

## **Implantation et persistance des souches mucoïdes de *Pseudomonas aeruginosa* dans les poumons des malades atteints de mucoviscidose**

La colonisation des poumons par des souches mucoïdes de *Pseudomonas aeruginosa* est à l'origine des graves complications respiratoires apparaissant à un stade évolué de la mucoviscidose. La forte osmolarité du mucus bronchique des malades semble jouer un rôle dans l'activation de gènes bactériens qui vont diriger la synthèse d'une gangue protectrice d'exopolysaccharides de type alginate ; celle-ci facilitera l'adsorption du pathogène, le protégera des antibiotiques, des anticorps et des macrophages et empêchera son élimination par le système mucociliaire. Ainsi *P. aeruginosa* continuera-t-il à sécréter différentes substances toxiques accroissant les lésions tissulaires et des polysaccharides qui augmenteront encore la viscosité des sécrétions bronchiques, et donc l'insuffisance respiratoire des malades.

---

**Michèle  
Pennacino-Sauvage  
Christian Hulen**

---

### ADRESSE

M. Pennacino-Sauvage : stagiaire de recherche, boursière de l'Association française de lutte contre la mucoviscidose. C. Hulen : maître de conférences, à l'université Paris XI. Cercoa-Cnrs, 2 à 8, rue Henri-Dunant, 94320 Thiais, France.

**P**seudomonas aeruginosa, bactérie saprophyte opportuniste, est actuellement à l'origine d'un grand nombre d'infections chez l'homme, les insectes et les plantes. Ce microorganisme présente une résistance naturelle à un certain nombre d'antibiotiques et une capacité incomparable à s'adapter et à survivre dans des environnements hostiles. Depuis plus de vingt ans, le milieu hospitalier du monde occidental s'est vu coloniser par *Pseudomonas aeruginosa*, responsable d'un nombre croissant de pneumonies ou de bactérié-

mies chez les malades sous traitement immunosuppresseur, ou chez les grands brûlés.

La pathogénicité de *Pseudomonas aeruginosa* est liée à la capacité du microorganisme de s'adsorber sur un grand nombre de supports (verre, métal, polymères...) et de tissus épithéliaux, et de sécréter des quantités importantes de produits ayant une activité nécrosante sur ces tissus (phospholipase, protéases et exotoxines).

Il existe, à ce jour, des souches particulièrement résistantes à un nombre croissant d'antibiotiques et qui pré-

sentent un caractère mucoïde par fabrication d'exopolysaccharides de type alginate (polysaccharides constitués d'acides uroniques). Les formes mucoïdes de *Pseudomonas aeruginosa* sont rencontrées dans certains cas d'infections urinaires ou d'otites, et colonisent surtout les poumons des malades atteints de mucoviscidose. Cette infection particulière, persistante, représente une des phases les plus sévères de la maladie. Chez les enfants atteints de mucoviscidose, l'infection précoce des voies respiratoires par *Pseudomonas aeruginosa* est actuellement la cause majeure de mortalité.

### La mucoviscidose

La mucoviscidose est la maladie héréditaire la plus fréquente dans les populations nord-européennes issues de la branche caucasienne. Elle est la conséquence d'une mutation sur un seul gène situé sur le bras long du chromosome 7. Cette mutation récessive est présente actuellement à une fréquence d'environ 1/16 dans les populations anglo-saxonnes et 1/20 dans la population française, ce qui donne en moyenne un enfant homozygote pour environ 2 000 naissances [1]. La gravité de la maladie varie d'un sujet à un autre, mais elle ne reste jamais sans effet.

Les résultats obtenus récemment par l'emploi des techniques de la génétique inverse ont permis la localisation fine, puis le clonage du gène de la mucoviscidose [2]. Ce gène code pour une protéine membranaire (CFTR, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) impliquée dans le transport ou la régulation du transport des ions chlore à travers la membrane plasmique des cellules des glandes exocrines (pancréas, glandes salivaires et sudoripares) et des cellules des tissus épithéliaux à activité sécrétoire (voies respiratoires) [3].

L'imperméabilité de ces cellules au chlore provoque la production de sécrétions visqueuses, collantes et mal hydratées (l'eau, suivant le mouvement des électrolytes, ne sort pas des cellules), responsables des manifestations symptomatologiques de la mucoviscidose. Cette mauvaise hydratation des sécrétions provoque une obturation des canaux, aboutissant à une dégénérescence du pan-

créas, à un accroissement de la taille des glandes et à l'apparition, dans les voies respiratoires inférieures, d'un mucus épais, très visqueux responsable d'une diminution de l'activité ciliaire [4]. Ce défaut dans l'élimination physique du mucus pulmonaire est à l'origine d'une obstruction des petites voies aériennes, cause d'une insuffisance respiratoire et de surinfections bactériennes chroniques, plus ou moins graves, laissant à chaque fois des séquelles définitives dans les tissus.

### Les infections pulmonaires

Les premières infections sont en général provoquées par *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae*, pathogènes couramment rencontrés dans les voies respiratoires des enfants. Cependant, leur persistance dans les poumons après une infection aiguë est spécifique des enfants mucoviscidosiques. Au cours de la croissance, grâce à un traitement antibiotique adapté, ces deux espèces bactériennes disparaissent, mais sont souvent remplacées par *Pseudomonas aeruginosa* qui devient peu à peu l'unique pathogène responsable de la détérioration clinique du malade [5]. Une étude récente, utilisant les techniques d'immuno-histocytologie, a montré que les bactéries étaient adsorbées sur les membranes des bronchioles, mises à nu et attaquées par les toxines bactériennes [6].

La colonisation des malades par *Pseudomonas aeruginosa* et l'inefficacité des traitements antibiotiques actuels à éliminer totalement ce pathogène sont des obstacles importants à la qualité et à l'espérance de vie des enfants atteints de mucoviscidose.

#### • Colonisation par *Pseudomonas aeruginosa* et émergence des souches mucoïdes

La colonisation par *Pseudomonas aeruginosa* des malades atteints de mucoviscidose se fait initialement par adsorption de souches bactériennes non mucoïdes sur la muqueuse buccale, puis par colonisation des voies aériennes supérieures [7]. La salive de ces malades favorise même l'agrégation des bactéries (environ 7 fois plus que celle des personnes saines, [8]). La migration de ces souches vers les voies respiratoires inférieures

précède l'émergence du caractère mucoïde et l'établissement des infections chroniques, caractéristiques de l'atteinte pulmonaire.

Il existe un tropisme de *Pseudomonas aeruginosa* pour l'appareil respiratoire. L'adhérence des bactéries sur les mucines trachéobronchiales se fait par les pilis pour les souches non mucoïdes, puis par les alginates quand les souches deviennent mucoïdes [9].

L'émergence des souches mucoïdes de *Pseudomonas aeruginosa* est due à des facteurs qui semblent spécifiques du poumon des malades. Le mécanisme du passage de l'état non mucoïde à l'état mucoïde n'est pas encore parfaitement élucidé mais l'on sait qu'il fait intervenir une régulation génétique complexe au niveau du chromosome bactérien, associée à des facteurs externes :

— l'antibiothérapie, nécessaire à l'élimination des autres espèces bactériennes (*Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae*). Elle est responsable de la sélection, puis de la prédominance de *Pseudomonas aeruginosa* [10] ;

— l'adhérence préférentielle des souches mucoïdes à l'épithélium trachéal et trachéobronchique, surtout quand les tissus sont endommagés soit par les intubations endotrachéales (permettant l'élimination du mucus), soit par bronchiectasie, soit par le dysfonctionnement mucociliaire [9, 11] ;

— la présence d'une concentration élevée en calcium dans les poumons augmentant les propriétés gélifiantes des alginates et permettant la formation de microcolonies résistantes aux différents systèmes d'élimination [12] ;

— la présence d'une concentration élevée en NaCl, stimulant chez la bactérie la production des enzymes de la biosynthèse des alginates [13].

• **Persistance des souches mucoïdes de *Pseudomonas aeruginosa* dans les voies respiratoires** (figure 1, p. 889) Plusieurs éléments interviennent successivement pour que *Pseudomonas aeruginosa* soit l'unique pathogène persistant dans les poumons des malades.

— **La résistance aux antibiotiques.** La gangue muqueuse, constituée

## RÉFÉRENCES

1. Kitzis A, Warren P, Kaplan JC. Génétique inverse et mucoviscidose. *médecine/sciences* 1988 ; 4 : 151-6.
2. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, et al. Identification of the cystic fibrosis gene : chromosome walking and jumping. *Science* 1989 ; 245 : 1059-65.
3. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, et al. Identification of the cystic fibrosis gene : cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989 ; 245 : 1066-73.
4. Chartrand SA, Marks MI. Pulmonary infections in cystic fibrosis pathogenesis and therapy. In : Pennington JE, ed. *Respiratory Infections : Diagnosis and Management*. New York : Raven Press, 1983 : 201-16.
5. Ramphal R, Vishwanath S. Why *Pseudomonas* the colonisateur and why does it persist ? *Infection* 1987 ; 15 : 278-87.
6. Baltimore RS, Christie CDC, Smith GJW. Immunohistopathologic localization of *P. aeruginosa* in lungs from patients with cystic fibrosis. *Am Rev Resp Dis* 1989 ; 140 : 1650-61.
7. Woods DE, Iglewski BH, Johanson WG. Host and bacterial factors in the colonization of the respiratory tract. In : Schlessinger D, ed. *Microbiology*. Washington DC : ASM publications, 1982 : 348-52.
8. Komiyama K, Habbick B, Tumber SK. Whole submandibular and parotid saliva-mediated aggregation of *P. aeruginosa* in cystic fibrosis. *Infect Immun* 1989 ; 57 : 1299-304.
9. Ramphal R, Pier GB. Role of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid polysaccharide in adherence to tracheal cells. *Infect Immun* 1985 ; 47 : 1-4.
10. Govan JRW, Fyfe JAM. Mucoids *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis : resistance of the mucoid form to carbenicillin, flucoxacin, tobramycin and the isolation of mucoid variants *in vitro*. *J Antimicrobiol Chemoth* 1978 ; 4 : 232-240.
11. Pier GB. Pulmonary disease associated with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis : current status of the host-bacterium interaction. *J Infect Dis* 1985 ; 151 : 575-80.

d'alginate (polymères d'acides uroniques chargés négativement) entourant les bactéries, les protège contre l'action des antibiotiques. La haute force ionique de cette barrière est responsable de l'absence de pénétration des antibiotiques jusqu'à la microcolonie. En particulier, les alginates sont capables de fixer de grandes quantités d'aminoglycosides, généralement actifs sur les souches non mucoides de *Pseudomonas aeruginosa* [14].

— **L'inhibition des systèmes d'élimination physique.** En règle générale, les bactéries infectant les voies respiratoires sont complexées à des IgA et éliminées dans le mucus bronchique par l'activité ciliaire des cellules épithéliales. L'efficacité de ce système est très diminuée dans les poumons des malades atteints de mucoviscidose. L'association d'un mucus hypervisqueux aux alginates produits par les bactéries mucoides inhibe pratiquement toute l'activité ciliaire et entraîne la formation de complexes stagnants [5]. Il faut aussi noter que certaines souches mucoides de *P. aeruginosa* sont capables de s'adsorber spécifiquement par leurs alginates sur des cellules de l'épithélium buccal [15] et participent ainsi à la persistance de l'infection.

— **L'inhibition du système immunitaire.** Les malades atteints de mucoviscidose n'ont pas les signes classiques d'immunosuppression généralement associés aux infections par *Pseudomonas aeruginosa*. Paradoxalement, la réponse immunitaire est plus importante que chez les autres malades et c'est malgré la présence d'un grand nombre d'anticorps dirigés contre les différentes parties de la bactérie (alginates, LPS, protéines de membrane externe) que la colonisation persiste, ce qui suggère l'existence d'une anomalie dans le fonctionnement de cette réponse immunitaire.

Ramphal et Vishwanath [5] font l'hypothèse que les mucines liées aux protéines bactériennes sont reconnues comme protéines du soi et donc capables d'éviter le système immunitaire. L'absence d'opsonisation de *Pseudomonas aeruginosa* est peut-être due à cette liaison préférentielle aux mucines et serait une raison de sa sélection comme colonisateur prédominant.

*Pseudomonas aeruginosa* produit plusieurs facteurs de virulence dont le plus toxique est l'exotoxine A, agissant par ADP ribosylation du facteur d'élongation de la traduction EF2 et inactivant, entre autres, les macrophages.

Parmi les autres toxines produites par la bactérie, l'élastase contribue directement aux lésions tissulaires qui sont aussi favorisées par l'inactivation des composés du complément (C3, C5a) et des IgG [5]. Elle est aussi capable de dégrader les protéines à activité antibactérienne, comme le lysozyme, présentes dans le mucus bronchique [16].

Outre l'élastase bactérienne, une autre élastase d'origine humaine, produite par les polynucléaires neutrophiles, est présente en grande quantité dans le mucus des malades atteints de mucoviscidose. Cette élastase leucocytaire est, elle aussi, capable de provoquer l'inactivation des IgG par clivage en fragments Fab et Fab'2 [11].

Les alginates possèdent par ailleurs la capacité d'interférer avec les anticorps et d'inhiber la phagocytose en se liant aux macrophages [17]. Ils peuvent inhiber le complément, et leurs propriétés antigéniques déclencheraient un mécanisme d'inflammation accentuant encore la dégradation tissulaire [18].

## Les souches mucoides de *Pseudomonas aeruginosa*

Les souches mucoides de *Pseudomonas aeruginosa* présentes dans les poumons des malades atteints de mucoviscidose sont le reflet d'une adaptation particulière, mais parfaite, de la bactérie à son hôte.

Les souches mucoides de *Pseudomonas aeruginosa* se caractérisent par la production de quantités importantes d'exopolysaccharides de type alginate, production pouvant parfois atteindre de 2 à 3 fois le poids de la bactérie. L'observation des souches mucoides en microscopie électronique à transmission permet de visualiser, après coloration au rouge de ruthénium (figure 2, p. 891 photo A), les alginates qui entourent le microorganisme et en doublent le volume. Une coloration à l'acide phosphotungstique de ces mêmes bactéries permet de déli-

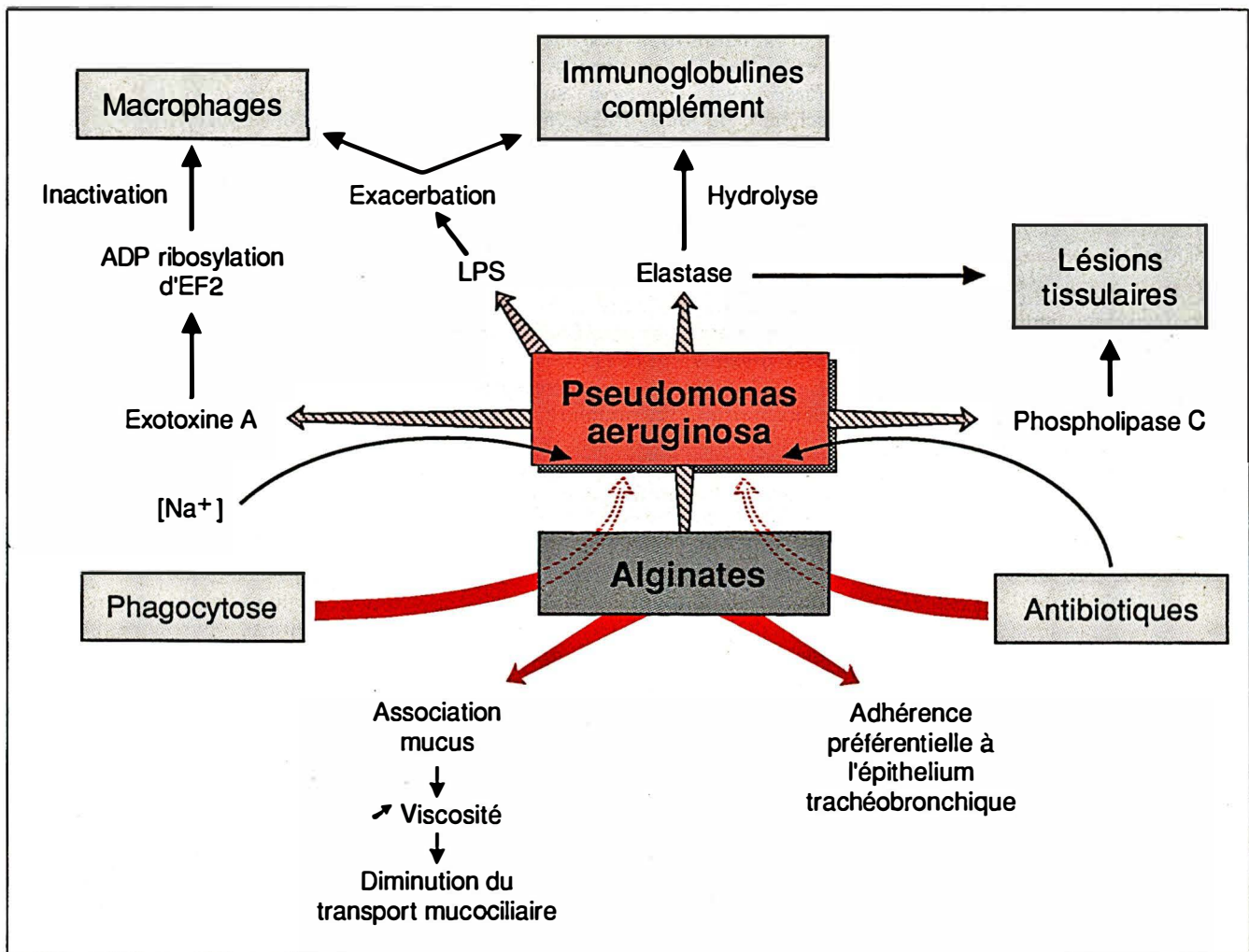


Figure 1. **Les relations de *Pseudomonas aeruginosa* avec son hôte.** La bactérie adsorbée sur les cellules trachéales sécrète un certain nombre de facteurs cytotoxiques (partie haute de la figure) et fabrique des alginates qui renforcent son adhérence aux tissus et la protègent des systèmes d'élimination (partie basse de la figure). EF2 : facteur d'élongation 2 ; LPS : lipopolysaccharide de la membrane bactérienne.

imiter les structures membranaires, donnant ainsi une idée du volume bactérien moyen, et de visualiser des structures filamenteuses reliant les bactéries entre elles (flèches, figure 2, photo B).

• **Les alginates**

Les alginates sont constitués de polymères linéaires d'acide D-mannuronique (M) et d'acide L-guluronique (G, son épimère en C5) en enchaînement B 1-4 (figure 3, p. 891). Ces polymères sont de haut

poids moléculaire et peuvent comporter plusieurs centaines de résidus. D'autres souches de *Pseudomonas* comme *Pseudomonas mendocina* et *Pseudomonas cepacia* sont capables, dans certaines conditions, de produire des alginates, ce qui explique leur apparition en tant qu'éléments pathogènes chez les malades atteints de mucoviscidose et les nouvelles résistances aux antibiotiques observées vis-à-vis de ces dernières souches. Les alginates produits par *Pseudomonas aeruginosa* se caractérisent par la

présence de groupements acétyls sur certains résidus mannuroniques (M) qui les protègent de l'épimérisation en acides guluroniques (G). La composition en acides uroniques des alginates de *Pseudomonas aeruginosa* est de type alterné, MM et MG, avec un rapport de M/G toujours supérieur à 1 [14]. L'absence de blocs GG, poly-G ou poly-M est la différence la plus importante entre les alginates de *Pseudomonas aeruginosa* et ceux d'*Azotobacter vinelandii* ou des algues brunes *Fucus gardneri*.

## RÉFÉRENCES

12. Govan JRW, Harris GS. *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis : unusual bacterial adaptation and pathogenesis. *Microbiol Science* 1986 ; 3 : 301-8.
13. Berry A, De Vault JD, Chakrabarty AM. High osmolarity is a signal for enhanced algD transcription in mucoid and non mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Bacteriol* 1989 ; 171 : 2312-7.
14. Nichols W, Dorrington SM, Slack MPE, Walmsley HL. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrobial Ag Chemother* 1988 ; 132 : 518-23.
15. Doig P, Smith NR, Todd T, Irvin RT. Characterization of the binding of *P. aeruginosa* alginate to human epithelial cells. *Infect Immun* 1987 ; 55 : 1517-22.
16. Jacquot J, Tournier JM, Puchelle E. *In vitro* evidence that human airways lysozyme is cleaved and inactivated by *P. aeruginosa* elastase and not by human leukocyte elastase. *Infect Immun* 1985 ; 47 : 555-60.
17. Simpson JA, Smith SE, Dean RT. Alginate inhibition of the uptake of *Pseudomonas aeruginosa* by macrophages. *J Gen Microbiol* 1988 ; 134 : 29-36.
18. Woods PE, Bryan LE. Studies on the ability of alginate to act as a protective immunogen against infection with the *Pseudomonas aeruginosa* in animals. *J Infect Dis* 1985 ; 151 : 581-8.
19. Horan NJ, Jarman T, Dawes F. Studies on some enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown on continuous culture. *J Gen Microbiol* 1981 ; 129 : 2985-90.
20. Barnejee PC, Vanags RI, Chakrabarty AM, Maitra PK. Alginic acid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* mutants defective in carbohydrate metabolism. *J Bacteriol* 1983 ; 155 : 238-45.
21. Darzins A, Frantz B, Vanags R, Chakrabarty AM. Nucleotide sequence analysis of the phosphomannose isomerase gene (*pmi*) of *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with the corresponding *Escherichia coli* gene *manA*. *Gene* 1986 ; 42 : 293-302.
22. Darzins A, Nixon LL, Vanags R, Chakrabarty AM. Cloning of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* phosphomannose isomerase genes and their expression in alginate negative mutants. *J Bacteriol* 1985 ; 161 : 249-57.
- **Biosynthèse des alginates**  
La caractérisation des enzymes présentes dans les souches mucoïdes de *Pseudomonas aeruginosa* suggère un schéma de biosynthèse similaire à celui observé chez les algues brunes et chez les bactéries productrices d'alginate, *Azotobacter sp.* et *Athrobacter sp.* Les études biochimiques menées par Horan *et al.* [19] et par Barnejee *et al.* [20] ont permis de reconstituer la chaîne de biosynthèse des alginates par *Pseudomonas aeruginosa* (figure 4, p. 892).  
Cette biosynthèse se décompose en deux parties. La première, non spécifique, utilise une voie du métabolisme secondaire du glucose, la voie d'Etner-Doudoroff. La seconde, spécifique de la biosynthèse des alginates, utilise des enzymes induites spécialement pour la fabrication des exopolysaccharides.  
Les étapes spécifiques de la biosynthèse des alginates débutent par la transformation du fructose-6-phosphate en mannose-6-phosphate par la phosphomannose isomérase (PMI). Le gène codant pour la PMI (*algA*) a été localisé à 34 minutes sur le chromosome bactérien. Il a été cloné sur un plasmide interspécifique et placé sous le contrôle du promoteur *tac\**. Dans ces conditions, après induction par l'IPTG (Isopropyl thio-galactoside), on trouve une activité PMI dans les bactéries transformées et la synthèse d'un polypeptide de 56 000 daltons. Le séquençage du gène *algA* a mis en évidence une phase ouverte de lecture codant pour un polypeptide de 53 000 daltons [21].  
L'hybridation du gène *algA* de *Pseudomonas aeruginosa* avec le gène *manA* codant pour la phosphomannose isomérase d'*Escherichia coli* montre qu'il n'existe aucune homologie de séquence entre ces deux gènes ; en revanche, il existe des régions fortement homologues dans le gène de *Pseudomonas mendocina*, de *Pseudomonas putida* et même d'*Azotobacter vinelandii* [21].  
La réaction catalysée par la PMI est une activité commune à la biosynthèse de l'acide colanique impliqué, chez certaines souches mucoïdes d'*Escherichia coli*, dans la structure des polysaccharides de la capsule, et à la biosynthèse des alginates chez *Pseudomonas aeruginosa*. Le produit du gène *manA* est capable de compléter un mutant dans le gène *algA* de *Pseudomonas aeruginosa*, et la réciproque a été aussi observée [22].  
Le phosphate situé en position 6 sur le mannose est ensuite transféré par la phosphomannose mutase (PMM) en position 1. Peu de renseignements ont été obtenus sur la PMM. Cependant on a remarqué que cette activité enzymatique augmente dans les souches mucoïdes productrices d'alginate. La position du gène sur le chromosome bactérien n'est pas encore précisée. Il semblerait pourtant que le gène codant pour la PMM se trouve dans la région 34 minutes, qui doit contenir tous les gènes codant pour les enzymes cytoplasmiques de la biosynthèse des alginates [23].  
L'activation du sucre se fait par la GDP-mannose pyrophosphorylase (GMP) avec l'intervention d'une molécule de GTP. Sà-Corréia *et al.* [23] ont montré que l'hyper-expression du gène *algA* codant pour la PMI provoque aussi une augmentation de la quantité de GMP dans les bactéries. Devant l'impossibilité de séparer l'activité PMI et l'activité GMP, ces auteurs suggèrent que le gène *algA* code pour les deux activités. Il se pourrait donc que le même polypeptide de 56 000 daltons possédât les deux activités enzymatiques, situées chacune dans des domaines différents de la protéine et fonctionnant indépendamment l'une de l'autre.  
La GDP-mannose déshydrogénase (GMD) oxyde en deux étapes le GDP-mannose en GDP-mannuronate (figure 4). Cette réaction nécessite la réduction de deux molécules de NAD<sup>+</sup> par molécule de GDP-mannose transformée. La GMD est la dernière enzyme cytoplasmique spécifique de la biosynthèse des alginates et sa synthèse est fortement stimulée dans les souches mucoïdes.  
Le gène *algD* codant pour la GMD a été identifié et situé dans la même région chromosomique 34 minutes. Ce gène a été cloné dans un plasmide interspécifique et placé sous le contrôle du promoteur *tac\**. Son expression dans des « maxicells »\*\* d'*E. coli* conduit à la fabrication d'un polypeptide de 48 000 daltons [24].

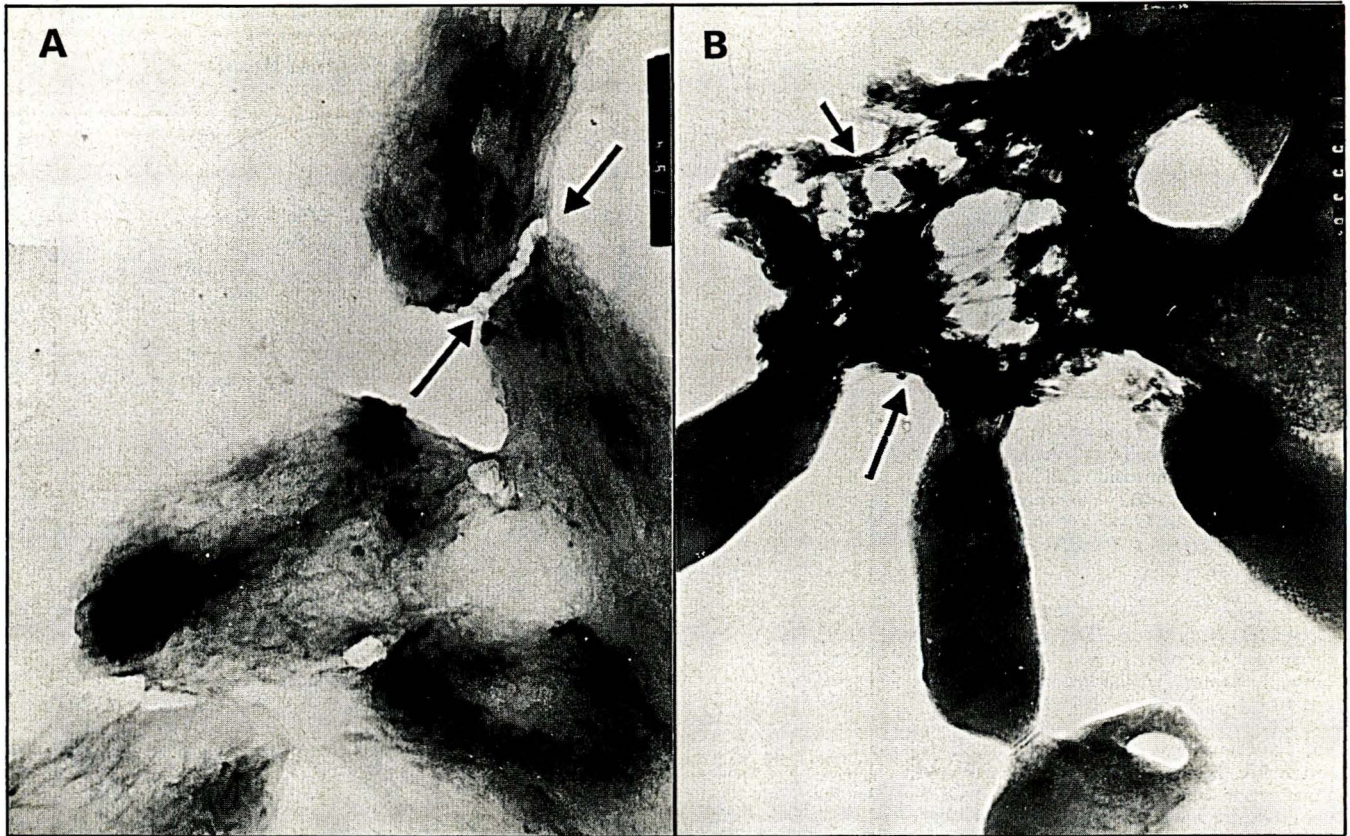


Figure 2. **Observation en microscopie électronique à transmission de la souche mucoïde *Pseudomonas aeruginosa* A22 alg+.** (A) : coloration des acides uroniques au rouge de ruthénium. Grossissement 50 000. (B) coloration à l'acide phosphotungstique. Grossissement 50 000. Les flèches montrent les structures filamenteuses qui relient les bactéries entre elles et les associent.

La purification de la GMD a été entreprise à partir de souches hyperproductrices contenant le gène *algD* sous le contrôle du promoteur *tac*. Dans ces conditions, la GMD se présente sous forme d'un hexamère de 290 000 daltons constitué par l'association de 6 sous-unités identiques de

\* Promoteur *tac* : promoteur obtenu par la fusion de la région d'ADN - 35 du promoteur de l'opéron tryptophane avec la région - 10 et l'opérateur de l'opéron lactose. Ce promoteur hybride est contrôlé par le répresseur de l'opéron lactose.

\*\* « Maxicells » : cellules obtenues après une forte irradiation à 254 nm de bactéries *Escherichia coli* déficientes dans les systèmes de recombinaison (*RecA*) et de photoréparation (*UvrA* et *Pht1*). L'ADN chromosomique n'est plus transcrit tandis qu'un ADN plasmidique est encore exprimé.

*m/s* n° 9, vol. 6, novembre 90

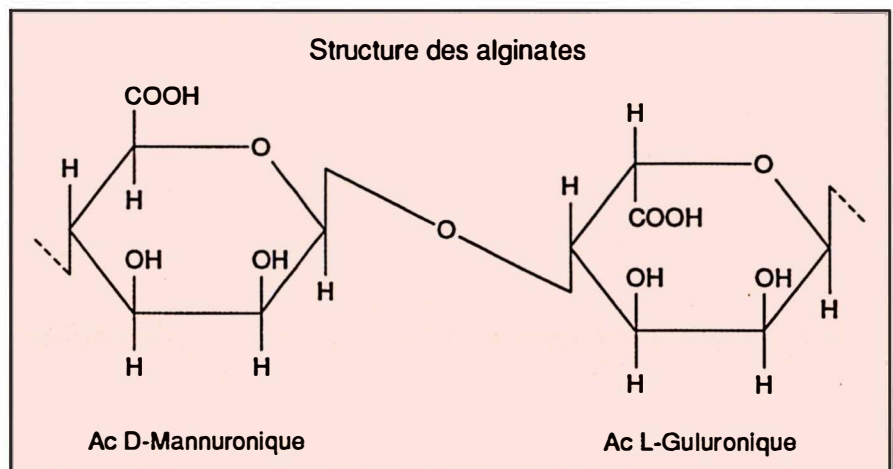


Figure 3. **Structure des alginates.** Les alginates sont constitués d'acides D-mannuroniques (M) et d'acides L-guluroniques (G) en enchaînement B 1 → 4.

## RÉFÉRENCES

23. Sà-Corréia I, Darzins A, Wang SK, Berry A, Chakrabarty AM. Alginate biosynthesis in mucoid and non mucoid *Pseudomonas aeruginosa* : overproduction of PMI, PMM and GMP by overexpression of the *pmi* gene. *J Bacteriol* 1987 ; 169 : 3224-31.
24. Deretic V, Gill JF, Chakrabarty AM. Gene *algD* coding for GDP-mannose dehydrogenase is transcriptionally activated in mucoid strains. *J Bacteriol* 1987 ; 169 : 351-8.
25. Roychoudhury S, May TB, Gill JF, Singh SK, Feingold DS, Chakrabarty AM. Purification and characterization of GDP-mannose dehydrogenase. *J Biol Chem* 1989 ; 264 : 9380-5.
26. Chitnis CE, Ohman DE. Cloning of *P. aeruginosa algG*, which controls alginate structure. *J Bacteriol* 1990 ; 172 : 2894-900.
27. Nguyen L, Schiller N. Identification of a slime polysaccharide depolymerase in mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Microbiol* 1989 ; 18 : 323-9.
28. Flynn JL, Ohman DE. Use of gene replacement cosmid vector for cloning alginate conversion genes from mucoid and non mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains : *algS* controls expression of *algT*. *J Bacteriol* 1988 ; 170 : 3228-36.
29. Deretic V, Konyecsní WM, Mohr CD, Martin DW, Hiber NS. Common denominators of promoter control in *Pseudomonas* and other bacteria. *Bio/Technology* 1989 ; 7 : 1249-54.
30. Konyecsní WM, Deretic V. DNA sequence and expression analysis of *algP* and *algQ*, components of the multigene system transcriptionally regulating mucoidy in *P. aeruginosa* : *algP* contains direct repeats. *J Bacteriol* 1990 ; 172 : 2511-20.
31. Kimbara K, Chakrabarty AM. Control of alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* : regulation of the *algR1* gene. *Biochem Biophys Res Comm* 1989 ; 164 : 601-8.
32. Kato J, Misra TK, Chakrabarty AM. AlgR3, a protein resembling eukaryotic histone H1, regulates alginate synthesis in *P. aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 2887-91.

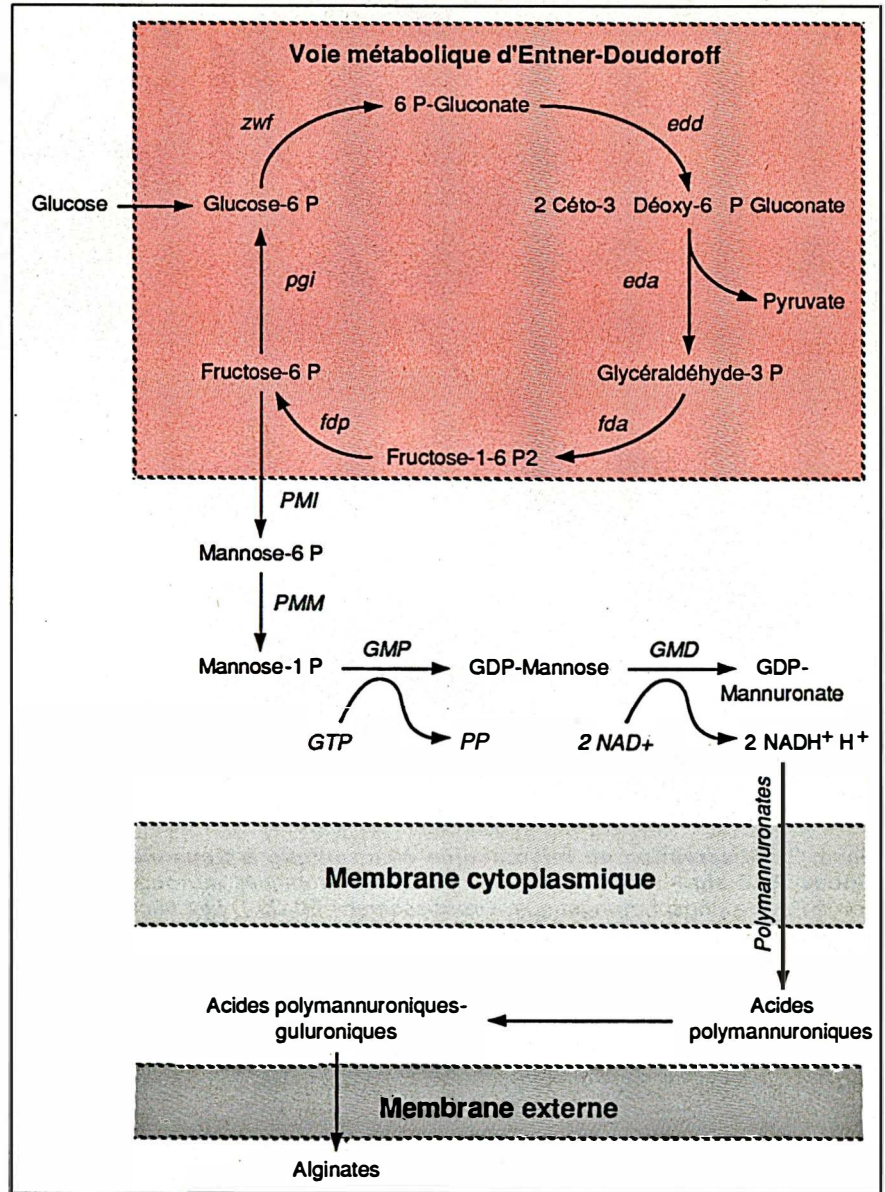


Figure 4. **Schéma de biosynthèse des alginates chez *Pseudomonas aeruginosa*.** *zwf* : glucose 6-phosphate déshydrogénase, *edd* : phospho-gluconate déshydratase, *eda* : phospho-2céto-3désoxy gluconate aldolase, *fda* : fructose diphosphate aldolase, *fdp* : fructose diphosphatase, *pgi* : phosphoglucose isomérase, *PMI* : phospho-mannose isomérase, *PMM* : phospho-manno-mutase, *GMP* : GDP-mannose pyrophosphorylase, *GMD* : GDP-mannose déshydrogénase.

48 000 daltons [25]. Dans les souches naturelles mucoïdes, la protéine se trouve sous forme d'un monomère auquel est associé au moins un nucléosido-sucré.

Les étapes extracytoplasmiques de la biosynthèse des alginates chez *Pseudomonas aeruginosa* (polymérisation, acétylation, épimérisation) sont très mal connues et aucune des protéines qui participent à ces étapes n'a été isolée. Cependant, très récemment, le gène *algG* qui code pour la C5 épimérase, enzyme qui transforme les acides D-mannuroniques non acétylés en acides L-guloniques, a été cloné et localisé dans la région 34 minutes entre *algD* et *algA* [26]. La caractérisation du produit de ce gène apporterait des renseignements précieux sur les dernières étapes de la biosynthèse des alginates.

Un dernier type d'activité associée aux fractions membranaires et périsplasmiques doit être signalé. Les souches mucoïdes et non mucoïdes de *Pseudomonas aeruginosa* possèdent une activité exopolysaccharide dépolymérase surtout active sur les acides poly-mannuroniques non acétylés [27]. L'intégration de ce type d'activité dans le schéma de biosynthèse ne semble pas aisée, sauf si l'on veut bien considérer que la mesure de ces activités lytiques pourrait représenter la réaction inverse de la polymérisation.

#### • Régulation de la biosynthèse des alginates

L'apparition de la mucoïdie chez les souches de *Pseudomonas aeruginosa* est un phénomène complexe, sous la dépendance de facteurs externes à la bactérie. Plusieurs études génétiques ont montré que toutes les souches de *Pseudomonas aeruginosa* possédaient l'information nécessaire à la synthèse des enzymes intervenant dans la biosynthèse des alginates.

Trois régions du chromosome semblent impliquées dans le passage des souches vers la forme mucoïde. Deux régions de régulation, une à 9 minutes sur la carte chromosomique, l'autre à 68 minutes, et une région contenant les gènes de structure pour les enzymes impliquées dans la chaîne de biosynthèse, et située à 34 minutes.

Bien que l'on puisse dresser un

schéma de régulation (figure 5), on ne sait pas actuellement quel est l'élément premier qui déclenche le phénomène, ni sur quoi il agit. Cependant, il semble bien qu'un rôle important soit tenu par la région 68 minutes du chromosome, où sont situés les gènes *algS* et *algT* qui contrôlent le passage des souches non mucoïdes vers la forme mucoïde. *algS* contrôle l'expression du gène *algT*, dont le produit diffusible agit sur une cible non encore identifiée [28].

La région de régulation 9 minutes a été beaucoup plus étudiée, et on y a décelé la présence de cinq gènes de régulation, *algP*, *algQ*, *algR1*, *algR2* et *algR3* [29-32]. Les produits des gènes *algQ*, *algR1* et *algR2* agissent sur le promoteur du gène *algD* qui code pour la GDP-mannose déshydrogé-

nase et activent la transcription du gène, ce qui explique les grandes quantités d'enzyme trouvées dans les souches mucoïdes.

L'activation de la transcription par les protéines *algR1* et *algR2*, qui agissent conjointement, est en relation directe avec la concentration en sel du milieu extérieur. En effet, le gène *algR1* ressemble au gène *ompR* de régulation de la biosynthèse des protéines de membrane externe chez *Escherichia coli*, et des expériences ont montré que la protéine *ompR* était capable de stimuler la transcription du gène *algD*. Ces gènes de régulation font partie de la classe des gènes activés en réponse à une modification de l'osmolarité du milieu extérieur, et l'augmentation de la concentration en NaCl se traduit par une augmen-

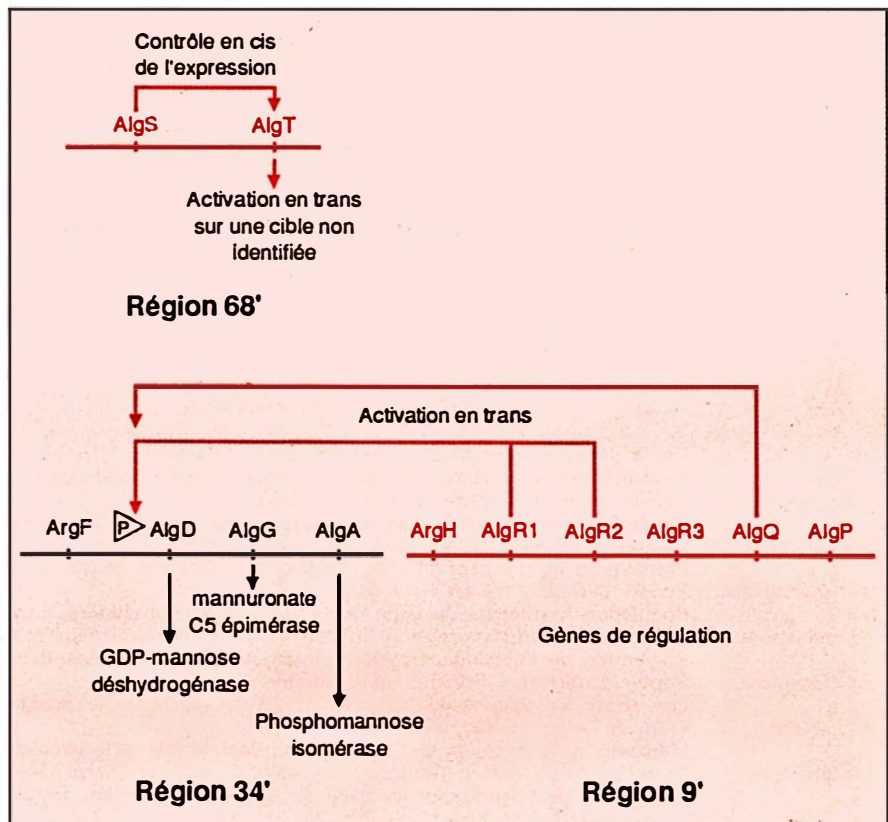


Figure 5. Régulation de la biosynthèse des alginates chez les souches mucoïdes de *Pseudomonas aeruginosa*.

▽ = promoteur du gène *algD*



tation du niveau de synthèse de la GDP-mannose déshydrogénase [13]. Tous les résultats obtenus jusqu'à maintenant concernent l'activation du gène *algD*. En revanche, le contrôle de l'expression des autres gènes de structure de la région 34 minutes n'est pas encore élucidé.

Le quatrième gène identifié dans la région 9 minutes, *algP*, présente du côté 3' une répétition directe de séquences en tandem, six unités de 75 paires de bases. Le gène *algP* paraît agir en synergie avec *algQ*, les deux gènes étant exprimés de manière constitutive chez toutes les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, qu'elles soient mucoïdes ou non mucoïdes [30].

Le produit du gène *algR3* possède toutes les propriétés des protéines de type histone, avec une moitié C-terminale riche en lysines au sein de courtes séquences ala-ala-lys-pro répétées une trentaine de fois [32]. Ce même motif peut d'ailleurs être retrouvé dans la protéine hypothétique (car non encore caractérisée) correspondant à la phase ouverte de lec-

ture du gène *algP*, où on le trouve répété 36 fois du côté C-terminal [30].

L'étude de ce schéma de régulation permet de mieux comprendre l'apparition de la mucoïdie chez les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et le rôle important joué par la concentration anormalement élevée en  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  dans le mucus des poumons des malades, comme inducteur de l'activation des gènes de régulation, puis des gènes de structure des protéines qui participent à la biosynthèse des alginates. La présence de protéines de type histone parmi les produits des gènes de régulation pose le problème de la structure de l'ADN au niveau des promoteurs. Une régulation par variation de la topologie de la molécule d'ADN au niveau des promoteurs, en particulier *algD* et *algR1*, pourrait ainsi intervenir ■

#### TIRÉS A PART

C. Hulen.

## Summary

**Colonization and persistence of mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients' lungs**

Chronic lung infection by *Pseudomonas aeruginosa* is the most important cause of morbidity and mortality in cystic fibrosis (CF) patients.

High osmolarity of the mucus activates transcription of *P. aeruginosa* genes that control alginate biosynthesis. Bacteria are then protected from both antibiotics and normal lung clearance systems, i.e. phagocytosis and ciliary activity. In addition, bacterial toxin release results in alteration of the tracheal epithelial cells and in hydrolysis of some components of the humoral defense systems. Alginate also increases viscosity of the bronchial mucus, resulting therefore in respiratory tract obstruction.