Nantes Université

Pôle Santé
UFR des Sciences pharmaceutiques et biologiques

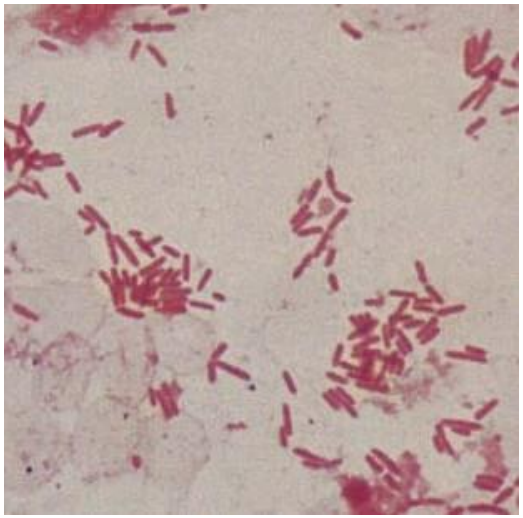
Physiopathologie des infections à *Pseudomonas aeruginosa*

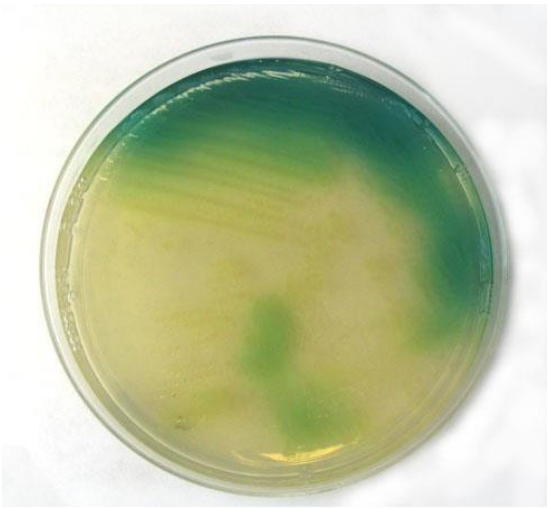
2024-2025

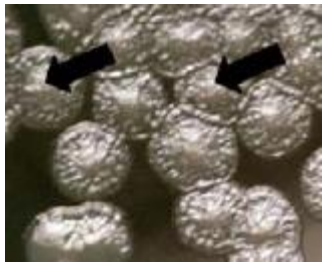
Dr Lise CREMET - MCU-PH
Service de Bactériologie - CHU de Nantes
Faculté de Pharmacie de Nantes
CR2TI Equipe 6, IRS2 Nantes Biotech
lise.cremet@univ-nantes.fr
lise.cremet@chu-nantes.fr

Morphologie & caractères culturaux

- Bacille à Gram négatif mobile
- Catalase et oxydase positives
- Cultivé facilement en aérobiose
- Aspect des colonies : «large», «small» ou muqueuses
- Dégage une odeur aromatique caractéristique
- Production de pigments (pyocyanine, pyoverdine)





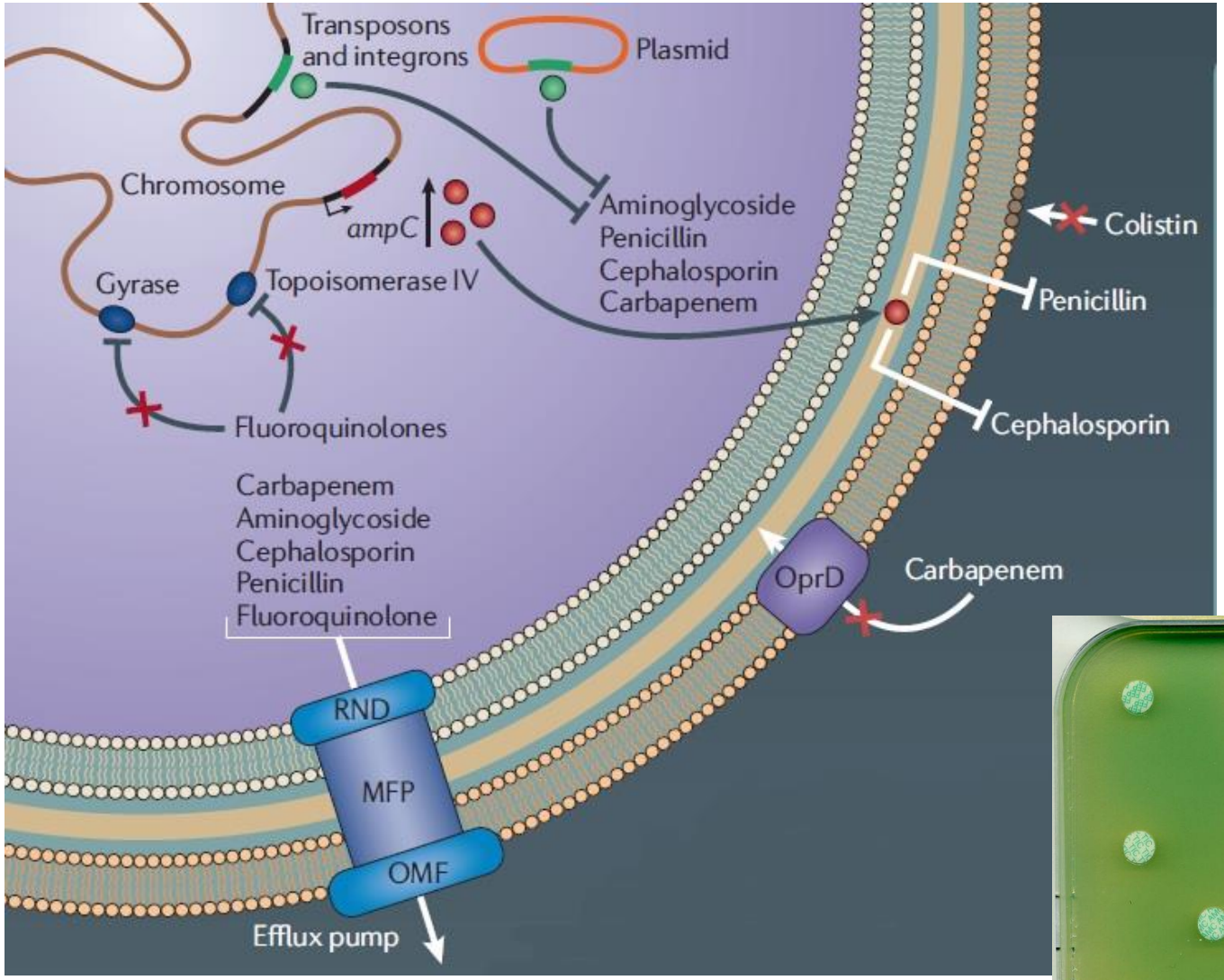


Habitat

- **Bactérie ubiquitaire**
- Réservoirs : l'environnement humide +++
- Eaux, sols, végétaux, poussières
- Éviers, nébulisateurs, appareils d'assistance respiratoire, équipements de dialyse, eau du robinet, antiseptiques, …
- Colonisation du tube digestif, du tractus respiratoire, de zones cutanées humides ou du tractus urinaire.

Pouvoir pathogène

- **Agent d'infections associées aux soins:**
- Résistance naturelle à de nombreux antibiotiques
- Peut contaminer le matériel médical (sondes, fibroscopes) ou chirurgical (instruments, matériels de prothèse)
- Peut contaminer les solutions antiseptiques, les solutés injectables, les collyres ou des produits cosmétiques
- Transmission manuportée par le personnel


Transposons and integrons
Plasmid
Chromosome
ampC
Aminoglycoside
Penicillin
Cephalosporin
Carbapenem
Colistin
Gyrase
Topoisomerase IV
Penicillin
Cephalosporin
Fluoroquinolones
Carbapenem
Aminoglycoside
Cephalosporin
Penicillin
Fluoroquinolone
OprD
Carbapenem
RND
MFP
OMF
Efflux pump

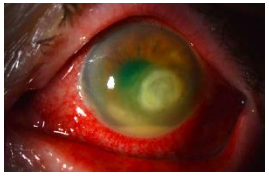
Pouvoir pathogène

- **Pathogène opportuniste :**

  Peu virulent pour l'individu normal mais agent infectieux redoutable lorsque les défenses immunitaires du sujet sont altérées

- Patients immunodéprimés
- Unités de soins intensifs,
- Unités de grands brûlés
- Services de néonatalogie
- Unités d'oncologie et hématologie
- Au cours de la mucoviscidose

Infections oculaires gravissimes (porteurs de lentilles)



Otites externes (nageurs)

Méningites (porteurs de dérivations de LCR)

Pneumopathies
(PAVM, mucoviscidose, DDB ou BPCO)

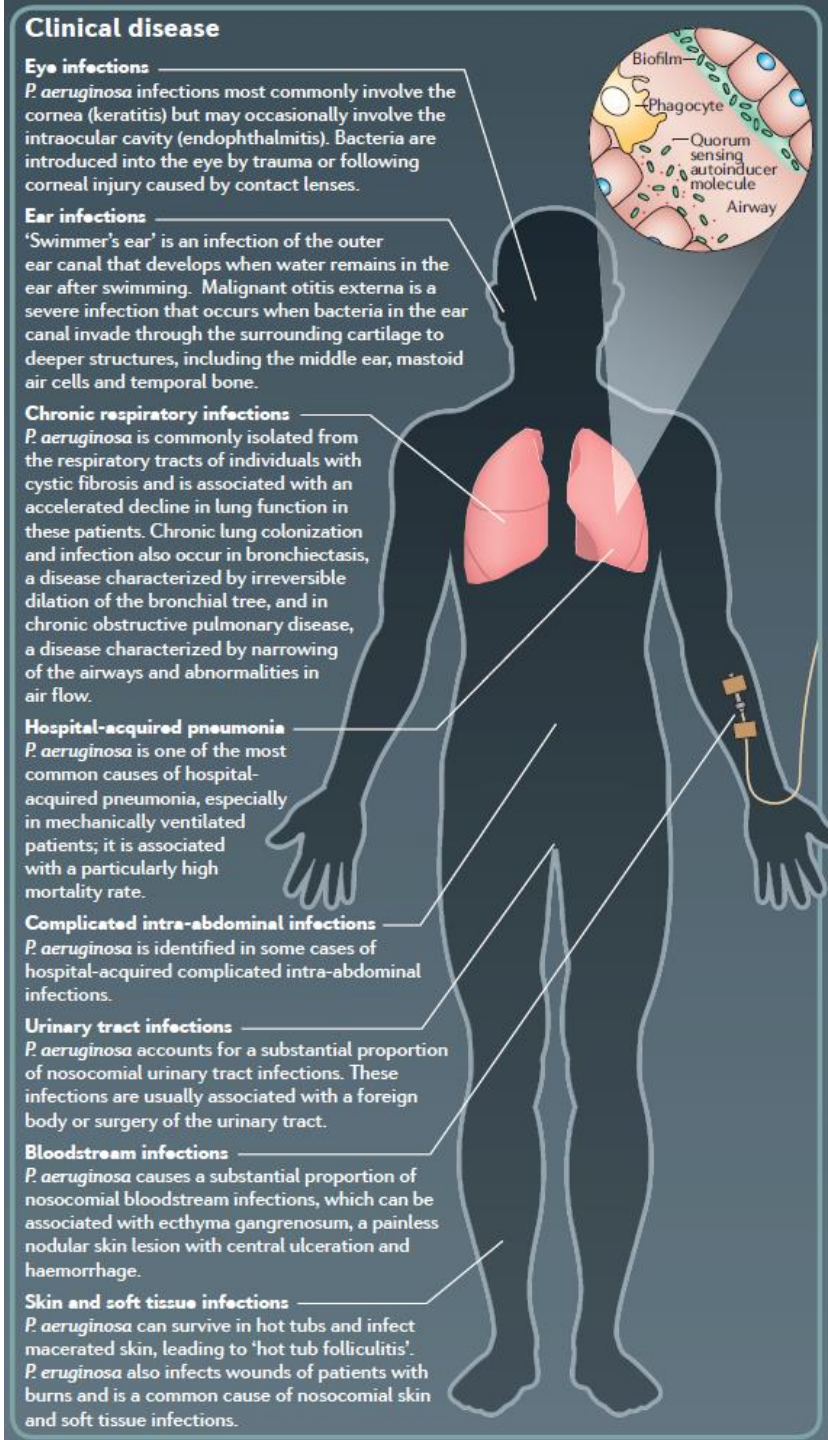
Infections intra-abdominales compliquées

Infections urinaires
(nosocomiales ou iatrogènes)

Bactériémies nosocomiales

Surinfections de plaies
chirurgicales, traumatiques, ulcéreuses, d'escarres, ou de lésions de brûlure

Infections ostéo-articulaires
(secondaires à une fracture ouverte)



Pathogénèse des infections à *P. aeruginosa*

- **3 étapes :**
  1. colonisation (adhérence, formation de biofilm)
  2. multiplication et invasion locale (enzymes extracellulaires et toxines)
  3. dissémination systémique (bactériémie, métastases septiques)

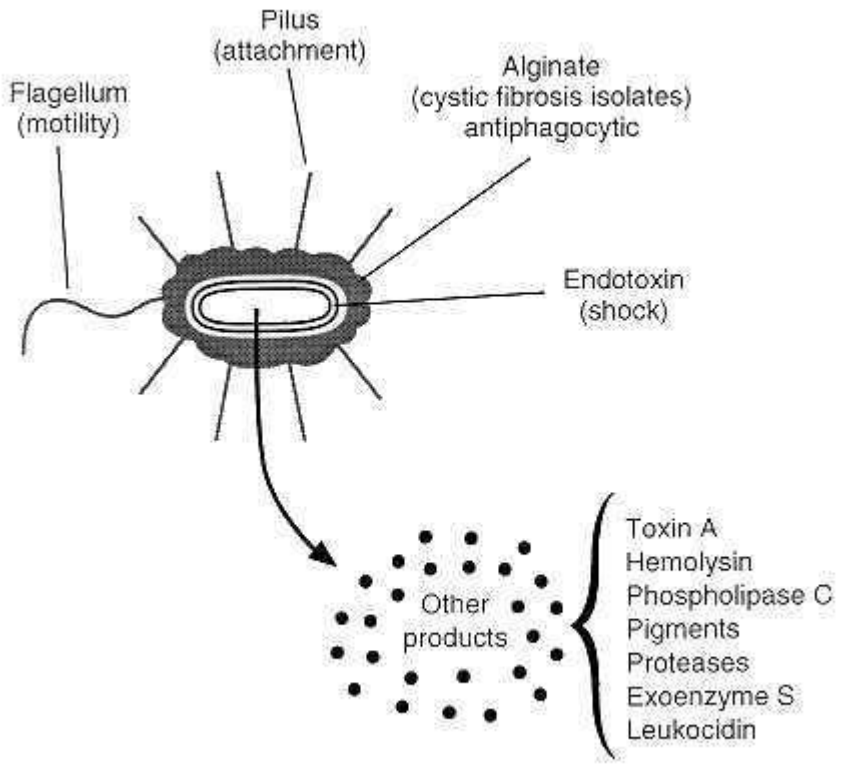
- **Infections aigues :**
- Prédominance des mécanismes d'invasion, de dégradation tissulaire et de dissémination

- **Infections chroniques (mucoviscidose) :**
- Perte de caractéristiques immunogènes, adhérence, formation de biofilm, état inflammatoire persistant

Facteurs de virulence membranaires & extracellulaires

- **Facteurs membranaires :**
  - Le flagelle
  - Les adhésines
  - L'alginate

➡ ***Adhérence de la bactérie & formation de biofilm***



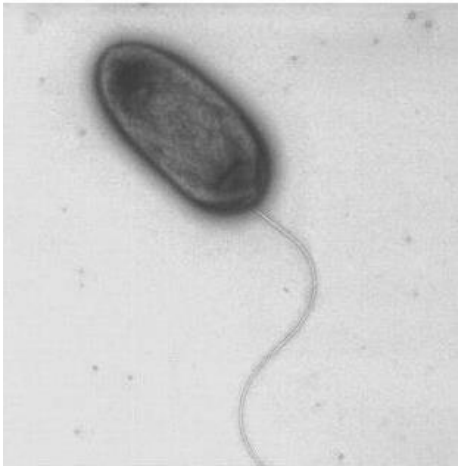
- **Facteurs extracellulaires :**
  - Les exotoxines
  - Les protéases
  - Les hémolysines
  - La phospholipase
  - Les toxines protéiques

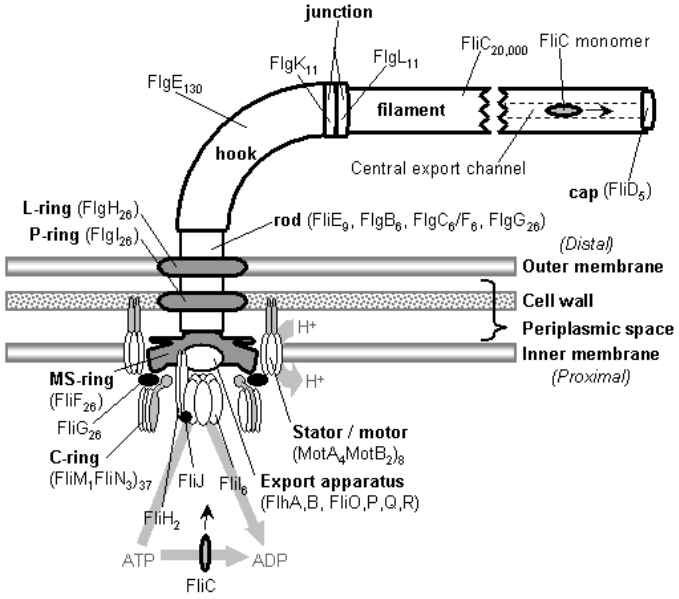
➡ ***Altération des cellules et dégradation des tissus***

Facteurs de virulence membranaires

Le flagelle

- Un seul flagelle polaire
- Flagelline : principale protéine constitutive du flagelle
- Assure la mobilité
- Impliqué dans l'adhérence aux cellules épithéliales respiratoires
- Rôle important dans le développement du biofilm bactérien
- Synthèse réprimée chez les souches mucoïdes isolées d'infections chroniques



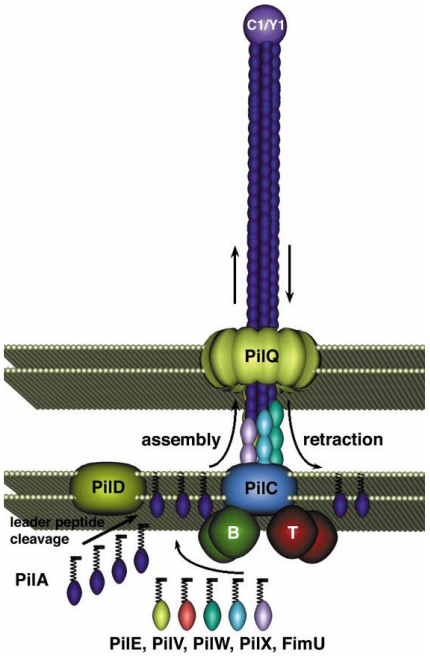


Les adhésines

- **Adhésines de type fimbriae :**
- Gènes *cupA*, *cupB & cupC*
- Essentiels pour l'adhérence aux surfaces abiotiques, comme le verre et le plastique
- Participent à la formation de biofilm

- **Pili de type IV :**
- Structure dynamique (extension-rétraction)
- Mobilité par glissement « twitching »
- Adhérence aux cellules épithéliales

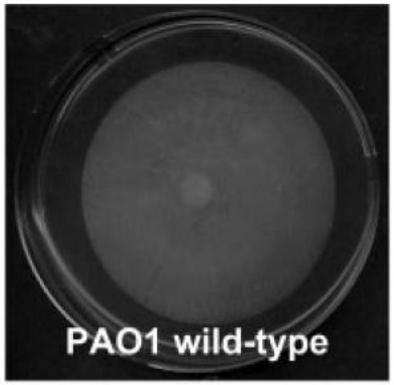
TWITCHING
(pilus retraction)



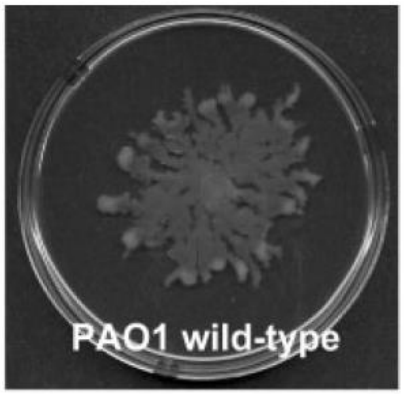
Mattick. Ann. Rev. Microbiol. 2002

Mobilité

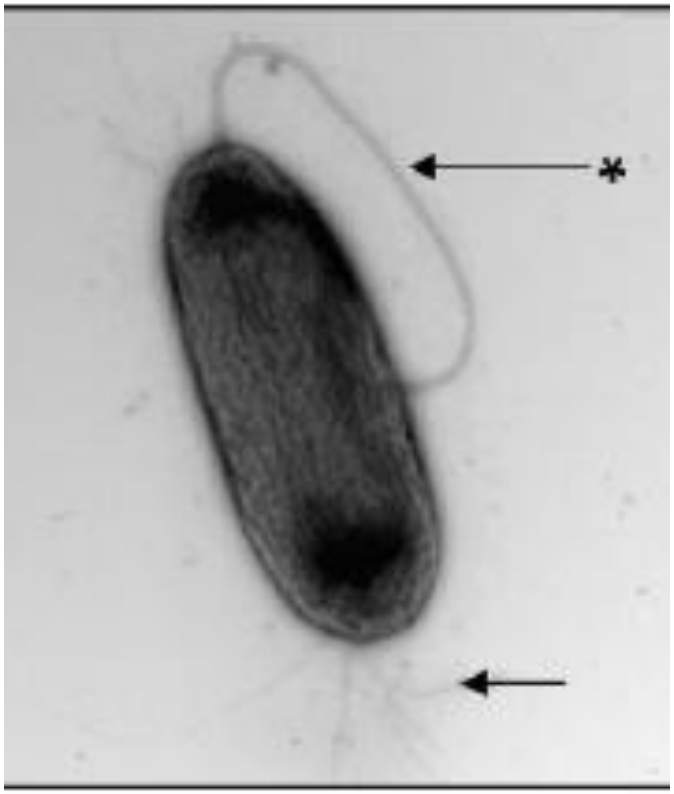
Flagelle : mobilité de type « swimming » ou « swarming »

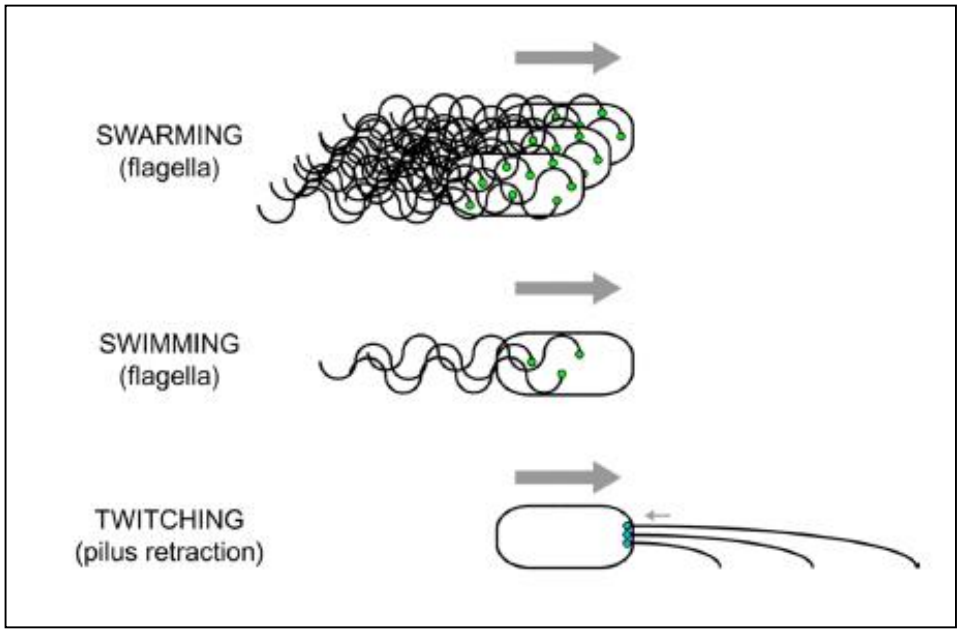


LB agar 0.3% - swimming

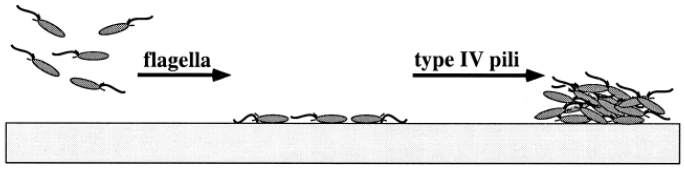


LB agar 0.5% - swarming



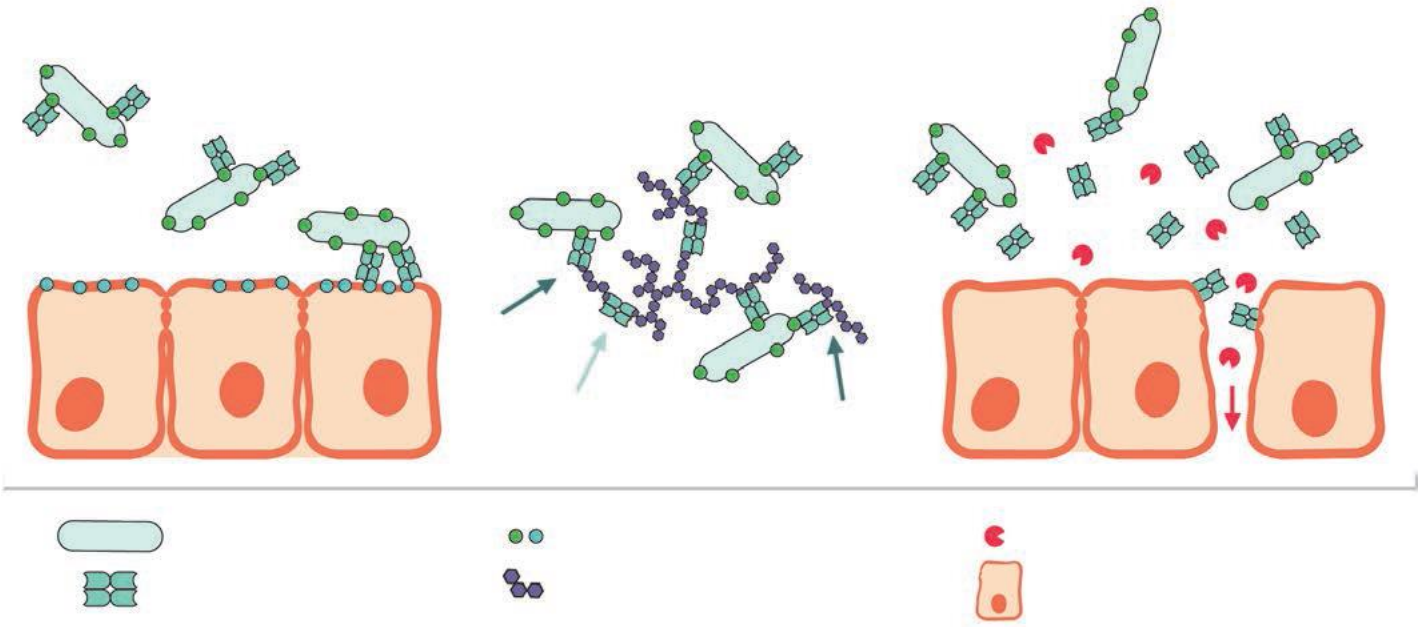


Pili de type IV : mobilité de type « twitching »



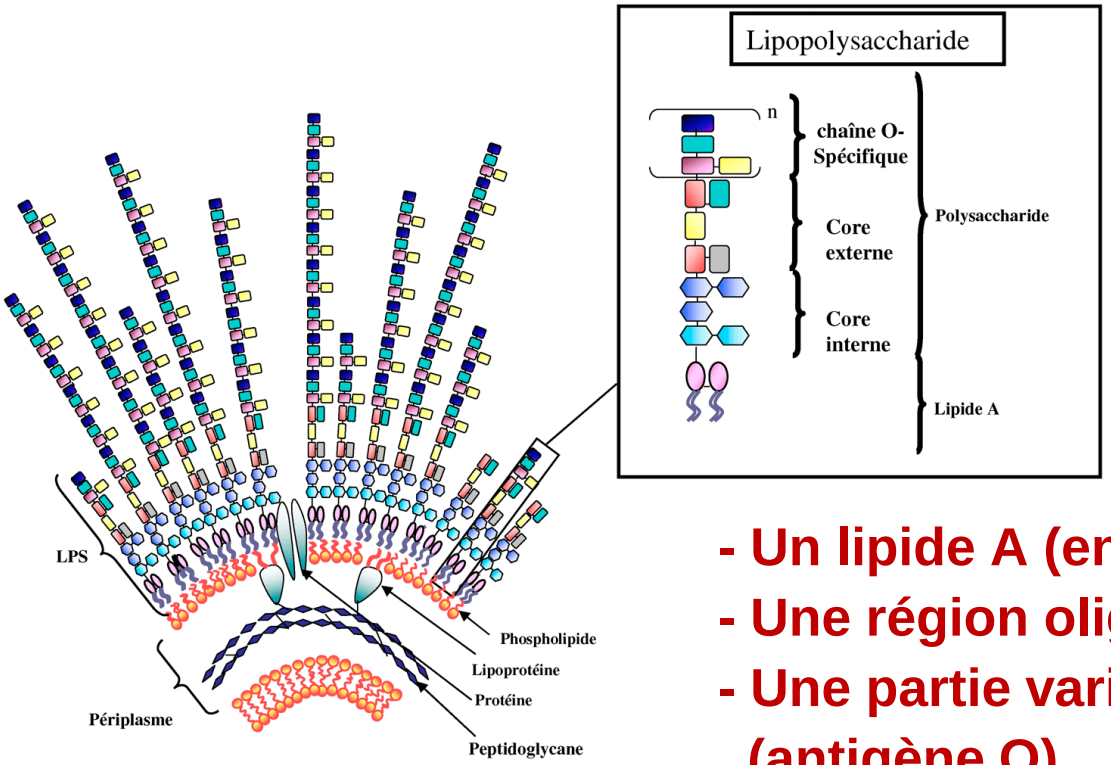
Les adhésines

- **Lectines LecA & LecB**
- Liaison à des résidus galactose (LecA) et fucose (LecB)
- Impliquées dans l'adhérence aux cellules épithéliales
- Participent à la formation de biofilm (aggrégation des bactéries)
- Entrainent des dommages tissulaires



Proposed functions of *P. aeruginosa* lectins: **adhesion to host epithelial cells**; attachment of bacterial cells to **biofilm** matrix polysaccharides and cross-linking of these polysaccharides; **disruption of epithelial barrier** function and increase in permeability for other virulence factors.

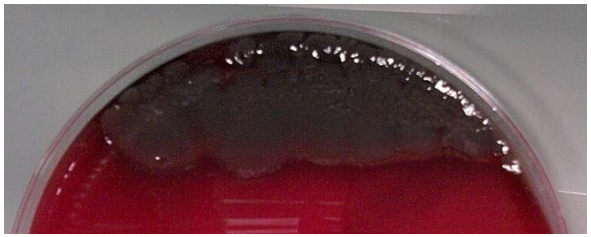
Le lipopolysaccharide (LPS)

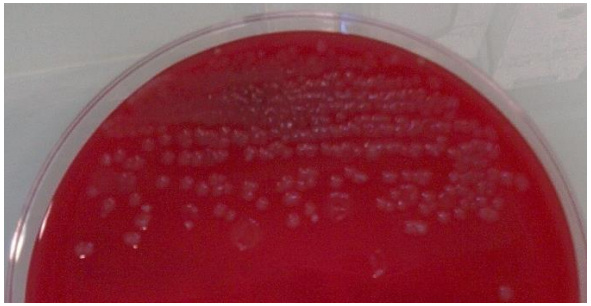


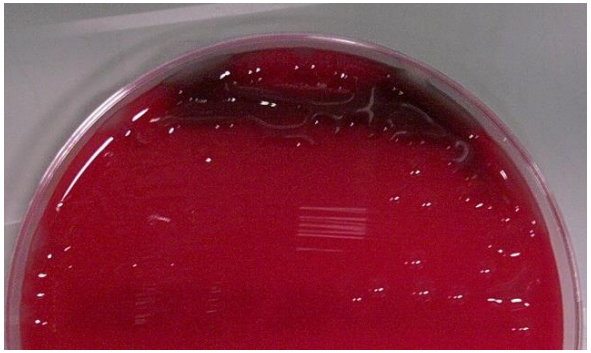
- Un lipide A (endotoxine)
- Une région oligosaccharidique (core)
- Une partie variable polysaccharidique (antigène O)

- Rôle protecteur contre la lyse provoquée par le sérum
- Impliqué dans la stimulation de la réponse inflammatoire
- Impliqué dans l'adhérence aux cellules épithéliales

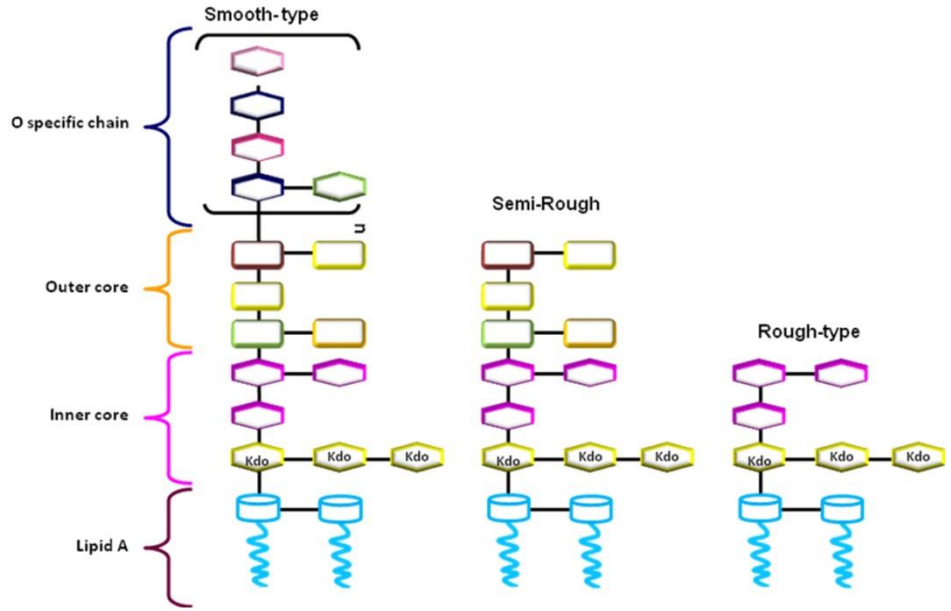
Le lipopolysaccharide (LPS)







- Deux formes structurales de LPS responsables d'un phénotype lisse ou rugueux
- Le phénotype lisse a été souvent décrit comme plus virulent



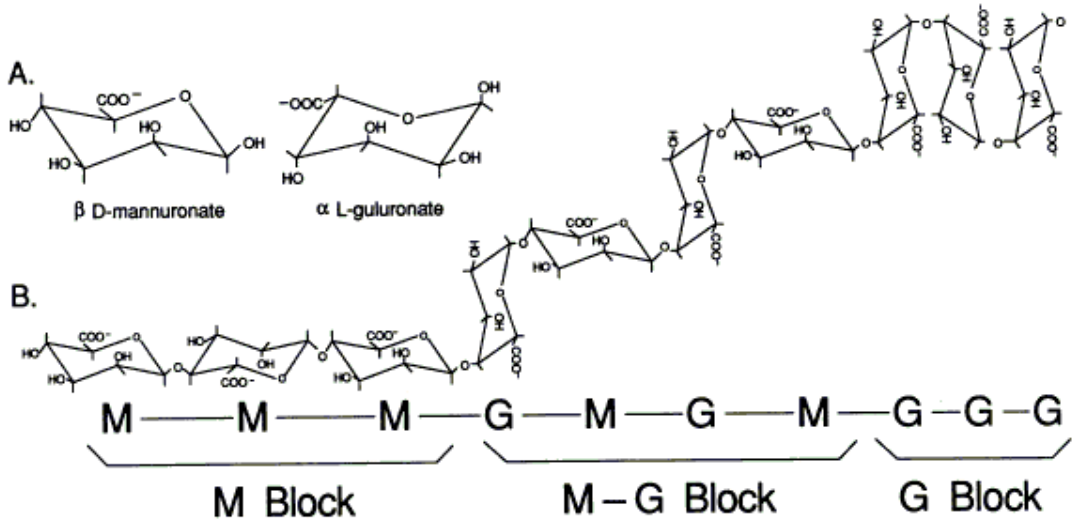
Matrice polymérique extra-cellulaire

> Impliquée dans la formation de biofilm :

- Exopolysaccharide capsulaire: alginate
- Exopolysaccharides aggregatifs: Pel, Psl

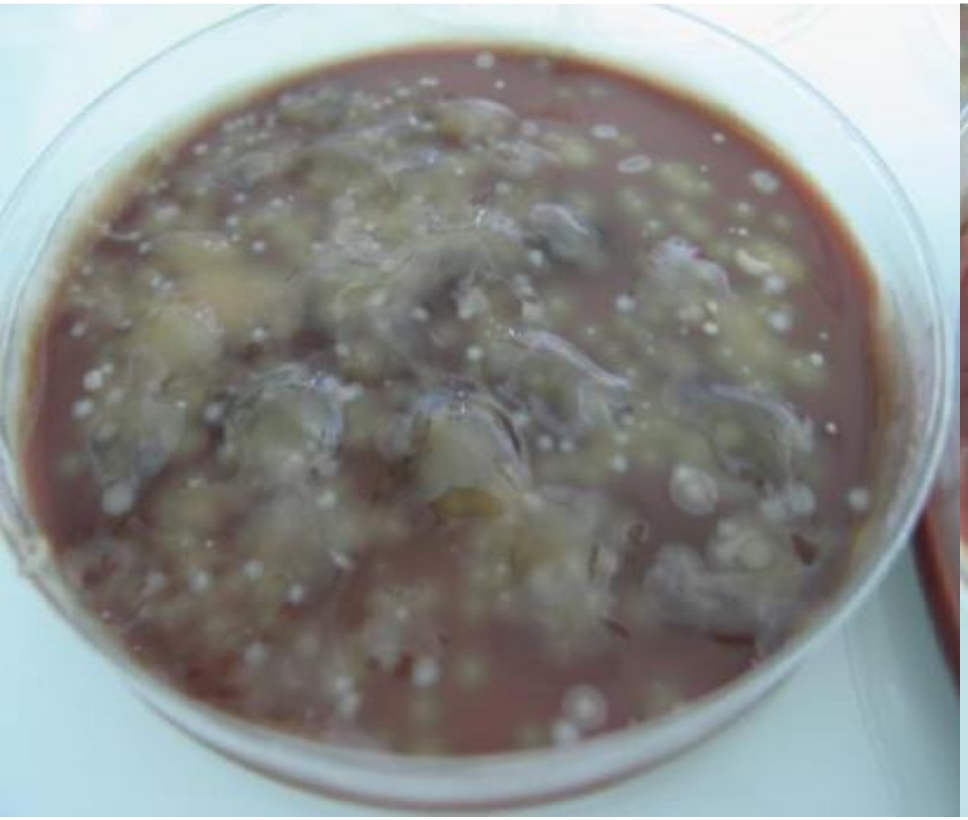
L’alginate

- Polymère linéaire d’acide D-mannuronique partiellement acétylé lié à l’acide L-guluronique
- Produit par les souches dites « muqueuses », isolées d’infections chroniques comme la mucoviscidose
- Forme une gangue polysaccharidique protectrice
- Résistance aux antibiotiques et aux défenses de l’hôte
- Obstruction des voies aériennes



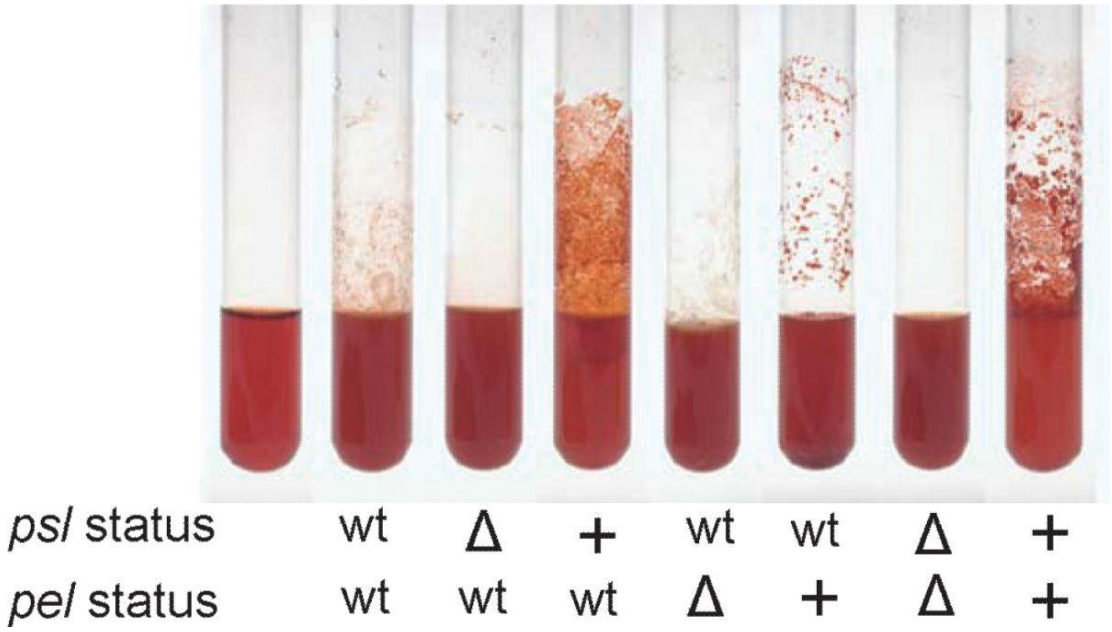
P. aeruginosa muqueux

> Phénotype lié à une hyperproduction d'alginate



Exopolysaccharides aggregatifs: Pel, Psl

- Rôle dans adhérence initiale aux surfaces biotiques ou abiotiques, rôle structural (stabilité et compaction du biofilm)

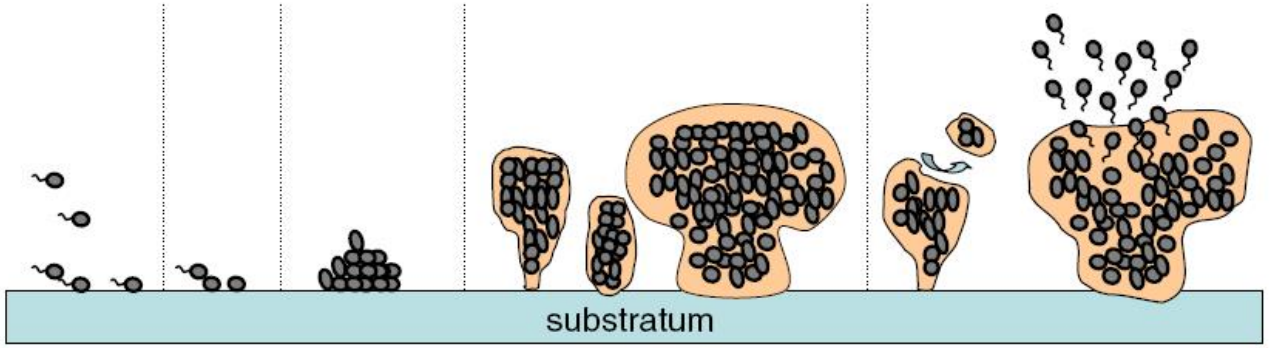


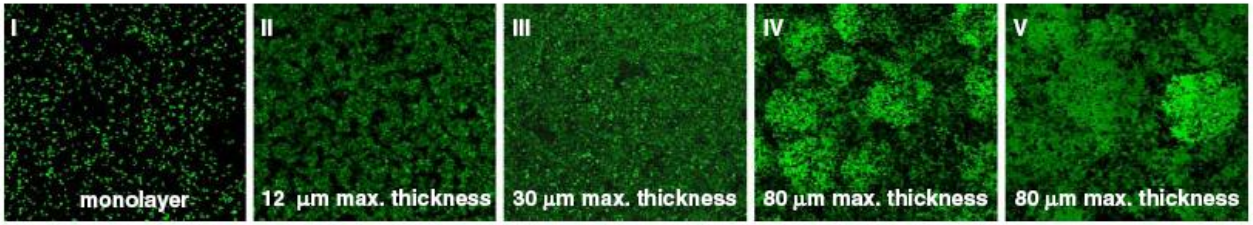
P. aeruginosa PAO1 strains with wild type, inactivated, or overexpressed status of Psl and Pel were grown in culture tubes containing Congo red to observe aggregation.

Formation de biofilms

- Le biofilm constitue une communauté, souvent hétérogène et structurée, de bactéries attachées à une surface et englobées dans une matrice d'exopolysaccharides essentiellement composée d'alginate

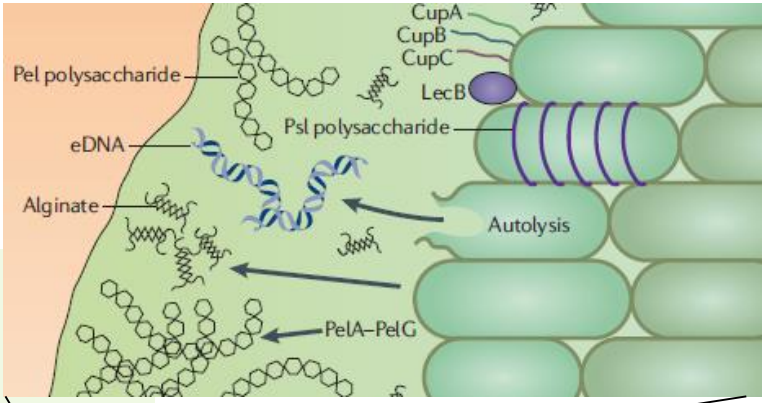
- Impliqué dans le développement d'infections persistantes :
  - Protection contre la réponse immunitaire anti-pyocyanique
  - Résistance aux antibiotiques

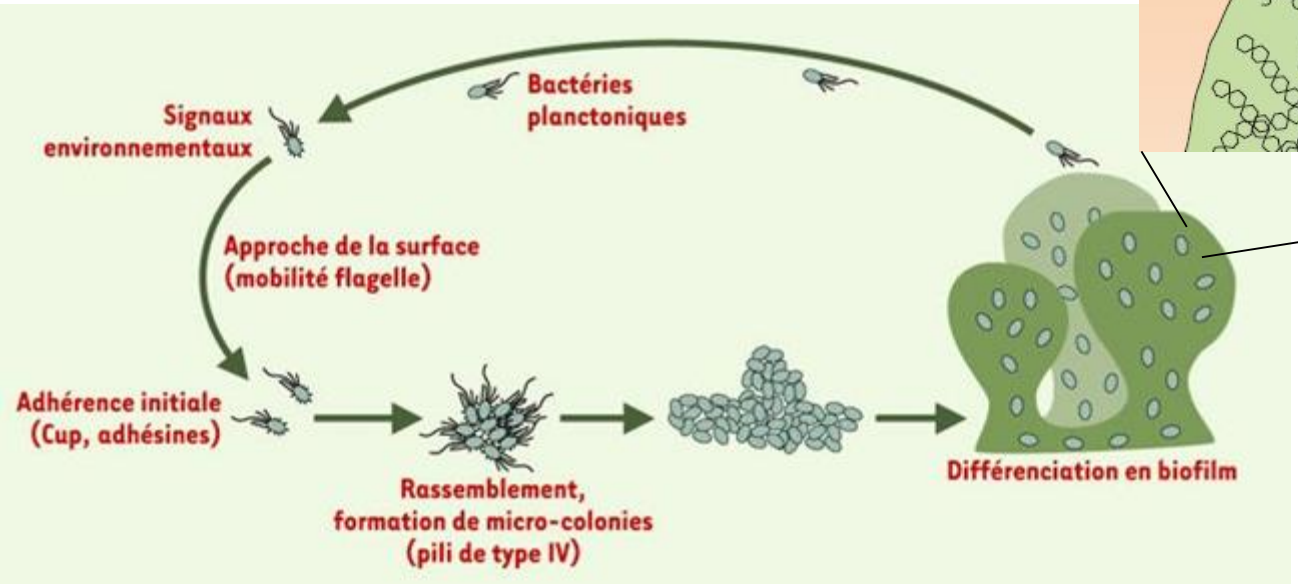




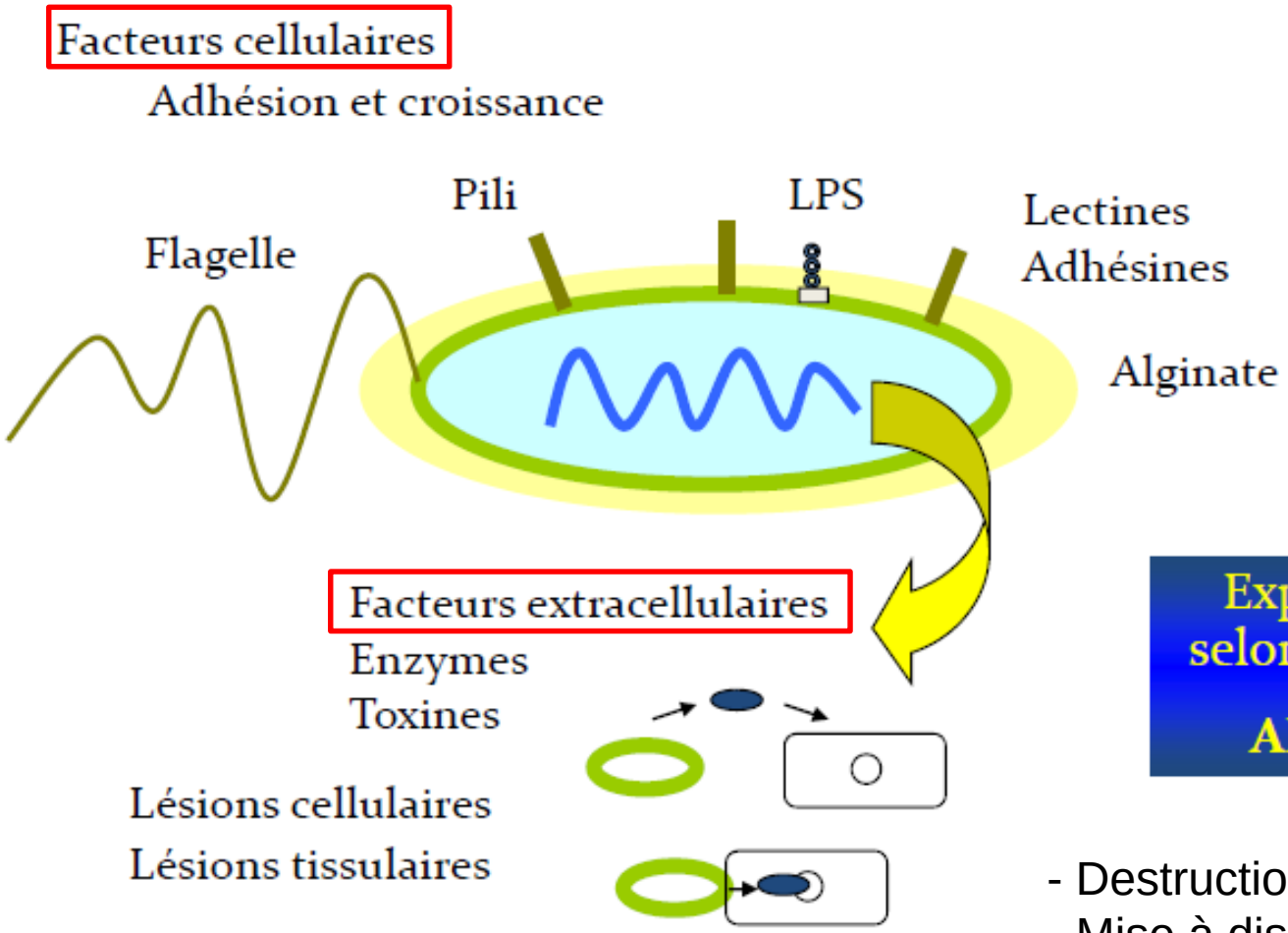
Formation de biofilms

- **4 étapes :**
  1. Attachement réversible de la bactérie à une surface
  2. Rassemblement en microcolonies attachées de manière irréversible
  3. Structuration et consolidation du biofilm
  4. Détachement et implantation sur d'autres surfaces saines





Facteurs de virulence membranaires & extracellulaires



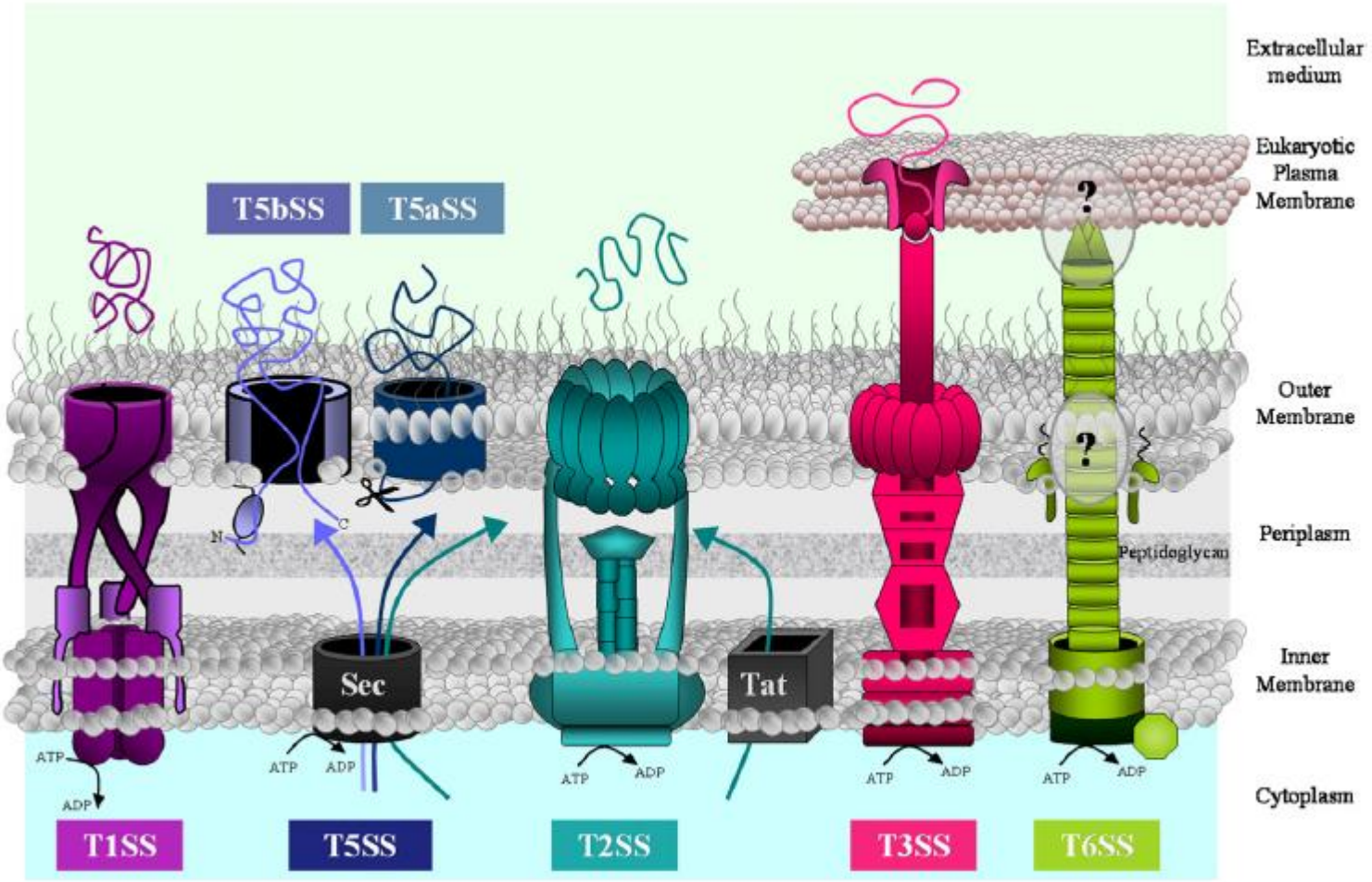
Expression variable selon l'environnement

ADAPTABILITE

- Destruction des barrières
- Mise à disposition de nutriments

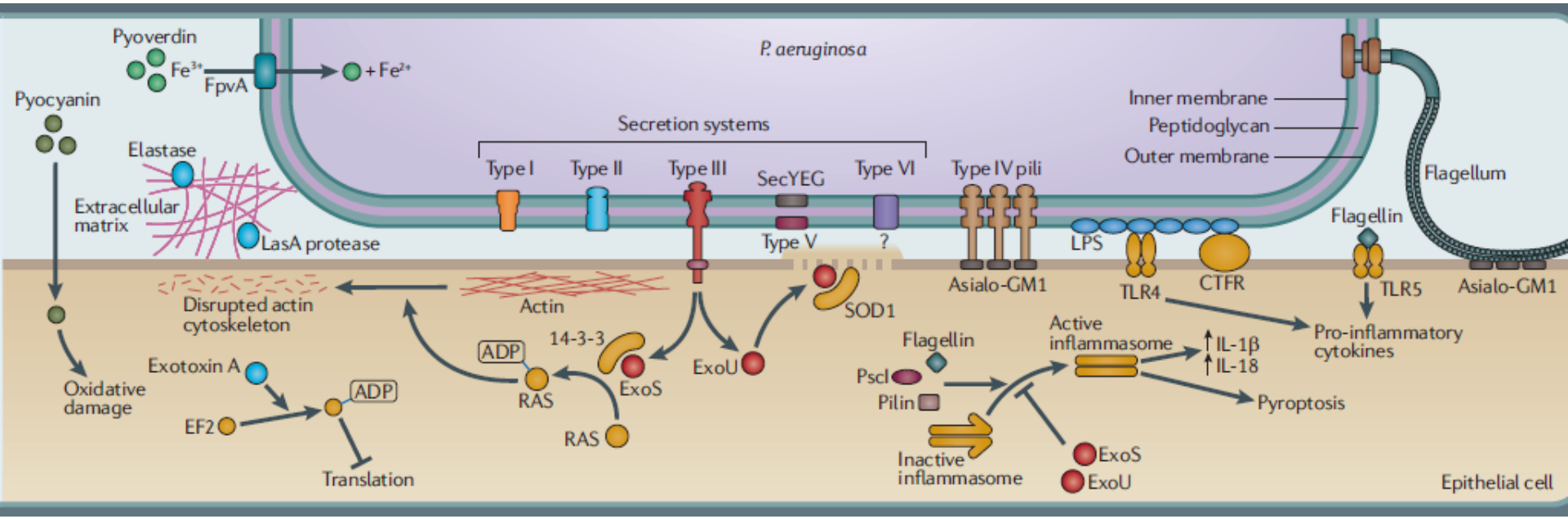
Facteurs de virulence extracellulaires

- **Différentes machineries de sécrétion :**



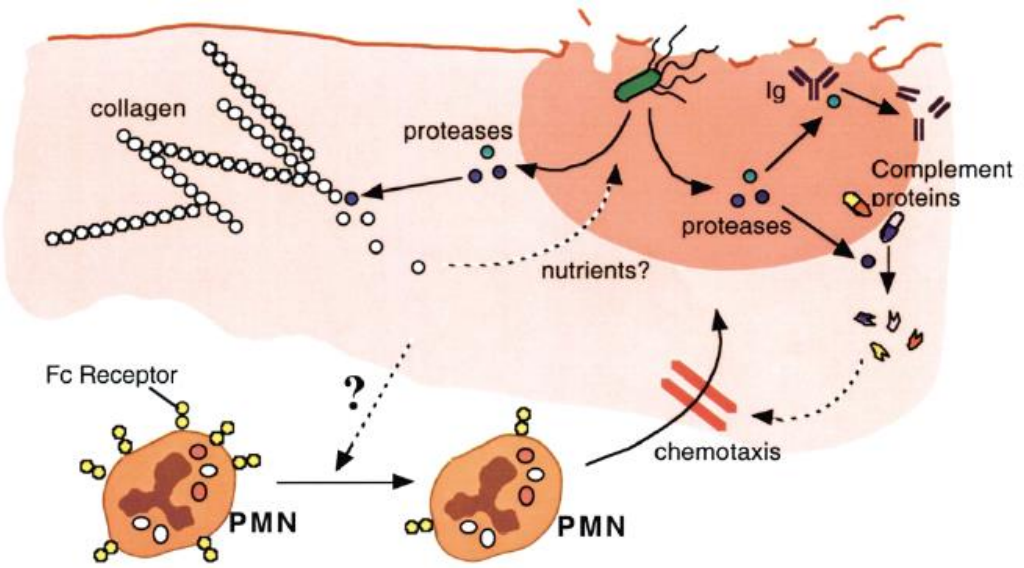
Facteurs de virulence extracellulaires

- **Substances sécrétées :**
  - Sidérophores
  - Pyocyanine
  - Toxines et enzymes de dégradation facilitant l'invasion des tissus



Enzymes protéolytiques

- **Elastase**
- **Protéinase alcaline**
- **Protéase IV**



Dégradations tissulaires

Epithélium pulmonaire :
élastine,laminine,collagènes protéoglycanes (***élastase***)

Oculaire :
fibrine (***protéases***)

Modulation de réponse immunitaire

- Inactivation des IgA, IgG,
- Inactivation de composants du complément,
- Inhibition du chimiotactisme des PNN
- Induction de sécrétion d'interleukines

Toxines

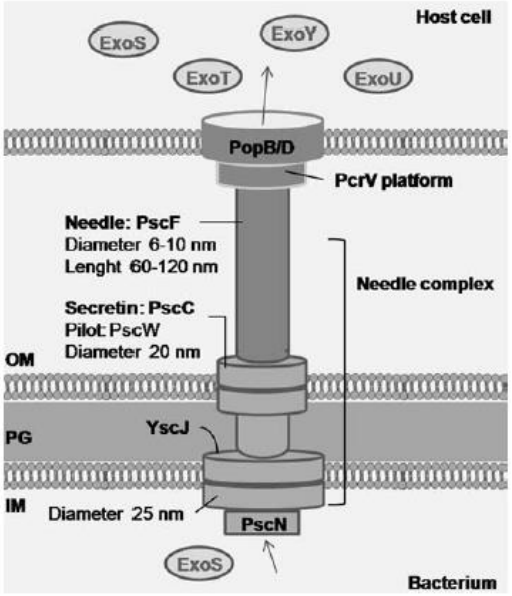
Exotoxine A :

- Sécrétée par le T2SS
- Composé protéique le plus toxique produit par *P.aeruginosa*
- Inhibe la synthèse protéique de la cellule eucaryote cible
- Provoque la mort de la cellule cible par nécrose

Exoenzymes sécrétées par le T3SS :

- ExoS, ExoT, ExoU & ExoY

Le T3SS permet à la bactérie d'injecter directement ses toxines dans la cellule hôte, à la manière d'une seringue



Exoenzymes sécrétées par le T3SS

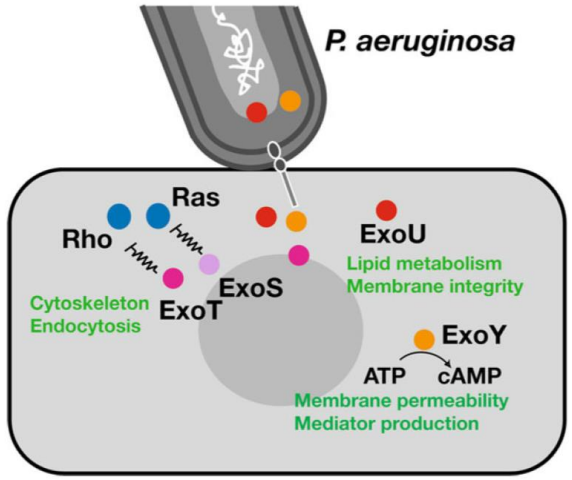


Figure 4 Contact-dependent toxin translocation during type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* translocates toxins after direct contact with the surface of the target eukaryotic cell. ExoS and ExoT modulate the cytoskeleton and endocytosis through interaction with Ras and/or Rho GTPases; ExoU disrupts the integrity of the lipid membrane by targeting phospholipids; and ExoY causes edema formation by increasing cyclic adenosine monophosphate.

Effectors	Genes	Activity	Effect on host
ExoS	*exoS*	ADP-ribosyltransferase GAP activity	Antiphagocytosis
ExoT	*exoT*	GAP activity	Inhibition of wound healing
ExoU	*exoU*	Patatin-like phospholipase	Cell death Acute lung injury Bacteremia, sepsis
ExoY	*exoY*	Adenylate cyclase	Edema, inhibition of inflammatory cytokine secretion

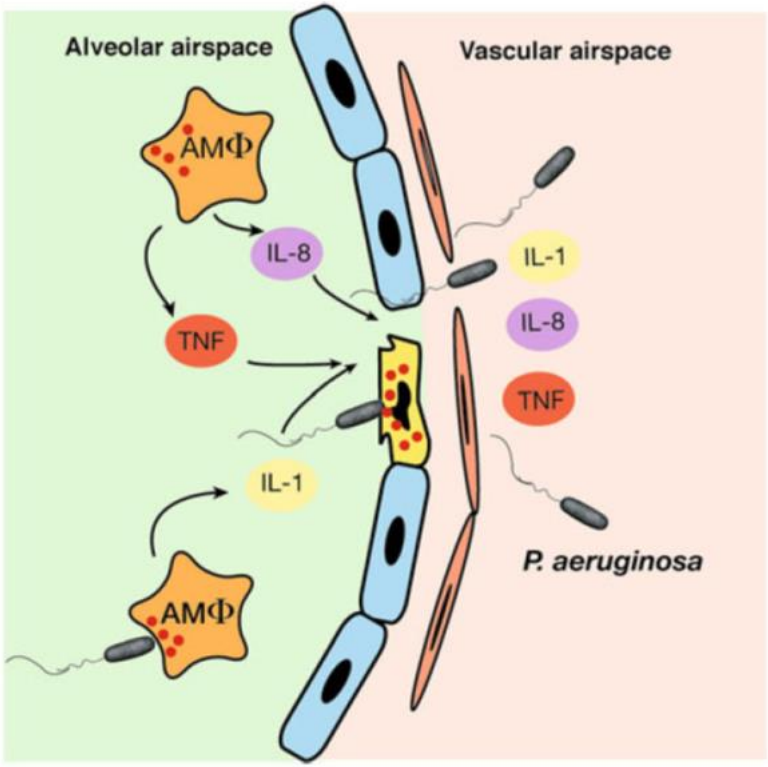
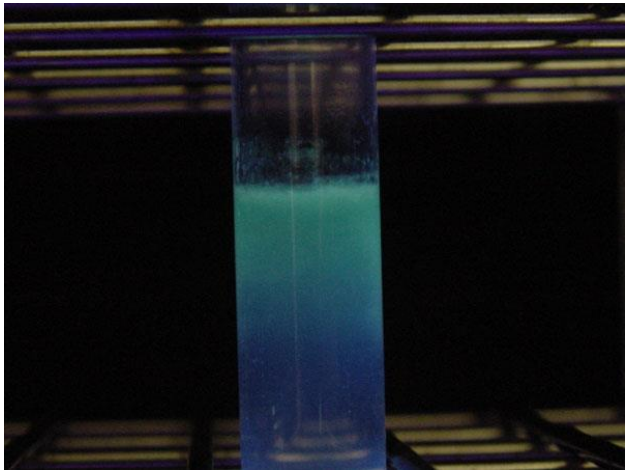


Figure 6 Acute lung injury caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* secretes and injects type III secretory toxins (ExoS, ExoT, ExoU, and ExoY) into alveolar macrophages and epithelial cells, blocking macrophage phagocytosis, inducing epithelial disruption, and causing the dissemination of bacterial and inflammatory mediators from the airspace into the systemic circulation, which eventually results in bacteremia and sepsis. *AMΦ* alveolar macrophages, *IL-1* interleukin-1, *IL-8* interleukin-8, *TNF* tumor necrosis factor.

Pyocyanine

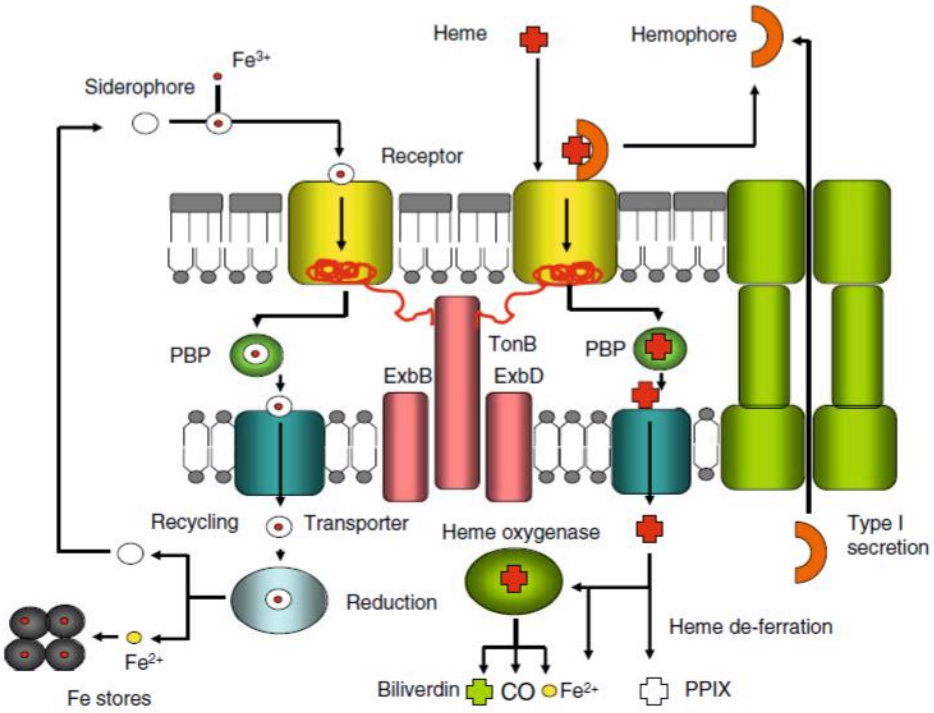
- Pigment spécifique de *P. aeruginosa*, généralement de couleur bleue en solution aqueuse
- A un rôle crucial dans la virulence de *P. aeruginosa*
- Catalyse la formation de dérivés oxygénés très toxiques, entrainant une nécrose du tissu respiratoire
- Augmente la production d'Il-8, induit l'apoptose des polynucléaires neutrophiles et réprime la réponse immunitaire de l'hôte



Systèmes de capture du Fer

- **Sidérophores : pyoverdine & pyochéline**

- Molécules de bas poids moléculaire, sécrétées par la bactérie, qui chélatent le Fe^{3+} (libre ou lié à la transferrine)
- Les ferrisidérophores sont recaptés par la bactérie, par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques (de type TonB)



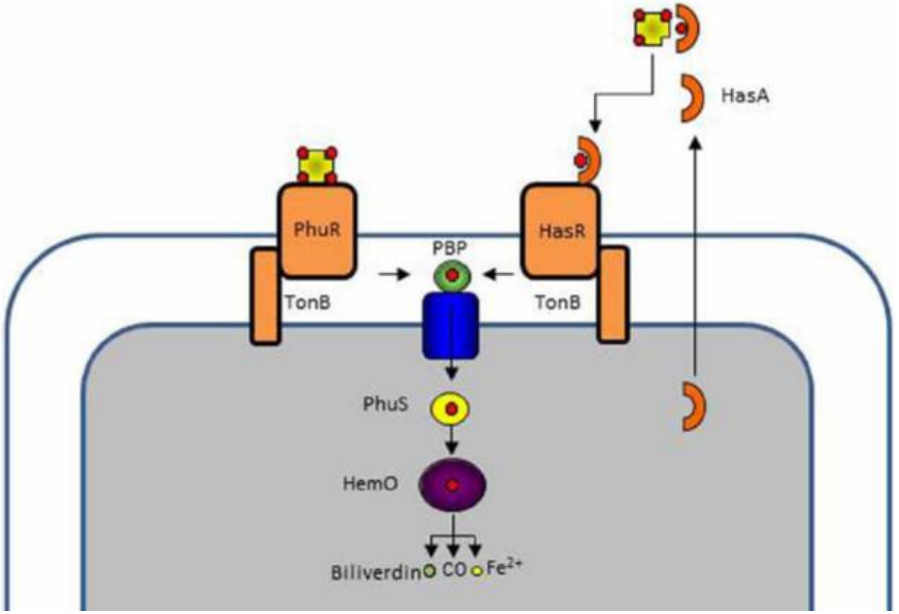
Systèmes de capture du Fer

- **Pyoverdine** : un chromophore + une chaîne peptidique
- Fluorescence des Pseudomonas, en particulier si croissance en milieu pauvre en Fer
- Régule la sécrétion de 2 facteurs de virulence (exotoxine A & protéase IV)

- **Pyochéline** :
- Affinité pour Fer < Pyoverdine, mais sécrétée préférentiellement
- Contribue à la destruction des cellules épithéliales pulmonaires (dommages oxydatifs et inflammation)

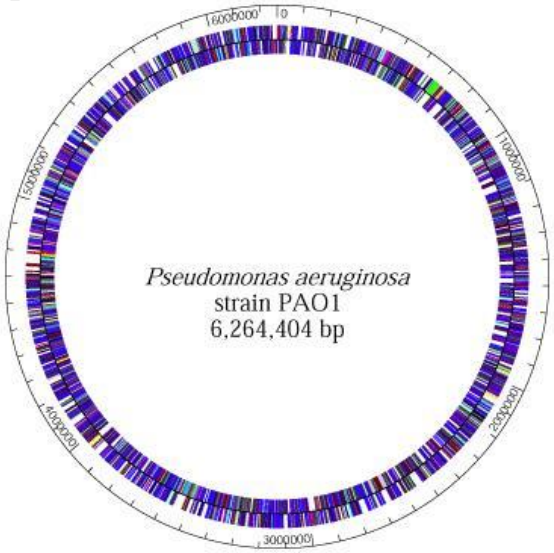
Systèmes de capture du Fer

- **Capture de l'hème d'hémoprotéines** (hémoglobine, hémopexine, cytochromes)
- Extraction de l'hème au niveau d'un récepteur TonB (système Phu)
- Extraction préalable de l'hème, par une protéine sécrétée (hémophore), puis liaison du complexe hémophore-hème à un récepteur TonB (système Has)
- Dégradation intra-cytoplasmique de l'hème en biliverdine, CO et Fe^{2+}

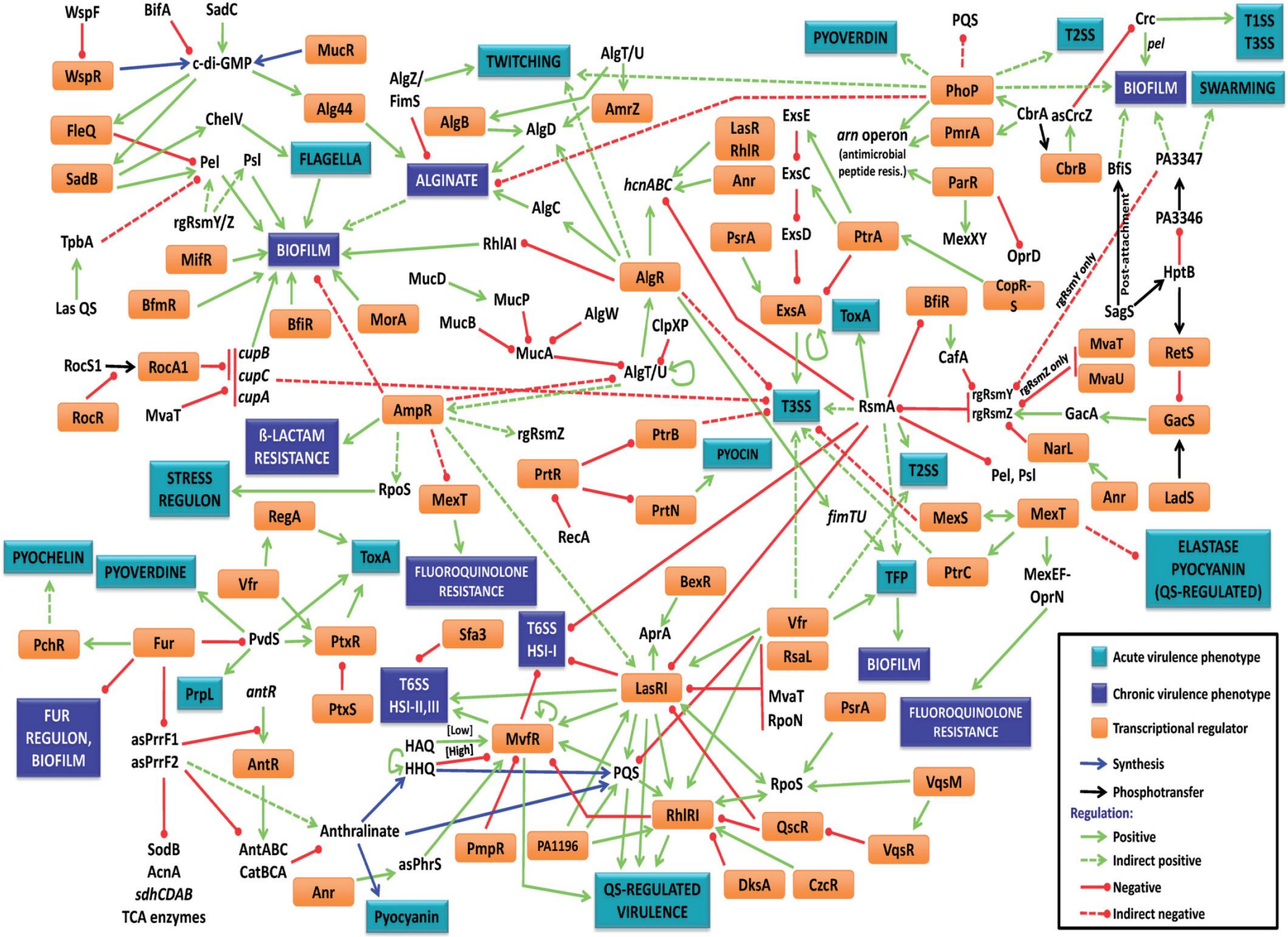


Virulence de *P. aeruginosa* : phénomène adaptatif

- **Régulation des facteurs de virulence :**
  - Génome relativement similaire d'une souche à l'autre (≈ 90%)
  - L'environnement et les conditions locales conditionnent l'expression préférentielle de certains gènes



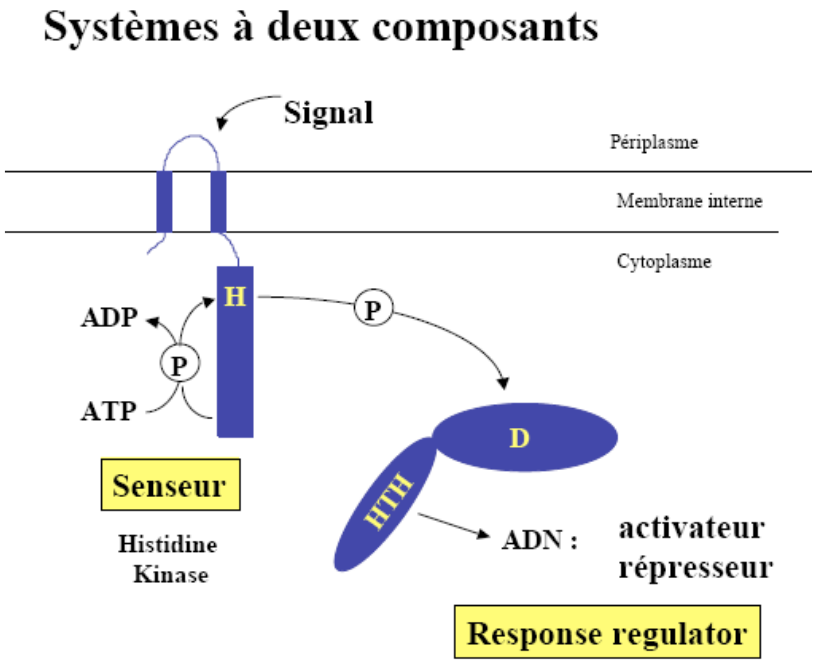
- **2 mécanismes principaux :**
  - Les systèmes de transduction de signaux à deux composants
  - Le *quorum sensing*



WspF
BifA
SadC
WspR
c-di-GMP
MucR
Alg44
FleQ
CheIV
SadB
Pel
Psl
FLAGELLA
TpbA
rgRsmY/Z
Las QS
MifR
BIOFILM
BfmR
BfiR
MorA
RocS1
RocA1
cupB
cupC
cupA
RocR
MvaT
AlgZ/
FimS
TWITCHING
AlgT/U
AlgB
AlgD
AmrZ
ALGINATE
AlgC
RhlAI
AlgR
MucD
MucP
MucB
AlgW
MucA
AlgT/U
ClpXP
AmpR
rgRsmZ
ß-LACTAM
RESISTANCE
STRESS
REGULON
RpoS
MexT
RegA
ToxA
FLUOROQUINOLONE
RESISTANCE
PYOCHELIN
PYOVERDINE
Vfr
PchR
Fur
PvdS
PtxR
PrpL
antR
PtxS
FUR
REGULON,
BIOFILM
asPrrF1
asPrrF2
AntR
SodB
AcnA
sdhCDAB
TCA enzymes
AntABC
CatBCA
Anthralinate
Anr
asPhrS
Pyocyanin
Sfa3
T6SS
HSI-I
T6SS
HSI-II,III
HAQ
HHQ
[Low]
[High]
MvfR
PmpR
PA1196
QS-REGULATED
VIRULENCE
PYOCIN
PtrB
PrtR
PrtN
RecA
BexR
AprA
LasRI
PQS
RhlRI
QscR
DksA
CzcR
VqsR
VqsM
RpoS
PsrA
MvaT
RpoN
Vfr
RsaL
TFP
BIOFILM
FLUOROQUINOLONE
RESISTANCE
MexS
MexT
MexEF-
OprN
ELASTASE
PYOCYANIN
(QS-REGULATED)
fimTU
T2SS
Pel, Psl
NarL
Anr
LadS
GacS
GacA
rgRsmY
rgRsmZ
rgRsmZ only
MvaT
MvaU
RetS
SagS
HptB
PA3346
PA3347
Post-attachment
BfiS
CbrB
CbrA
asCrcZ
CbrB
PhoP
PmrA
ParR
MexXY
OprD
CopR-
S
PYOVERDIN
PQS
T2SS
Crc
pel
T1SS
T3SS
BIOFILM
SWARMING
arn operon
(antimicrobial
peptide resis.)
LasR
RhlR
Anr
hcnABC
ExsE
ExsC
ExsD
PsrA
PtrA
ExsA
ToxA
BfiR
CafA
T3SS
RsmA
Acute virulence phenotype
Chronic virulence phenotype
Transcriptional regulator
Synthesis
Phosphotransfer
Regulation:
Positive
Indirect positive
Negative
Indirect negative

Systèmes de transduction de signaux à deux composants

1. Un senseur ancré dans la membrane cytoplasmique perçoit le signal extérieur
2. Cascade de phosphorylations aboutissant à l'activation d'un facteur de transcription
3. Activation ou répression d'un gène codant un facteur de virulence



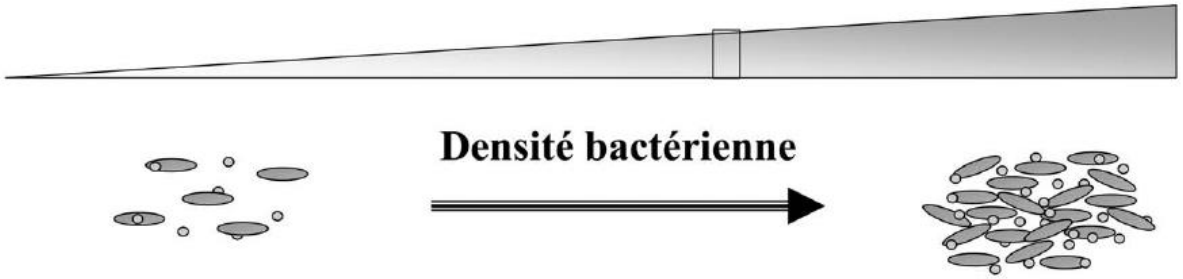
- Systèmes communs à toutes les bactéries
- Chez *P. aeruginosa*, nombre record de ces systèmes régulateurs (~ 127 pour PAO1 *vs* ~ 60 chez *E. coli*)

Le *quorum sensing*

ou

« Perception de la densité cellulaire de la population bactérienne "

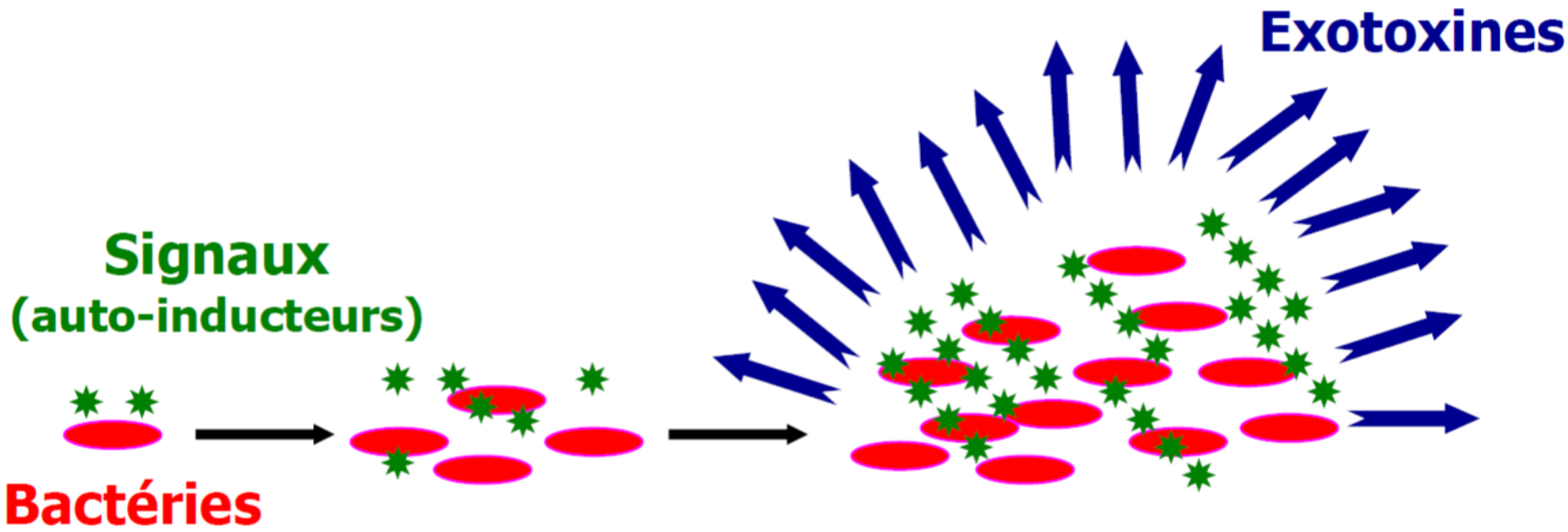
- Principal mécanisme de régulation de la pathogénicité et de l'adaptation chez *P. aeruginosa*
- Permet la production d'un maximum de facteurs de virulence en phase de croissance exponentielle tardive et en phase stationnaire au sein d'une population
- Système de communication intercellulaire reposant sur la diffusion de petites molécules (acyl-homosérine lactone ou AHL) au travers des membranes bactériennes



Le *quorum sensing*

ou

« Perception de la densité cellulaire de la population bactérienne "



Système de communication permettant aux bactéries de détecter leur densité et de coordonner l'expression de leur virulence et la formation de biofilm

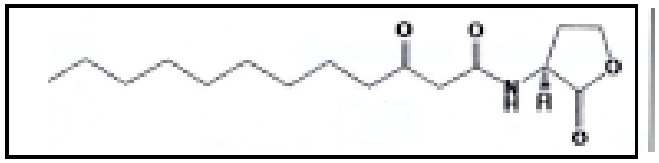
Le *quorum sensing*

- **Petites molécules diffusibles** :
  « auto-inducteurs » ou « alarmones »

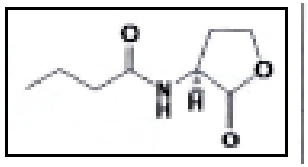
- Deux types :
  - N-acyl-homoserine lactones (AHLs)
    systèmes Las et Rhl
  - 2-alkyl-4 quinolones (AQs)
    systèmes PQS/IQS

Le *quorum sensing*

- **Systèmes LasR/lasI & RhlR/RhlI :**
- Deux molécules diffusibles principales (AHL) :
  - C12-HSL (système LasI/LasR)
  - C4-HSL (système RhlI/RhlR)
- 1 gène I (*lasI* ou *rhlI*) codant une AHL synthase
- 1 gène R (*lasR* ou *rhlR*) codant un récepteur protéique de l'AHL (régulateur transcriptionnel)



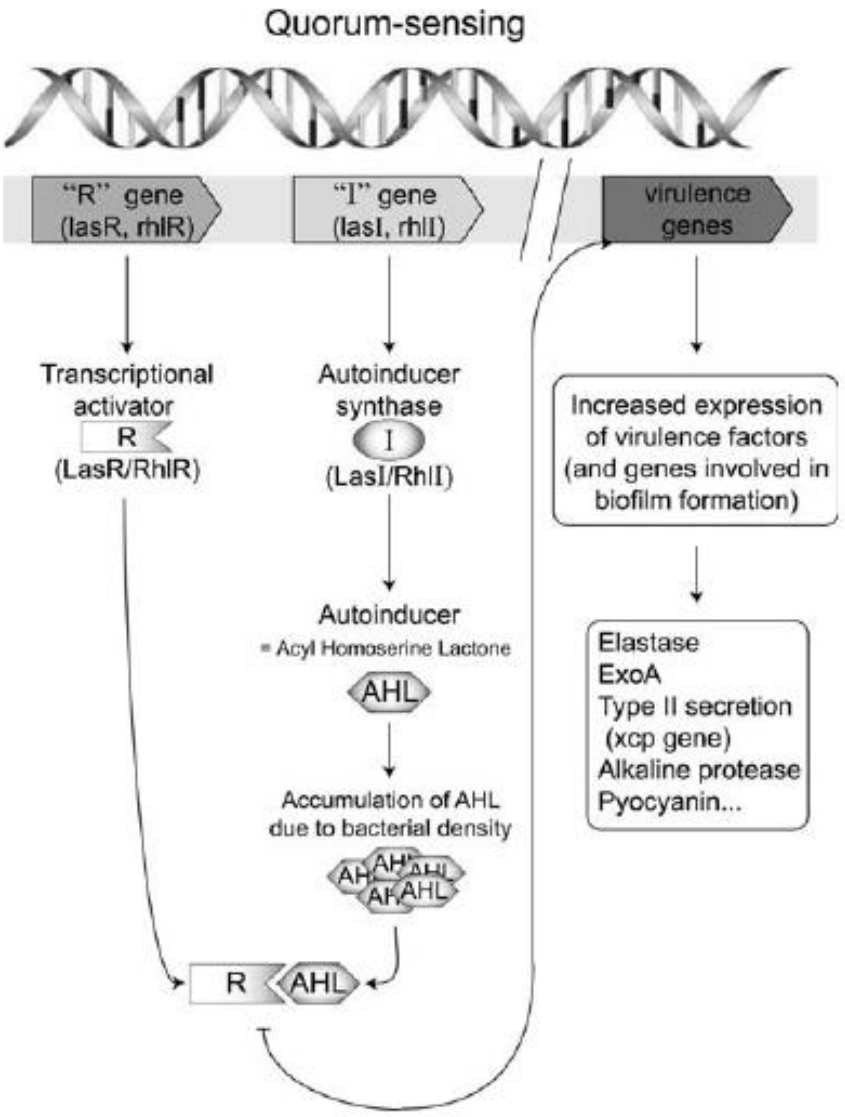
3-oxo-C12-HSL



C4-HSL

Le *quorum sensing*

- Les AHL (C12-HSL & C4-HSL) sont synthétisées par leurs enzymes respectives (LasI & RhlI)
- Lorsque la concentration des AHL atteint un certain seuil, elles se lient à leur récepteur protéique spécifique (LasR & RhlR)
- La liaison de l'AHL à son récepteur active la transcription de nombreux gènes et notamment du gène I

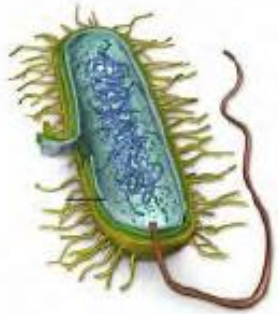


Kipnis *et al*. Méd. et mal. infectieuses 2006; 36 : 78-91

Le *quorum sensing*

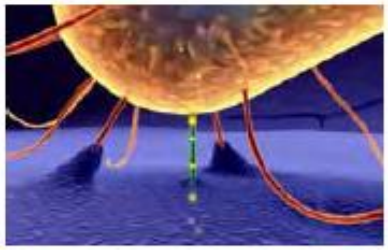
- Environ 10% du génome est régulé par le *quorum sensing*
- Exemple de gènes de virulence régulés :
  - Exotoxine A
  - Protéase alcaline
  - Élastase
  - Sidérophores
  - Pyocyanine
  - Phospholipase C
  - Formation de biofilm
- Ce système explique le caractère opportuniste de *P. aeruginosa*: "silencieux" ou "agressif" selon l'environnement et la densité de population

Deux modes de virulence de *P. aeruginosa* :

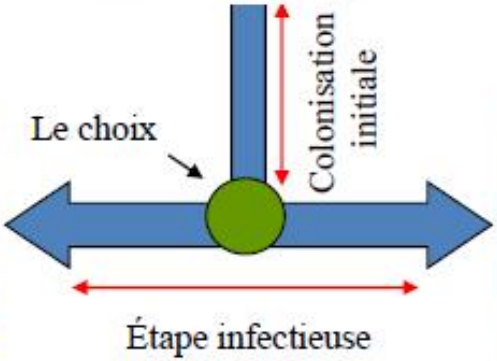


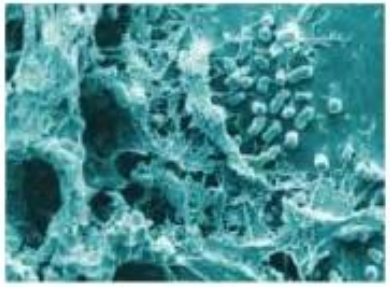
Infection invasive caractérisée par la sécrétion de nombreuses toxines (injectisome)

Infection inflammatoire associée à la capacité de *P. aeruginosa* à former une communauté appelée biofilm



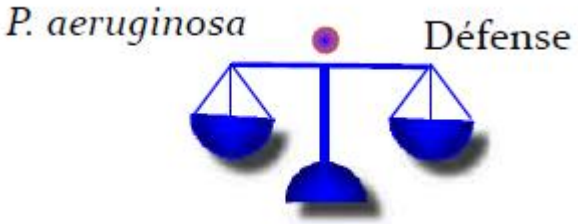
Infection aiguë





Infection chronique

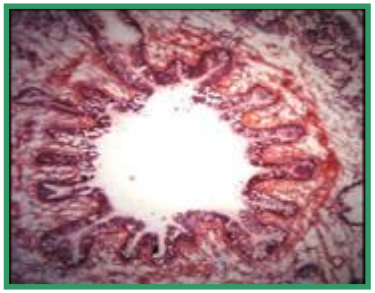
Interactions Hôte-pathogène

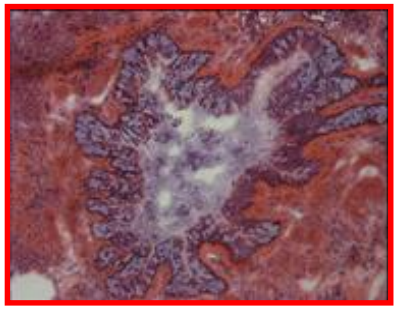


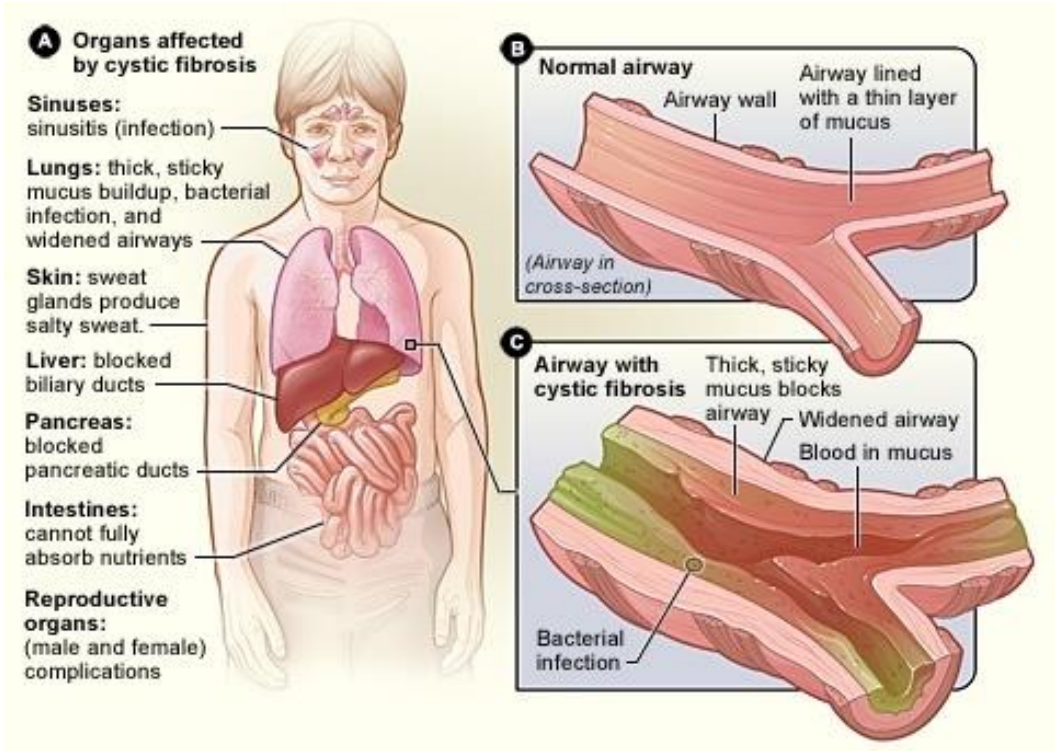
Cas particulier de la mucoviscidose

- Maladie héréditaire affectant le gène codant la protéine CFTR, impliquée dans le transport des ions chlorures au niveau de nombreux tissus

- **Au niveau pulmonaire :**
- Hyperviscosité du mucus
- Réduction clairance mucociliaire
- Inflammation locale chronique
- Terrain propice aux infections



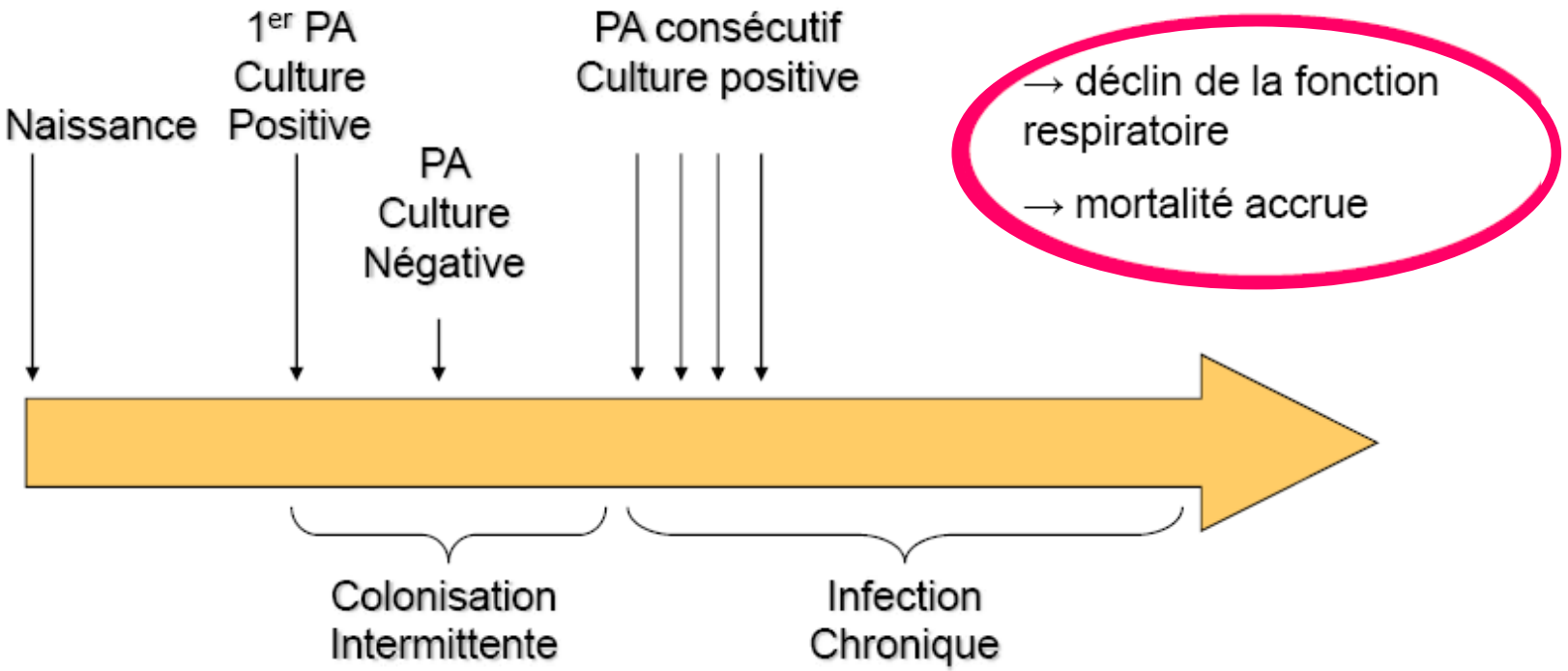




Cas particulier de la mucoviscidose

Histoire naturelle de l'infection par *P. aeruginosa* :

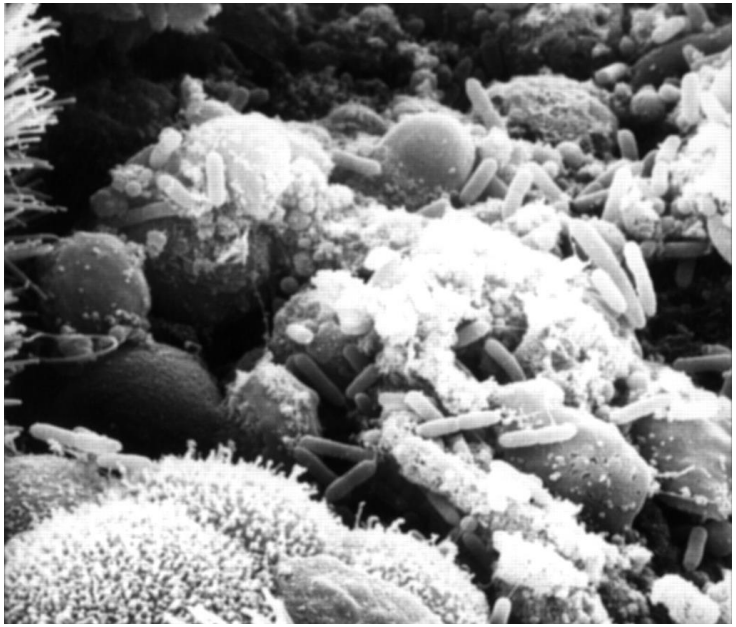
Phénotype mucoïde



Cas particulier de la mucoviscidose

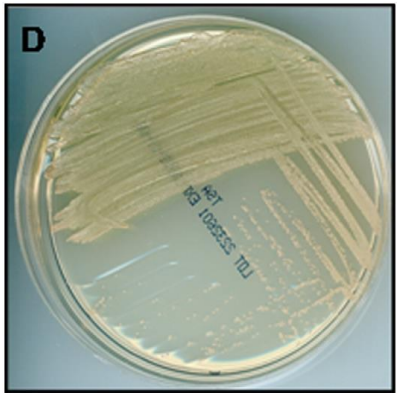
Infection chronique (formation de biofilm) :

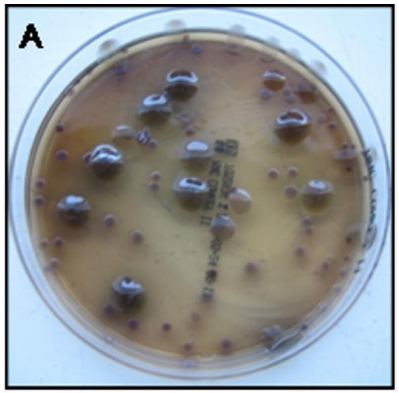
- *P. aeruginosa* englué dans un mucus hypervisqueux ne peut être éliminé de la surface des voies respiratoires

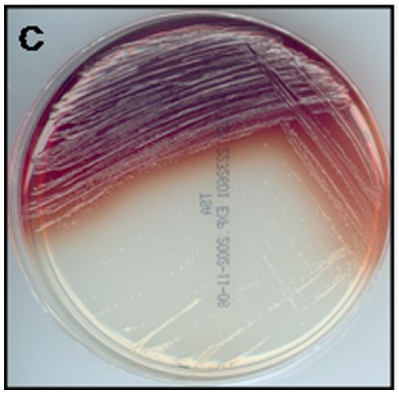


- Conversion en phénotype mucoïde
- Switch pour un métabolisme anaérobie
- Lésions épithéliales et inflammation locale chronique
- Résistance aux antibiotiques (mauvaise diffusion et croissance ralentie)

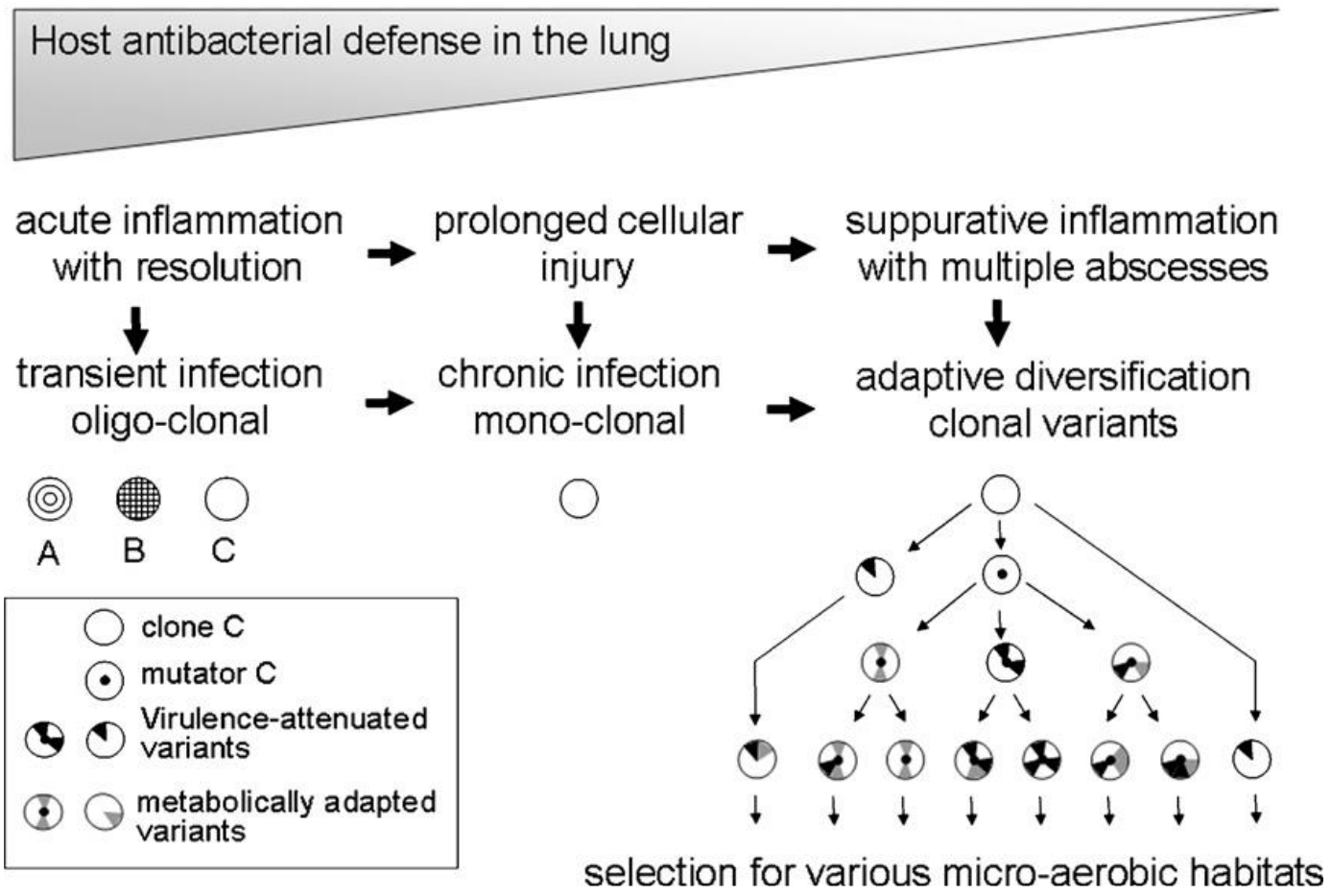
Cas particulier de la mucoviscidose







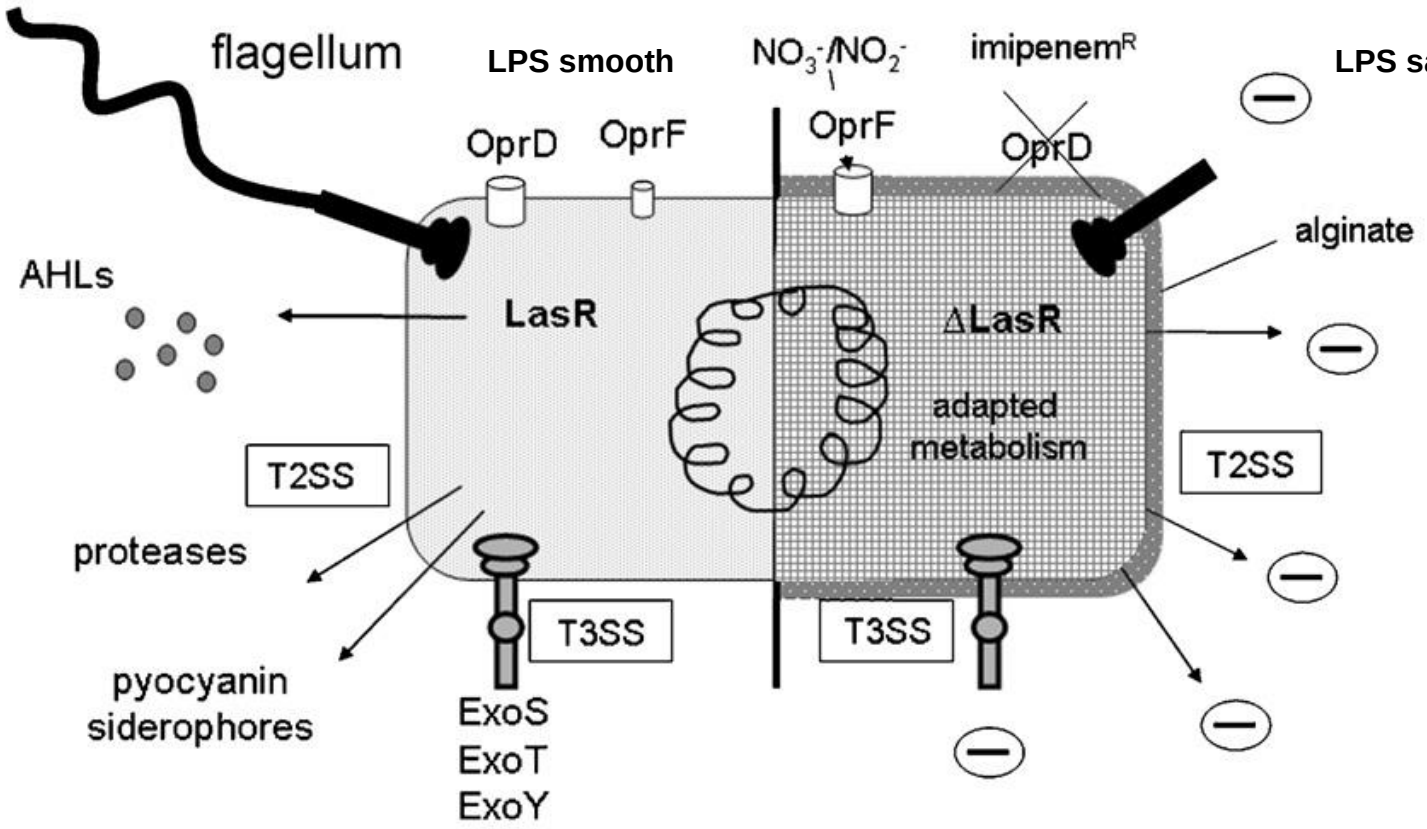
Etapes progressives de l'infection :



Hogardt *et al*. Int. J. Med. Microbio. 2010; 300 : 557-62

Cas particulier de la mucoviscidose

initial infection pathogen → chronic infecting pathogen



non-mutator → mutator

Hogardt *et al*. Int. J. Med. Microbio. 2010; 300 : 557-62