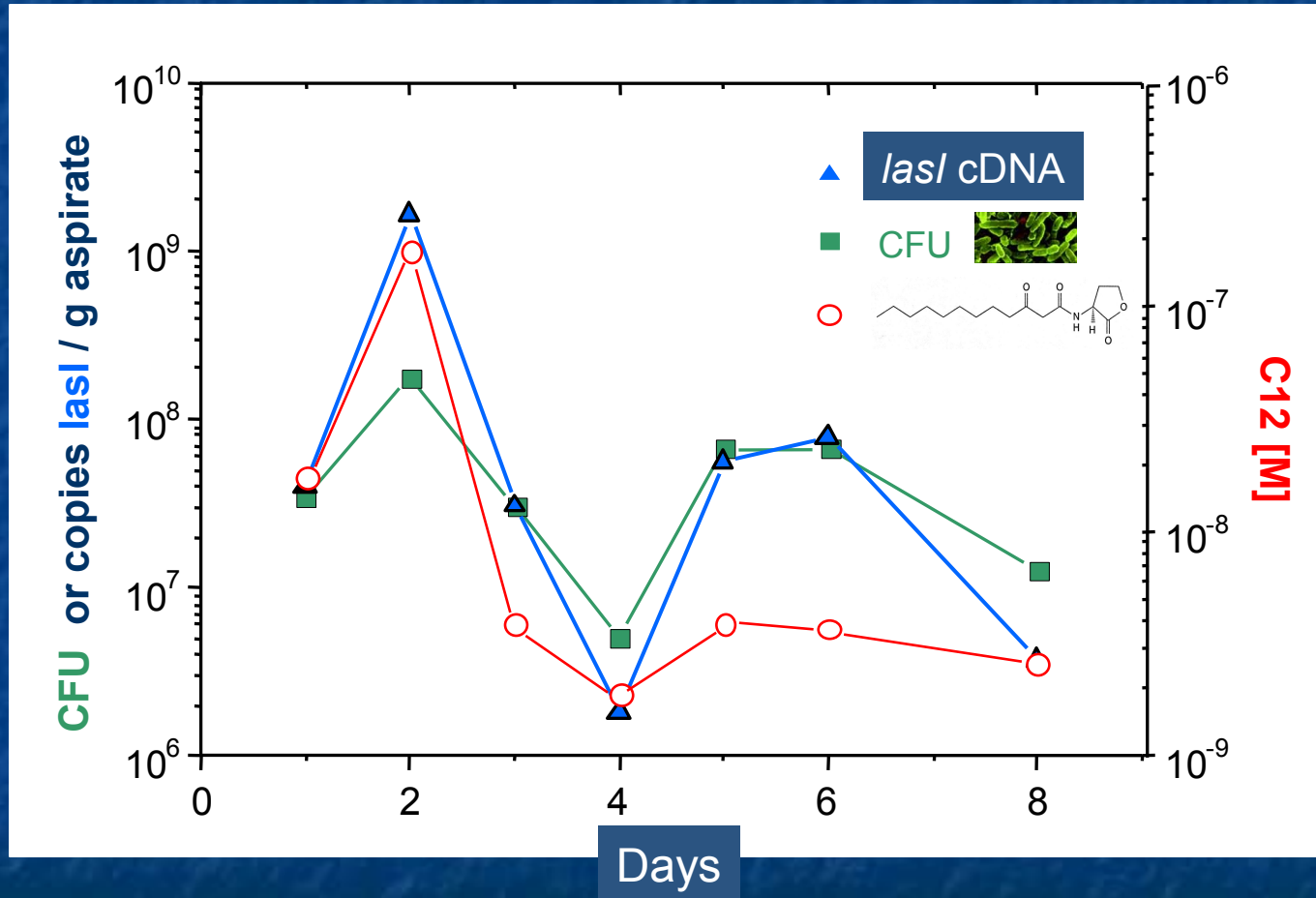
# Détection du 3-oxo-C12-HSL dans les aspirations trachéales



Charge bactérienne (CFU / g d'aspiration)

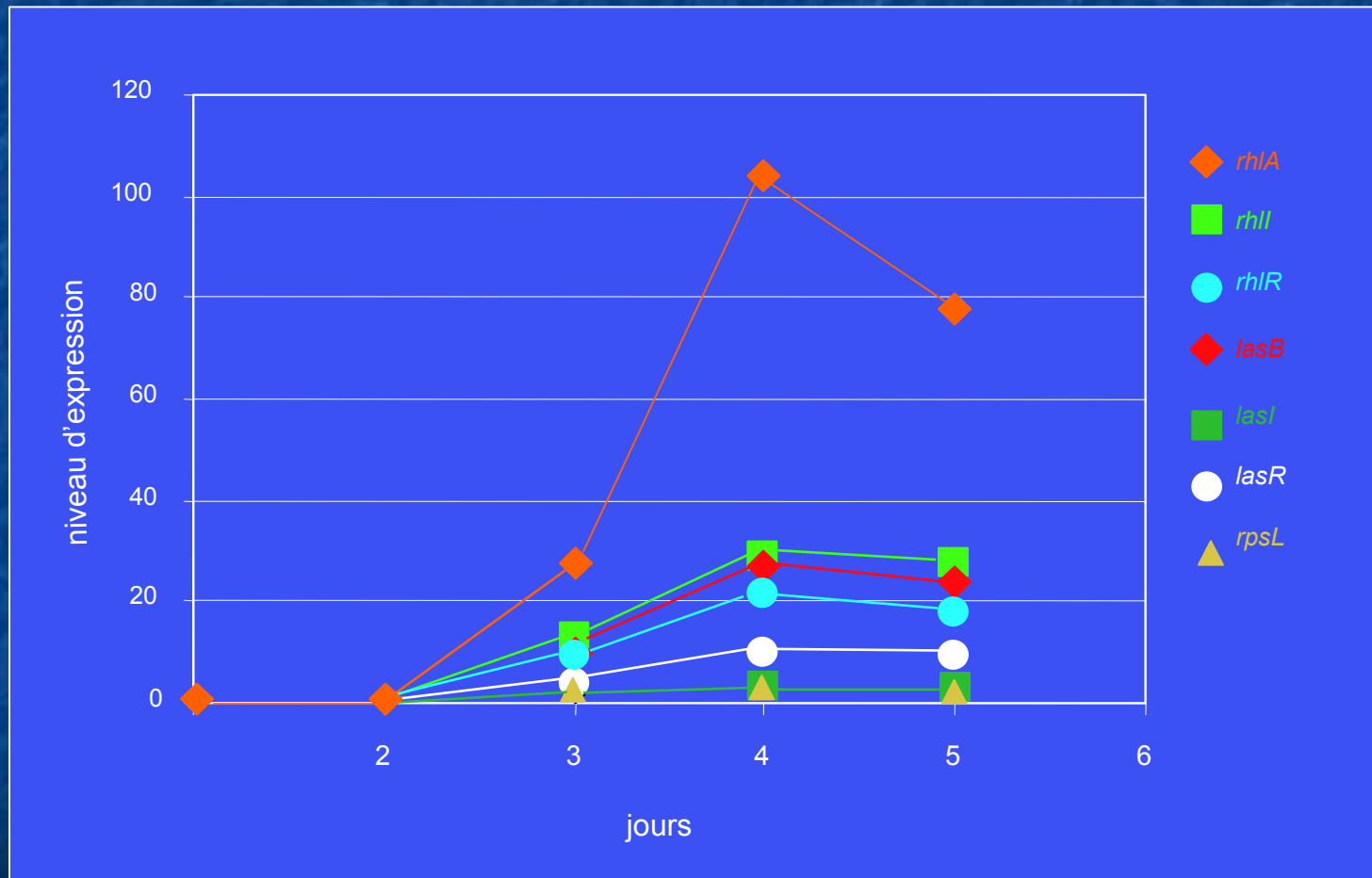
Le 3-oxo-C12-HSL augmente avec une charge bactérienne  $> 10^7$

# Corrélations entre l'expression de *lasI*, concentration de 3-oxo-C12-HSL et charge bactérienne



Le 3-oxo-C12-HSL ne s'accumule pas « *in patient* »

# Le quorum-sensing « *in patient* »



# Conclusions

- La plupart des souches colonisant initialement des patients intubés sont capables de quorum-sensing
- Chez de nombreux patients, ces souches sont progressivement remplacées par des mutants du quorum-sensing
- Le quorum-sensing « *in patient* » existe, mais est-il nécessaire pour la pathogénèse des pneumonies acquises sous ventilation mécanique?

# Remerciements

Thilo Köhler

Rachel Comte\_

Paul Woods

Jean Luc Dumas

Anita Reinhardt

Karl Perron

Anbics Corporation

FNRS

