

Mise au point

Quorum-sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* : mécanisme moléculaire, impact clinique, et inhibition

Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* : molecular mechanism, clinical impact, and inhibition

R. Ruimy *, A. Andremont

Laboratoire de bactériologie (Pr A. Andremont) groupe hospitalier Bichat – Claude-Bernard, 46, rue Henri-Huchard 75877 Paris cedex 18, France

Reçu et accepté le 7 février 2004

Résumé

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie opportuniste responsable de diverses infections nosocomiales. L'expression des gènes de virulence au site de l'infection joue un rôle dans la physiopathologie de ces infections. La transcription de nombreux gènes de virulence de *P. aeruginosa* est sous le contrôle d'un mécanisme de régulation dépendant de la densité bactérienne, appelé quorum-sensing (QS). Deux systèmes de QS, nommés *las* et *rhl*, ont été identifiés chez *P. aeruginosa*. Chaque système se définit par un couple composé d'une protéine régulatrice et d'une enzyme autoinductrice : LasR/LasI pour le système *las* et RhlR/RhlI pour *rhl*. L'enzyme autoinductrice contribue à la synthèse de petites molécules, les acylhomosérine lactone (AHL) qui diffusent facilement de bactéries à bactéries. Lorsque le taux d'AHL atteint un seuil critique, les AHL se lient à la protéine régulatrice. Le complexe ainsi formé active la transcription de plusieurs facteurs de virulence. Cette activation permet d'amplifier et de synchroniser la virulence à l'ensemble de la population bactérienne. Les AHL possèdent une activité immunomodulatrice propre qui joue aussi un rôle dans la physiopathologie de l'infection. Le rôle du QS a été démontré expérimentalement sur différents modèles animaux d'infections à *P. aeruginosa*. Chez l'homme, l'expression du QS et la présence d'AHL ont été détectées dans des prélèvements respiratoires de patients atteints de mucoviscidose et infectés à *P. aeruginosa*. L'importance du QS au cours d'autres infections restent encore à démontrer. En conséquence, la connaissance des mécanismes moléculaires du QS offrent l'opportunité de développer de nouvelles cibles thérapeutiques dont l'objectif consistera à atténuer la virulence des souches au cours de l'infection.

© 2004 Société de réanimation de langue française. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic bacteria causing a wide variety of nosocomial infections. The expression of virulence genes in the infection site plays an important pathophysiological role. The transcription of several virulence genes of *P. aeruginosa* is controlled by a regulatory mechanism depending on bacterial density, named quorum-sensing (QS). Two QS systems, *las* and *rhl*, were identified in *P. aeruginosa*. Each system is defined by a couple of a regulation protein and an autoinducer enzyme: LasR/LasI and RhlR/RhlI for the *las* and *rhl* QS systems, respectively. The autoinducer enzyme contributes to the synthesis of small molecules, the acyl homoserin lactones (AHLs) which easily diffuse through bacterial membranes. When they reach a critical level, the AHLs are linked to the regulation protein. The resulting complex activates the transcription of multiple virulence genes. This activation can amplify and synchronise the virulence of the whole bacterial population. The AHLs also have an immuno-modulation activity, which plays a role in the pathophysiology of the infection. The role of the QS was experimentally demonstrated in different animal models of *P. aeruginosa* infections. In humans, the expression of the QS and the presence of AHL were detected in respiratory specimens of cystic fibrosis patients infected by *P. aeruginosa*. The effect of QS in other types of infection requires further studies. As a whole, the knowledge of the molecular mechanisms of QS offers the opportunity to develop new therapeutic targets to attenuate the virulence of strains during *P. aeruginosa* infections.

© 2004 Société de réanimation de langue française. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa* ; Quorum sensing

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; Quorum sensing

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : raymond.ruimy@bch.ap-hop-paris.fr (R. Ruimy).

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa représente le type même de l'espèce bactérienne opportuniste et volontiers multi-résistante aux antibiotiques. Les souches de *P. aeruginosa* sont souvent présentes dans l'environnement et peuvent provoquer des infections sévères chez les sujets aux défenses diminuées comme les malades atteints de mucoviscidose, les brûlés, les cancéreux ayant reçu de la chimiothérapie cytotoxique et les malades intubés en réanimation. L'incidence des pneumopathies nosocomiales est particulièrement élevée dans les services de réanimation. Dans l'enquête nationale de prévalence de 2001, leur fréquence atteint 11% de l'ensemble des infections nosocomiales. Le taux de mortalité de ces pneumopathies a été évalué de 24 à 76% (pour revue voir [1]).

Les souches de *P. aeruginosa* responsables de pneumopathies chez les sujets ventilés n'appartiennent pas à un groupe clonal particulier par rapport aux souches de l'environnement ou à celles responsables de bactériémies chez les sujets aplasiques, mais sont réparties de façon aléatoire au sein de l'espèce [2]. Il est probable que des différences dans l'expression de certains gènes soient à l'origine de la survenue des infections. De très nombreux facteurs de virulence ont été décrits chez *P. aeruginosa* sans qu'il semble y avoir de répartition différentielle de ces facteurs entre les souches responsables d'infections et celles isolées de l'environnement.

Le système de communication bactérienne appelé Quorum-sensing (QS) [3], découvert initialement sur des bactéries marines bioluminescentes, a trouvé un intérêt aux yeux des scientifiques lorsque ce mécanisme a été retrouvé chez d'autres bacilles à Gram négatif (pour revue voir [4]) comme *P. aeruginosa* [5-8]. Dans ce système, la communication dépend de la densité bactérienne et repose sur la synthèse et la diffusion, de bactérie à bactérie, de petites molécules appelées acylhomosérines lactones (AHL). Chez *P. aeruginosa*, le QS amplifie et coordonne l'expression de gènes dits de virulence par activation de leur transcription. La majorité des gènes régulants et régulés par le QS commence à être bien connue. Le rôle de ce mécanisme au cours de l'infection à *P. aeruginosa* a été largement étudié sur différents modèles expérimentaux dont la souris, les plantes et un nématode (pour revue voir [9]).

Cliniquement, la physiopathologie de l'infection à *P. aeruginosa* se déroule en deux temps, la phase d'infection vraie succède à une phase précoce de colonisation. La transition entre colonisation et infection est associée à une augmentation de la concentration bactérienne au niveau des alvéoles pulmonaires [10,11]. Il est probable que cette augmentation est un facteur clef de la physiopathologie de l'infection en déclenchant la mise en œuvre des facteurs de virulence dont l'expression est régulée par le QS. Les premières études cliniques qui suggèrent une expression du QS au cours de l'infection à *P. aeruginosa* ont essentiellement été réalisées chez les patients atteints de mucoviscidose. La fonctionnalité

du QS chez différents isolats cliniques vient récemment d'être étudiée *in vitro*. Il reste à apprécier l'importance réelle de ce système dans les autres infections à *P. aeruginosa*.

L'inhibition potentielle de ce système de régulation aboutirait à l'atténuation de la virulence de *P. aeruginosa* au site de l'infection. Les gènes régulant le QS et les AHL peuvent donc être des cibles potentielles des inhibiteurs. Cette nouvelle voie thérapeutique trouve tout son intérêt chez *P. aeruginosa* puisque des souches multirésistantes aux antibiotiques peuvent facilement être sélectionnées.

2. Une histoire typique d'une découverte : de *Vibrio fischeri* du calamar à *P. aeruginosa* chez l'homme

La découverte du QS s'est déroulée en trois étapes [12]. La première, pendant les années 70, concernait l'étude de la bioluminescence d'une bactérie marine, *V. fischeri*. J.W. Hastings et ses collaborateurs ont été les premiers à proposer l'hypothèse du QS en observant l'émission de luminescence par *V. fischeri* lorsque cette bactérie atteint une forte densité. Dans l'eau de mer, *V. fischeri* peut être retrouvé soit à l'état libre, soit en symbiose dans des organes particuliers de certains poissons comme l'espèce de calamar, *Euprymna scolopes* (pour revue voir [13]). A l'état libre dans l'eau de mer (correspondant à une concentration bactérienne faible), *V. fischeri* n'émet pas de lumière. A l'opposé, lorsque *V. fischeri* se retrouve concentré dans l'organe spécialisé de *Eu. scolopes* à une concentration de l'ordre de 10^{10} à 10^{11} CFU/ml, il émet une lumière. Cette symbiose entre les calamars et *V. fischeri* permet aux calamars d'échapper à leurs prédateurs. Les calamars sont repérés par leurs prédateurs situés en dessous d'eux grâce à l'ombre qu'ils provoquent en passant devant la lumière de la lune. Devenant lumineux grâce à *V. fischeri*, les calamars ne provoquent plus d'ombre et peuvent se nourrir en toute tranquillité. Le concept d'auto-induction et de communication bactérienne a été alors proposé [3]. Cette hypothèse a rencontré un grand scepticisme ou un désintérêt de la part de la communauté scientifique.

Durant la décennie suivante, les molécules et les gènes impliqués dans ce mécanisme ont été caractérisés et le modèle du QS a ainsi pu être confirmé. Deux gènes principaux, *luxR* et *luxI* sont impliqués dans ce mécanisme [14]. Le gène *luxI* code pour une enzyme qui participe à la synthèse d'un auto-inducteur de la famille des AHL. Ces auto-inducteurs diffusent librement dans le milieu et de bactéries à bactéries [15]. Lorsque la concentration en AHL atteint un seuil critique, elles se lient aux protéines LuxR codées par le gène *luxR*. Le complexe LuxR/AHL devient activateur de la transcription: (i) de gènes impliqués dans la synthèse de la luminescence, et (ii) de *luxI* qui synthétise alors plus d'auto-inducteur.

Devant la caractérisation moléculaire et génétique de ce mécanisme, les scientifiques ont été obligés d'accepter l'existence du QS mais ont souligné son caractère limité à quelques bactéries marines. L'opinion des scientifiques

changea dans les années 90 lorsque plusieurs équipes indépendantes découvrirent que ce mécanisme existe chez plusieurs bacilles à Gram négatif (pour revue voir [4]) dont certains sont responsables d'infections opportunistes chez l'homme comme *P. aeruginosa* [5-7,16]. La liste de ces bactéries est disponible sur le site <http://www.nottingham.ac.uk/quorum/>

L'objectif actuel est de mieux caractériser ce mécanisme chez les bactéries pathogènes, d'évaluer son impact lors de l'infection et de trouver des molécules pouvant l'inhiber. De nouveaux médicaments pouvant empêcher l'expression de la virulence pourraient donc compléter l'arsenal des antibiotiques.

3. Mécanismes du quorum-sensing chez *P. aeruginosa*

Chez *P. aeruginosa*, deux systèmes de QS ont été découverts, le système *las* et le système *rhl*, contrôlant à eux deux la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la virulence.

Le système *las*, le premier à avoir été décrit [5], comprend le gène *lasR* codant pour la protéine régulatrice LasR et le gène *lasI* codant pour une enzyme, auto-inducteur synthase, LasI, nécessaire à la synthèse d'un type d'AHL : *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C12-HSL). Comme chez *V. fischeri*, les 3-oxo-C12-HSL possèdent la propriété de traverser facilement les membranes bactériennes et constituent ainsi un véritable moyen de communication entre les bactéries. Lorsque la concentration en 3-oxo-C12-HSL atteint un seuil critique, témoin d'une concentration bactérienne élevée, une molécule d'AHL se lie à deux protéines LasR pour constituer un complexe activateur de la transcription de plusieurs gènes. Cette activation est déclenchée de manière synchrone dans toute la population bactérienne à la jonction entre la phase de croissance exponentielle et le début de la phase stationnaire (Figure 1). Les gènes activés par ce système comme indiqué sur la Figure 2 comprennent :

- *lasB* [5], *lasA* [17], *aprA* [6] codant respectivement pour deux élastases, et pour une protéase alcaline contribuant chacune à la destruction des tissus pulmonaires,
- *toxA* [6], codant pour une exotoxine ADP-ribosylante,
- *xcpR* et *xcpP* [18], codant pour des protéines de la machinerie de sécrétion de type II nécessaires à l'exportation de ces facteurs hors de la bactérie,
- et *lasI*, permettant une augmentation rapide de la synthèse de 3-oxo-C12-HSL et donc une amplification du signal par auto-induction [19].

Le deuxième système *rhl* fonctionne selon le même schéma et comprend le gène *rhlR*, codant pour la protéine régulatrice RhlR et le gène *rhlI*, codant pour une enzyme auto-inducteur synthase, RhlI nécessaire à la synthèse d'un second type d'AHL : *N*-butyryl-L-homosérine lactone (C4-HSL) [20,21]. Le complexe RhlR-C4-HSL contrôle l'expression de l'opéron *rhlAB* nécessaire à la production de rham-

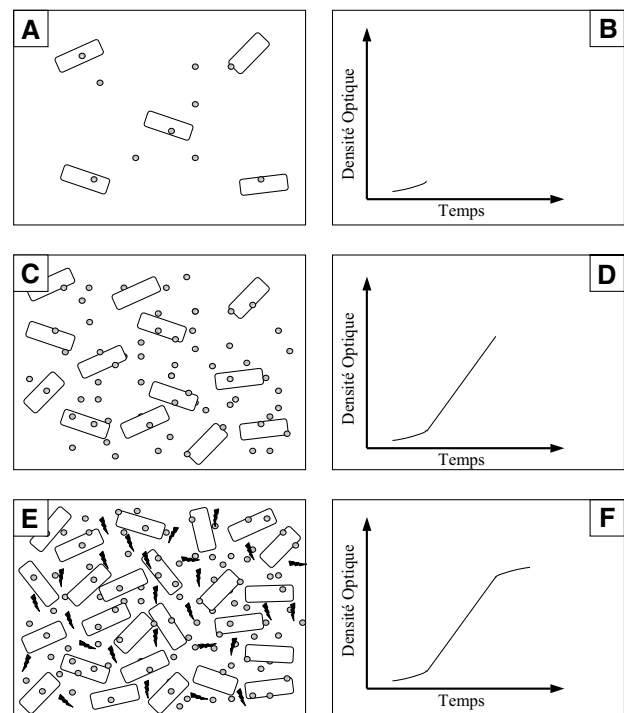


Fig. 1. Principe de l'expression du Quorum sensing au cours de la croissance bactérienne.

La croissance bactérienne dans un milieu de culture (A, C, E) est suivie au cours du temps en fonction de la densité optique (B, D, F). Au cours de la phase de latence (A,B), la synthèse de petites molécules appelées acyl-homosérine lactones (AHL) représentées par de petits cercles gris augmente. Cette synthèse dépend d'une synthase auto-inductrice. Les AHL diffusent facilement de bactéries à bactéries. Lorsque la quantité d'AHL atteint un seuil critique à la jonction entre la phase de croissance exponentielle (C, D) et la phase stationnaire (E, F), les AHL déclenchent la production de facteurs de virulence (éclair noir). Cette production est coordonnée à toute la population bactérienne.

nolipide [20], et l'expression d'une série de gènes dont *lasB*, *lasA*, *aprA*, et *rhlI*.

Récemment, plusieurs autres gènes régulés par le QS ont été identifiés dans trois études en utilisant une approche d'analyse transcriptionnelle du génome de *P. aeruginosa* et la technologie des puces à ADN [22-24]. La majorité des transcrits régulés par le QS traduirait des protéines dont les fonctions sont hypothétiques voire inconnues. Quarante dix-sept gènes sont trouvés en commun dans les trois études. Pour confirmer la validité de ces résultats, il faudra identifier et caractériser ces protéines.

Malgré la similitude structurale entre couples activateurs/inducteurs (LasR/LasI et RhlR/RhlI) des deux systèmes, aucun des composants d'un système ne peut remplacer ceux de l'autre. Cependant, il existe des interactions entre ces deux systèmes. Le complexe LasR-3-oxo-C12-HSL active la transcription de *rhlR* et *rhlI* (Figure 2). De plus, les 3-oxo-C12-HSL peuvent entrer en compétition avec les C4-HSL pour le site de liaison à RhlI et pourraient ainsi agir comme un antagonisme du système *rhl*. Il existe donc une hiérarchie entre ces deux systèmes avec le système *las* qui régule positivement le système *rhl* [25].

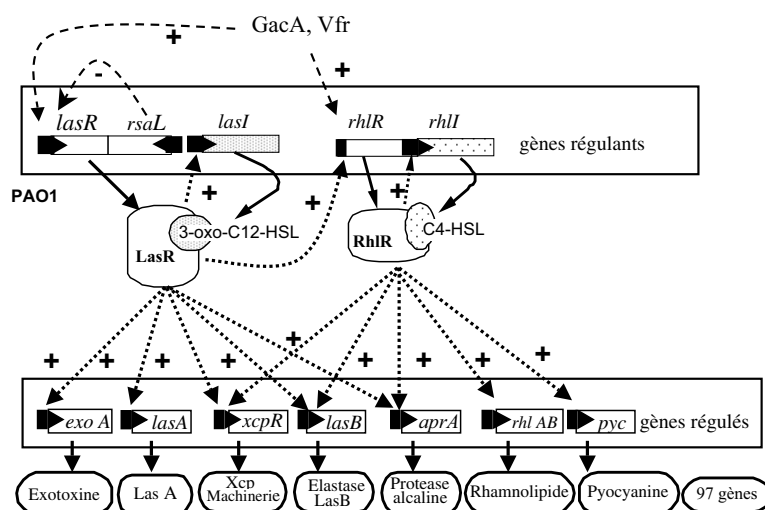


Fig. 2. Mécanisme moléculaire du Quorum sensing chez *P. aeruginosa*

Deux systèmes de Quorum sensing ont été identifiés chez *P. aeruginosa* : le système *las* et *rhl*. Le système est constitué d'un gène régulateur *lasR* codant pour la protéine LasR, d'un gène *lasI* codant pour une synthase auto-inductrice LasI participant à la synthèse d'une petite molécule de la famille des homosérines lactones (HSL) 3-oxo-C12-HSL. Le complexe LasR/3-oxo-C12-HSL est activateur transcriptionnel de gènes de virulence (indiqué en bas de la figure) et de *lasI*. Selon le même modèle, le système *rhl* est constitué de gènes *rhIR*, *rhII* et d'une autre HSL : C4-HSL. Ce système active des gènes en commun avec le système *las* et propre comme le rhamnolipide. Le système *las* contrôle le système *rhl*. Le système *las* est contrôlé négativement par le produit du gène *rsaL* et positivement par GacA et Vfr. Récemment, 97 gènes dont la majorité ont une fonction hypothétique viennent d'être impliqués dans le QS.

Les mécanismes régulant positivement l'expression des gènes *lasR* et *rhIR* sont encore mal connus. Ils semblent faire intervenir des signaux extérieurs, notamment par l'intermédiaire :

- d'un système à deux composants type protéines kinases impliquant les protéines LemA-GacA ; GacA activant *lasR* et *rhIR* [26].
- et d'un système utilisant l'AMPc comme Vfr [27].

La régulation négative du système *las* est actuellement attribuée à deux gènes *rsaL* et *qscR*. Le gène *rsaL* est situé immédiatement en aval de *lasR* et inhibe la synthèse de LasI [28]. Plus récemment, l'analyse du génome complet de *P. aeruginosa* a révélé l'existence d'un gène homologue à *lasR* nommé *qscR* [29]. La protéine encodée par ce gène inhibe également la transcription de *lasI* et pourrait ainsi assurer le contrôle du QS empêchant son déclenchement dans des environnements ne nécessitant pas sa mise en œuvre.

L'interaction entre tous ces gènes rend plus complexe la régulation de ces deux systèmes comme cela avait été supposé au départ.

Plusieurs autres molécules régulant le QS ont pu être détectées dans des surnageants de cultures de *P. aeruginosa*. Des molécules d'AHL autres que les deux principales 3-oxo-C12-HSL et C4-HSL ont ainsi été retrouvées en très faible quantité. Elles pourraient agir comme des inhibiteurs compétitifs de l'auto-induction tant que la concentration en 3-oxo-C12-HSL n'atteint pas un seuil critique. Des molécules de dipeptides cycliques (diketopiperazines) ont également été retrouvées chez *P. aeruginosa* [30]. Leur rôle reste encore très hypothétique mais pourrait, selon l'environnement où les bactéries se trouvent, inhiber ou activer le QS. Enfin, plus surprenante a été l'identification d'une molécule autoinductrice, 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (PQS), dont la struc-

ture est proche des quinolones [31]. Le PQS, dont la synthèse est sous le contrôle de LasR, active la transcription de *lasB* et *rhII*, et constituerait un lien supplémentaire entre le système *las* et *rhl* [31]. La similarité structurale entre PQS et les quinolones restent encore énigmatique même si l'activité antimicrobienne de ce PQS n'a pas été retrouvée.

4. Implications du QS de *P. aeruginosa* en pathologie

4.1. Preuve expérimentale du rôle du QS de *P. aeruginosa*

Différents types de modèles animaux ont été utilisés pour préciser le rôle du QS dans la pathogénie de *P. aeruginosa*. Dans le modèle de pneumopathie à *P. aeruginosa* chez la souris nouveau-née, l'intensité de l'infection est appréciée sur la capacité à déclencher une pneumonie aiguë, une bactériémie et une mortalité du souriceau [32,33]. Dans ce modèle, seule la souche PAO1 a été testée puisqu'il s'agissait de la souche chez laquelle le QS a été décrit et pour laquelle plusieurs mutants isogéniques étaient disponibles. Les lésions pulmonaires obtenues avec PAO1 sont essentiellement de type inflammatoire avec une infiltration de polynucléaires sans destruction des structures alvéolaires. En comparaison, la souche dérivée de PAO1 et rendue déficiente en *lasR* déclenche une pneumonie beaucoup moins sévère, peu ou pas de bactériémie, et une mortalité significativement plus basse. De même, une réduction significative de la virulence a été retrouvée avec les souches mutantes pour les autres gènes du QS en *lasI*, *rhII*, ou à la fois en *lasI* et *rhII*. La diminution de la virulence la plus marquée est observée avec le double mutant. Lorsque ces souches mutées sont respectivement complémentées par un plasmide portant soit *lasR*, *lasI*, *rhII*,

ou *lasI* et *rhlI*, le niveau de virulence est restauré. Ces résultats confirment le rôle prépondérant du QS dans la pneumopathie à *P. aeruginosa*. Dans le modèle de souris brûlée et infectée par *P. aeruginosa*, les souches mutées dans les gènes du QS donnent également des infections cutanées moins extensives, de rares localisations secondaires (foie et rate) et une mortalité moindre que la souche parentale [34]. Ce modèle montre que le QS joue un rôle dans la dissémination de *P. aeruginosa* de la peau au foie et à la rate [34]. Ces deux modèles plaident clairement en faveur du rôle du QS dans la survenue de la pneumopathie chez le patient ventilé ou de l'infection chez le brûlé. En revanche, les études sur un modèle d'infection de la cornée chez la souris ne retrouvent pas d'effet du QS dans la virulence de *P. aeruginosa* puisque la souche mutée pour *lasR* est aussi virulente que la souche PAO1 [35]. Les auteurs de ces travaux expliquent les différences observées entre le poumon et la cornée par l'existence d'un stimuli tissulaire spécifique à l'origine du déclenchement ou de l'inhibition du QS. Cette hypothèse n'a pas encore été confirmée.

Pour rechercher des facteurs de virulence communs à trois organismes différents (un nematode, *Caenorhabditis elegans*, une plante, *Arabidopsis thaliana* et la souris brûlée), une approche de transposition au hasard dans le génome d'une souche clinique PA14 a été développée. Les souches mutantes par insertion d'un transposon dans le gène *lasR* ou dans le gène *gacA* apparaissent beaucoup moins virulentes dans les trois modèles que la souche PA14 [36]. Ce résultat révèle non seulement que le système du QS régule la virulence dans différents règnes (végétaux et animaux) du monde vivant et suggère que le QS est un mécanisme d'adaptation dont l'apparition est ancienne dans l'évolution de *P. aeruginosa*. Cette approche originale montre également que les résultats obtenus sur un modèle plus simple et moins coûteux comme sur *C. elegans* peuvent être extrapolés à ceux des mammifères [37].

4.2. Rôle des AHL au cours de l'infection à *P. aeruginosa*

Les AHL ont tout d'abord pu être détectées dans les expectorations et les biopsies bronchiques des patients mucoviscidiques.

Parmi les AHL, seul le 3-oxo-C12-HSL présente chez l'hôte une activité immuno-modulatrice [38,39]. Le 3-oxo-C12-HSL joue un rôle dans l'infection en inhibant la prolifération lymphocytaire, en réduisant la production de TNF α induit par le lipo-polysaccharide de *P. aeruginosa*, et en stimulant la vasodilatation. De plus, le 3-oxo-C12-HSL possède la capacité de provoquer une bradycardie lorsqu'il est administré aux rats. Récemment, il a été démontré *in vivo* et *in vitro* que le 3-oxo-C12-HSL accélère l'apoptose des macrophages et des polynucléaires neutrophiles [40]. En conséquence, le 3-oxo-C12-HSL n'exerce pas uniquement un rôle de régulation de la virulence dépendant du QS mais agit également directement sur les défenses de l'hôte pour augmenter les chances de survie des bactéries.

4.3. Rôle du QS dans la formation des biofilms de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa a la capacité de former des biofilms dont l'architecture est constituée de microcolonies engainées dans des exopolysaccharides d'alginate qui se structurent en forme de champignons ou de piliers séparés par des canaux permettant la circulation de nutriments [41]. Les bactéries situées au sein des biofilms deviennent résistantes à la phagocytose, aux anticorps, aux désinfectants et aux antibiotiques. La nature des mécanismes de ces résistances n'a pas encore été complètement élucidée. Ces biofilms représentent la principale cause de persistance de la pneumopathie chez les patients mucoviscidiques et de l'infection oculaire chez les sujets porteurs de lentilles de contact [41].

Trois étapes peuvent être distinguées dans la formation des biofilms : une étape initiale d'attachement à la surface d'une muqueuse ou d'un matériel étranger, suivie d'une étape de prolifération aboutissant à la formation de microcolonies et enfin d'une étape de structuration du biofilm. Il a été montré que le QS joue un rôle dans la dernière étape [42]; ce qui n'est pas surprenant puisque le QS est dépendant d'une forte densité bactérienne. Le biofilm obtenu à partir d'une souche mutée dans le gène *lasI* est plus fin, peu structuré, et sensible à l'action d'un détergent à 0.2% SDS. Par contre, une souche mutante dans le gène *rhlI* donne un biofilm peu modifié comparable à celui obtenu avec la souche parentale. L'addition de 3-oxo-C12-HSL restaure un biofilm structuré et confirme le rôle essentiel du QS via *lasI*.

La production de 3-oxo-C12-HSL au sein des biofilms a été mesurée sur un modèle de vessie artificielle et sur des sondes urinaires issues de patients [43]. Le rôle du QS dans la constitution des biofilms ouvre des perspectives thérapeutiques pour l'utilisation d'inhibiteurs du QS.

4.4. • Études cliniques et Importance du QS dans les infections à *P. aeruginosa*

• Études cliniques

Les études cliniques qui prouvent une activité du QS au cours de l'infection concernent exclusivement les infections broncho-pulmonaires à *P. aeruginosa* chez les patients mucoviscidiques [44-47]. Deux approches ont été développées pour établir ce rôle. La première approche a eu pour but de quantifier directement dans les expectorations les ARN messagers (ARNm) des gènes régulés par le QS (*toxA*, *lasA* et *lasB*) et des gènes régulant le QS (*lasR* et *lasI*) [45]. La quantification des transcrits est réalisée à l'aide de sondes d'ADN radioactives, spécifiques de chaque gène et hybridées sur les ARN totaux extraits des expectorations. La faible quantité des ARNm et leur demi-vie courte rendent cette approche difficile mais possible à condition que le nombre de bactéries présentes dans le prélèvement soit important; ceci est effectivement le cas pour les expectorations des patients mucoviscidiques où *P. aeruginosa* peut facilement atteindre 10⁸ CFU/ml. Les résultats montrent que les niveaux des transcrits de *lasR*, et de *lasI* sont corrélés entre eux et avec

ceux de *toxA*, *lasA* et *lasB* dans les expectorations. Ce résultat suggère que la transcription des gènes est coordonnée au cours de l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* chez ce type de patients. La deuxième approche a consisté à détecter la présence d'AHL dans les expectorations et les biopsies transbronchiques des patients atteints de mucoviscidose [44,46,47]. Les concentrations des deux AHL varient selon les patients. Les 3-oxo-C12-HSL sont présents chez 75% des patients, les C4-HSL chez 69% et les deux ensembles chez 61% d'entre eux. Aucune des deux AHL n'est détectée pour 14% des patients. De plus, les 3-oxo-C12-HSL sont pour la majorité des patients en quantité plus élevée que les C4-HSL. Les raisons de cette différence ne sont pas encore clairement élucidées mais plusieurs hypothèses sont proposées. Les C4-HSL pourraient diffuser plus facilement dans les poumons que les 3-oxo-C12-HSL qui persisteraient plus longtemps dans les expectorations. Une forte expression des pompes d'efflux par mutations serait responsable d'un efflux important des C4-HSL [44].

En conséquence, ces deux approches plaident en faveur d'une activité de virulence régulée par le QS dans les infections broncho-pulmonaires à *P. aeruginosa* des patients atteints de mucoviscidose. Cette activité n'est cependant pas présente chez la totalité des patients.

• Importance du QS dans les infections à *P. aeruginosa*

Les études utilisant des modèles animaux ont essentiellement été menées avec la souche PAO1 et moins fréquemment avec la souche PA14. La souche PAO1 est une souche clinique qui présente un phénotype de virulence dépendant du QS. Elle est qualifiée de souche invasive. A l'opposé une souche qualifiée de cytotoxique telle la souche PA103 présente une virulence utilisant le système de sécrétion de type III [48]. Ce système s'active au contact de la cellule eucaryote et aboutit à la constitution d'un canal entre la bactérie et la cellule eucaryote permettant à la bactérie d'injecter des exoenzymes délétères pour la cellule. La souche PA103 ne possède pas de système de QS fonctionnel et la souche PAO1 de système de sécrétion de type III. La souche invasive (PAO1), la souche cytotoxique (PA103) et la souche invasive et cytotoxique (6294) ont été comparées sur un modèle de pneumopathie chez la souris [49]. La mortalité apparaît chez la souris à une concentration bactérienne de l'ordre de 10^7 UFC/ml avec la souche PA103 alors qu'il faut 10^9 UFC/ml pour les souches PAO1 et 6294. La souche PA103 entraîne une destruction importante des alvéoles pulmonaires avec une infiltration très modérée de polynucléaires alors que la souche PAO1 donne des lésions pulmonaires moins sévères, une conservation de la structure des alvéoles pulmonaires et une infiltration importante de polynucléaires. Les lésions obtenues avec 6294 sont mixtes, moins intenses que PA103 et plus que PAO1. Cette étude montre que l'effet de la virulence contrôlé par QS est plus modéré que celui exprimé par le système de sécrétion de type III. Il existe probablement un équilibre entre ces deux systèmes de virulence : QS et système de sécrétion de type III.

Par ailleurs, la fonctionnalité du QS a été récemment étudiée sur une collection de souches isolées de prélèvements respiratoires de pneumopathies nosocomiales bien documentées, de souches d'hémocultures de patients neutropéniques, et d'environnements (d'eaux de rivières et de piscines) [50]. La quantification des ARNm des gènes *lasR*, *lasB* et *aprA* a été réalisée par RT-PCR en temps réel au début de la phase exponentielle de croissance et de la phase stationnaire sur un échantillon de 35 souches représentatifs de chacune des trois origines d'isolement. Les résultats montrent que seules 50% des souches de *P. aeruginosa* ont montré une transcription d'*aprA* et de *lasB* dépendant de l'augmentation de la transcription de *lasR*. Ils suggèrent que le système de régulation du QS n'est impliqué que pour 50% des souches quelle que soit leur origine.

5. Inhibition du QS : nouvelle voie de traitement des infections à *P. aeruginosa*

La forte prévalence de la multi-résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa* et l'absence de perspectives de développement de nouveaux antibiotiques nécessitent d'explorer d'autres voies thérapeutiques. L'inhibition du QS s'inscrit tout à fait dans cette démarche. A la différence des antibiotiques, l'inhibition du QS n'a pas d'action directe sur la croissance bactérienne mais sur la réduction de la virulence de *P. aeruginosa* (pour revues récentes voir [51]). Il est ensuite nécessaire que le système immunitaire du patient élimine les *P. aeruginosa* rendus moins virulents. Cependant, cette voie thérapeutique ne sera efficace qu'à la seule condition que la souche de *P. aeruginosa* responsable de l'infection exerce une virulence principalement contrôlée par le QS.

Actuellement, trois cibles potentielles peuvent être envisagées pour inhiber le QS :

- la synthèse et l'activité des AHL
- la formation des complexes LasR et RhlR avec les AHL correspondants
- la transcription de *lasR/lasI* et *rhlR/rhlI* par les activateurs GacA et Vfr

De plus, l'activité des macrolides chez les patients mucoviscidosiques ou atteints de panbronchiolite diffuse pourrait être expliquée par une inhibition du QS [52].

5.1. Inhibition de l'activation et de la synthèse des AHL

Les AHL sont des molécules instables même au pH physiologique et qui deviennent inactives lorsque le pH du milieu augmente. Cette inactivation des AHL passe par une ouverture du cycle appelée « lactonolyse ». Plusieurs espèces bactériennes comme *Bacillus* sp. possèdent des lactonases clivant le cycle des AHL [53]. Les gènes *aiiA* codant les lactonases ont été introduits et exprimés dans une souche de *P. aeruginosa* via un plasmide. Dans cette souche, la synthèse des C4-HSL et des 3-oxo-C12-HSL est considérablement réduite de telle sorte qu'ils ne peuvent plus déclencher

d'activation de la transcription des gènes de virulence. L'utilisation de telles enzymes se heurtent à deux inconvénients. Le premier concerne le caractère réversible de l'action de l'enzyme dépendant du pH: les AHL inactivées par l'ouverture de leur cycle pourraient redevenir actives par fermeture spontanée du cycle. Le second est la taille trop importante des enzymes rendant leur transport difficile au sein du site infectieux et donc leur utilisation par voie systémique peu envisageable. La seule application possible pourrait être locale comme topique dans les infections cutanées à *P. aeruginosa* chez les sujets brûlés.

L'utilisation d'anticorps anti-3-oxo-C12-HSL vient récemment d'être rapportée comme nouvelle approche de blocage des AHL [51]. Ces anticorps se lient aux AHL extracellulaires les rendant incapables de diffuser librement de bactéries à bactéries et les empêchant d'exercer leur activité immuno-modulatrice. Les premiers résultats paraissent très encourageants mais nécessitent d'être confirmés par d'autres études.

Par ailleurs, il a été possible d'inhiber la synthèse d'AHL en modifiant la nature des précurseurs indispensables à cette synthèse. Les mutations dans les enzymes impliquées dans le métabolisme des acides gras, précurseurs des AHL, entraînent une synthèse importante d'acide gras à courtes chaînes [54]. L'enzyme LasI se trouve alors saturée d'acyl à courte chaîne et réduit la synthèse de 3-oxo-C12-HSL. Dans ces conditions, la virulence de la souche de *P. aeruginosa* est significativement atténuée. Cette approche est potentiellement intéressante pour inhiber le QS.

5.2. Inhibition de la formation des complexes LasR ou RhlR avec les AHL

La liaison des protéines LasR ou RhlR avec ses AHL correspondantes entraîne une activation de la transcription de plusieurs gènes par interaction avec l'ADN et le domaine C-terminal des protéines. Le complexe LasR-HSL se lie en amont du gène cible (promoteur/opérateur) par le domaine N-terminal de la protéine. L'inhibition de la liaison LasR-HSL par une AHL antagoniste est une approche en développement. Plusieurs antagonistes ont récemment ainsi été identifiés et leurs actions évaluées sur la virulence de *P. aeruginosa* [55].

Une autre voie d'inhibition de la liaison LasR-AHL est l'utilisation d'antagonistes dérivés des furanones. Cette recherche résulte de l'observation de l'action de furanone halogénée sécrétée par une espèce d'algue, *Delisea pulchra*. Les furanones d'algues déplacent la liaison luxR-AHL et empêchent la colonisation de l'algue par des bactéries [56]. Hentzer et al. [57] ont récemment montré que l'utilisation d'un composé synthétique de furanone halogénée est capable d'inhiber la transcription de gènes de virulence chez *P. aeruginosa*. L'administration de ce composé chez la souris dans un modèle de pneumopathie réduit de trois log la quantité de bactéries isolées de leurs poumons par rapport aux souris non traitées. L'avantage de l'utilisation de telles molécules réside dans leur petite taille et leur facilité d'administration.

5.3. Inhibition de la transcription de lasR/lasI et rhlR/rhII

In vitro, la délétion des gènes qui contrôlent la transcription de *lasR* et de *rhlR* comme *gacA* et *vfr* réduirait la production des protéines LasR et RhlR et donc la production de facteurs de virulence [26,27]. Cette approche a été bien démontrée pour *gacA* sur un modèle de brûlures de la souris infectée à *P. aeruginosa*.

Des études récentes fondées sur l'analyse transcriptionnelle du génome de *P. aeruginosa* ont montré que lorsque la densité bactérienne est faible, l'apport d'AHL exogène ne permet pas d'activer le QS [22,24]. Ces études suggèrent donc que d'autres facteurs doivent être impliqués pour activer le QS. L'inhibition de ces facteurs en amont du QS ouvre une voie potentielle pour inhiber le QS.

Enfin, l'utilisation d'oligonucléotides antisens pouvant s'hybrider aux ARNm des gènes *lasR*, *lasI*, *rhlR*, *rhlI* pourrait également inhiber l'expression du QS [51]. A la différence des eucaryotes, cette technologie n'a encore été utilisée que sur peu de bactéries. Elle reste cependant une voie potentielle d'inhibition du QS.

5.4. Inhibition du QS par macrolides

Les macrolides n'ont pas d'action bactéricide ou bactériostatique sur *P. aeruginosa*. Cependant, plusieurs études montrent des effets bénéfiques du traitement au long cours par macrolides chez des patients mucoviscidiques ou atteints de bronchiolite diffuse. L'action des macrolides pourrait être anti-inflammatoire et/ou modulerait la production de protéases de *P. aeruginosa*. Récemment, Tateda et al. [52] rapportent que 2 µg d'azithromycine inhibent le QS et que l'addition d'auto-inducteur synthétique restaure partiellement l'expression de *lasR* et *rhlR* mais pas celle de *lasI*. Le mécanisme d'action reste encore à déterminer.

6. Conclusion

Le système du QS chez *P. aeruginosa* est double (*las*, *rhl*) et régule clairement l'expression de gènes de virulence. Des mutants de ce système ont prouvé leur rôle dans la virulence de *P. aeruginosa in vitro* comme sur la majorité des modèles animaux. Ces preuves ont essentiellement été établies sur deux souches PAO1 et PA14. Sur une collection de souches isolées de différentes origines (pneumopathie, bactériémie, environnement), le QS ne semble s'exprimer que pour environ 50% des souches. Hormis chez les patients atteints de mucoviscidose, aucune étude clinique n'a été menée pour mesurer l'importance du QS chez les patients ventilés développant une pneumopathie à *P. aeruginosa*. La virulence qui passe par le système de sécrétion de type III paraît plus brutale que celle régulée par le QS. L'importance relative de ces deux systèmes chez les souches responsables d'infections reste à évaluer. L'exploration des voies d'inhibition du QS à visée thérapeutique est en plein essor. Il faut cependant

se rappeler que malgré le développement d'un arsenal thérapeutique aussi sophistiqué qu'il soit, nous n'échapperons pas à la sélection naturelle de mutants résistants. Cette sélection sera d'autant plus difficile à s'exercer qu'une combinaison d'inhibiteurs touchant les deux systèmes sera utilisée. Ce risque est d'autant plus grand chez les patients mucoviscidiques infectés à *P. aeruginosa* puisque près de 20% des souches isolées de leurs expectorations sont hypermutatrices [58]. Enfin, la place de ce traitement par rapport à l'antibiothérapie restera à définir en sachant que le traitement anti-QS n'aura pas d'action sur la croissance bactérienne.

Remerciements

Nous remercions Laurence Armand-Lefevre pour ses remarques sur ce manuscrit.

Références

- [1] Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:867–903.
- [2] Ruimy R, Genauzeau E, Barnabe C, Beaulieu A, Tibayrenc M, Andremont A. Genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from ventilated patients with nosocomial pneumonia, cancer patients with bacteremia, and environmental water. *Infect Immun* 2001;69:584–8.
- [3] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 1994;176:269–75.
- [4] Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ, Salmond GP. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2001;25:365–404.
- [5] Gambello MJ, Iglewski BH. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol* 1991;173:3000–9.
- [6] Gambello MJ, Kaye S, Iglewski BH. LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of *exotoxin A* expression. *Infect Immun* 1993;61:1180–4.
- [7] Passador L, Cook JM, Gambello MJ, Rust L, Iglewski BH. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 1993;260:1127–30.
- [8] Pearson JP, Gray KM, Passador L, Tucker KD, Eberhard A, Iglewski BH, et al. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:197–201.
- [9] Rumbaugh K, Griswold J, Hamood A. The role of quorum sensing in the *in vivo* virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes and Infection* 2000;2:1721–31.
- [10] Chastre J, Fagon JY, Bornet-Lecso M, Calvat S, Dombret MC, al Khani R, et al. Evaluation of bronchoscopic techniques for the diagnosis of nosocomial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:231–40.
- [11] Fagon JY, Chastre J, Domart Y, Trouillet JL, Gibert C. Mortality due to ventilator-associated pneumonia or colonization with *Pseudomonas* or *Acinetobacter* species: assessment by quantitative culture of samples obtained by a protected specimen brush. *Clin Infect Dis* 1996;23:538–42.
- [12] Greenberg PE. Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *ASM News* 1997;63:371–7.
- [13] Ruby EG, Asato LM. Growth and flagellation of *Vibrio fischeri* during initiation of the sepiolid squid light organ symbiosis. *Arch Microbiol* 1993;159:160–7.
- [14] Engebrecht J, Nealson K, Silverman M. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* 1983;32:773–81.
- [15] Kaplan HB, Greenberg EP. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* 1985;163:1210–4.
- [16] Pearson JP, Passador L, Iglewski BH, Greenberg EP. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1490–4.
- [17] Toder DS, Gambello MJ, Iglewski BH. *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of lasR. *Mol Microbiol* 1991;5:2003–10.
- [18] Chapon-Herve V, Akrim M, Latifi A, Williams P, Lazdunski A, Bally M. Regulation of the *xcp* secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 1997;24:1169–78.
- [19] Seed PC, Passador L, Iglewski BH. Activation of the *Pseudomonas aeruginosa lasI* gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *J Bacteriol* 1995;177:654–9.
- [20] Ochsner UA, Koch AK, Fiechter A, Reiser J. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1994;176:2044–54.
- [21] Latifi A, Winson MK, Foglino M, Bycroft BW, Stewart GS, Lazdunski A, et al. Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol* 1995;17:333–43.
- [22] Schuster M, Lostroh CP, Ogi T, Greenberg EP. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* 2003;185:2066–79.
- [23] Wagner VE, Bushnell D, Passador L, Brooks AI, Iglewski BH. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol* 2003;185:2080–95.
- [24] Hentzer M. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J* 2003;22:3803–15.
- [25] Latifi A, Foglino M, Tanaka K, Williams P, Lazdunski A. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhlR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* 1996;21:1137–46.
- [26] Reimmann C, Beyeler M, Latifi A, Winteler H, Foglino M, Lazdunski A, et al. The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol Microbiol* 1997;24:309–19.
- [27] Albus AM, Pesci EC, Runyen-Janecky LJ, West SE, Iglewski BH. Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1997;179:3928–35.
- [28] de Kievit T, Seed PC, Nezezon J, Passador L, Iglewski BH. RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1999;181:2175–84.
- [29] Chugani SA, Whiteley M, Lee KM, D'Argenio D, Manoel C, Greenberg EP. QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:2752–7.
- [30] Holden MT, Ram Chhabra S, de Nys R, Stead P, Bainton NJ, Hill PJ, et al. Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* 1999;33:1254–66.
- [31] Pesci EC, Milbank JB, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, et al. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:11229–34.

- [32] Pearson JP, Feldman M, Iglewski BH, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect Immun* 2000;68:4331–4.
- [33] Tang HB, DiMango E, Bryan R, Gambello M, Iglewski BH, Goldberg JB, et al. Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect Immun* 1996;64:37–43.
- [34] Rumbaugh KP, Griswold JA, Iglewski BH, Hamood AN. Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. *Infect Immun* 1999;67:5854–62.
- [35] Preston MJ, Fleiszig SM, Zaidi TS, Goldberg JB, Shortridge VD, Vasil ML, et al. Rapid and sensitive method for evaluating *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors during corneal infections in mice. *Infect Immun* 1995;63:3497–501.
- [36] Rahme LG, Stevens EJ, Wolfort SF, Shao J, Tompkins RG, Ausubel FM. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 1995;268:1899–902.
- [37] de Kievit TR, Iglewski BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* 2000;68:4839–49.
- [38] Telford G, Wheeler D, Williams P, Tompkins PT, Appleby P, Sewell H, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun* 1998;66:36–42.
- [39] Ritchie AJ, Yam AO, Tanabe KM, Rice SA, Cooley MA. Modification of *in vivo* and *in vitro* T- and B-cell-mediated immune responses by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect Immun* 2003;71:4421–31.
- [40] Tateda K, Ishii Y, Horikawa M, Matsumoto T, Miyairi S, Pechere JC, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect Immun* 2003;71:5785–93.
- [41] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318–22.
- [42] Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 1998;280:295–8.
- [43] Stickler DJ, Morris NS, McLean RJ, Fuqua C. Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules *in situ* and *in vitro*. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:3486–90.
- [44] Erickson DL, Endersby R, Kirkham A, Stuber K, Vollman DD, Rabin HR, et al. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems may control virulence factor expression in the lungs of patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* 2002;70:1783–90.
- [45] Storey DG, Ujack EE, Rabin HR, Mitchell I. *Pseudomonas aeruginosa* lasR transcription correlates with the transcription of *lasA*, *lasB*, and *toxA* in chronic lung infections associated with cystic fibrosis. *Infect Immun* 1998;66:2521–8.
- [46] Geisenberger O, Givskov M, Riedel K, Hoiby N, Tummeler B, Eberl L. Production of N-acyl-L-homoserine lactones by *P. aeruginosa* isolates from chronic lung infections associated with cystic fibrosis. *FEMS Microbiol Lett* 2000;184:273–8.
- [47] Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 2000;407:762–4.
- [48] Finck-Barbancon V, Goranson J, Zhu L, Sawa T, Wiener-Kronish JP, Fleiszig SM, et al. ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol Microbiol* 1997;25:547–57.
- [49] Sawa T, Ohara M, Kurahashi K, Twining SS, Frank DW, Dorques DB, et al. *In vitro* cellular toxicity predicts *Pseudomonas aeruginosa* virulence in lung infections. *Infect Immun* 1998;66:3242–9.
- [50] Cabrol S, Olliver A, Pier GB, Andremont A, Ruimy R. Transcription of quorum-sensing system genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2003;185:7222–30.
- [51] Smith R, Iglewski B. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *J Clin Invest* 2003;112:1460–5.
- [52] Tateda K, Comte R, Pechere JC, Kohler T, Yamaguchi K, Van Delden C. Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1930–3.
- [53] Dong YH, Gusti AR, Zhang Q, Xu JL, Zhang LH. Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:1754–9.
- [54] Hoang T, Schweizer H. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl-carrier protein reductase: a target for triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis. *J Bacteriol* 1999;181:5489–97.
- [55] Smith K, Bu Y, Suga H. Library screening for synthetic agonists and antagonists of a *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer. *Chem Biol* 2003;10:563–71.
- [56] Manefield M, de Nys R, Kumar N, Read R, Givskov M, Steinberg P, et al. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology* 1999;145(Pt 2):283–91.
- [57] Hentzer M, Riedel K, Rasmussen T. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* 2002;148:87–102.
- [58] Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 2000;288:1251–4.