



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Contribution à l'étude d'un système de quorum sensing chez *Brucella melitensis* 16M

De Muylder, Géraldine

Award date:
2002

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**CONTRIBUTION À L'ETUDE D'UN SYTÈME DE QUORUM SENSING CHEZ
BRUCELLA MELITENSIS 16M**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Géraldine De Muylder

Juin 2002

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Contribution à l'étude d'un système de quorum sensing chez *Brucella melitensis* 16M

DE MUYLDER Géraldine

Résumé

Le quorum sensing est un système de régulation, répandu dans l'univers bactérien, qui dépend de la densité cellulaire. Il fait intervenir des molécules, appelées phéromones, qui s'accumulent dans le milieu environnant au fur et à mesure que la population croît. Ce système permet la coordination du comportement bactérien à l'échelle de la population..

Le quorum sensing implique trois acteurs moléculaires : une phéromone diffusible, une enzyme catalysant la synthèse de cette phéromone, la synthétase, et un ou plusieurs régulateur(s) transcriptionnel(s) s'activant suite à la liaison de la phéromone.

Chez *Brucella*, l'identification de deux phéromones de type N-acyl homosérine lactone ainsi que de deux régulateurs transcriptionnels homologues à des régulateurs du quorum sensing, BabR et VjbR, ont suggéré la présence d'un système de régulation dépendant de la densité cellulaire. Cependant, aucune synthétase n'a été isolée à ce jour. Un gène présentant des homologies avec le gène *hdtS* de *Pseudomonas fluorescens* encodant une synthétase a été découvert chez *Brucella*. Le but de ce travail est d'étudier *hdtS* afin de déterminer s'il code pour une synthétase de N-acyl-homosérine lactone chez *Brucella*. Ce gène *hdtS* a été cloné dans le plasmide pBBRmcs1. La production d'homosérine lactone par HdtS a été testée dans un système hétérologue *Escherichia coli* grâce à l'utilisation de biosenseurs, outils permettant la détection d'HSL. Aucun de ces tests n'a permis de conclure à la synthèse d'HSL par HdtS. Par ailleurs, des données suggèrent que chez *Brucella* le quorum sensing joue un rôle dans la régulation de la transcription de *vjbR*. Afin de conforter cette hypothèse, une synthétase de *Pseudomonas aeruginosa* (*lasI*) a été surexprimée dans une souche de *Brucella*. Cela nous a permis de constater la répression de *vjbR*.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2002

Promoteur: J.-J. Letesson

Je voudrais tout d'abord remercier le Professeur Jean-Jacques Letesson de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Merci mille fois (au moins !) à Chantal, pour tout ce qu'elle a fait pour moi, pour tous ses conseils et ses idées de génie, pour sa patience et sa disponibilité face à mes multiples questions, que ce soit sur une notion quelconque du travail au labo, sur l'art de porter des lentilles ou encore sur l'affrontement des erreurs de type -110 de l'ordinateur....
Merci, donc, t'étais super !

Je remercie également le Professeur Pierre Van Cutsem, Véronique Royer, Sabine Pirotton et Maxime Wéry pour leur lecture critique de ce mémoire.

Merci au Professeur Xavier de Bolle pour sa disponibilité sans limites.

Merci aussi à Steph, à Rose-May et à Calou pour avoir si souvent répondu à mes questions, et merci pour les lettres en Anglais (...)

Merci à Valérie (pour ton enthousiasme contagieux), Amélie, Anne, David, Garçon, Régis, Marie, Céline, Sophie, Godefroid, Etienne, Sandrine, Mauro, Christian et tous les autres..... pour votre aide précieuse, vos encouragements et votre bonne humeur...

Merci à Bernard pour ses explications utiles ...

Je n'oserais pas oublier les zamis,...

Alors Merci à Caro, mon petit dico des synonymes adoré, merci pour tous les moments partagés pendant cette fabuleuse aventure du mémoire...

Merci à Marie avec qui on a réalisé quelques exploits mémorables aux TP pendant les 4 années, sans oublier les passionnantes discussions métaphysiques sur la philosophie profonde de *Brucella* !

Merci à Val, sœur de frites et de pittas (...) pour les cyber-pétages de plombzzz. A nos fous rires. !!

Et puis merci à Allan, Jérôme (qui a, tant bien que mal, essayé de m'inculquer quelques notions en matière de BD...), Caroline, Agustina, Gladys, Sarah, Françoise et Mélanie pour la bonne ambiance qui a régné pendant tout le mémoire.

Je salue aussi les « collègues » de l'URBO et de l'URBC ; merci surtout à Sophie et à Céline (A tous nos délires...Je t'attends pour les pâtes aux courgettes et de nouvelles aventures!)

Et enfin, je remercie mes parents, Antoine, Bruno et Seb, d'être toujours là quand il faut.

Je voudrais quand même faire un clin d'œil aux ordinateurs, qui ont pris un malin plaisir à dissimuler régulièrement mes corrections...hum !

Abbréviations

Nal :	acide nalidixique
Kan :	kanamycine
Amp :	ampicilline
Sm :	streptomycine
Cm :	chloramphénicole
IPTG :	Isopropyl- β -D-thiopyranoside.
bla :	gène de résistance à l'ampicilline
pb :	paires de bases
Kb :	kilo bases
Mb :	mégabase
PCR :	polymerase chain reaction
A :	Adénine
T :	thymidine
C :	cytosine
G :	guanosine
ADN :	acide désoxyribonucléique
ARN :	acide ribonucléique
dNTP :	désoxyribonucléotide
ddNTP :	didésoxyrinucléotide
Tm :	température de melting
mcs :	site multiple de clonage
SDS :	sodium dodecyl sulfate
BSA :	Bovine serum albumine
HRP :	Horseradish Peroxydase
N-acyl HSL :	N-acyl homoserine lactone
DKP :	dikétopipérazines
PQS :	<i>Pseudomonas</i> Quinolone Signal
AI-2 :	Autoinducer-2
DO :	densité optique
Rpm :	rotation par minute
UV :	ultraviolet
V :	volt
mA :	milliampère
hv:	lumière

FM B4/2002/34

Noms des plasmides	Gènes de résistance	Ori compatible avec :	Propriétés	Souches portant les plasmides
pBBRmcs1	CAT	<i>E. coli</i> et <i>Brucella</i> ColEI et p15A	Cfr matériel et méthodes	<i>E. coli</i> DH10B <i>E. coli</i> JM109
pBBRmcs1-hdtS	CAT	<i>E. coli</i> et <i>Brucella</i> ColEI et p15A	<i>hdtS</i> sous contrôle du promoteur de <i>lacZ</i>	<i>E. coli</i> DH10B <i>E. coli</i> JM109
pBBRmcs4	<i>bla</i>	<i>E. coli</i> et <i>Brucella</i> ColEI et p15A	Cfr matériel et méthodes	<i>E. coli</i> DH10B, <i>E. coli</i> JM109 <i>B. melitensis</i> 16M, <i>B. melitensis</i> 16MpFTvjBR
pBBRmcs4-lasI	<i>bla</i>	<i>E. coli</i> et <i>Brucella</i> ColEI et p15A	<i>lasI</i> sous contrôle du promoteur de <i>lacZ</i>	<i>E. coli</i> DH10B, <i>E. coli</i> JM109 <i>B. melitensis</i> 16M, <i>B. melitensis</i> 16MpFTvjBR
pBL59	<i>bla</i>	<i>E. coli</i> ColEI et p15A	Porte un fragment de 2,4 kb contenant le gène <i>hdtS</i>	<i>E. coli</i> DH10B <i>E. coli</i> JM109
pSB1142	<i>tet^R</i>	<i>E. coli</i> Rep	Senseur détectant la présence de N-acyl HSL à chaînes longues	<i>E. coli</i> JM109
pSB1075	<i>bla</i>	<i>E. coli</i> Rep	Senseur détectant la présence de N-acyl HSL à chaînes longues	<i>E. coli</i> JM109
pSB401	<i>tet^R</i>	<i>E. coli</i> Rep	Senseur détectant la présence de N-acyl HSL à chaînes courtes	<i>E. coli</i> JM109

1. INTRODUCTION	1
1.1. Quorum Sensing	1
1.1.1. Définition	1
1.1.2. Le paradigme : le système LuxI/LuxR chez <i>Vibrio fischeri</i>	3
1.1.2.1. Biochimie de la production de la lumière.....	4
1.1.2.2. Les gènes de luminescence	4
1.1.2.3. Fonctionnement du système de régulation de la luminescence (figure 1.3)	4
1.1.3. Le quorum sensing chez les bactéries Gram négatives.....	6
1.1.3.1. Système LasI /LasR-RhlI /RhlR chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
1.1.3.2. Le transfert conjugatif du plasmide Ti chez <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	9
1.1.3.2.1 Le plasmide Ti	9
1.1.3.2.2 Régulation du transfert interbactérien du plasmide Ti	10
1.1.3.2.3 Intérêt de la régulation du transfert conjugatif du plasmide Ti par le quorum sensing....	11
1.2. Les synthétases d'HSL.....	12
1.2.1. Structure des N-acyl homosérine lactones	12
1.2.2. LuxI et ses homologues.....	12
1.2.2.1. Substrats de luxI	13
1.2.2.1.1 Précurseur de l'anneau homosérine lactone.....	13
1.2.2.1.2 Origine de la chaîne acyl	14
1.2.2.2. Mécanisme enzymatique.....	14
1.2.2.3. Interaction Enzyme-Substrat.....	15
1.2.2.4. Spécificité de substrat.....	16
1.2.2.5. Régulation de la synthèse d'HSL	16
1.2.3. LuxM et AinS	17
1.2.3.1. LuxLM chez <i>V. harveyi</i>	17
1.2.3.2. AinS chez <i>V. fischeri</i>	18
1.2.4. HdtS	19
1.3. <i>Brucella</i>	20
1.3.1. Généralités	20
1.3.2. Etude du quorum sensing chez <i>Brucella</i>	23
1.3.2.1. Présence de N-acyl-HSL chez <i>Brucella</i>	23
1.3.2.2. Identification de deux régulateurs de type LuxR	23
1.3.2.3. Effets de différents acteurs du quorum sensing sur la régulation de <i>virB</i>	24
1.3.2.4. Le mystère de la synthétase	25
2. OBJECTIFS DU MEMOIRE	26
3. RESULTATS ET DISCUSSION	27
3.1. Etude de <i>hdtS</i> de <i>Brucella</i>.....	27
3.1.1. Constructions.....	27
3.1.1.1. pBBRmcs1-hdts.....	27
3.1.1.2. pBBRmcs4-lasI.....	32
3.1.2. Analyse de la production d'HSL par HdtS.....	35

1. INTRODUCTION	1
1.1. Quorum Sensing	1
1.1.1. Définition	1
1.1.2. Le paradigme : le système LuxI/LuxR chez <i>Vibrio fischeri</i>	3
1.1.2.1. Biochimie de la production de la lumière	4
1.1.2.2. Les gènes de luminescence	4
1.1.2.3. Fonctionnement du système de régulation de la luminescence (figure 1.3)	4
1.1.3. Le quorum sensing chez les bactéries Gram négatives	6
1.1.3.1. Système LasI /LasR-RhlI /RhlR chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
1.1.3.2. Le transfert conjugatif du plasmide Ti chez <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	9
1.1.3.2.1. Le plasmide Ti	9
1.1.3.2.2. Régulation du transfert interbactérien du plasmide Ti	10
1.1.3.2.3. Intérêt de la régulation du transfert conjugatif du plasmide Ti par le quorum sensing	11
1.2. Les synthétases d'HSL	12
1.2.1. Structure des N-acyl homosérine lactones	12
1.2.2. LuxI et ses homologues	12
1.2.2.1. Substrats de luxI	13
1.2.2.1.1. Précurseur de l'anneau homosérine lactone	13
1.2.2.1.2. Origine de la chaîne acyl	14
1.2.2.2. Mécanisme enzymatique	14
1.2.2.3. Interaction Enzyme-Substrat	15
1.2.2.4. Spécificité de substrat	16
1.2.2.5. Régulation de la synthèse d'HSL	16
1.2.3. LuxM et AinS	17
1.2.3.1. LuxLM chez <i>V. harveyi</i>	17
1.2.3.2. AinS chez <i>V. fischeri</i>	18
1.2.4. HdtS	19
1.3. <i>Brucella</i>	20
1.3.1. Généralités	20
1.3.2. Etude du quorum sensing chez <i>Brucella</i>	23
1.3.2.1. Présence de N-acyl-HSL chez <i>Brucella</i>	23
1.3.2.2. Identification de deux régulateurs de type LuxR	23
1.3.2.3. Effets de différents acteurs du quorum sensing sur la régulation de <i>virB</i>	24
1.3.2.4. Le mystère de la synthétase	25
2. OBJECTIFS DU MEMOIRE	26
3. RESULTATS ET DISCUSSION	27
3.1. Etude de <i>hdtS</i> de <i>Brucella</i>	27
3.1.1. Constructions	27
3.1.1.1. pBBRmcs1-hdts	27
3.1.1.2. pBBRmcs4-lasI	32
3.1.2. Analyse de la production d'HSL par HdtS	35

3.1.2.1.	Description des senseurs utilisés.....	35
3.1.2.1.1	Souches d' <i>E. coli</i> senseur.....	35
3.1.2.1.2	<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	37
3.1.2.2.	Tests de la production de N-acyl HSL par HdtS grâce à différentes techniques.....	38
3.1.2.2.1.	Cotransformations	38
3.1.2.2.2.	Cross-Streak.....	43
3.1.2.2.3.	Cocultures	45
3.1.2.2.4.	TLC (Thin Layer Chromatography)	46
3.1.3.	Discussion.....	50
3.1.3.1.	Cotransformations, Cross-streaks et cocultures	50
3.1.3.2.	TLC.....	50
32.	Surexpression d'une synthétase chez <i>Brucella</i> et analyse du promoteur de <i>vjbR</i>	53
4.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	58
5.	MATERIELS ET METHODES	62
5.1.	Matériels.....	62
5.1.1.	Solutions et milieux.....	62
5.1.1.1.	Solutions d'antibiotiques et autres.....	62
5.1.1.2	Milieux de culture	62
5.1.1.1.1.	Milieu riche pour <i>E. coli</i> : milieu LB : (Luria Bertani).....	62
5.1.1.1.2.	Milieux riches pour <i>Brucella</i>	63
5.1.2.	Souches bactériennes et plasmides	63
5.1.2.1	Souches bactériennes	63
5.1.2.1.1	<i>E.coli</i> DH10B	63
5.1.2.1.2	<i>E.coli</i> S17	63
5.1.2.1.3	<i>E.coli</i> JM109	64
5.1.2.1.4	<i>Chromobactérium violaceum</i> CV026	64
5.1.2.1.5	<i>Brucella</i> sp	64
5.1.2.2	Plasmides	64
5.2.	Méthodes.....	69
5.2.1	Techniques relatives à l'ADN.....	69
5.2.1.1	Préparation de cellules CaCl ₂ compétentes	69
5.2.1.2	Transformations de bactéries CaCl ₂ compétentes.....	69
5.2.1.3	Test blanc/ bleu.....	70
5.2.1.4	Extraction d'ADN plasmidique	71
5.2.1.4.1	Préparation d'ADN en petite quantité (minipréparation d'ADN plasmidique)	72
5.2.1.4.2	Préparation d'ADN plasmidique en moyenne quantité (midipréparation d'ADN plasmidique)	73
5.2.1.5	restriction d'ADN plasmidique purifié	74
5.2.1.6	Electrophorèse en gel d'agarose	75
5.2.1.7	Extraction d'ADN d'un gel d'agarose.....	77
5.2.1.8	Purification d'ADN	78
5.2.1.9	Réaction de ligation.....	78
5.1.2.10	Polymerase chain reaction (PCR).....	79

5.1.2.1.1	Séquençage.....	81
5.2.2	La conjugaison bactérienne.....	83
5.2.3	Techniques relatives aux protéines : analyse de l'expression d'une protéine par Western Blot..	85
5.2.3.1	Préparation d'extraits protéiques totaux	85
5.2.3.2	Dosage protéique.....	86
5.2.3.2.1	Le dosage BCA.....	86
5.2.3.3	Le western blot.....	87
5.2.3.3.1	Electrophorèse en gel polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE).....	87
5.2.3.3.2	Transfert sur membrane de nitrocellulose.....	91
5.2.3.3.3	Ponceau	93
5.2.3.3.4	Immunodétection.....	93
5.2.4	Méthodes de détection de la production de N-acyl homosérine lactones	96
5.2.4.1	Cotransformations	97
5.2.4.2	Cocultures.....	97
5.2.4.3	Cross-streak	98
5.2.4.4	TLC (Thin Layer Chromatography).....	99
5.2.4.4.1	Extractions d'HSL	99
5.2.4.4.2	TLC.....	100

6 BIBLIOGRAPHIE 103

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

1.1. Quorum Sensing

1.1.1. Définition

Une des caractéristiques principales des bactéries est leur capacité à s'adapter aux changements de l'environnement. Cette nature dynamique des bactéries repose sur leur faculté de percevoir des signaux provenant de l'environnement extérieur et d'exprimer en conséquence des gènes donnés.

Contrairement à ce qu'on a longtemps cru, les bactéries formant une colonie n'agissent pas individuellement. Bien qu'il s'agisse d'organismes unicellulaires, elles sont capables de s'associer et de mettre en œuvre des comportements multicellulaires. Ces associations peuvent impliquer des spécialisations de cellules individuelles qui seront favorables à l'ensemble de la population. Par exemple, dans les populations de cyanobactéries, les hétérocystes fixent l'azote atmosphérique pour la population (Kaiser, 2001). Une organisation multicellulaire peut également conduire à des changements du comportement de l'ensemble d'une population. C'est le cas, par exemple, de la formation des corps fructifères chez *Myxococcus xanthus*. En effet, dans un milieu riche, ces myxobactéries croissent de manière indépendante, cependant lorsque les ressources en eau ou en nutriments se raréfient, les cellules s'agglutinent pour former une structure multicellulaire appelée corps fructifère. Ce corps fructifère regroupe des milliers de spores résistantes à des environnements hostiles et leur permet de se disséminer vers des lieux plus favorables à leur développement (Kaiser, 2001). La formation des biofilms bactériens constitue également un bel exemple de comportement multicellulaire où différentes espèces bactériennes s'associent afin de créer un environnement optimal pour leur croissance (Watnick & Kolter, 2000). La coordination du

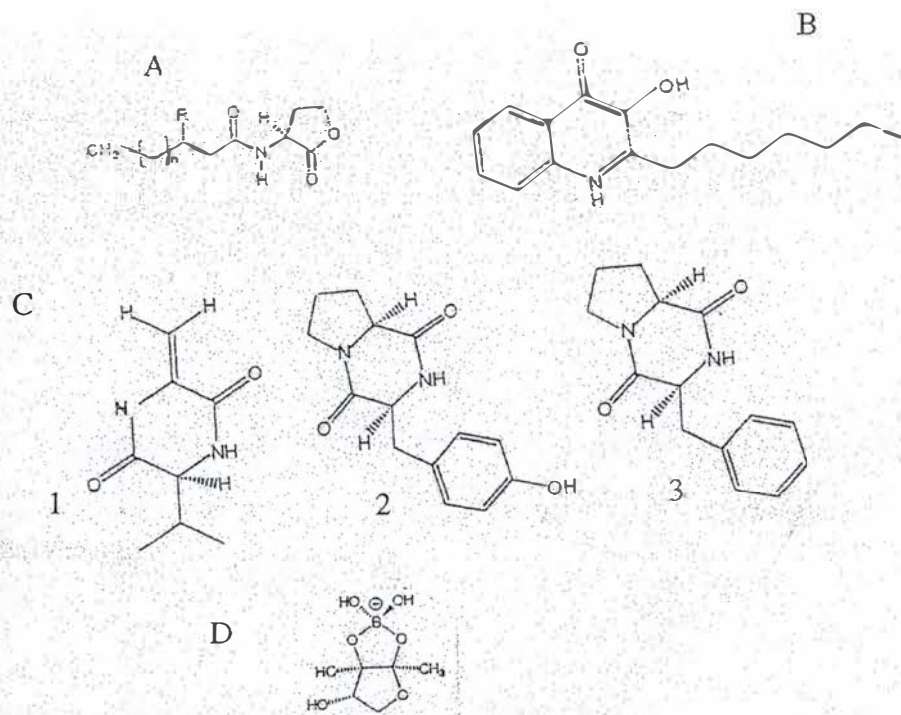


Figure 1.1: Représentation des phéromones chez les bactéries Gram négatives

- A- N-acyl homoserine lactone
- B- PQS (*Pseudomonas* quinolone signal)
- C- Diketopiperazine (DKP)
 - 1- cyclo(Δ Ala-L-Val)
 - 2- cyclo(L-Pro-L-Tyr)
 - 3- cyclo(L-Phe-L-Pro)
- D- AI-2 (furanosyl borate diester)

comportement d'une population bactérienne permet également d'optimiser ses relations avec l'organisme hôte, qu'elles soient pathogéniques ou symbiotiques.

Tous ces comportements bactériens complexes nécessitent une interaction entre les différents individus d'une population. La communication des bactéries peut s'effectuer par contact direct ou par échange de signaux moléculaires.

Le quorum sensing est un système de régulation, dépendant de la densité cellulaire (Fuqua *et al.*, 1994). Il fait intervenir des molécules de faible poids moléculaire, les phéromones, émises par les bactéries. Elles diffusent librement à travers les membranes et s'accumulent dans le milieu environnant au fur et à mesure que le nombre de bactéries augmente. Elles permettent ainsi aux cellules individuelles de "sentir" quand une densité de population minimale, ou quorum, est atteinte afin d'initier une réponse concertée. Le quorum sensing permet donc la communication entre tous les individus d'une population, qui peut ainsi générer une réponse coordonnée.

Des systèmes de quorum sensing sont décrits tant chez les bactéries Gram positives que chez les Gram négatives. Chez les bactéries Gram positives, les phéromones sont des petits peptides (Dunny & Leonard, 1997).

Dans l'univers des bactéries Gram négatives, les phéromones les plus répandues sont les N-acyl homosérine lactones. Cependant, récemment de nouvelles familles de molécules servant de signal à ces bactéries ont été découvertes : le 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (PQS=Pseudomonas Quinolone Signal) et les dikétopiperazines (DKP) interviennent tous deux dans le système de quorum sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* (Holden *et al.*, 2000), (Holden *et al.*, 1999) (figure 1.1).

Une nouvelle famille de phéromones a également été découverte chez *Vibrio harveyi*, *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli* (Surette *et al.*, 1999). Cette molécule initialement appelée AI-2 (Autoinducer-2), a récemment été identifiée comme étant un furanosyl borate diester (Chen *et al.*, 2002) (figure 1.1).

Dans ce travail, nous nous focaliserons sur les bactéries Gram négatives utilisant des signaux de type N-acyl homosérine lactone.

1.1.2. Le paradigme : le système LuxI/LuxR chez *Vibrio fischeri*

Le quorum sensing chez les bactéries Gram négatives a été décrit pour la première fois en 1970 par K. H. Nealson et J. W. Hastings dans le cadre d'études sur la bactérie *Vibrio fischeri* (Nealson *et al.*, 1970), (Eberhard, 1972).

V. fischeri est une bactérie luminescente symbiotique marine qui existe dans deux types d'habitats : elle peut se trouver libre dans le milieu ou en symbiose avec certains animaux marins (des poissons monocentrides comme *Monocentris japonica* ou des calamars comme *Euprymna scolopes*), chez qui elle colonise les organes lumineux (Nealson & Hastings, 1979). *V. fischeri* fournit de la lumière à l'hôte, lequel permet à la bactérie de se développer dans un environnement protégé et riche en nutriments. Les organismes hôtes trouvent différents intérêts à la présence des bactéries luminescentes: la lumière permet dans certains cas d'attirer des proies alors que dans d'autres elle sert à échapper à la prédation. Dans le cas du calamar, qui vit surtout la nuit, la lumière émise mimerait celle de la lune et effacerait l'ombre du calamar, celui-ci échapperait ainsi aux prédateurs qui chassent sous lui (Losick & Kaiser, 1997).

Nealson et Hastings ont observé qu'en fonction des conditions, l'intensité de lumière émise par les bactéries luminescentes varie. En effet, quand *V. fischeri* se trouve sous forme libre dans le milieu marin, la densité cellulaire est faible et les bactéries ne produisent pas de lumière, par contre dans les organes lumineux où la concentration en bactéries est très élevée, elles sont luminescentes. Cela leur a permis de supposer que la production de lumière est régulée par un message chimique entre cellules (Nealson, *et al.*, 1970).

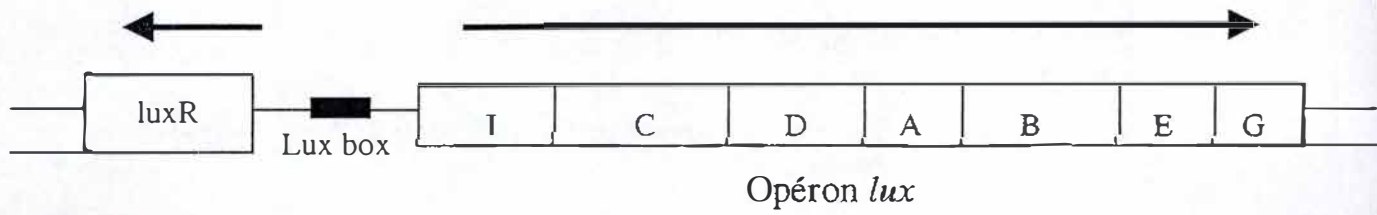
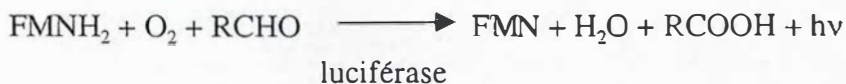


Figure 1. 2 : Organisation génétique du locus intervenant dans la régulation de la bioluminescence chez *V. fischeri*
D'après (Swift *et al.*, 1996)

1.1.2.1. Biochimie de la production de la lumière

Chez les bactéries bioluminescentes, l'émission de lumière implique l'oxydation, par l'oxygène moléculaire, de deux substrats : la flavine mononucléotide réduite (FMNH₂) et une aldéhyde à longue chaîne (RCHO). Cette réaction est catalysée par la luciférase (Nealson and Hastings, 1979).



1.1.2.2. Les gènes de luminescence

Chez *V. fischeri*, la bioluminescence requiert l'expression du régulon *lux* qui contient deux unités transcriptionnelles divergentes, *luxR* et l'opéron *lux ICDABEG* (Sitnikov *et al.*, 1995) (figure 1.2).

Le gène *luxR* code pour un régulateur transcriptionnel, *luxI* code pour une synthétase, l'enzyme qui catalyse la synthèse d'une phéromone de type N-acyl homosérine lactone (l'oxo-C₆HSL), *luxA* et *luxB* encodent les deux sous unités de la luciférase (α et β), et *lux C*, *luxD*, *luxE* encodent les composants d'un complexe requis pour le recyclage du substrat aldéhyde de la luciférase. La fonction de *luxG* est inconnue (Sitnikov, *et al.*, 1995).

1.1.2.3. Fonctionnement du système de régulation de la luminescence (figure 1.3)

L'émission de lumière est corrélée à la densité de population : la luminescence de *V. fischeri* est faible jusqu'à ce que la population atteigne un nombre de bactéries assez élevé. En effet, quand la densité cellulaire est faible, l'opéron *luxICDABEG* est transcrit à un niveau basal, trop faible pour entraîner la production de lumière. Par contre, la petite quantité de LuxI produite catalysera la synthèse d'HSL. Lorsque la population croît, la quantité d'HSL

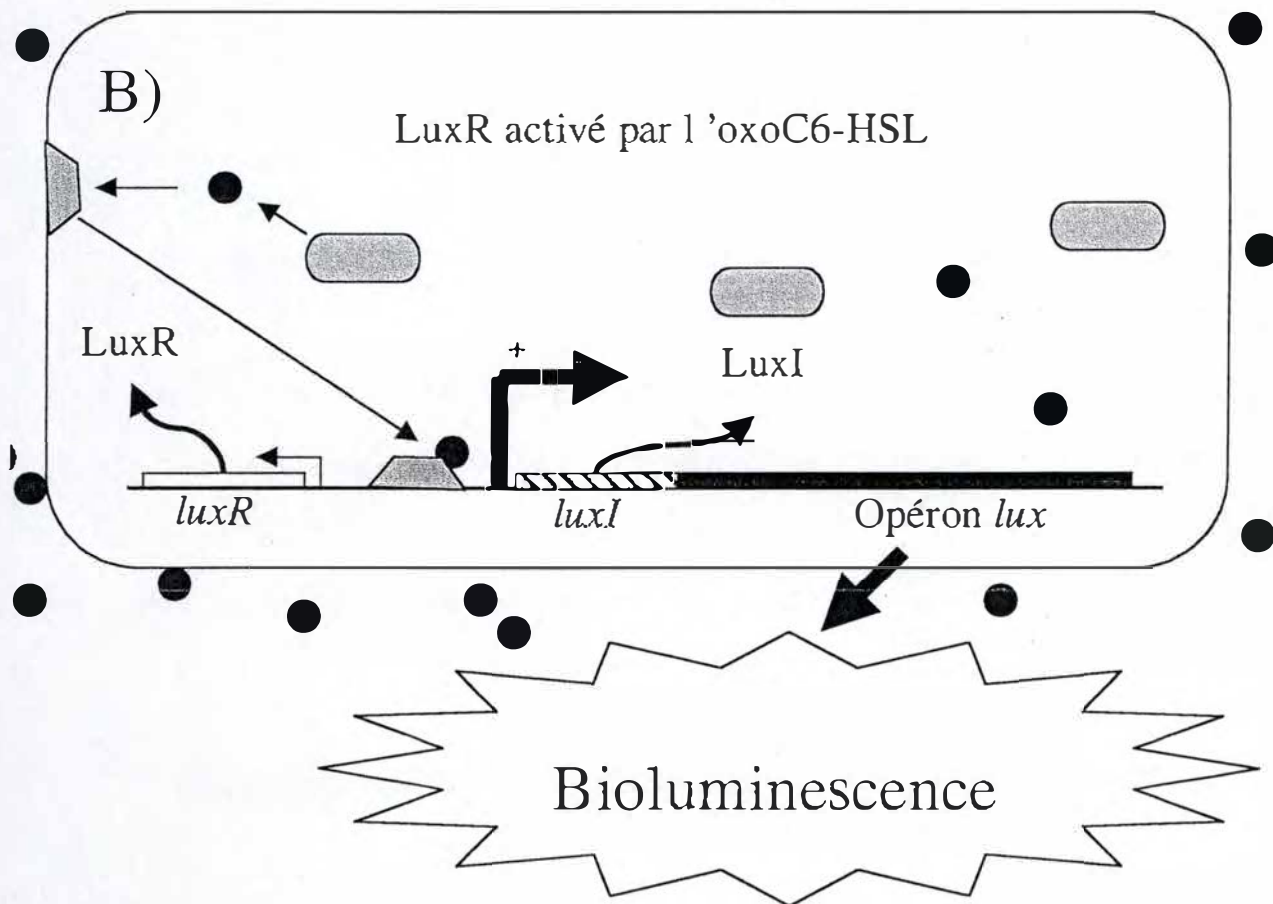
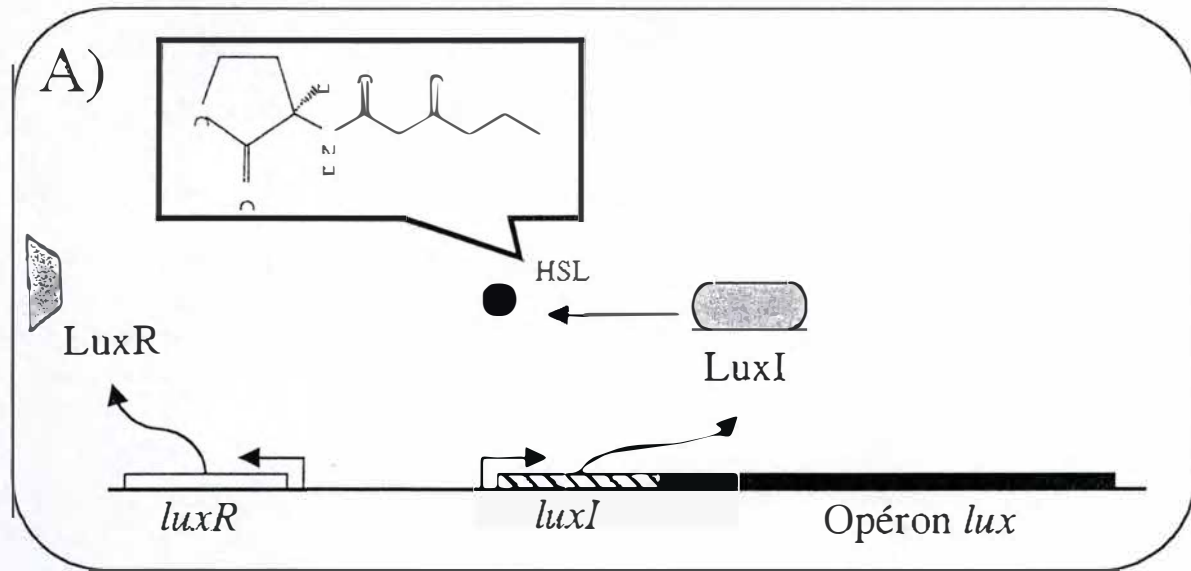


Figure 1.3: Quorum sensing chez *V. fischeri*

A- A faible densité bactérienne, il y a un taux basal d'expression de *luxR* et de l'opéron *lux*. La concentration de l'autoinducteur est insuffisante pour se fixer à LuxR et la production de lumière est nulle.

B- A haute densité bactérienne, la concentration de l'HSL atteint une valeur critique et elle se lie à LuxR. Le complexe LuxR-HSL stimule la transcription de l'opéron *lux* induisant la production de la lumière.

produite et diffusant dans le milieu augmente. A partir d'un certain seuil, caractéristique d'une densité de population donnée, les HSL se lieront au régulateur transcriptionnel LuxR.

Le complexe LuxR-HSL va induire la transcription de l'opéron *luxICDABEG*, ce qui conduit à la production de lumière, mais constitue également un feed back positif: l'activation de la transcription de *luxI* permet en effet d'amplifier le signal. Les phéromones sont ainsi appelées « autoinducteurs » puisqu'elles participent à la régulation positive de leur production (Fuqua, et al., 1994).

Le complexe LuxR-HSL intervient également dans la régulation de la transcription de *luxR*, mais le mécanisme de contrôle est différent de celui qui régule l'opéron *luxICDABEG* (Sitnikov *et al.*, 1996). Quand la concentration d'autoinducteur est faible par rapport à celle de LuxR, le complexe LuxR-HSL, régule positivement *luxR*, par contre quand la quantité de N-acyl-homosérine lactone est élevée, *luxR* est régulé négativement par le complexe LuxR-HSL (Shadel & Baldwin, 1991). Ce contrôle négatif permet à LuxR de limiter sa propre production. Le feed-back positif exercé sur *luxICDABEG* est freiné mais pas éteint, ce qui maintient le taux de luminescence constant. C'est en effet ce qui est observé dans l'organe lumineux des organismes hôtes où *Vibrio Fisheri*, à des densités de population élevées, émet une quantité de lumière forte mais constante.

Une séquence de 20 nucléotides, située environ 44 nucléotides en amont du site +1 de l'opéron *lux*, appelée "lux box", est le site de fixation du complexe LuxR-HSL intervenant dans la régulation de l'opéron *lux*. (Fuqua *et al.*, 1996).

Chez *V. fisheri*, les bactéries ne se trouvent dans un milieu confiné que dans l'organe lumineux de l'hôte et peuvent y atteindre une densité de population suffisante pour déclencher la transcription des gènes de luminescence. On suppose que l'accumulation des HSL permet à la bactérie de savoir si elle se trouve libre dans le milieu ou en symbiose avec l'hôte. Le système de quorum sensing chez *V. fisheri* aurait donc évolué pour lui permettre de produire de la lumière uniquement dans des conditions optimales.

<u>Système de quorum sensing</u>				
<u>Bactéries</u>	<u>Synthétases</u>	<u>Régulateurs transcriptionnel</u>	<u>HSLs</u>	<u>Fonctions régulées</u>
<i>Vibrio fischeri</i>	LuxI AinS	LuxR AinR	3 oxo-C ₆ HSL C ₄ HSL	Bioluminescence
<i>Vibrio harveyi</i>	LuxLM LuxS	LuxN LuxQ	3 hydroxy-C ₄ HSL AI-2	Bioluminescence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LasI RhII	LasR RhIR	3 oxo-C ₁₂ HSL C ₄ HSL	Sécrétions d'enzymes extracellulaires, formation de biofilm, synthèse de rhamnolipides, de facteurs de virulence
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tral	TraR	3 oxo-C ₈ HSL	Transfert conjugatif du plasmide Ti
<i>Erwinia carotovora</i>	ExpI	ExpR	3 oxo-C ₆ HSL	Synthèse de facteurs de virulence extracellulaires et d'antibiotique carbapenem
<i>Erwinia stewartii</i>	EsaI	EsaR	3 oxo-C ₆ HSL	Synthèse d'exopolysaccharides capsulaires
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	RhII CinI	RhIR CinR	C ₆ HSL C ₈ HSL 3-hydroxy-7-cis-C ₁₄ -HSL	Interaction avec le rhizome, nodulation, inhibition de la croissance, expression des gènes de la rhizosphère
<i>Chromobacterium violaceum</i>	CviI	CviR	C ₆ HSL	Synthèse d'exoenzymes, d'antibiotiques, de violacéine
<i>Escherichia coli</i>	LuxS	SdiA	AI-2	Division cellulaire
<i>Salmonella typhimurium</i>	LuxS		AI-2	Expression de facteurs de virulence putatifs

Tableau 1.1 : Ce tableau reprend quelques espèces bactériennes chez lesquelles a été identifié un système de quorum sensing ainsi que des fonctions régulées par ce système [Swift, 1996 #12]

Le phénomène du quorum sensing repose donc sur trois acteurs principaux:

- la synthétase qui permet la synthèse de l'autoinducteur (LuxI dans le cas de *V. fischeri*)
- l'autoinducteur (oxo-C₆HSL chez *V. fischeri*)
- le régulateur transcriptionnel (LuxR chez *V. fischeri*)

1.1.3. Le quorum sensing chez les bactéries Gram négatives

Pendant plusieurs années, le phénomène du quorum sensing a été restreint aux bactéries bioluminescentes, jusqu'à la découverte de la production d'HSL par d'autres espèces bactériennes (Fuqua, et al., 1994). A partir des années 90, il est devenu évident que la régulation des gènes en fonction de la densité cellulaire est un système répandu dans l'univers bactérien. Des homologues du couple LuxI/LuxR ont en effet été découverts chez de nombreuses bactéries, chez qui ils régulent des gènes impliqués dans diverses fonctions, telles que la symbiose, la pathogénie, le transfert de plasmide, la synthèse d'antibiotiques.... Par exemple, chez le phytopathogène *Erwinia carotovora*, le quorum sensing régule la production d'exoenzymes indispensables à sa virulence (Pirhonen *et al.*, 1993). De même chez *Agrobacterium*, *Pseudomonas* et *Rhizobium*, il intervient dans l'établissement de relations symbiotiques ou pathogènes avec l'hôte approprié (tableau 1.1). L'importance du quorum sensing dans la pathogénie est démontrée par la diminution de la virulence de souches mutées dans les acteurs du quorum sensing (Pirhonen, et al., 1993; Tang *et al.*, 1996).

Nous développerons ci-dessous les systèmes de quorum sensing intervenant dans la pathogénie de *P. aeruginosa*, cette bactérie possédant un système de régulation hiérarchisé. Nous nous intéresserons également au quorum sensing chez *A. tumefaciens*, bactérie appartenant, comme *Brucella*, à la famille des α -2 protéobactéries (Moreno, 1998).

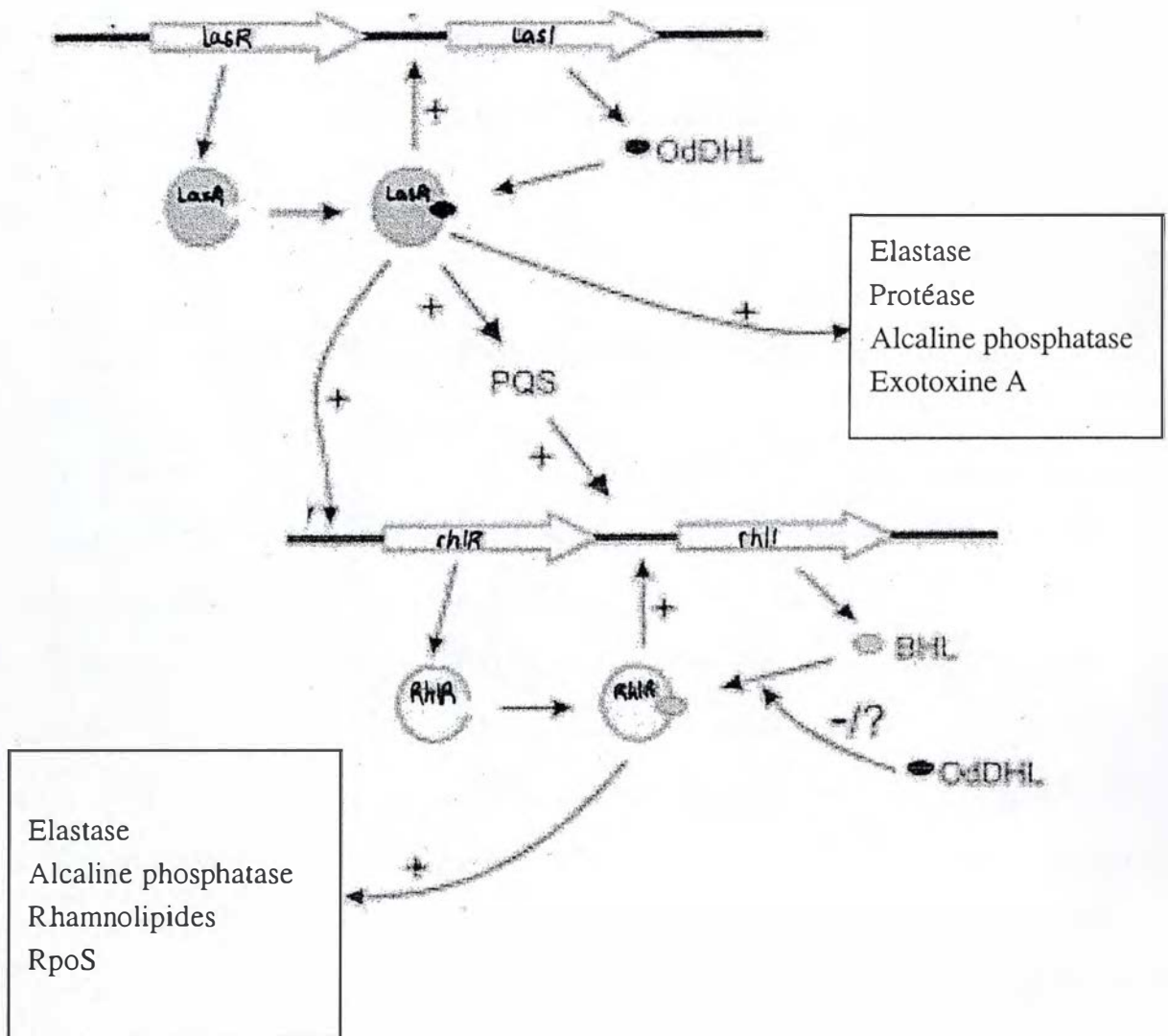


Figure 1. 4: Quorum sensing chez *P. aeruginosa*

La régulation par le système de quorum sensing débute par la transcription de *lasR* et de *lasI*. Quand la population atteint une certaine densité, la concentration de l'oxo-C12 HSL produite par LasI devient suffisante pour se lier au régulateur LasR. Le complexe LasR-HSL induit l'expression d'une grande quantité de gènes dont *lasR*, *lasI*, *rhlR*, *rhlI* et les gènes requis pour la synthèse de PQS. RhlR s'associe à la C4-HSL produite par RhlI, pour activer la transcription de plusieurs gènes dont *rhlI*. PQS active également l'expression de *rhlI*. L'oxo C12-HSL inhibe RhlR en empêchant son interaction avec la C4HSL [Pesci, 1997 #62]

Les signes + et -, indiquent respectivement une régulation positive et négative.

PQS= *Pseudomonas* quinolone signal

BHL= C4HSL

OdDHL= oxoC12HSL

D'après (Whitehead *et al.*, 2001)

1.1.3.1. Système LasI/LasR-RhII/RhIR chez *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est une bactérie Gram négative, pathogène opportuniste, qui infecte les blessures et les brûlures chez l'homme. Elle cause également de nombreuses infections chez les individus immunodéprimés, elle est notamment responsable de l'infection des poumons de patients atteints de mucoviscidose (Parsek & Greenberg, 2000).

La pathogénie de *P. aeruginosa* est due à la sécrétion de différents facteurs de virulence (protéases, élastase, exotoxines, adhésines...) (Tang, et al., 1996) et à la formation de biofilms bactériens (Watnick and Kolter, 2000).

L'expression de ces facteurs extracellulaires n'est pas constitutive. En effet, en culture, la production de protéases est maximale à la fin de la phase exponentielle ainsi qu'au début de la phase stationnaire. La régulation des gènes de virulence chez *P. aeruginosa* dépend de la densité de la population bactérienne, elle pourrait donc se trouver sous le contrôle du quorum sensing (Gambello & Iglewski, 1991).

En effet, des gènes appelés *lasI* et *lasR* ont été identifiés, ils sont respectivement homologues à *luxI* et à *luxR* de *V. fischeri* (Passador *et al.*, 1993). Chez *P. aeruginosa*, le régulateur transcriptionnel LasR agit avec une phéromone de la famille des N-acyl homosérine lactones (3-oxo-C₁₂HSL) qui est synthétisée par LasI. Lorsque la densité de population est élevée, la N-acyl HSL se lie à LasR. Le complexe LasR-3-oxo-C₁₂HSL active la transcription de différents gènes de virulence, dont *lasB* (codant pour l'élastase), *lasA* (qui code pour une protéase), *aprA* (qui code pour une alcaline phosphatase), *toxA* (codant pour l'exotoxineA) ainsi que *lasI*, ce qui constitue un feed-back positif (de Kievit & Iglewski, 2000) (figure 1.4).

Le quorum sensing chez *P. aeruginosa* est cependant complexifié par l'existence d'un deuxième système régulateur, composé d'une enzyme homologue à LuxI, RhII, ainsi que d'un régulateur transcriptionnel homologue à LuxR, RhIR. RhII catalyse la synthèse d'un autre membre de la famille des N-acyl homosérine lactones : C₄HSL (Winson *et al.*, 1995) (Brint & Ohman, 1995).

Le complexe C₄HSL-RhlR régule l'expression de deux gènes déjà sous le contrôle du système LasI/LasR : *lasB* et *aprA*, ainsi que l'expression de différents autres gènes dont *rhlI*, *rhlAB* (gènes codant pour la production de rhamnolipides) et le gène codant pour le facteur σ (*rpoS*) (Williams *et al.*, 2000) (Pearson *et al.*, 1997) (figure 1.4).

Ces systèmes de quorum sensing interagissent afin que les deux cascades de régulation s'effectuent au moment optimal. Le complexe LasR-oxo-C₁₂HSL active la transcription de *rhlR* et de *rhlI*. De plus la 3-oxo-C₁₂HSL peut entrer en compétition avec la C₄HSL empêchant ainsi sa fixation au régulateur RhlR. Cela permet d'établir une hiérarchie dans le système (Pesci & Iglewski, 1997).

Chez *P. aeruginosa*, la 3-oxo-C₁₂HSL et la C₄HSL sont les principales phéromones détectées, cependant d'autres signaux sont impliqués dans le quorum sensing. L'expression du gène *lasB* est contrôlée pas PQS (*Pseudomonas* Quinolone Signal) en plus de la régulation qu'exercent déjà sur ce gène LasR et RhlR (Pesci *et al.*, 1999). Le contrôle de l'expression de PQS fait intervenir LasR, et PQS induit la transcription de *rhlI*. PQS constitue donc un élément supplémentaire qui permet la connexion des deux circuits régulateurs RhlI/RhlR et LasI/LasR.

Une troisième famille de phéromones, les dikétopiperazines (DKP), joue également un rôle dans le quorum sensing de *P. aeruginosa* (Holden, *et al.*, 2000). Les DKP sont des dipeptides cycliques ayant de nombreuses activités biologiques et pharmacologiques chez les plantes et les animaux supérieurs. Ils pourraient donc avoir un rôle dans les interactions entre procaryotes et eucaryotes.

Impliqué dans la régulation fine des facteurs de virulence, le quorum sensing chez *P. aeruginosa* joue donc un rôle important dans la pathogénie. Cela est appuyé par le fait que des mutants dans le gène *lasR* ont une virulence réduite (Tang, *et al.*, 1996), de tels mutants sont

également incapables de former un biofilm normal (Davies *et al.*, 1998). *Pseudomonas* a longtemps été considérée comme un organisme exerçant son action de façon individuelle, on sait maintenant que les bactéries d'une population interagissent les unes avec les autres pour coordonner leur développement et optimiser leur comportement. En effet, si *Pseudomonas* sécrète ses facteurs de virulence avant d'avoir atteint une densité de population suffisante, elle ne pourra pas échapper au système de défense de l'hôte ni s'installer dans sa niche environnementale de prédilection (Williams, *et al.*, 2000).

1.1.3.2. Le transfert conjugatif du plasmide Ti chez *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens est une bactérie Gram négative appartenant, comme *Brucella* à la famille des $\alpha 2$ protéobactéries (Moreno, 1998). C'est un phytopathogène, responsable de la galle du collet chez des plantes dycotylédones. Cette maladie est caractérisée par la croissance de nodules tumoraux au niveau de la tige des plantes. La galle du collet est due au transfert du plasmide Ti (Tumor Inducing) des bactéries vers le noyau des plantes (Zhu *et al.*, 2000).

1.1.3.2.1 Le plasmide Ti

Le plasmide Ti contient de l'ADN oncogène (la région T) qui encode des produits stimulant la division cellulaire chez la plante et conduisant à la formation des nodules tumoraux. Il contient également l'ensemble des gènes requis pour son transfert. Il existe deux systèmes de transfert fonctionnellement distincts, le système *vir* et le système *tra*. En effet, le plasmide Ti doit être transféré à la plante, mais également à toutes les bactéries de la population. L'opéron *vir*, encodant un système de sécrétion type IV contient une vingtaine de gènes impliqués dans la transformation des cellules de la plante, alors que ce sont les gènes *tra* qui sont responsables du transfert interbactérien du plasmide (conjugaison). L'expression des gènes *vir* est induite par des composés phénoliques produits par les plantes, comme l'acétosyringone par exemple (Lewin, 1994).

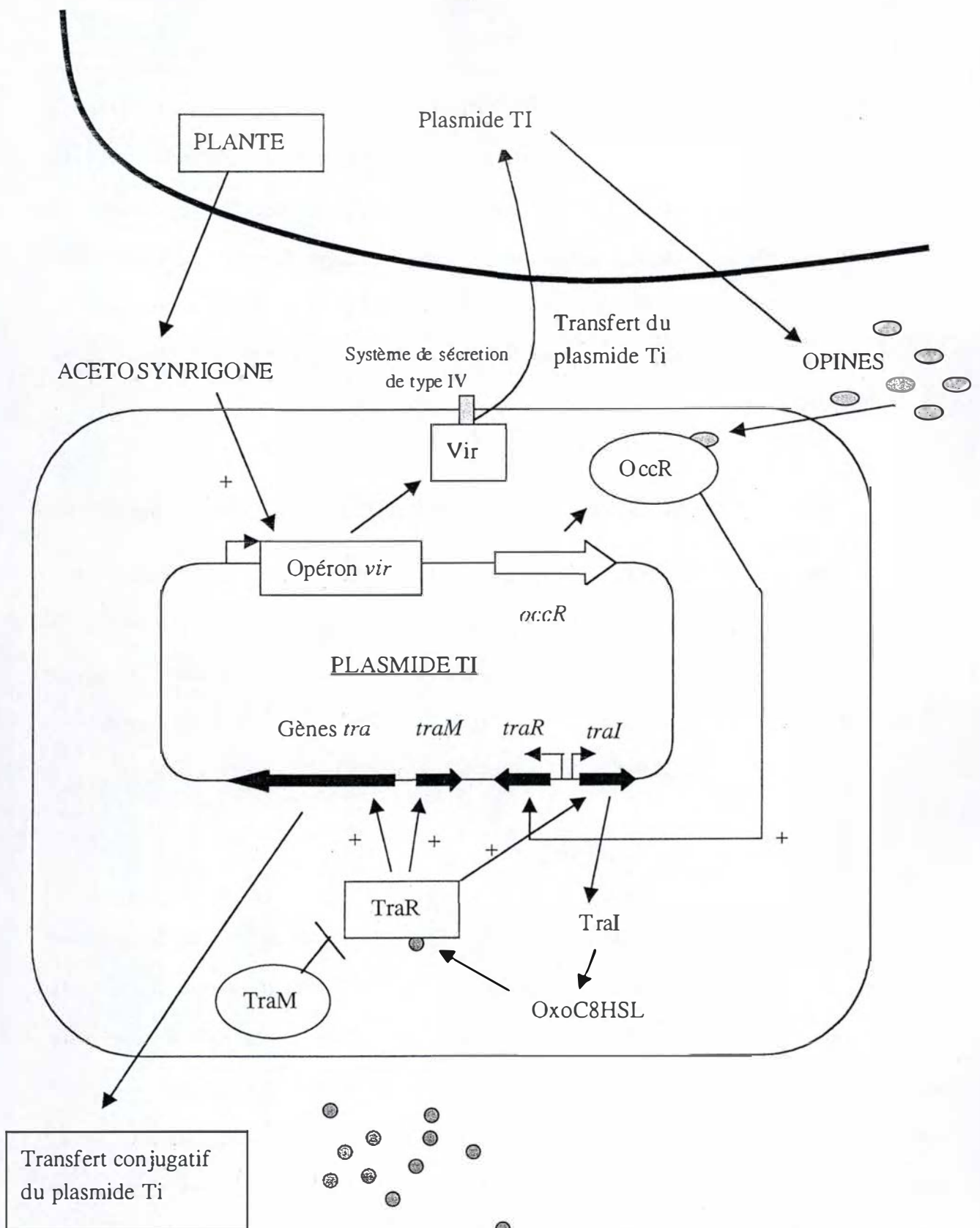


Figure 1.5: Quorum sensing chez *A. tumefaciens* portant un plasmide Ti à octopine. La plante produit un composé qui induit la transcription de l'opéron *vir*. Celui-ci permet le transfert du plasmide Ti à la plante conduisant à la production d'opine. L'opine, se lie au régulateur OccR et active ainsi la transcription de *traR*. Quand la densité de la population augmente, les HSL produites par TraI s'accumulent et se fixent à TraR. Le complexe TraR-HSL active la transcription des gènes *tra* et stimule ainsi le transfert interbactérien du plasmide (Dunny, 1999)

Le plasmide Ti porte également des gènes codant pour la synthèse et la dégradation de sucres particuliers : les opines. Les gènes de synthèse des opines s'expriment uniquement lorsque le plasmide Ti se trouve dans une cellule végétale, par contre les gènes codant pour leur catabolisme ne sont induits que chez la bactérie. Il existe deux types de plasmides Ti qui se distinguent par l'opine qu'ils synthétisent, les plasmides à nopaline et les plasmides à octopine (Dunny, 1999). L'induction de tumeurs chez la plante apporte à *Agrobacterium* un habitat unique où il est le seul à pouvoir se développer. En effet, les nodules tumoraux produisent les opines, source de carbone utilisable uniquement par les bactéries capables de les dégrader, c'est-à-dire contenant le plasmide Ti.

1.1.3.2.2 Régulation du transfert interbactérien du plasmide Ti

Deux types de signaux différents interagissent afin de réguler la conjugaison chez *A. tumefaciens* : le premier est produit par la bactérie et fait intervenir un système de quorum sensing, alors que le second dépend de la plante infectée (de Kievit and Iglewski, 2000) (figure 1.5). On retrouve effectivement sur le plasmide Ti, des homologues de *luxI* et de *luxR*, nommés *traI* et *traR*. TraI catalyse la synthèse d'une molécule de la famille des N-acyl homosérine lactones, la 3-oxo-C₈HSL (Hwang *et al.*, 1994). Quand cette dernière atteint une concentration assez élevée, reflétant la densité de la population des cellules donneuses de plasmide, elle se lie au régulateur transcriptionnel TraR. Ce complexe va induire la transcription des gènes *tra*, responsables du transfert interbactérien du plasmide, ainsi que celle de *traI*, créant une boucle d'amplification du signal.

La conjugaison ne s'effectue cependant pas dans un milieu sans opines. Ces sucres seraient donc un facteur clé dans la régulation du transfert du plasmide Ti (Pierson III *et al.*, 1998). Toute cellule végétale infectée produit des opines qui servent à la fois de nutriment et de signal à la bactérie (Miller & Bassler, 2001). En effet, une protéine activée par la liaison à l'opine régule la transcription de *traR*. Dans le cas des plasmides à octopine ce régulateur se

nomme OccR et il active la transcription de *traR* en présence d'octopine. Par contre dans le cas des plasmides à nopaline le régulateur, AccR, inhibe constitutivement *traR*, mais la liaison à la nopaline permet de lever cette répression (Dunny, 1999).

Quand la densité de population d'*A. tumefaciens* possédant le plasmide est faible, *traI* n'est transcrit qu'à un niveau basal et il n'y a qu'une petite quantité de phéromone synthétisée. Au moment où la plante produit l'opine, la transcription de *traR* est activée, et lié à l'homosérine lactone, il induit la transcription des gènes *tra* nécessaires au transfert du plasmide Ti.

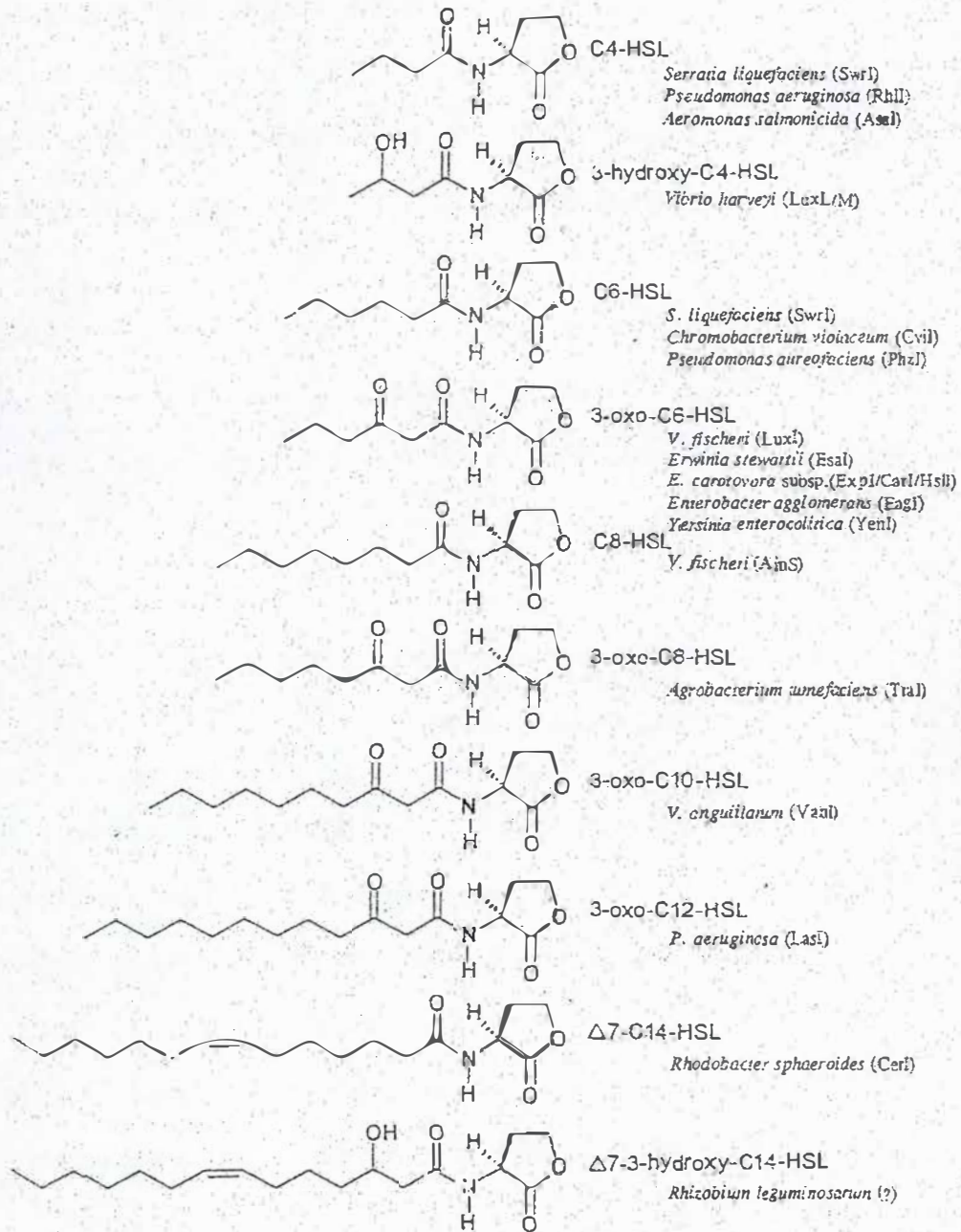
Le quorum sensing d'*A. tumefaciens* fait intervenir un gène supplémentaire, appelé *traM*, également activé par le complexe TraR-HSL et dont la fonction est de réguler négativement *traR* en empêchant sa liaison à l'ADN et donc l'activation de l'expression des gènes cibles (Fuqua *et al.*, 1995).

1.1.3.2.3 Intérêt de la régulation du transfert conjugatif du plasmide Ti par le quorum sensing

L'avantage que retire *Agrobacterium* de la régulation de la conjugaison en fonction de la densité cellulaire n'est pas clair. En effet, étant donné que le transfert conjugatif d'un plasmide est un phénomène qui requiert beaucoup d'énergie, il serait intéressant pour la population bactérienne d'évaluer la quantité d'éventuelles cellules receveuses, or les homosérine lactones ne reflètent que le nombre des cellules donneuses. Ce système pourrait simplement servir à s'assurer que le plasmide Ti se maintienne dans la population (Salmond *et al.*, 1995).

Il est en revanche plus facile de comprendre que, par la présence d'opines, la conjugaison est bénéfique aux cellules receveuses puisque le plasmide Ti est nécessaire au catabolisme de ce sucre (Dunny, 1999).

Figure 1.6: Structure chimique des différentes N-acyl HSL existant dans le monde bactérien (Dunny, 1999).



1.2. Les synthétases d'HSL

1.2.1. Structure des N-acyl homosérine lactones

Les N-acyl HSL sont toutes composées d'une chaîne acyl liée à l'homosérine lactone par un lien amide. Ces molécules varient d'une espèce bactérienne à l'autre, créant une spécificité du signal d'une bactérie donnée (Swift *et al.*, 1996). Les N-acyl HSL peuvent varier à 3 niveaux, premièrement, la longueur de leur chaîne carbonée varie de 4 à 14 carbones. Deuxièmement, le troisième carbone de la chaîne acyl peut présenter différentes substitutions : il peut être lié à un groupement hydroxyl (OH), un groupement carbonyle ou être tout à fait réduit. Enfin, la chaîne acyl peut présenter divers degrés de saturation. Cependant, jusqu'à présent, les N-acyl HSL connues n'ont qu'une double liaison (figure 1.6).

1.2.2. LuxI et ses homologues

La production d'HSL est associée, chez un grand nombre de bactéries Gram négatives, à l'activité de protéines homologues à la synthétase de *V. fischeri*, LuxI. L'expression de synthétases de type LuxI dans un hôte hétérologue comme *E. coli* conduit à la formation d'HSL spécifiques, suggérant que ces enzymes sont entièrement responsables de la synthèse d'HSL (More *et al.*, 1996). On peut également conclure de cette observation que les précurseurs des HSL sont des métabolites courants.

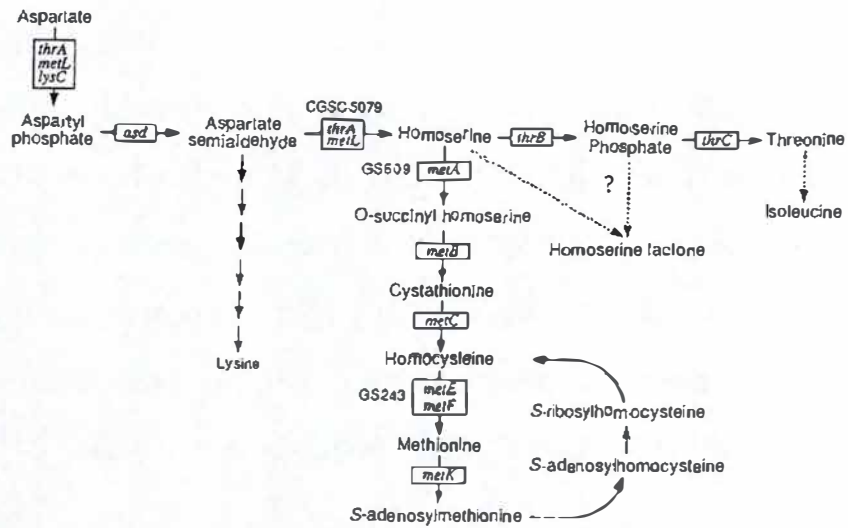


Figure 1.7; Pathway biosynthétique de la lysine et de la méthionine chez *E. coli* (Hanzelka & Greenberg, 1996).

1.2.2.1. Substrats de luxI

La réaction enzymatique aboutissant à la synthèse d'HSL consiste en l'assemblage d'une chaîne acyl et du cycle homosérine lactone.

1.2.2.1.1 Précurseur de l'anneau homosérine lactone

Différentes hypothèses ont été émises quant à l'origine de l'homosérine lactone des N-acyl HSL. L'homosérine et ses dérivés se retrouvent dans la plupart des cellules bactériennes car ce sont des intermédiaires dans la voie biosynthétique de la méthionine, la lysine et la thréonine. La première hypothèse fut donc de supposer que les HSL étaient synthétisées à partir des pools cellulaires d'homosérine (figure 1.7). Mais cette hypothèse a vite été réfutée par de nombreuses expériences qui ont, par ailleurs, appuyé une deuxième hypothèse. Cette dernière fait dériver les N-acyl HSL de la S-Adénosyl-Méthionine (SAM).

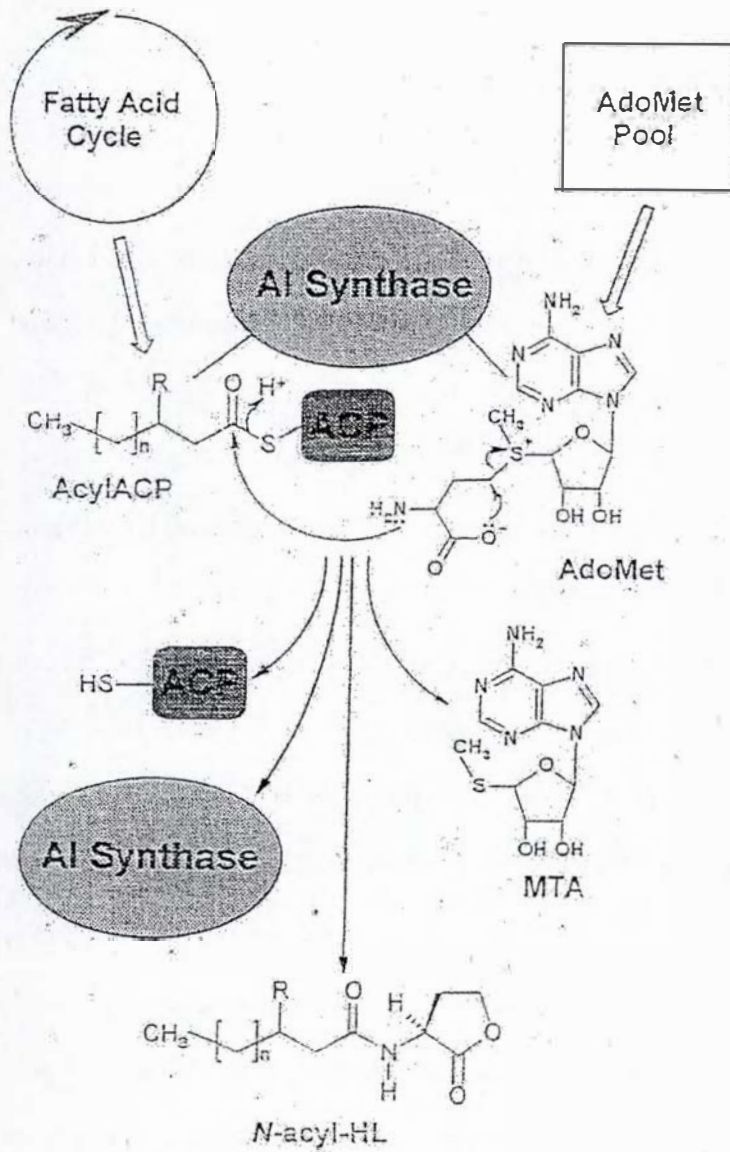
Dans la cellule, la SAM est la principale source de groupement méthyl, c'est donc une molécule importante. Les preuves les plus convaincantes de l'utilisation de la SAM pour la formation de N-acyl HSL proviennent d'études de synthèse d'HSL *in vitro*, à partir des synthétases purifiées d'*A. tumefaciens* (TraI), de *V. fischeri* (LuxI) et de *P. aeruginosa* (RhII). Dans chaque cas, la N-acyl HSL spécifique de chaque système analysé (oxo-C₈HSL pour TraI, oxo-C₆HSL pour LuxI, C₄HSL pour RhII) est formée en faisant agir la synthétase purifiée avec la SAM et des extraits de *E. coli*, qui fournissent le substrat de la chaîne acyl. Par contre, si cette même réaction est réalisée en remplaçant la SAM par l'homosérine, aucune N-acyl HSL n'est détectée (More, et al., 1996), (Schaefer *et al.*, 1996), (Parsek *et al.*, 1999).

D'autres expériences ont permis d'analyser les conditions nécessaires à la synthèse de N-acyl HSL dans des souches de *E. coli* mutée pour la formation d'homosérine et contenant un plasmide qui surexprime LuxI. Les N-acyl HSL ne sont produites que lorsque le milieu est

Figure 1.8 : Mécanisme putatif de la synthèse de N-acyl homosérine lactone par les protéines de type LuxI (Dunny, 1999).

AdoMet= S adénosyl méthionine

MTA= 5' Méthylthio adénosine



pourvu de SAM, par contre l'ajout d'homosérine n'entraîne pas la formation de N-acyl HSL (Hanzelka & Greenberg, 1996).

1.2.2.1.2 Origine de la chaîne acyl

Etant donné que les N-acyl HSL sont constituées en partie d'une chaîne d'acide gras, on a depuis longtemps suggéré que leur synthèse devait être liée au métabolisme des lipides. Les pools cellulaires d'acides gras peuvent dériver soit de la voie de synthèse, soit de la voie de dégradation des lipides. La biosynthèse des acides gras chez les procaryotes fait intervenir une protéine transporteuse d'acyls appelée l'ACP (acyl carrier protein). Tous les acides gras naissants se fixent à cette protéine, la cellule contient donc un ensemble d'ACP portant toute une gamme de chaîne acyles.

La dégradation des acides gras se fait par la voie de la β -oxydation. Avant leur oxydation, les acides gras libres sont activés par condensation au coenzyme A. Il existe donc également, dans la cellule, toute une série d'acyl-CoA. A nouveau, des études *in vitro* utilisant des synthétases purifiées ont permis de démontrer la participation de l'acyl-ACP à la synthèse de N-acyl HSL, plutôt que celle de l'acyl-CoA (Parsek, et al., 1999), (Schaefer, et al., 1996), (More, et al., 1996).

1.2.2.2. Mécanisme enzymatique

L'identification des substrats des synthétases homologues à LuxI a permis de proposer un mécanisme enzymatique pour ces enzymes (figure 1.8).

Le groupement amine de la SAM possède une paire d'électrons libres sur l'atome d'azote de la méthionine, permettant une attaque nucléophile sur le groupement carbonyle de la chaîne acyl. Cela conduit à la formation d'un lien amide entre les deux molécules. L'étape

suivante de la réaction consiste à lactoniser l'intermédiaire "acyl-SAM", libérant ainsi l'acyl-HSL et la 5'-méthylthioadénosine.

1.2.2.3. Interaction Enzyme-Substrat

La façon dont les substrats se fixent à l'enzyme n'est pas encore clairement définie. Ils pourraient se fixer en même temps, aléatoirement ou suivre un processus à deux étapes. Le premier modèle faisant intervenir un processus à deux étapes implique d'abord la fixation de la chaîne acyl sur l'enzyme, via la formation d'un lien thioester, ce qui aboutirait à la formation d'un intermédiaire Enzyme/Acyl-ACP. Ensuite viendrait l'attaque nucléophile conduisant à la fixation de la SAM au complexe (Dunny, 1999). Ce modèle suppose l'ancrage de la chaîne acyl à l'enzyme via un résidu cystéine ou sérine, cependant on sait actuellement que la mutation de tels résidus n'influence pas la synthèse d'HSL. Il est néanmoins possible que cette partie de l'activité enzymatique soit tributaire d'un autre résidu conservé (Fuqua, 1999). Un second modèle de synthèse où les substrats se fixent à l'enzyme suivant un processus à deux étapes a donc été proposé : l'enzyme fixerait d'abord la SAM, puis seulement l'acyl-ACP (Parsek, et al., 1999),(Watson *et al.*, 2002). C'est ce dernier modèle qui est favorisé actuellement.

Ces modèles à deux étapes se basent sur le comportement des acyl-transférases impliquées dans le métabolisme des acides gras et dans la biosynthèse des phospholipides. La structure cristallographique de la synthétase de *Erwinia stewartii* -Esal- a été déterminée, et a montré une ressemblance structurale remarquable avec les N-acyl-transférases, (Watson, et al., 2002). Elle a également permis de mieux analyser le site actif et de favoriser un modèle enzymatique à plusieurs étapes.

1.2.2.4. Spécificité de substrat

Le site actif de l'enzyme doit reconnaître les deux substrats : la SAM et une acyl-ACP particulière parmi tout le pool disponible, afin de synthétiser l'HSL spécifique associée à une espèce bactérienne donnée (Dunny, 1999)

Toutes les réactions impliquées dans la reconnaissance spécifique enzyme-substrat sont loin d'être déterminées, cependant la structure cristallographique de EsaI, ainsi que des expériences de mutagenèse aléatoire au niveau du gène correspondant, ont permis de situer d'éventuels résidus importants dans les interactions de l'enzyme avec le substrat (Watson, et al., 2002).

1.2.2.5. Régulation de la synthèse d'HSL

Quand la densité de la population bactérienne est faible, le gène codant pour la synthétase est transcrit à un niveau basal, conduisant à la synthèse d'une quantité basale d'HSL. Ce phénomène joue un rôle essentiel dans le quorum sensing et n'importe quel élément qui affecte positivement ou négativement ce niveau basal de synthèse a un effet sur la régulation générale des gènes cibles puisqu'il modifie le moment où la N-acyl HSL atteint la concentration seuil.

Le gène codant pour la synthétase est en général induit par le régulateur homologue à LuxR correspondant, créant un feed-back positif. Cependant d'autres systèmes peuvent intervenir dans le contrôle de l'expression du gène de la synthétase. Par exemple, chez *P.aeruginosa*, *rhlI* est régulé par le système LasR/LasI, ainsi que par le système à deux composants GacA/GacS qui constitue un autre élément pour percevoir l'environnement extérieur, (Withers et al., 2001).

Il pourrait également exister un contrôle de l'activité enzymatique. La prédiction la plus simple est de supposer l'inhibition de l'enzyme par les produits finaux comme la 5'-méthylthioadénosine, bien que cela n'ait pas encore été démontré (Dunny, 1999).

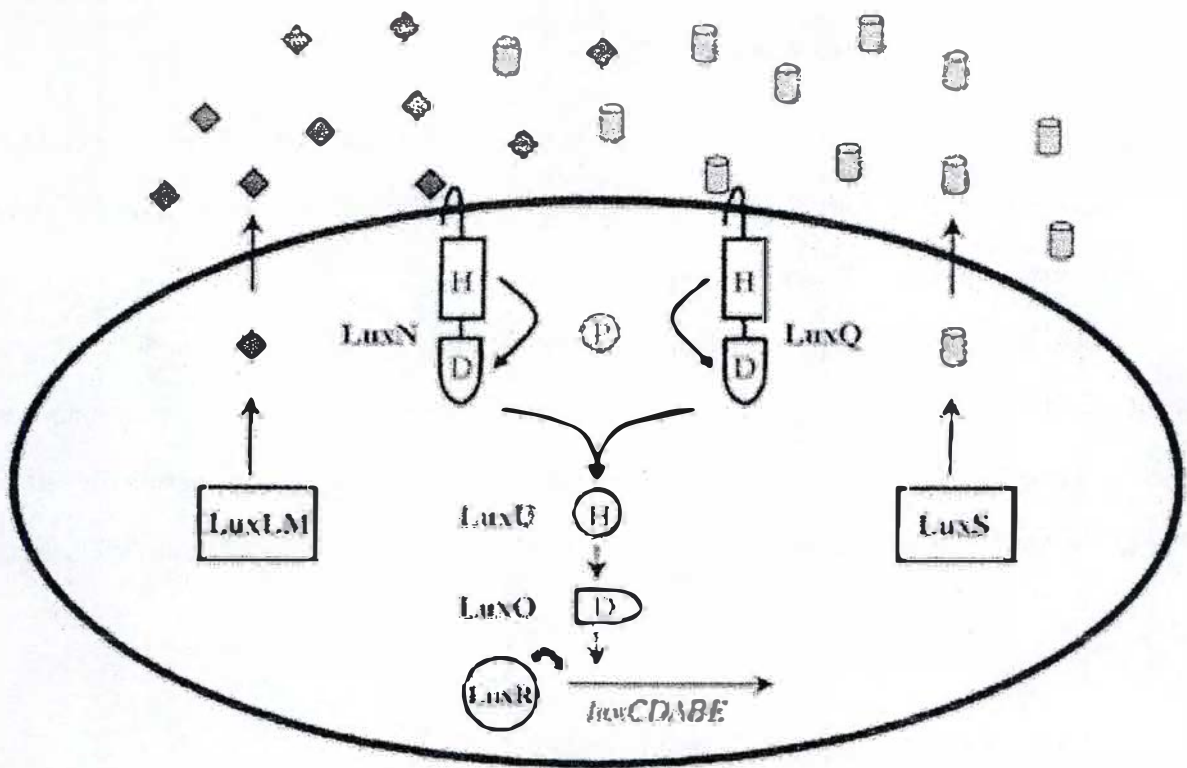


Figure 1.9: Quorum sensing chez *V. harveyi*

Les carrés et les cylindres représentent respectivement la C6HSL et AI-2. La synthèse de l'HSL dépend de LuxLM, celle de AI-2 de LuxS.

D'après (Miller & Bassler, 2001).

1.2.3. LuxM et AinS

LuxI et ses homologues constituent une famille de synthétases responsables de la production de N-acyl HSL dans la plupart des bactéries étudiées. Cependant, une deuxième famille de synthétases de N-acyl HSL a été identifiée chez deux espèces du genre *Vibrio*.

1.2.3.1. LuxLM chez *V. harveyi*

Vibrio harveyi est une bactérie marine chez qui le contrôle des gènes de luminescence se fait grâce au quorum sensing. Le système est néanmoins un peu particulier puisqu'il fait intervenir deux types de signaux qui fonctionnent en parallèle. D'une part, comme la majorité des bactéries Gram négatives utilisant le quorum sensing, *V. harveyi* produit et répond à une phéromone de type N-acyl HSL : la 3-hydroxy-C₄HSL (Bassler *et al.*, 1993). D'autre part, les gènes de luminescence chez *V. harveyi* sont sensibles à une deuxième molécule qui n'appartient pas à la famille des N-acyl HSL, le furanosyl borate diester, communément appelé AI-2.

Chacun de ces deux systèmes fait intervenir une protéine senseur kinase : LuxN et LuxQ qui détectent de manière spécifique, respectivement l'hydroxy-C₄HSL et AI-2 (figure 1.9).

Ces protéines senseur présentent des homologies avec la partie C terminale des protéines senseurs des systèmes à deux composants. Une troisième protéine, LuxU, intègre les informations provenant de LuxN et de LuxQ et les transmet à un régulateur de réponse appelé LuxO.

Quand la densité de population est faible les phéromones sont absentes, et les protéines senseurs s'autophosphorylent. Le phosphate est transféré jusqu'à LuxO qui, dans l'état phosphorylé réprime l'expression de l'opéron *luxCDABE*. Quand la densité de population est

élevée, la quantité de phéromones augmente. Ces dernières se lient à la protéine senseur, LuxN ou LuxQ, qui passe de l'état kinase à celui de phosphatase. LuxO est alors déphosphorylé par LuxN ou LuxQ, il est ainsi inactif et un régulateur transcriptionnel, appelé LuxR mais ne présentant pas d'homologies avec LuxR de *V. fischeri*, active la transcription de l'opéron luminescent (Miller and Bassler, 2001).

Chez *V. harveyi*, on ne trouve pas d'homologues au système habituel LuxR/LuxI. La 3-hydroxy-C₄HSL est synthétisée par la protéine LuxLM qui ne présente aucune similarité avec LuxI.

1.2.3.2. AinS chez *V. fischeri*

Chez *V. fischeri*, la 3-oxo-C₁₂HSL synthétisée par LuxI intervient avec LuxR dans la régulation de l'opéron *lux*. Mais récemment la production d'une deuxième HSL, la C₈HSL a été découverte. Cette molécule induit également la production de lumière en présence de LuxR. Le gène codant pour la protéine responsable de la synthèse de C₈HSL chez *V. fischeri* a été isolé. Ce gène, nommé *ainS* ne présente aucune similarité avec LuxI, mais bien avec LuxM de *V. harveyi* (Gilson *et al.*, 1995). Une deuxième famille de synthétases de N-acyl HSL, comprenant LuxM de *V. harveyi* et AinS de *V. fischeri*, a ainsi été définie.

Les analyses de la protéine AinS purifiée ont permis de confirmer son activité enzymatique et de définir les substrats nécessaires à son action : AinS catalyse la synthèse de C₈HSL à partir de SAM et d' acyl ACP, mais contrairement aux homologues de LuxI, elle est également capable d'utiliser un acyl CoA (Hanzelka *et al.*, 1999).

1.2.4. HdtS

Une grande partie des bactéries colonisant les plantes produisent une large gamme de composés secondaires antifongiques qui leur réserve l'exclusivité de la niche écologique. *Pseudomonas fluorescens* F113 est une bactérie du sol qui colonise les racines des plantes. Elle produit le 2-4-diacétylphloroglucinol qui inhibe la croissance de champignons microscopiques particuliers. Comme ce composé n'est synthétisé qu'à de fortes densités de population, il est logique de supposer qu'il est sous la dépendance du quorum sensing. Afin d'analyser cette hypothèse, différentes recherches ont été effectuées sur *P. fluorescens* F113. Cette souche produit trois phéromones différentes de la famille des N-acyl HSL, la 3-hydroxy-C₁₄HSL, la C₁₀HSL, la C₆HSL, mais aucun homologue du couple LuxI/LuxR ni d'AinS ou de LuxLM n'a été détecté (Laue *et al.*, 2000).

Le locus codant pour la molécule responsable de la synthèse de ces trois N-acyl HSL a été identifié grâce à l'utilisation de biosenseurs. Les biosenseurs sont des souches bactériennes permettant la détection de N-acyl HSL. Ils seront décrits ultérieurement au point 3.1.2.1. Un senseur luminescent (pSB401) a été utilisé pour cribler une banque de *P. fluorescens* F113. Les clones produisant de la lumière ont été sélectionnés et analysés permettant ainsi de définir une ORF, nommée *hdtS*, codant pour l'éventuelle synthétase de *P. fluorescens* F113. Différentes techniques ont permis démontrer que le gène identifié encodait bien la protéine responsable de la synthèse des trois N-acyl HSL (Laue, et al., 2000). Cette protéine ne présentant d'homologies ni avec LuxI ni avec LuxM ou AinS, constitue une troisième famille de synthétases de N-acyl HSL.

D'après les données de comparaison de séquences, HdtS serait similaire à des acyltransférases d'acide lysophosphatidique (LPA) que l'on retrouve chez *Neisseria meningitidis* (NlaB) ou chez *E. coli* (PlsC). Mais aucune de ces deux espèces ne produit de N-acyl HSL. Chez *N. meningitidis* ou chez *E. coli*, les LPA-acyltransférases catalysent le

transfert d'une chaîne acyl, provenant de l'acyl-ACP ou de l'acyl-CoA, sur LPA pour former l'acide phosphatidique qui est un intermédiaire important dans la biosynthèse des phospholipides (Shih *et al.*, 1999).

Chez HdtS, on observe deux motifs qui correspondent, d'après les comparaisons de séquences avec les autres LPA acyltransférases, à des sites de fixation d'acyl-CoA et d'acyl-ACP. HdtS pourrait donc être une acyltransférase qui transférerait des chaînes acyl sur un substrat comme la SAM pour générer des N-acyl HSL. Cependant, elle pourrait également être impliquée dans la synthèse de substrats, nécessaires à la formation des N-acyl HSL par d'autres enzymes (Fuqua, 1999).

1.3. Brucella

1.3.1. Généralités

Brucella est un cocco-bacille Gram négatif dont la taille varie de 0,6 à 1,5 μm sur 0,5 à 0,7 μm . C'est une bactérie asporulée, aérobie stricte, non mobile, appartenant à la classe des α -2 protéobactéries. Cette classe regroupe toute une variété de bactéries pathogènes ou symbiotiques, qui s'associent aux cellules eucaryotes mammifères ou végétales.

Brucella est une bactérie intracellulaire facultative infectant les mammifères, chez qui elle provoque des problèmes d'avortement chez les femelles et de fertilité chez les mâles (Young, 1995). Elle est responsable d'une zoonose de répartition mondiale et crée des problèmes économiques majeurs, ainsi que des problèmes de santé humaine (Corbel, 1997).

Lorsqu'elle infecte l'homme, *Brucella* est responsable d'une maladie appelée fièvre de Malte. Les individus atteints peuvent présenter des symptômes d'ordre général (fièvre, sueurs, anorexie, fatigue, perte de poids, dépression...), mais la maladie peut devenir chronique et une série de complications apparaissent (endocardite, arthrite...) (Young, 1995).

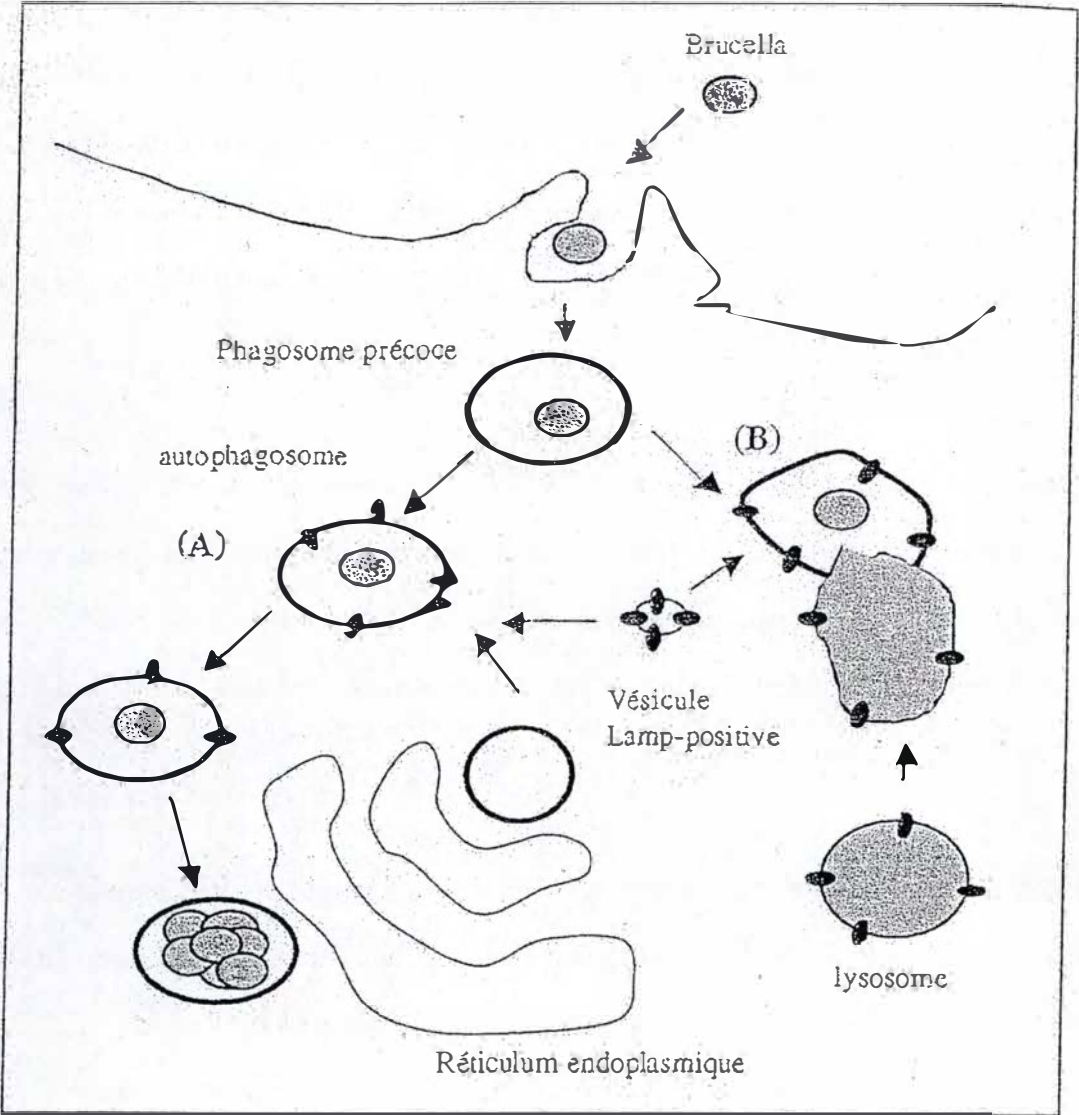
La brucellose humaine est essentiellement due à la consommation d'aliments infectés d'origine animale, comme le lait non pasteurisé par exemple. Mais elle peut également être causée par des contaminations accidentelles directement à partir d'animaux infectés : les bactéries entrent en contact avec l'organisme par inhalation d'aérosols infectieux ou par des lésions cutanées, elle touche donc plus particulièrement les fermiers et les vétérinaires. Une combinaison d'antibiotiques permet de traiter la brucellose, en général on associe la doxycycline à la rifampicine.

Il existe six espèces dans le genre *Brucella*, dont quatre sont pathogènes pour l'homme : *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* et *B. canis*. Ces quatre espèces ont cependant un hôte animal de prédilection : *B. abortus* cause des problèmes d'avortement chez les bovins, *B. melitensis* est le principal agent de la brucellose chez les petits ruminants alors que *B. suis* et *B. canis* infectent respectivement les porcins et les chiens.

Le génome de la plupart des espèces de *Brucella* est composé de deux chromosomes circulaires de 1,2Mb et de 2,2Mb. Aucun plasmide naturel ni aucun échange génétique naturel n'a été mis en évidence chez *Brucella* (O'Callaghan & MacMillan, 2001).

Brucella étant un pathogène essentiellement intracellulaire, un aspect clé de sa virulence est donc sa capacité à transformer l'environnement de la cellule hôte en une niche propice à sa survie et à sa multiplication (Boschiroli *et al.*, 2001). Les mécanismes impliqués dans l'adhésion, l'invasion et la colonisation des cellules hôtes ne sont pas tous élucidés. Pour survivre, *Brucella* détourne la voie classique de fusion phago-lysosomale. Après l'invasion des cellules, *Brucella* se retrouve dans un phagosome qui possède les caractéristiques de l'endosome précoce. Environ 50 minutes après l'infection, les bactéries virulentes sont situées dans un compartiment ressemblant aux vacuoles autophagiques. La voie classique de maturation des autophagosomes implique l'acquisition des protéines de membrane

Figure 1.10: représentation du trafic intra-cellulaire de *Brucella* (Pizarro-Cerda, 1999)

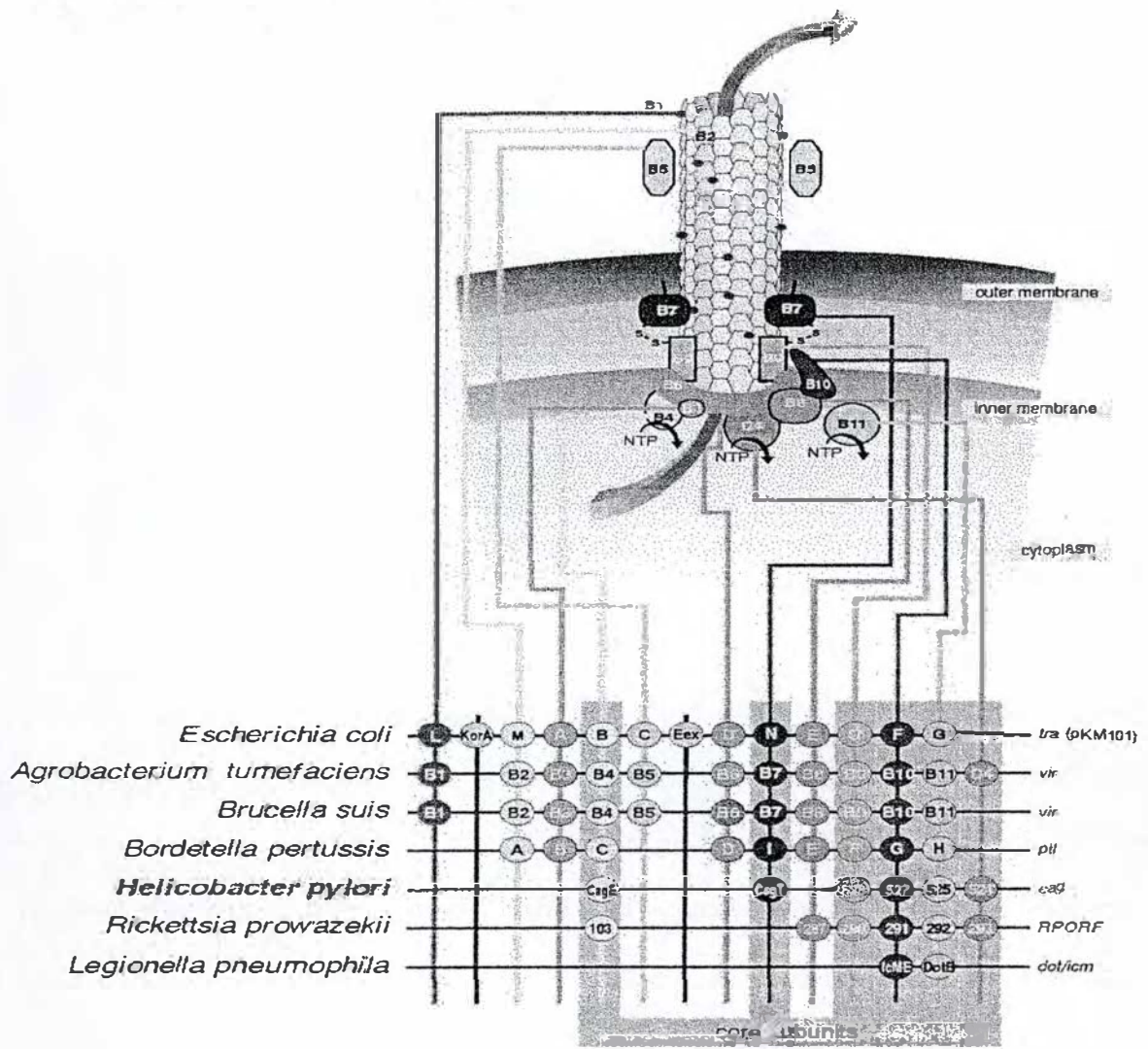


lysosomales, ils sont acides, mais ne contiennent pas d'enzymes hydrolytiques. Les *Brucella* virulentes paraissent inhiber la maturation des phagosomes vers les lysosomes et après 24 heures d'infection, elles se situent dans un compartiment, appelé vacuole de réplication, ayant des caractéristiques membrabaires du réticulum endoplasmique rugueux (RER) où elles trouvent un environnement optimal et se multiplient (Pizarro-Cerda *et al.*, 1999) (figure 1.10).

De nombreuses études, se basant sur des techniques de biologie moléculaire récentes ont été réalisées afin d'identifier des gènes de virulence chez *Brucella*, cependant, peu de mécanismes sont encore clairement définis (Lestrade *et al.*, 2000). Un système de sécrétion de type IV, homologue à l'opéron *virB* d'*A. tumefaciens* a été identifié chez *Brucella*. L'appareil de sécrétion de type IV, décrit chez plusieurs bactéries Gram négatives, sert au transport de macromolécules, protéines ou ADN (figure 1.11). Chez *Brucella*, des mutants *virB* sont atténués chez la souris BALB/c et ne sont capables de se multiplier ni dans les cellules HeLa, ni en macrophages, modèles cellulaires utilisés en laboratoire pour étudier la virulence ou le trafic intracellulaire de *Brucella* (Delrue *et al.*, 2001). Ces données suggèrent que VirB est impliqué dans la virulence de *Brucella*. De plus, il a été observé que la transcription de *virB* est induite trois heures après l'infection en macrophages, VirB n'intervient donc pas dans les premières étapes de l'infection de la cellule hôte (Boschiroli *et al.*, 2002). Des études *in vitro* ont montré que l'opéron *virB* est régulé par des agents qui miment les conditions rencontrées par *Brucella* lors de l'infection. L'acidification du phagosome pourrait être un signal stimulant la transcription de *virB* (Boschiroli, *et al.*, 2002).

Un système de régulation à deux composants, appelé BvrR/BvrS a également été découvert comme étant important dans la mise en place d'un environnement cellulaire optimal pour le développement de *Brucella* (Sola-Landa *et al.*, 1998). Des souches de *Brucella* mutées dans *bvrR* ou *bvrS* sont incapables d'envahir les cellules HeLa et ont perdu leur capacité à modifier le pathway endocytaire (Pizarro-Cerda, *et al.*, 1999).

Figure 1.11 : représentation du système de sécrétion type IV chez plusieurs bactéries Gram négatives, d'après (Covacci *et al.*, 1999).



1.3.2. Etude du quorum sensing chez *Brucella*

Pour mener à bien le processus d'infection, les facteurs de virulence doivent être régulés de façon très fine. Un éventuel système de quorum sensing pourrait jouer un rôle dans la régulation des gènes impliqués dans la virulence de *Brucella*.

1.3.2.1. Présence de N-acyl-HSL chez *Brucella*

Au laboratoire, B. Taminiau a identifié deux N-acyl HSL dans le surnageant de cultures de *B. melitensis* 16M, suggérant pour la première fois l'existence d'un système de quorum sensing chez un pathogène intracellulaire (Taminiau *et al.*, 2002)

Une des deux phéromones a été purifiée, caractérisée chimiquement et identifiée comme étant une C₁₂HSL. La deuxième molécule n'a pas été caractérisée chimiquement étant donné sa trop faible concentration dans le surnageant, mais serait une oxo-C₁₂HSL, d'après les profils de migration obtenus en TLC (voir point 5.2.4.4). Par rapport à la plupart des bactéries Gram négatives utilisant un système de régulation dépendant de la densité, *Brucella* produit de très faibles quantités de N-acyl HSL. Il a en effet fallu extraire 18 litres de surnageant d'une culture de *B. melitensis* 16M pour caractériser chimiquement la C₁₂HSL au moyen d'une HPLC, alors que dans le cas d'autres bactéries Gram négatives 5-6 litres de surnageant suffisent (Taminiau, *et al.*, 2002).

1.3.2.2. Identification de deux régulateurs de type LuxR

B. melitensis produisant un signal de type N-acyl HSL, les études se sont focalisées sur la recherche d'éventuels homologues au système luxR/luxI.

Afin d'identifier le gène codant pour la synthétase de la C₁₂HSL, une banque génomique de *B.abortus* a été criblée avec des souches bactériennes senseur, détectant la production de N-acyl HSL. Un gène candidat, allumant ce système senseur, a ainsi été isolé. Cependant, après analyse de sa séquence, ce gène s'est avéré être homologue à un régulateur du quorum sensing plutôt qu'à la synthétase attendue. Il s'agit sans doute d'un faux positif, puisque dans les systèmes classiques du quorum sensing, un régulateur transcriptionnel requiert la présence d'autoinducteurs pour activer la transcription de gènes cibles. Ce régulateur transcriptionnel putatif a été nommé BabR.

Par ailleurs, une banque de mutants transpositionnels a été criblée en vue de détecter les bactéries atténuées dans leur capacité à se répliquer dans les cellules eucaryotes. Parmi les mutants isolés lors de ce criblage, une *Brucella* mutée dans un autre gène présentant des homologies avec un régulateur transcriptionnel de la famille de luxR a été détectée. Ce gène est appelé *vjbR* (Vacuolar Jacking *Brucella* Regulator) (Rose-May Delrue, communication personnelle).

Deux régulateurs transcriptionnels homologues à *luxR*, BabR et VjbR ont donc été identifiés chez *B. melitensis*.

1.3.2.3.Effets de différents acteurs du quorum sensing sur la régulation de *virB*

Depuis la découverte d'acteurs moléculaires d'un système de quorum sensing (C₁₂HSL, régulateurs transcriptionnels) plusieurs études ont analysé leur éventuel rôle dans la virulence de *Brucella*. Différents liens ont été établis entre les N-acyl HSL produites par *Brucella*, le régulateur VjbR et l'opéron *virB* qui code pour un système de sécrétion type IV, indispensable à la réplication de *Brucella*.

D'une part, il a été observé qu'en milieu minimum, l'ajout de C₁₂HSL à une culture de *B.melitensis*, en début de phase exponentielle entraîne une inhibition de la transcription de l'opéron *virB* (Taminiau, et al., 2002). D'autre part, des études menées sur les relations entre

VirB et VjbR ont permis de conclure que VjbR exerce une régulation positive sur *virB* (Rose May Delrue, thèse en cours).

1.3.2.4. Le mystère de la synthétase

A ce jour, aucun gène codant pour une éventuelle synthétase n'a été identifié, malgré les nombreuses stratégies mises en œuvre. Une banque de *B. melitensis* a été criblée avec des senseurs disponibles; des homologues au gène *luxI* ont été recherchés dans le génome de *B. melitensis* et *B. suis*; des amorces nucléotidiques dégénérées ont été créées sur base d'alignements multiples de séquence des différentes synthétases connues chez d'autres espèces afin d'amplifier le gène de la synthétase par PCR; des expériences de Southern blot sur de l'ADN génomique de *Brucella* ont été réalisées avec des sondes hétérologues correspondant aux gènes *traI* et *raiI*.

OBJECTIFS DU MEMOIRE

2. OBJECTIFS DU MEMOIRE

A partir des années 90, des systèmes de régulation dépendant de la densité de population ont été découverts chez un nombre croissant de bactéries Gram positives et Gram négatives (Fuqua, et al., 1994). Chez *Brucella*, deux régulateurs de la famille de LuxR, BabR et VjbR ont été identifiés, ainsi que deux N-acyl HSL dont une est caractérisée chimiquement, la C₁₂HSL. Cependant aucune synthétase d'HSL n'a été trouvée malgré l'utilisation de différentes stratégies.

La découverte chez *P. fluorescens* d'une troisième famille de synthétases d'HSL, HdtS, a permis d'ouvrir une nouvelle piste dans la recherche d'une synthétase chez *Brucella*. Un gène présentant des homologies avec *hdtS* a en effet été trouvé dans le génome de *B. melitensis*. Ce gène est également homologue à des acyl-transférases.

L'objectif de ce travail est de cloner le gène *hdtS* de *Brucella* et de déterminer s'il pourrait coder pour une protéine capable de synthétiser des HSL. Pour cela, plusieurs techniques faisant intervenir des biosenseurs, outils permettant de détecter la présence de N-acyl HSL, ont été utilisées.

D'autre part, n'ayant pas encore pu identifier de synthétase chez *Brucella*, une alternative pour étudier le système de régulation dépendant du quorum sensing a été mise en œuvre. Un vecteur exprimant une synthétase de *Pseudomonas aeruginosa* (LasI) qui catalyse la production d'une N-acyl HSL proche de celle de *Brucella* a été introduite dans différentes souches de *B. melitensis* 16M NaI^R disponibles au laboratoire. Ces souches contiennent un gène rapporteur, la GFP, en aval de promoteurs d'intérêt. Nous avons ainsi abordé l'étude de l'implication des HSL dans la régulation de *vjbR*.

RESULTATS ET
DISCUSSION

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Etude de *hdtS* de *Brucella*

Afin d'analyser l'éventuelle production d'HSL par HdtS de *Brucella*, le gène *hdtS* a été cloné dans le plasmide pBBRmcs1 sous la dépendance du promoteur de *lacZ*.

Le gène *lasI* de *P. aeruginosa* codant pour la synthétase LasI a également été cloné sous la dépendance du promoteur de *lacZ* dans le plasmide pBBRmcs4. Ce plasmide nous fournira un contrôle positif adapté puisque LasI catalyse la synthèse d'une HSL à longue chaîne, l'oxo-C₁₂HSL.

3.1.1. Constructions

3.1.1.1. pBBRmcs1-hdts

pBBRmcs1 est un plasmide à faible taux de répllication (10 à 15 copies par cellule) portant l'origine de répllication Rep, il est dès lors compatible avec les plasmides portant les origines de répllication ColE1 et p15A et pourra donc leur être associé ultérieurement. pBBRmcs1 porte le gène codant pour la Chloramphénicol Acétyl Transférase (CAT) qui confère la résistance au chloramphénicol (Kovach *et al.*, 1994).

Une région contenant l'ORF *hdtS* de *B. melitensis* a été clonée directionnellement dans le pBBRmcs1 en aval du promoteur de *lacZ* de *E. coli*, aux sites *XhoI* et *PstI*. Cette région a tout d'abord été amplifiée à partir de l'ADN génomique de *Brucella melitensis* 16M NaI^R par l'enzyme taq polymérase, avec les amorces *hdtS*-amont-*XhoI* et *hdtS*-aval-*PstI*. Ces amorces possèdent respectivement les sites de restriction *XhoI* et *PstI* à leur extrémité 5' permettant le clonage directionnel (figure 3.1)

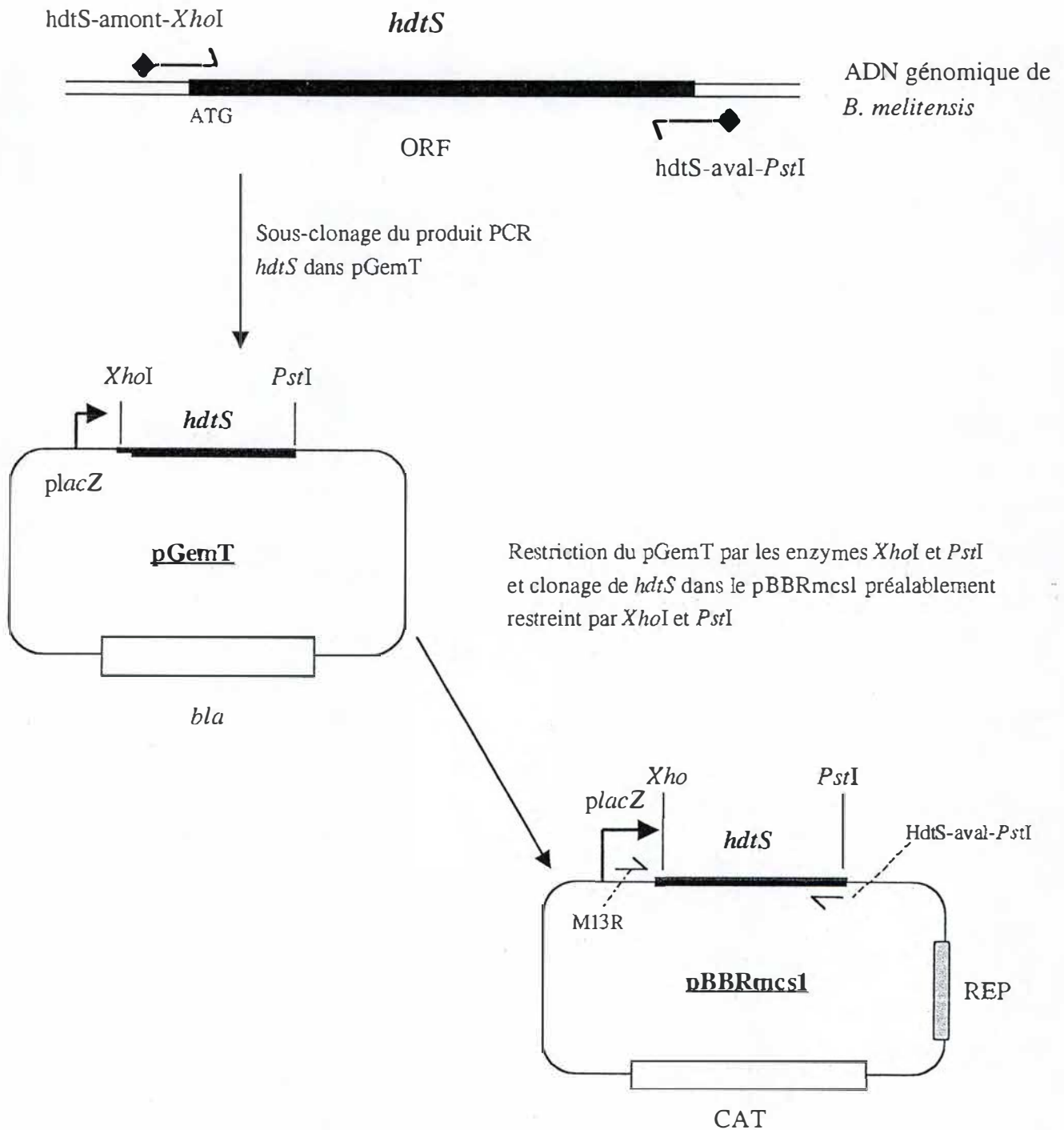


Figure 3.1 : Clonage de *hdtS* dans le pBBRmcs1

La séquence codante du gène *hdtS* a été amplifiée par les amorces HdtS-amont-*XhoI* et HdtS-aval-*PstI* qui contiennent respectivement les sites de restriction *XhoI* et *PstI* (◆)
 Le produit PCR a ensuite été sous cloné dans le vecteur intermédiaire pGemT ;
 L'insert contenant *hdtS* a été ensuite ressorti du pGemT par les enzymes *XhoI* et *PstI* pour être cloné directionnellement dans le pBBRmcs1

Après sa purification, le produit PCR *hdtS* a été inséré dans un vecteur intermédiaire, le pGemT, afin de faciliter la restriction *XhoI-PstI*. En effet, le produit PCR ne contient que quelques paires de bases aux extrémités, près des sites *XhoI* et *PstI*, ce qui diminue l'efficacité des enzymes de restriction. Le pGemT a un taux de répllication élevé et porte le gène conférant la résistance à l'ampicilline. Le plasmide ainsi obtenu a été appelé pGemT-hdtS

Des *E.coli* DH10B CaCl_2 compétentes ont été transformées avec le produit de ligation pGemT-hdtS. Ces cellules ont ensuite été cultivées une nuit sur un milieu sélectif contenant de l'ampicilline ainsi que du X-gal et de l'IPTG pour détecter les clones recombinants via un test blanc/bleu. Des minipréparations d'ADN ont été réalisées sur 18 colonies blanches issues de la transformation. Pour vérifier la présence de l'insert dans les plasmides pGemT-hdtS, deux restrictions diagnostiques, *EcoRI* et *NotI* ont été réalisées. Trois clones ayant le bon profil ont ainsi pu être sélectionnés (Figure 3.2). (les résultats de la restriction *EcoRI* ne sont pas montrés).

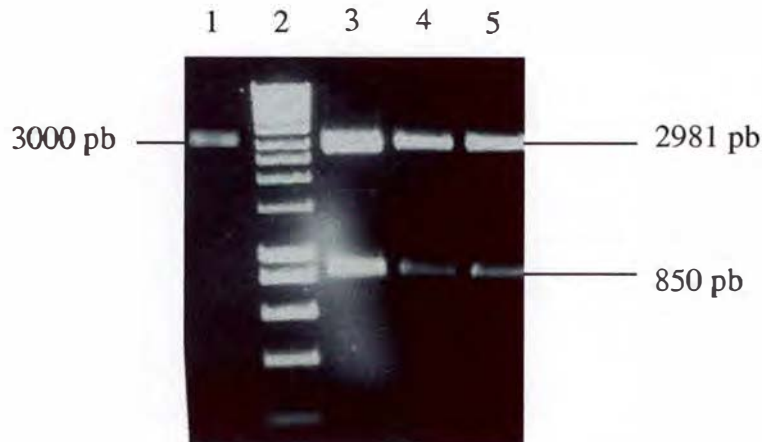


Figure 3.2 : Restriction diagnostique des plasmides pGemT-hdtS et pGemT par l'enzyme *NotI*

1. Piste 1 : pGemT
2. Piste 2 : marqueur hyperladder
3. Piste 3 : pGemT-hdtS clone 1
4. Piste 4 : pGemT-hdtS clone 2
5. Piste 5 : pGemT-hdtS clone 3

La restriction de pGemT-hdtS par *NotI* génère deux fragments de 850 et 2981 pb.
Le pGemT vide restreint par *NotI* se linéarise et a une taille d'environ 3000 pb.

Afin d'insérer le gène d'intérêt dans le vecteur final, pBBRmcs1, une double restriction par les enzymes *XhoI* et *PstI* a été effectuée sur les clones 1, 2 et 3 pour ressortir l'insert du pGemT-hdtS (figure 3.3).



Figure 3.3 :

-Restriction *XhoI* et *PstI* de pGemT-hdtS afin d'extraire le fragment *hdtS*. Les fragments de *hdtS* et pGemT ont respectivement une taille d'environ 800 et de 3000 pb..

Piste 1 : pGemT-hdtS clone 1

Piste 2 : pGemT-hdtS clone 2

Piste 3 : pGemT-hdtS clone 3

Piste 5 : hyperladder

- Piste 4 : Restriction de *XhoI/PstI* du pBBRmcs1 générant un fragment de 4672 pb.

Après avoir été purifié à partir du gel d'agarose, ce fragment d'environ 800 paires de base a été ligué par la T4-DNA ligase au pBBRmcs1 préalablement restreint par les deux enzymes *XhoI* et *PstI*. Cette construction a été nommée pBBRmcs1-hdtS. Le plasmide pBBRmcs1 restreint a également été incubé avec la T4-DNA ligase, sans insert, constituant un contrôle négatif.

Des *E.coli* DH10B CaCl_2 compétentes ont été transformées, d'une part avec le produit de ligation pBBRmcs1-hdtS, d'autre part avec le contrôle négatif. Ces cellules ont ensuite été cultivées pendant une nuit sur un milieu sélectif contenant du chloramphénicol, du X-gal et de l'IPTG.

Afin de vérifier la présence de l'insert dans le plasmide, une PCR diagnostique a été réalisée sur 10 colonies blanches à l'aide de l'amorce hdtS-aval-*Pst*I et d'un primer universel, M13 reverse (M13R), s'hybridant en amont du gène *lacZ* (figure 3.1). Une colonie bleue après transformation, a été prise comme référence pour comparer les profils des différents produits de l'amplification. Sur base des résultats obtenus, 6 clones contenant l'insert ont pu être identifiés (figure 3.4).



Figure 3.4 : PCR diagnostique sur 11 colonies transformées avec le plasmide pBBRmcs1-hdtS
La PCR est réalisée avec les amorces hdtS-aval-pstI et M13R. Ce couple d'amorces permet de vérifier la présence de l'insert d'environ 800pb dans l'orientation du promoteur de *lacZ*.

L'insert est présent dans les clones se trouvant aux pistes 5, 7, 8, 9, 10 et 11.

Le contrôle négatif (colonie bleue) se trouve piste 1

Le marqueur utilisé est l'Hyperladder (bioline) = M

Afin de confirmer ces données, une restriction *Eco*RI a été effectuée sur une préparation plasmidique des 6 clones positifs après la PCR. Tous ces clones présentent le profil de restriction attendu pour le plasmide recombinant pBBRmcs1-hdtS.

Deux de ces 6 clones ont ainsi été choisis pour être séquencés à partir des amorces universelles pGemT-amont et pGemT-aval, qui s'hybrident respectivement au niveau de la

partie aval et de la partie amont du gène *lacZ*. L'analyse des séquences a montré que le gène *hdtS* de ces clones ne contenait pas de mutation.

3.1.1.2.pBBRmcs4-lasI

Une région contenant l'ORF *lasI* a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN génomique de *P. aeruginosa* PAO I avec l'enzyme Pfx, avec les amorces *lasI*-amont et *lasI*-aval. Après sa purification, le produit PCR a été inséré dans le plasmide pBBRmcs4 préalablement restreint par l'enzyme *EcoRV* (figure 3.5).

pBBRmcs4 est un plasmide possédant les mêmes caractéristiques que le pBBRmcs1, mis à part le gène de résistance à l'antibiotique qui confère, chez pBBRmcs4, la résistance à l'ampicilline (gène *bla*).

Des *E. coli* DH10B CaCl₂ compétentes ont été transformées avec le produit de ligation, nommé pBBRmcs4-lasI, et cultivées une nuit sur un milieu sélectif contenant de l'ampicilline, du X-gal et de l'IPTG. Des minipréparations d'ADN ont été réalisées sur 22 clones blancs.

Etant donné que le clonage a été effectué avec une matrice restreinte par une enzyme générant des bouts francs, l'insert peut se trouver dans deux orientations possibles: soit sous la dépendance du promoteur de *lacZ*, soit dans l'orientation contraire. Le plasmide peut également s'être refermé sur lui-même.

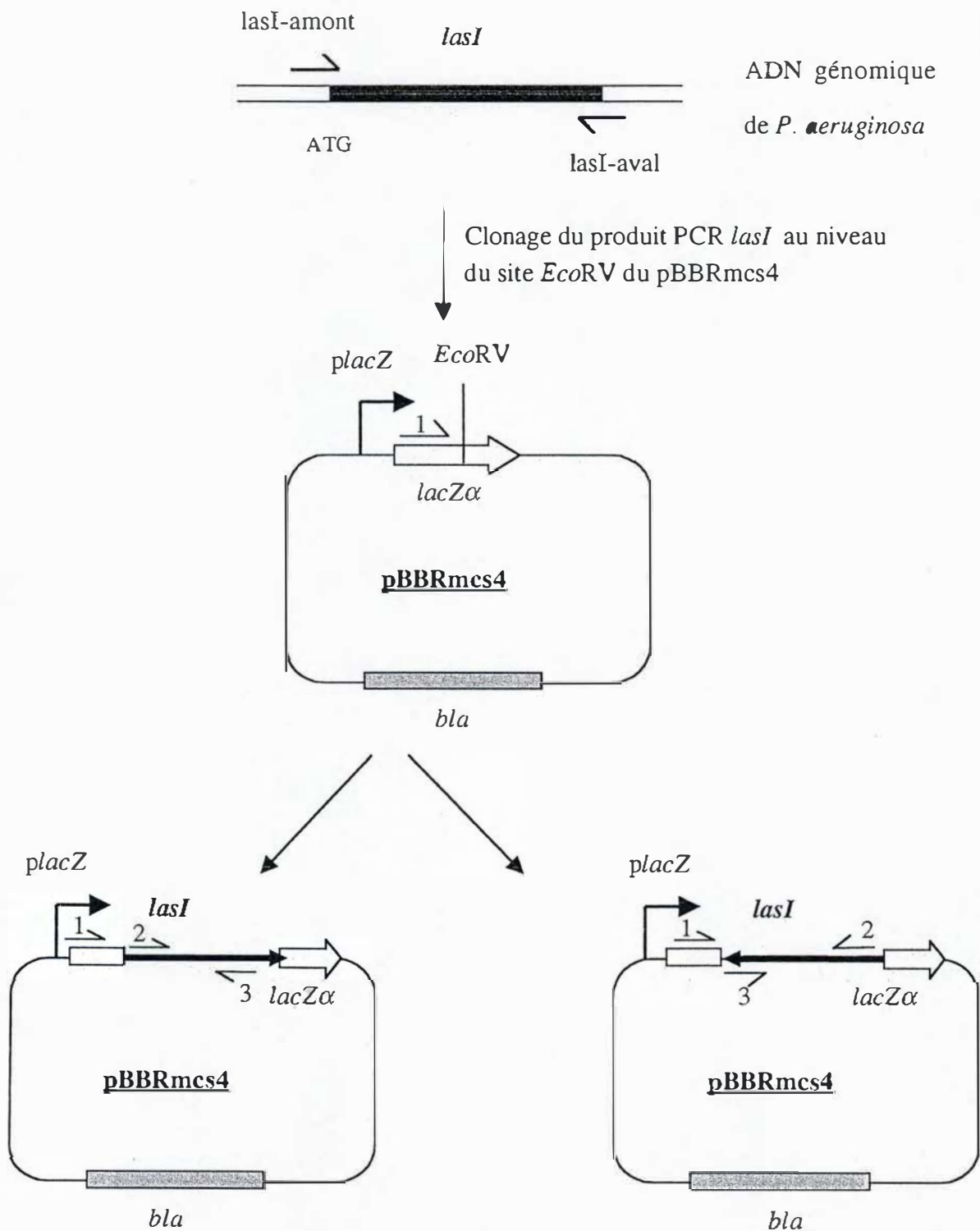


Figure 3.5 : Clonage de la synthétase *lasI* de *P. aeruginosa* dans le pBBRmcs4 au site *EcoRV*.

Le fragment peut s'insérer dans l'orientation du promoteur de *lacZ* (sens direct), ou dans le sens inverse.

Les amorces utilisées pour la PCR diagnostique sont représentées par des flèches

1- amorce M13 Reverse

2- amorce *lasI*-amont

3- amorce *lasI*-aval

Plusieurs manipulations nous ont permis de différencier ces trois types de plasmides. Tout d'abord une restriction par l'enzyme *EcoRI* et une restriction par *XmnI* ont été réalisées générant les profils attendus. Ensuite, des PCR sur 8 colonies nous ont permis de déterminer l'orientation de l'insert. A cet effet, trois couples d'amorces ont été utilisés, (i) le couple lasI-aval/lasI-amont permet de confirmer la présence de l'insert, (ii) le couple M13R/lasI-aval amplifie uniquement les inserts clonés dans le sens de transcription de *lacZ*, (iii) le couple M13R/lasI-amont amplifie les inserts clonés dans le sens inverse (figures 3.5 et 3.6). Suite à la PCR, un clone au profil correct a été choisi.

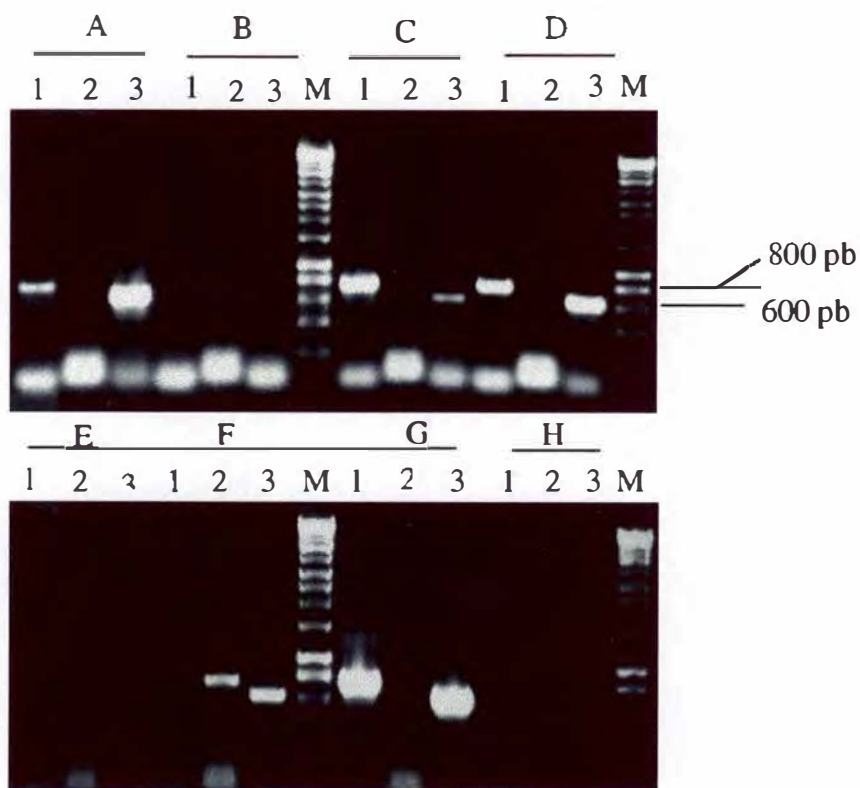


Figure 3.6 : PCR diagnostique sur les clones transformés avec pBBRmcs4-lasI

PCR sur colonies permettant de discriminer les plasmides vides, les plasmides contenant l'insert dans le sens direct et ceux le contenant dans le sens inverse.

1-PCR effectuée avec le couple d'amorces M13R/lasI-aval

2-PCR effectuée avec le couple d'amorces M13R/lasI-amont

3-PCR effectuée avec le couple d'amorces lasI-amont/lasI-aval

Les produits PCR amplifié par ces trois couples d'amorces ont respectivement une taille de 713, 713 et 620pb

Les clones B , E et H n'ont pas l'insert, les clones A, C, D et G l'ont dans le sens direct et le clone F possède l'insert dans le sens inverse.

Marqueur hyperladder (M)

Pour confirmation, ce clone (clone A) a été séquencé à partir des amorces pGemT-amont et pGemT-aval. L'analyse des deux séquences obtenues a montré la présence de deux mutations ponctuelles, l'une remplaçant un acide aspartique par une asparagine et l'autre remplaçant une lysine par une glutamine. La fonctionnalité de la synthétase encodée par le gène *lasI* n'est cependant pas altérée, comme le confirme un test fonctionnel décrit au point 3.1.2.2.

En plus de servir de contrôle positif pour comparer la production de N-acyl HSL par HdtS et par LasI, la construction pBBRmcs4-*lasI* sera utilisée ultérieurement lors de la surexpression d'une synthétase chez *Brucella*, résultat décrit au point 3.2.

3.1.2. Analyse de la production d'HSL par HdtS

3.1.2.1. Description des senseurs utilisés

Différents outils, permettant la détection de N-acyl HSL ont été mis au point (Winson *et al.*, 1998). Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé la souche d'*E. coli* JM109 contenant des plasmides senseurs luminescents et la souche *Chromobacterium violaceum* CV026 (McClellan *et al.*, 1997).

3.1.2.1.1. Souches d'*E. coli* senseur

Les souches d'*E. coli* JM109 senseur de N-acyl HSL sont des souches recombinantes contenant un plasmide capable de rapporter la présence de N-acyl HSL dans le milieu. Ces plasmides contiennent en effet le gène codant pour un régulateur transcriptionnel du quorum sensing homologue à *luxR* et un promoteur, régulé par ce régulateur, en amont d'un gène rapporteur. Les plasmides senseurs ainsi que la souche JM109 sont dépourvus de synthétase, rendant impossible l'activation du gène rapporteur sans apport d'HSL exogène ou sans introduction d'un vecteur répliquatif compatible portant un gène encodant une synthétase. Pour

rappel, un régulateur transcriptionnel de la famille de LuxR est activé suite à la liaison d'une N-acyl HSL (figure 3.7).

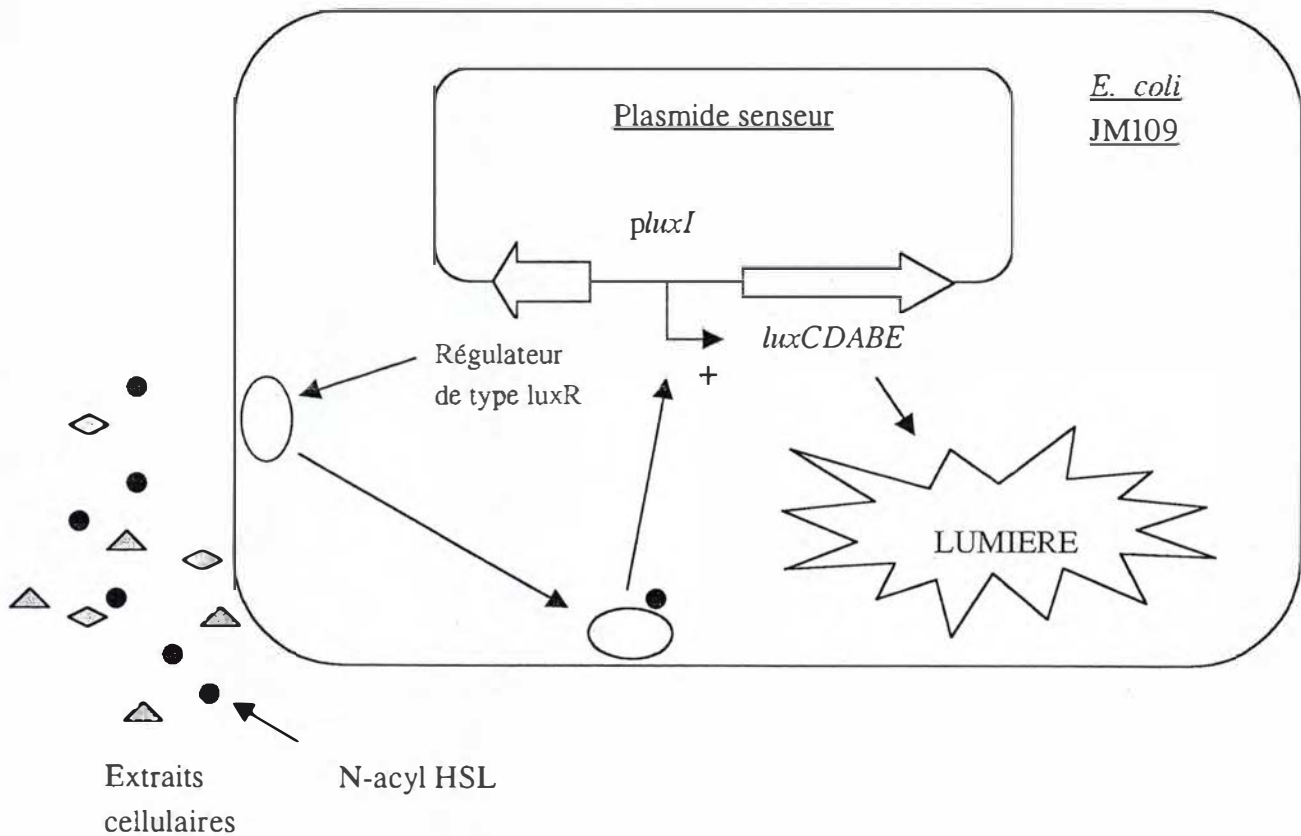


Figure 3.7 : Fonctionnement d'un plasmide senseur

Le plasmide senseur comporte un gène codant pour un régulateur transcriptionnel, un promoteur activable par ce régulateur (*luxI*) et un gène rapporteur. Le gène rapporteur porté par les plasmides que nous avons utilisés est l'opéron *luxCDABE*. Ni le plasmide senseur ni la souche bactérienne ne contiennent de synthétase, le système s'allume donc uniquement lors d'un apport exogène d'HSL.
N-acyl HSL = ●

Dans le cadre de ce travail, trois senseurs luminescents, décrits ci-dessous, ont été utilisés afin de couvrir la détection d'une large gamme d'HSLs : JM109 (pSB1075), JM109

(pSB1142) et JM109 (pSB401). Le système rapporteur de ces trois plasmides est l'opéron luminescent *luxCDABE* provenant de *Photobacterium luminescens* (Winson, et al., 1998).

3.1.2.1.1.1 pSB401

pSB401 porte le gène *luxR* et le promoteur de *luxI* de *V. fischeri* en amont de l'opéron *lux*. Ce senseur est très sensible à l'oxo-C₆HSL, une phéromone produite par *luxI*. Cependant, il est également capable de reconnaître une gamme d'HSL à courtes chaînes qu'il y ait ou non de substitutions au niveau du troisième carbone de la chaîne acyl (Winson, et al., 1998).

3.1.2.1.1.2 pSB1075

pSB1075 porte le gène *lasR* et le promoteur de *lasI* de *P. aeruginosa* PAO1 en amont de l'opéron *lux*. Etant donné que LasI produit l'oxo-C₁₂HSL, c'est à cette phéromone que le senseur est le plus sensible, mais il détecte également des N-acyl HSL à longues chaînes, avec ou sans substitutions au niveau du troisième carbone de la chaîne acyl (Winson, et al., 1998).

3.1.2.1.1.3 pSB1142

Comme pSB1075, pSB1142 porte le gène *lasR* et le promoteur de *lasI* de *P. aeruginosa* PAO1 en amont de l'opéron *lux* et détecte donc préférentiellement les N-acyl HSL à chaîne longue. Il dérive du plasmide pACYC, et a donc un taux de répllication plus faible.

3.1.2.1.2 *Chromobacterium violaceum* CV026

C. violaceum est une bactérie Gram négative produisant un pigment violet, la violacéine, en réponse à la présence de C₆HSL. La synthèse de ce pigment est sous la dépendance d'un système de quorum sensing ; il existe en effet chez *C. violaceum* un homologue à LuxI appelé CviI, qui catalyse la production de la C₆HSL, ainsi qu'un homologue à LuxR appelé CviR (McClean, et al., 1997).

L'isolement d'un mutant transpositionnel dans la synthétase *cviI*, appelé CV026, a permis de développer un nouvel outil de détection des N-acyl HSL. En effet, CV026 ne produisant plus de pigment violet, seul l'apport exogène de N-acyl HSL à courte chaîne (préférentiellement une C₆HSL) restaure sa production. Par contre, les N-acyl HSL exogènes à chaîne plus longue que 8 carbones n'entraînent pas la production de violacéine chez CV026 mais inhibent l'effet des N-acyl HSL exogènes à courte chaîne. Cette propriété peut être exploitée afin de détecter la présence d'HSL à longue chaîne.

3.1.2.2. Tests de la production de N-acyl HSL par HdtS grâce à différentes techniques

Afin de tester la production d'HSL par HdtS de *Brucella*, différentes techniques impliquant les senseurs décrits ci-dessus ont été utilisées.

3.1.2.2.1. Cotransformations

La cotransformation a pour but d'amener dans la souche *E. coli* JM109, un plasmide compatible avec le plasmide senseur, portant un gène codant pour une éventuelle synthétase.

Avant de réaliser la cotransformation, nous avons voulu vérifier la production basale de lumière par les cellules JM109 ne comportant que le plasmide senseur (figure 3.8). Cette expérience permet de constater que les senseurs JM109 (pSB1075) et JM109 (pSB401) présentent un certain bruit de fond. De la lumière est en effet émise sans ajout d'HSL ou sans apport de plasmide extérieur portant le gène codant pour une synthétase. On remarque que la souche JM109 (pSB1075) produit beaucoup plus de lumière que les autres senseurs, ce qui est probablement dû au taux de répllication plus élevé du plasmide senseur pSB1075. Ces données nous seront utiles pour interpréter les résultats de la cotransformation.

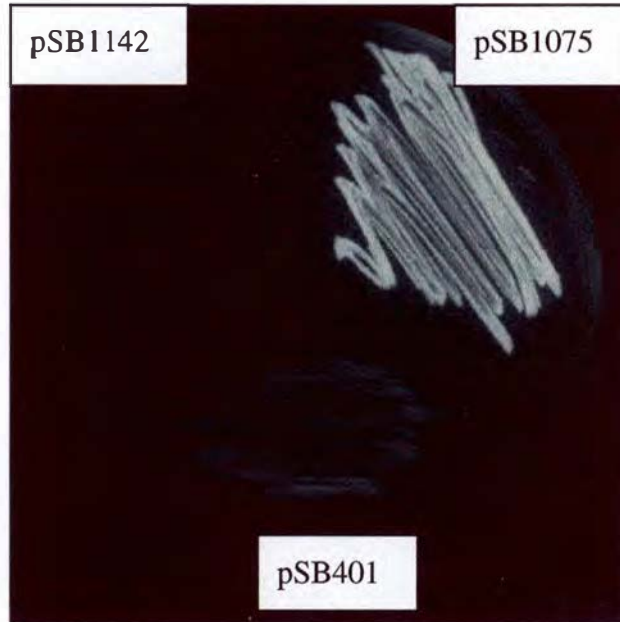


Figure 3.8 : Les souches JM109 (pSB401), JM109 (pSB1142), JM109 (pSB1075) ne contenant pas de plasmide apportant de synthétase, ont été étalées sur du milieu LB. L'émission de lumière indique la présence d'un certain bruit de fond.

Les trois senseurs, *E. coli* JM109 (pSB401, pSB1142, pSB1075) rendus CaCl_2 compétents ont été transformés d'une part avec le plasmide pBBRmcs1-hdtS, d'autre part avec le plasmide pBBRmcs4-lasI (contrôle positif), ainsi qu'avec les plasmides vides pBBRmcs1 ou pBBRmcs4 (contrôles négatifs). Un autre plasmide, pBL59, qui nous a été fourni par le laboratoire de Paul Williams à Nottingham, portant le gène encodant la synthétase HdtS de *P. fluorescens* F113, a également été utilisé comme contrôle positif (Laue, et al., 2000). Ces souches ont ensuite été cultivées une nuit sur un milieu sélectif contenant les antibiotiques appropriés. Après une nuit d'incubation, les boîtes ont été analysées à l'aide d'une caméra détectant la production de lumière. Les résultats sont présentés à la figure 3.9 et résumés dans le tableau 3.1.

		pSB401	pSB1142	pSB1075
<u>Test</u>	pBBRmcs1-hdtS	+	-	+
<u>Contrôles positifs</u>	pBBRmcs4-lasI	+	+	ND
	pBL59	+	-	ND
<u>Contrôles négatifs</u>	pBBRmcs1	+	-	+
	pBBRmcs4	+	-	ND

Tableau 3.1 : Cotransformations

Le signe + indique les cotransformations produisant de la lumière

Le signe - indique les cotransformations ne produisant pas de lumière

ND = Not Done : la cotransformation n'a pas été réalisée les plasmides n'étant pas compatibles car ils possèdent le même gène de résistance aux antibiotiques

Le senseur pSB1075 émet la même quantité de lumière qu'il soit cotransformé avec pBBRmcs1-hdtS ou avec le plasmide pBBRmcs1 vide. De tels résultats étaient attendus au vu de la lumière produite par le senseur pSB1075 seul (figure 3.8 et 3.9)

Le senseur pSB401 émet également la même quantité de lumière qu'il soit cotransformé avec un plasmide portant un gène codant pour une éventuelle synthétase (pBBRmcs1-hdtS, pBBRmcs4-lasI ou pBL59) ou avec un plasmide vide (pBBRmcs1 ou pBBRmcs4). Nous concluons de ces résultats que la lumière émise par le senseur pSB401 est due au bruit de fond du plasmide.

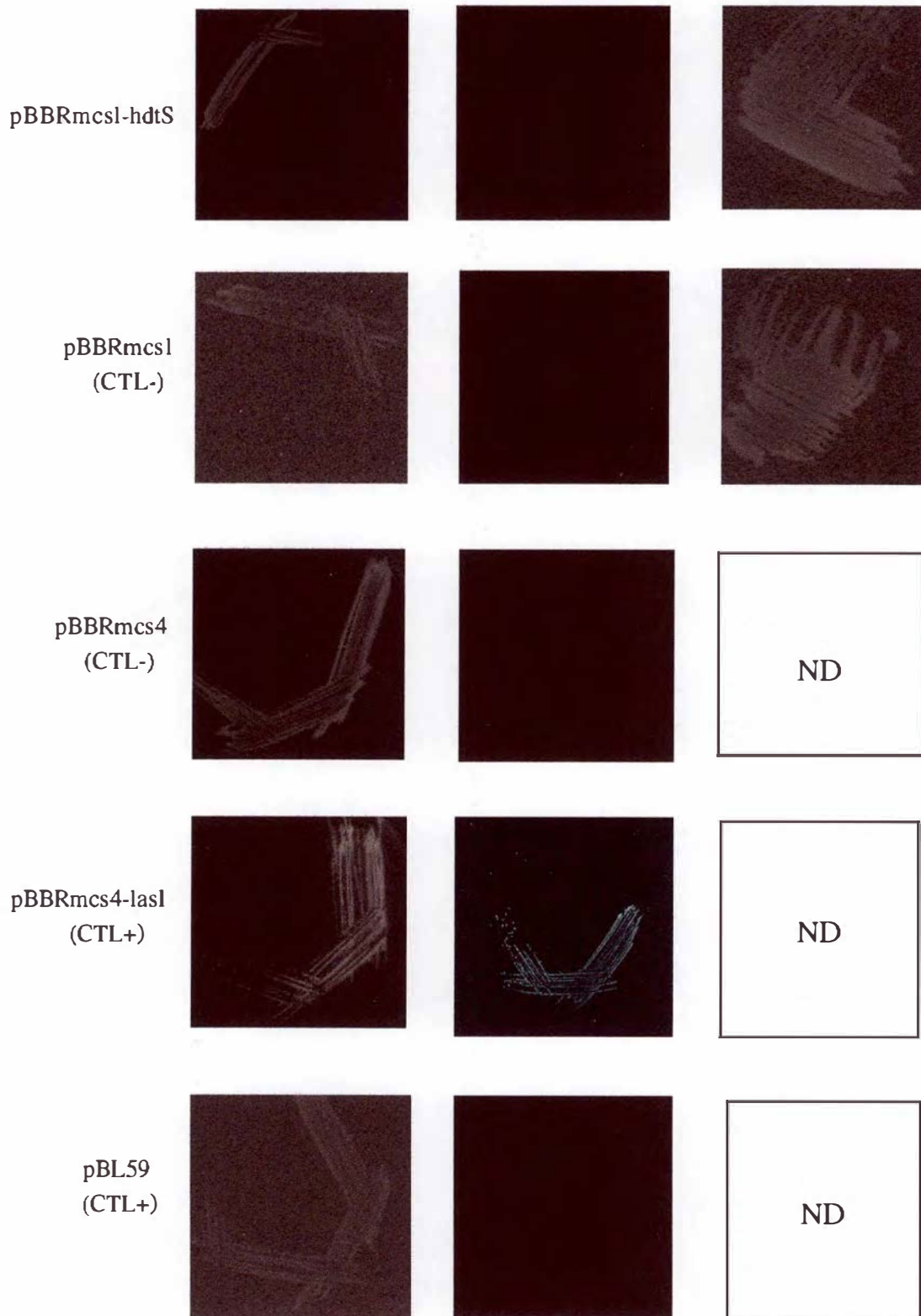
Le senseur pSB1142 semble être le senseur le plus adéquat pour la détection de N-acyl HSL à longue chaîne. En effet, aucune production de lumière n'est détectée dans les souches cotransformées avec les plasmides vides. La cotransformation avec le contrôle positif pBBRmcs4-lasI émet une certaine quantité de lumière permettant de montrer que *lasI* de *P. aeruginosa* cloné dans pBBRmcs4 est fonctionnel. Par contre pBL59 n'entraîne pas la production de lumière. Aucun signal lumineux n'est émis par le senseur JM109 (pSB1142) transformé avec le plasmide pBBRmcs1-hdtS. Les cotransformations n'ont pas pu montrer la production d'HSL par *hdtS*.

Il est très surprenant de constater l'absence d'activité de *hdtS* de *P. fluorescens*, dans le plasmide pBL59, étant donné que c'est une telle cotransformation qui a permis de montrer la production de N-acyl HSL par HdtS. Plusieurs restrictions diagnostiques réalisées sur le plasmide pBL59 provenant de Nottingham, ont généré un profil incorrect sur base de la publication de B. Laue (Laue, et al., 2000). Il est donc possible que *hdtS* soit incomplet ou absent du plasmide. Dans le temps imparti pour ce mémoire nous n'avons pas pu obtenir un plasmide pBL59 authentique. Lors des expériences ultérieures, le seul contrôle positif utilisé sera donc pBBRmcs4-lasI.

Résultats et discussion

Figure 3.9 : cotransformations

Transformation de la souche *E. coli* JM109 avec un plasmide senseur (pSB401, pSB1142, pSB1075) ainsi qu'avec une souche dont la production d'HSL est testée (pBBRmcs1-hdtS, pBBRmcs1, pBBRmcs4-lasl, pBBRmcs4, pBL59); ND = Not Done



3.1.2.2.2. Cross-Streak

Le cross streak est une autre technique utilisée pour détecter la production de N-acyl HSL par une souche bactérienne donnée, où les cellules à tester et les cellules senseurs sont striées sur une boîte de pétri, perpendiculairement les unes aux autres, établissant ainsi une seule zone de contact. Les N-acyl HSL peuvent ainsi diffuser de la souche à tester à la souche senseur.

Des cellules d'*E. coli* JM109 contenant un plasmide senseur luminescent sont ainsi mises en contact avec des cellules d'*E. coli* DH10B contenant le plasmide d'intérêt pBBRmcs1-hdtS, le plasmide servant de contrôle positif pBBRmcs4-lasI ou les contrôles négatifs pBBRmcs1 et pBBRmcs4 vides.

Les résultats obtenus par cette méthode confirment ce qui a été observé suite aux cotransformations (figure 3.10). Le gène *lasI* est fonctionnel puisqu'il permet d'allumer les senseurs à longue chaîne JM109 (pSB1075), JM109 (pSB1142). Le cross-streak a permis de constater que pSB1075 répond à la molécule synthétisée par LasI, donnée qui n'était pas fournie par les cotransformations. Aucune activité n'est détectée pour le gène *hdtS* de *Brucella* quel que soit le senseur utilisé.

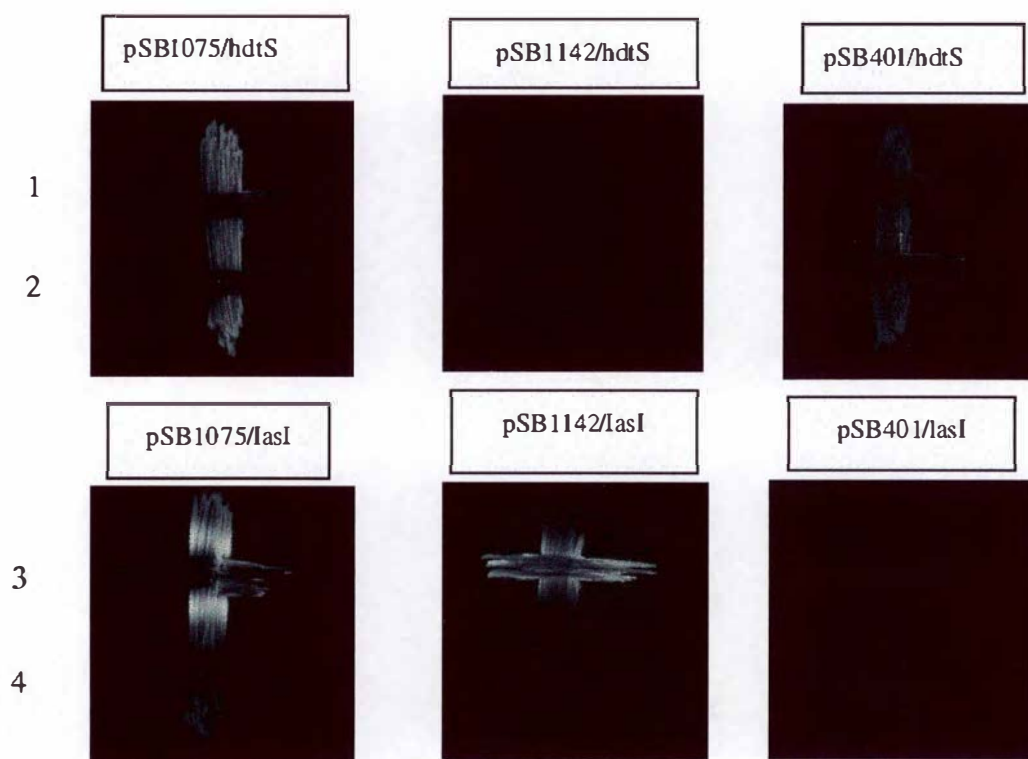


Figure 3.10: Cross-streak

Les senseurs JM109 (pSB1075), JM109 (pSB1142) et JM109 (pSB401) ont été striés verticalement.

Les souches dont la production de N-acyl HSL est testée sont striées horizontalement :

Ligne 1 : DH10B (pBBRmcs1-hdtS)

Ligne 2 : DH10B (pBBRmcs1)

Ligne 3 : DH10B (pBBRmcs4-lasI)

Ligne 4 : DH10B (pBBRmcs4)

3.1.2.2.3. Cocultures

Afin d'être plus précis dans la détection de la lumière, une culture d'une souche à tester est mélangée à une culture de senseur luminescent, la lumière produite par la souche senseur est quantifiée au moyen d'un luminomètre. Les résultats obtenus sont représentés sur le graphe de la figure 3.11. Ils confirment les résultats obtenus lors des deux expériences précédentes : LasI est fonctionnel, il induit la production de lumière par les senseurs luminescents pSB1142 et pSB1075, mais aucun signal n'est détecté pour pBBRmcs1-hdtS.

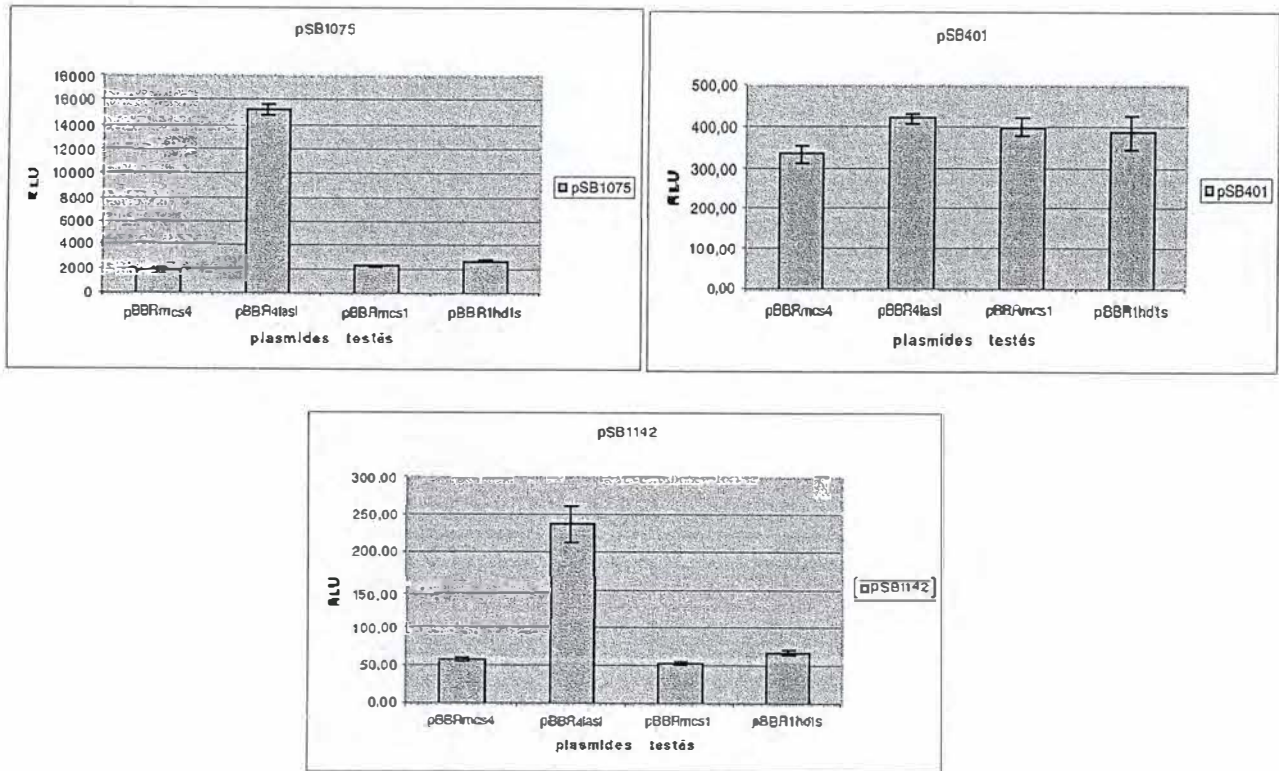


Figure 3.11 :Luminescence des cocultures

Les cultures de DH10B (pBBRmcs1), DH10B (pBBRmcs1-hdtS), DH10B (pBBRmcs4), DH10B (pBBRmcs4-lasI) ont été mélangées aux cultures senseurs JM109 (pSB1142), JM109 (pSB1075), JM109 (pSB401).

Les unités de luminescence (RLU) sont représentées en ordonnées.

RLU= Relative Light Unit

3.1.2.2.4. TLC (Thin Layer Chromatography)

Les 3 techniques décrites ci-dessus ont permis de montrer la présence, chez DH10B (pBBRmcs4-lasI), d'une molécule capable d'activer la production de lumière par les senseurs luminescents. On suppose que cette molécule est l'oxo-C₁₂HSL synthétisée par LasI. Dans toutes les autres souches testées, une molécule induisant la production de lumière par les senseurs semble absente.

Afin de confirmer la production de l'oxo-C₁₂HSL par LasI et de vérifier l'éventuelle production N-acyl HSL par HdtS, une TLC a été effectuée sur les extraits de culture, réalisées en milieu riche, des souches DH10B (pBBRmcs4-lasI), DH10B (pBBRmcs1-hdtS) et DH10B (pBBRmcs1). L'extraction a été réalisée à l'aide d'une méthode isolant spécifiquement les N-acyl HSL (Shaw *et al.*, 1997). Cette méthode permet de concentrer les N-acyl HSL ce qui optimise leur détection.

La TLC est une technique de chromatographie sur couche mince séparant les différents constituants d'un extrait en fonction de leur hydrophobicité. Il est ainsi possible de déterminer la taille des molécules en fonction de leur hauteur de migration par rapport à celle d'une molécule synthétique connue.

Lors de ce travail, les surnageants des cultures des souches suivantes ont été extraits :

E. coli DH10B (pBBR1-hdtS)

E. coli DH10B (pBBRmcs1-lasI) ---> contrôle positif

E. coli DH10B (pBBRmcs1) —> contrôle négatif

Une chromatographie sur couche mince a ensuite été réalisée sur ces extraits. Des N-acyl HSL synthétiques (C₆, C₁₂ ou C₁₀HSL en fonction du senseur), ont été utilisés comme référence, leur profil de migration pouvant être comparé avec celui de nos échantillons d'intérêt.

Lors de ces TLC, les senseurs décrits précédemment sont utilisés pour détecter les HSL séparées par la chromatographie. Une culture de senseur diluée dans du LB agar mou est

déposé sur la plaque de chromatographie et incubée une nuit à 30°C. La détection de la lumière produite par le senseur luminescent là où il est en contact avec les N acyl HSL se fait au moyen d'une caméra.

Plusieurs TLC ont été réalisées afin de faire varier différents paramètres et mettre au point les conditions de l'expérience.

-Une TLC utilisant le senseur *E. coli* JM109 contenant pSB1142, a été réalisée avec les extraits de DH10B (pBBRmcs1-hdtS), DH10B(pBBRmcs4-lasI), DH10B (pBBRmcs1) ainsi qu'avec la C₁₂HSL synthétique. Les résultats obtenus suite à cette TLC correspondent à ce qui est attendu. On détecte en effet un signal caractéristique de la 3-oxo-C₁₂HSL au niveau de l'échantillon provenant de DH10B (pBBRmcs4-lasI) (figure 3.12 piste 2). Les N-acyl HSL ayant une substitution hydroxyle au niveau du carbone 3 (oxo) migrent moins loin que les N-acyl HSL non substituées. En effet, la tache lumineuse correspondant au produit de LasI se situe plus bas que la C₁₂HSL synthétique (figure 3.12 piste1) et présente une traînée lumineuse caractéristique des composés possédant une oxo substitution. Ces données confirment la détection, par pSB1142, de la 3-oxo-C₁₂HSL produite par LasI (figure 3.12 piste 4).

La présence de la N-acyl HSL produite par LasI nous indique que les extractions ont été réalisées correctement. De plus, aucun signal n'est observé pour le contrôle négatif.

Aucun signal n'est détecté en piste 2 (figure 3.12), contenant l'extrait de DH10B (pBBRmcs1-hdtS). Etant donné que *Brucella* produit deux HSL à chaîne longue (la C₁₂HSL et en plus faible quantité une putative oxo-C₁₂HSL), on s'attend, si *hdtS* est bien la synthétase de *Brucella*, à ce que pSB1142 détecte un signal ayant le même profil de migration que la C₁₂HSL synthétique ou que l'oxo-C₁₂HSL produite par LasI, pour les extraits de DH10B(pBBRmcs1-hdtS). Or, l'absence de signal conduit à penser que HdtS ne produit pas d'HSL à chaîne longue (figure 3.12 piste 2).

Ce résultat a été confirmé lors d'une deuxième TLC réalisée dans les mêmes conditions.

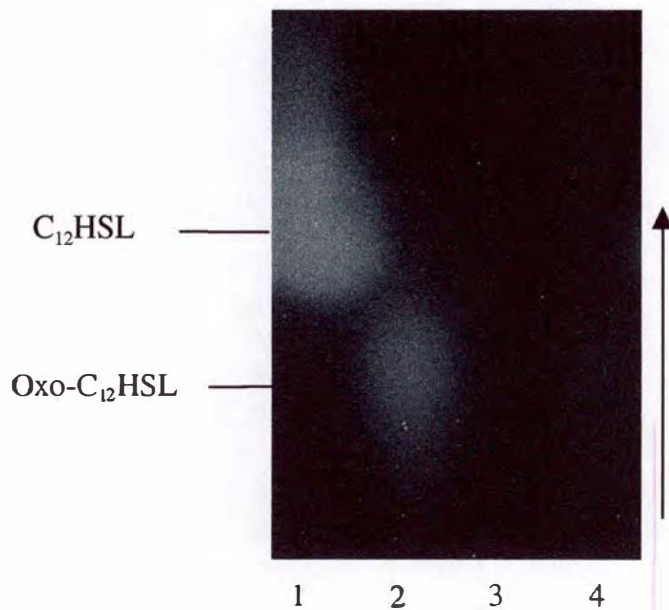


Figure 3.12 : TLC ayant permis la séparation des constituants d'extraits de différents surnageants. Les N-acyl HSL sont détectées grâce au senseur pSB1142.

- 1- C₁₂HSL synthétique (1μl)
- 2- extrait de la souche DH10B (pBBRmcs4-lasI) (5μl)
- 3- extrait de la souche DH10B (pBBRmcs1-hdtS) (5μl)
- 4- extrait de la souche DH10B (pBBRmcs1) (5μl)

-Les N-acyl HSL extraites des surnageants des cultures de DH10B (pBBRmcs1-hdtS), DH10B (pBBRmcs4-lasI), DH10B (pBBRmcs1) ainsi que l'oxo-C₁₂HSL synthétique ayant migré sur la plaque de silice ont également été soumises à une culture de senseur CV026 auquel a été préalablement ajoutée de la C₆HSL à une concentration de 2.10^{-5} μg/μl. Cette C₆HSL permet d'activer la production de violacéine par CV026, l'ensemble de la plaque apparaît donc mauve, sauf là où migrent des HSL à longue chaîne de carbone. Ces dernières inhibant l'effet de la C₆HSL, conduisent à la formation d'un spot blanc.

Un spot blanc est effectivement observé pour l'oxo C_{12} HSL synthétique (figure 3.13 piste 1). Les signaux émis par les extraits de DH10B (pBBRmcs1-hdtS), DH10B (pBBRmcs4-lasI) et DH10B (pBBRmcs1) possèdent tous trois les mêmes caractéristiques, un spot se situant plus haut que celui correspondant à l'oxo C_{12} HSL synthétique (pistes 2, 3 et 4) (figure 3.13).

Si l'on suppose que la *N*-acyl HSL produite par HdtS est une C_{12} HSL, le signal émis doit en effet se situer plus haut que celui de l'oxo- C_{12} HSL synthétique.

LasI synthétisant une oxo- C_{12} HSL, la molécule détectée dans l'extrait de la souche DH10B (pBBRmcs4-lasI) devrait avoir le même profil que l'oxo- C_{12} HSL synthétique (figure 3.13 piste 3). De plus, le contrôle négatif (plasmide vide) ne devrait produire aucune molécule interagissant avec le senseur (figure 3.13 piste 2). Ces résultats portent à croire que les signaux observés pour les extraits DH10B (pBBRmcs1-hdtS), DH10B (pBBRmcs1) et DH10B (pBBRmcs4-lasI) sont des artéfacts.

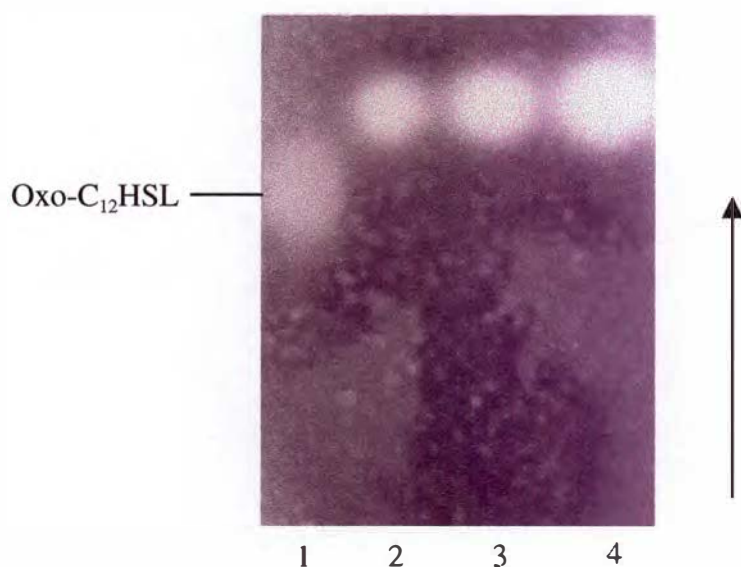


Figure 3.13: TLC ayant permis la séparation des constituants de différents surnageants. Les HSL sont détectées grâce au senseur CV026 en présence de C_6 HSL.

- 1- oxo- C_{12} HSL (1 μ l)
- 2- extrait de la souche DH10B (pBBRmcs1) (2 μ l)
- 3- extrait de la souche DH10B (pBBRmcs4-lasI) (2 μ l)
- 4- extrait de la souche DH10B (pBBRmcs1-hdtS)(2 μ l)

3.1.3. Discussion

3.1.3.1. Cotransformations, Cross-streaks et cocultures

Les cotransformations, les cross-streaks et les cocultures réalisées avec les souches senseurs de N-acyl HSL à chaînes longues, JM109 (pSB1142) et JM109 (pSB1075), n'ont pas permis de montrer que HdtS synthétise les HSL de *Brucella*. La lumière émise par les senseurs mis en présence de DH10B (pBBRmcs4-lasI) témoigne de la validité des conditions expérimentales. De plus, l'absence de lumière pour les contrôles négatifs indique que le signal provenant des senseurs associés à pBBRmcs4-lasI n'est pas dû à un élément du milieu de culture. Aucune conclusion ne peut être tirée des résultats obtenus avec le senseur JM109 (pSB401). Ce dernier reconnaissant préférentiellement les HSL à chaînes courtes ne donne pas d'informations valables quant à la production de N-acyl HSL par LasI ou éventuellement par HdtS.

3.1.3.2. TLC

L'analyse de surnageants de cultures a été réalisée afin de vérifier la production d'oxo- C_{12} HSL par LasI et de confirmer l'absence de C_{12} HSL dans les surnageants de la souche DH10B (pBBRmcs1-HdtS). Deux senseurs ont été utilisés :

1) pSB1142 a permis la détection de la 3-oxo C_{12} HSL synthétisée par LasI. Cela a pu être affirmé par comparaison des profils de migration de l'extrait de DH10B (pBBRmcs4-lasI) et de celui de la C_{12} HSL synthétique. Aucun signal n'est détecté par pSB1142 dans

l'extrait de DH10B (pBBRmcs1-hdtS) confirmant ainsi les résultats obtenus lors des expériences précédentes.

2) Lors de l'utilisation du senseur CV026, un même signal est détecté pour les extraits de DH10B (pBBRmcs1-hdtS), DH10B (pBBRmcs1) et DH10B (pBBRmcs4-lasI). Il pourrait s'agir d'un artefact puisque, contrairement à ce qui est observé dans le cas de la révélation des TLC par pSB1142, le signal observé pour l'extrait de DH10B (pBBRmcs4-lasI) n'a pas les caractéristiques attendues, il devrait en effet migrer à la même hauteur que l'oxo-C₁₂HSL synthétique. De plus, aucun signal ne devrait pas apparaître dans le cas du contrôle négatif. Ces données nous amènent à suggérer la présence d'une molécule, dans le milieu de culture dans lequel ont été réalisées les extractions, qui interagirait avec le régulateur transcriptionnel de CV026 et l'empêcherait d'être sensible à la C₆HSL.

Les extractions ont en effet été réalisées à partir de cultures bactériennes réalisées dans du milieu riche. Il a déjà été montré que ces milieux contiennent des inhibiteurs. En effet, à haute température, atteinte lors de leur stérilisation par exemple, des dipeptides cycliques (DKP) peuvent être formés. Chez *P. aeruginosa*. Ces DKP peuvent activer ou être antagonistes du système du quorum sensing (Holden, et al., 1999). Au laboratoire, Bernard Taminiau a montré qu'en présence d'extraits de 2YT et de peptone, des N-acyl HSL synthétiques ne sont plus capables d'activer les senseurs luminescents, confirmant ainsi la présence d'inhibiteurs (Taminiau, et al., 2002).

Cependant, malgré la présence d'un inhibiteur, CV026 devrait détecter l'oxo-C₁₂HSL produite par LasI puisque la TLC repose sur la séparation des molécules d'un extrait, elle sépare l'inhibiteur potentiel de la N-acyl HSL. Mais les deux senseurs, pSB1142 et CV026, n'ont pas la même sensibilité, la quantité de N-acyl HSL nécessaire à l'activation de pSB1142 pourrait être différente de celle requise pour l'activation de CV026. La détection des N-acyl HSL à chaînes longues par CV026 se base sur l'inhibition de la fixation de la C₆HSL ajoutée au milieu de culture au régulateur CviR. La proportion de C₆HSL par rapport à l'HSL à chaîne longue à détecter est donc un élément crucial. En effet, si la concentration en C₆HSL

est élevée par rapport à la concentration en HSL à chaîne longue, la compétition pour le site de fixation au régulateur transcriptionnel basculera en faveur de la C₆HSL empêchant toute détection de l'HSL à longue chaîne.

Suite aux résultats obtenus lors des différents tests effectués, deux hypothèses peuvent être émises quant à la production d'HSL par HdtS chez *Brucella*.

On peut tout d'abord conclure que HdtS n'est pas responsable de la synthèse des HSL de *Brucella*, hypothèse soutenue par les résultats négatifs des cross streak, des cocultures, des cotransformations et des TLC.

Cependant, on ne peut pas réfuter l'idée qu'HdtS soit la synthétase de *Brucella*, et que les tests réalisés n'aient pas pu détecter les N-acyl HSL produites. En effet, le fait qu'aucune production de N-acyl HSL ne soit jamais détectée dans la souche DH10B (pBBRmcs1-hdtS) pourrait être dû à une trop faible activité enzymatique de HdtS. Lors des TLC, la même quantité d'extrait provenant de DH10B (pBBRmcs4-lasI) et de DH10B (pBBRmcs1-hdtS) est chargée sur la plaque de silice, mais si l'activité enzymatique de lasI est différente de celle de HdtS, la concentration de N-acyl HSL dans les deux extraits sera différente, et peut-être insuffisante dans le cas de HdtS pour permettre la reconnaissance par l'un des deux senseurs. Cette hypothèse peut être appuyée par le fait que *Brucella* produit une très faible quantité d'HSL par rapport aux autres bactéries possédant un système de régulation dépendant de la densité cellulaire (Taminiau, et al., 2002).

De plus si l'on suppose la présence d'un inhibiteur dans les milieux riches, ce dernier pourrait être responsable des résultats négatifs des cotransformations, des cocultures et des cross-streak. Ces techniques ont en effet été réalisées avec des senseurs qui s'allument en présence d'HSL. Si un inhibiteur est présent, il se lierait au régulateur et empêcherait son activation et toute détection d'HSL. Le fait que LasI soit positif pourrait s'expliquer si l'on suppose que son activité enzymatique est élevée. La concentration d'oxo-C12HSL serait donc suffisante pour déplacer l'équilibre de la réaction d'inhibition.

3.2. Surexpression d'une synthétase chez *Brucella* et analyse du promoteur de *vjbR*

La réalisation de mutants est une technique fréquemment utilisée en biologie moléculaire, permettant d'étudier la fonction des gènes mutés. Etant donné qu'aucune synthétase de N-acyl HSL n'a été identifiée chez *Brucella*, il est impossible de construire un délétant qui faciliterait la compréhension du système de quorum sensing. La surexpression d'une synthétase d'HSL constitue dès lors une alternative intéressante pour l'étude des effets d'un système de régulation dépendant du quorum sensing.

Chez les bactéries Gram négatives présentant un système de régulation dépendant de la densité cellulaire, on observe une auto-régulation de la transcription des régulateurs. *VjbR* présentant des homologies avec un régulateur transcriptionnel du quorum sensing, nous avons étudié l'effet des HSL sur sa transcription. Pour cela, nous avons, d'une part, surexprimé la synthétase *lasI* de *P. aeruginosa* dans la souche de *B. melitensis* 16M pFTvjbR disponible au laboratoire.

D'autre part, plusieurs expériences ont été réalisées sur cette souche de *B. melitensis* 16M pFTvjbR. Cette souche a été obtenue suite à l'intégration du plasmide pFTvjbR dans le génome de *B. melitensis* 16M permettant de placer le gène *gfp* en aval du promoteur d'intérêt (*pvjbR*) (Rose May Delrue, thèse en cours) (figure 3.14). Le rapporteur utilisé dans cette partie du travail, la GFP, sera détecté par un anticorps monoclonal anti-GFP car on sait par expérience que la quantité de GFP synthétisée est trop faible pour la détecter en fluorescence.

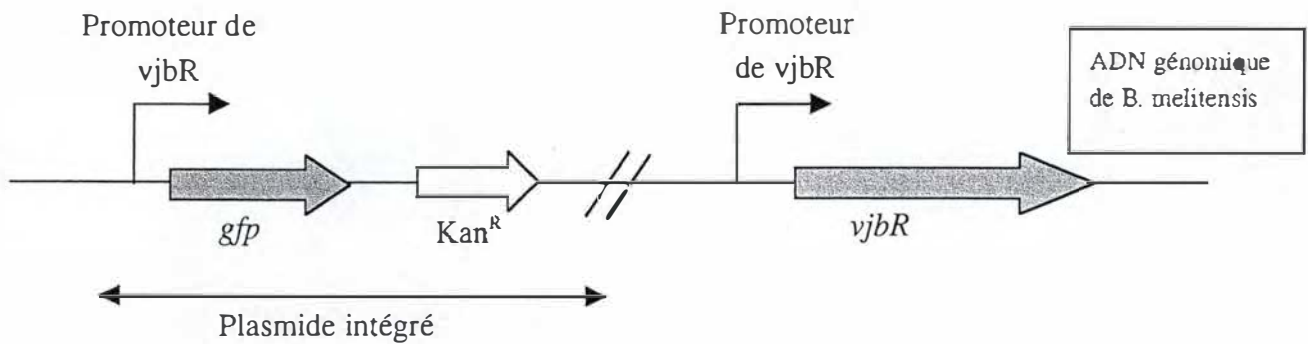


Figure 3.14 : Représentation schématique de la région chromosomique de *B. melitensis* 16M pFTvjbr ayant acquis le plasmide pFTvjbr par recombinaison homologue. Cette intégration permettant de positionner le gène rapporteur *gfp* en aval du promoteur de *vjbR*.

Une culture de *B. melitensis* 16M pFTvjbr a été mise en contact avec d'une part de l'oxo-C₁₂HSL synthétique et d'autre part avec de la C₁₂HSL synthétique. La même quantité d'acétonitrile, solvant dans lequel les HSL sont dissoutes, a été ajoutée à une troisième culture afin de disposer d'un contrôle négatif. Des extractions protéiques ont été réalisées dans chacune de ces trois cultures afin de pouvoir analyser la quantité de GFP présente par Western blot. La concentration protéique de chaque extrait est estimée par la méthode de dosage BCA pour que les données soient comparables. 2 µg de protéines issues de chaque souche de *Brucella* ont été séparées par un gel SDS-Page (Rose May Delrue, thèse en cours).

On observe un signal plus intense pour les extraits protéiques provenant de la culture contenant de l'acétonitrile par rapport à ceux contenant l'oxo-C₁₂HSL ou la C₁₂HSL. Les Western ont donc permis de montrer une répression de *vjbR* par la C₁₂HSL et par l'oxo-C₁₂HSL (figure 3.15).

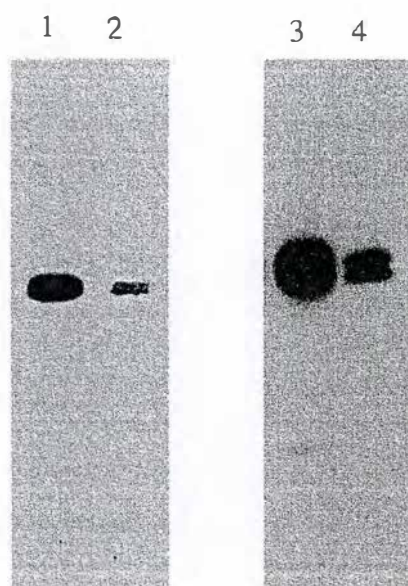


Figure 3.15. : résultat du western blot réalisé avec l'anticorps antiGFP sur extraits protéiques de la souche *B. melitensis* pFTVjbR

Piste 1 : sans ajout d'HSLs

Piste 2 : avec C_{12} HSL (3,5 μ M)

Piste 3 : sans ajout d'HSLs

Piste 4 : avec l'HSL oxo- C_{12} HSL(3,5 μ M)

Suite à ces données préliminaires, nous avons surexprimé chez *Brucella* la synthétase LasI de *P. aeruginosa* afin de confirmer l'implication des N-acyl HSL sur la transcription du gène *vjbR*.

LasI, qui catalyse la formation d'une oxo- C_{12} HSL proche de la C_{12} HSL de *Brucella*, a donc été introduit dans les souches de *B. melitensis* 16M pFTVjbR et *B. melitensis* 16M NaI^R, cette dernière servant de contrôle négatif. Nous avons utilisé la construction préalablement décrite où *lasI* est cloné dans le pBBRmcs4, plasmide répliquatif chez *Brucella*.

Pour introduire LasI dans les souches de *Brucella* d'intérêt, des souches d'*E. coli* S17 ont été transformées d'une part par le plasmide pBBRmcs4-lasI et d'autre part par le plasmide pBBRmcs4 sans insert pour disposer d'un contrôle négatif. Ces cellules transformées ont été ensuite cultivées sur un milieu sélectif contenant de l'ampicilline et de la streptomycine. *E.*

coli S17, ayant intégré le fragment RP4 dans son chromosome, a la capacité de former un pili conjugatif par lequel elle transfère du matériel génétique à une autre bactérie.

Les cellules d'*E. coli* S17 contenant pBBRmcs4 ou pBBRmcs4-lasI ont été mises en contact avec les 2 souches de *Brucella* (*B. melitensis* 16M pFTvjbR et *B. melitensis* 16M) afin d'y introduire les plasmides par conjugaison. Elles ont ensuite été cultivées pendant 3 jours, sur un milieu sélectif contenant la kanamycine et l'acide nalidixique pour sélectionner spécifiquement les souches de *Brucella*, ainsi que l'ampicilline permettant de ne sélectionner que les souches ayant acquis le plasmide.

La présence d'un plasmide dans les souches de *B. melitensis* d'intérêt a été vérifiée de deux manières différentes : (i) des minipréparations d'ADN plasmidique sur *Brucella* ont été restreintes par l'enzyme *Xmn*I. Les profils de restriction en électrophorèse ont ensuite été analysés et correspondent à ceux attendus pour pBBRmcs4 et pBBRmcs4-lasI (résultats non montrés) ; (ii) une culture liquide de chaque souche de *Brucella* a été mise en contact avec le senseur luminescent *E. coli* (pSB1142). Cela a permis de montrer l'émission de lumière plus intense dans les cellules contenant pBBRmcs4-lasI que dans celles qui contiennent pBBRmcs4 vide.

Afin d'évaluer l'activité des promoteurs d'intérêt, des extraits protéiques ont été réalisés pour quantifier la protéine GFP présente par Western blot.

Les protéines ont été extraites des 2 souches de *B. melitensis* ayant acquis le plasmide pBBRmcs4 ou pBBRmcs4-lasI à partir de cultures liquides en phase stationnaire. 5 µg de protéines issues de chaque souche de *Brucella* ont été séparées par un gel SDS-Page. La détection de la GFP en Western blot se fait grâce à un anticorps monoclonal anti-GFP.

Le résultat du Western blot nous indique un signal moins intense pour l'extrait protéique de la souche de *B. melitensis* 16M pFTvjbR portant le pBBRmcs4-lasI que pour celle contenant le plasmide pBBRmcs4 vide. La différence entre les deux signaux émis est cependant assez faible (figure 3.16). Aucun signal n'est détecté pour la souche de *B. melitensis* 16M Nal^R (contrôle négatif) puisqu'elle ne contient pas de GFP.

Résultats et discussion

La surexpression de LasI dans la souche de *B. melitensis* 16M a permis de confirmer les données établies concernant la répression de la transcription de *vjbR* par la C₁₂HSL et l'oxo-C₁₂HSL.



Figure 3.16 : résultat du western blot réalisé avec l'anticorps antiGFP sur les souches *B. melitensis* pFTVj**R** pBBRmcs4 et *B. melitensis* pFTVj**R** pBBRmcs4-lasI.

Piste 1 : extraits protéiques de la souche *B. melitensis* pFTVj**R** pBBRmcs4

Piste 2 : extraits protéiques de la souche *B. melitensis* pFTVj**R** pBBRmcs4-lasI

CONCLUSIONS ET
PERPESCTIVES

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La présence d'un système de quorum sensing chez *Brucella* a été suggérée suite à la découverte de deux phéromones de type N-acyl HSL ainsi que de deux régulateurs transcriptionnels de la famille de LuxR : BabR et VjbR. Cependant, malgré plusieurs stratégies mises en oeuvre, aucune synthétase homologue à LuxI ou à LuxM n'a encore été identifiée.

Durant ce travail, nous avons étudié le gène *hdtS* de *Brucella*, gène homologue à *hdtS* chez *P. fluorescens* dont le produit constitue une nouvelle famille de synthétases de N-acyl HSL [Laue, 2000 #5].

Le gène *hdtS* de *Brucella* a été cloné dans le vecteur pBBRmcs1 et exprimé dans la souche DH10B d'*E. coli* afin d'analyser la production de N-acyl HSL. La détection des N-acyl HSL produites a été réalisée grâce à divers biosenseurs (senseurs luminescents et CV026) qui permettent de couvrir la détection d'une large gamme d'HSL.

Les 4 tests effectués avec pBBRmcs1-hdtS : les cotransformations, les cocultures, les cross-streaks et les TLC réalisées avec le senseur pSB1142, concordent : ils n'ont pas permis de démontrer la synthèse d'HSL par HdtS de *Brucella*.

Les TLC réalisées avec le senseur CV026 ont fourni des résultats différents. D'une part, elles n'ont pas montré de signal correct pour le contrôle positif, c'est-à-dire une souche portant le gène *lasI* encodant la synthétase de l'oxo-C₁₂HSL. Elles ont, d'autre part, suggéré la présence d'un inhibiteur dans le milieu de culture LB (milieu riche).

D'une part, il est possible que les tests réalisés n'aient pas été suffisamment au point pour détecter la présence d'HSL produites par HdtS.

Lors des TLC, l'absence de signal dans les extraits de DH10B (pBBR.mcsI-hdtS) peut être due à une trop faible quantité de phéromones. De nouvelles extractions de N-acyl HSL à partir d'un volume de culture plus grand permettraient de concentrer davantage de phéromones, ce qui faciliterait leur détection.

Le système de détection des N-acyl HSL par CV026 se basant sur la compétition entre l'HSL à chaîne longue que l'on veut détecter et la C₆HSL ajoutée au milieu pour induire la production de violacéine, il pourrait être intéressant lors d'une nouvelle TLC, de diminuer les quantités de C₆HSL ajoutées au milieu de culture de CV026. En effet, la concentration en C₆HSL que nous avons utilisée est peut-être trop élevée pour détecter une éventuelle inhibition par les HSL à longue chaîne.

Afin de déterminer si une molécule qui inhiberait la détection des N-acyl-HSL par les senseurs est effectivement présente dans les milieux riches utilisés lors des différents tests, nous pourrions réaliser de nouvelles cotransformations, cocultures et cross-streak, en utilisant un milieu minimum au lieu du milieu riche. En effet dans un tel milieu il n'a pas été décrit que les éventuels composés inhibiteurs étaient présents. Des extractions d'HSL devraient également être effectuées à partir de cultures des souches d'intérêt dans du milieu minimum.

D'autre part, l'hypothèse selon laquelle les N-acyl HSL de *Brucella* seraient synthétisées par HdtS n'ayant pas été avérée, il pourrait être intéressant de réaliser un nouveau criblage. Auparavant, une banque génomique de *B. abortus* nommée pZERO II a été criblée avec les senseurs luminescents disponibles, pour identifier une synthétase. Cependant un criblage n'étant pas toujours saturant, il pourrait être intéressant de refaire un nouveau criblage.

Par ailleurs, nous pourrions imaginer un nouveau système de criblage en utilisant une banque de mutants transpositionnels qui serait transformée avec un plasmide portant le gène codant pour un régulateur sensible aux C₁₂HSL produites par *Brucella* et un promoteur régulable par ce régulateur placé en amont d'un gène rapporteur. Ce rapporteur devrait être

choisi de telle sorte qu'il cause la mort de la bactérie lorsqu'il est induit. Ainsi, toutes les bactéries possédant le gène codant pour la synthétase intact, mourront. Les seules bactéries vivantes seront celles qui, ayant intégré le transposon dans la synthétase, ne produisent plus de N-acyl HSL et n'activent pas le gène rapporteur.

Malgré la mise en œuvre de nombreuses stratégies utilisées classiquement pour identifier les synthétases, aucune n'a permis de découvrir celle de *Brucella*. On peut donc supposer que celle-ci n'appartient pas à une famille de synthétase connue, elle pourrait par exemple être multimérique.

L'étude de l'effet du quorum sensing sur la virulence de *Brucella* serait facilitée par la création d'un mutant de synthétase. Ce mutant pourrait être un délétant ou un mutant de surexpression. Cependant la synthétase de *Brucella* n'étant pas encore identifiée, nous avons proposé, lors de ce travail une alternative à la construction d'un mutant de synthétase. Pour cela, la synthétase LasI de *P. aeruginosa* catalysant la production d'une oxo-C₁₂HSL proche de la C₁₂HSL de *Brucella* a été introduite dans une souche de *B. melitensis* 16M NaI^R possédant le gène codant pour la GFP en aval du promoteur de *vjbR* (*B. melitensis* 16M pFTvjbR). Cette construction permet de visualiser l'effet d'HSL à longue chaîne sur le promoteur de *vjbR*. En effet, plusieurs expériences précédentes ont suggéré l'existence d'un lien entre le quorum sensing et la transcription de *vjbR*.

Deux méthodes différentes nous ont permis de vérifier la présence de *lasI* ainsi que sa fonctionnalité dans les souches d'intérêt de *B. melitensis* 16M NaI^R.

La répression de *vjbR* par les N-acyl HSL a ainsi été mise en évidence grâce à la quantification de la GFP par Western blot.

La construction pBBRmsc4-*lasI* a également été introduite dans deux autres souches de *B. melitensis* contenant le promoteur de l'opéron *virB* en amont de la GFP, l'une dans *B. melitensis* 16M NaI^R (cette souche est appelée *B. melitensis* 16M pFTvirB) et l'autre dans une souche de *B. melitensis* mutée dans *vjbR* (cette souche est appelée *B. melitensis* 16M

pFTvirB Δ vjbR) . Il serait donc intéressant de quantifier la GFP produite par ces deux souches, pour confirmer la répression de la transcription de *virB* par le quorum sensing ainsi que l'implication du régulateur VjbR dans ce système de régulation.

La construction pBBRmcs4-lasI dans la souche de *B. melitensis* 16M Nal^R pourra être utilisées ultérieurement lors d'infections dans différents modèles cellulaires (Macrophages ou cellules HeLa) ainsi qu'*in vivo* permettant de détecter une éventuelle influence des N-acyl HSL sur la virulence de *Brucella*.

MATERIEL ET METHODES

5. MATERIELS ET METHODES

5.1. Matériels

5.1.1. Solutions et milieux

5.1.1.1. Solutions d'antibiotiques et autres

Noms et abréviations	Solution de dissolution	Concentration stock	Concentration finale
Acide nalidixique (Nal)	NaOH 0,2N	25mg/ml	25µg/ml
Kanamycine (Kan)	H ₂ O	50mg/ml	50µg/ml
Ampicilline (Amp)	H ₂ O	50mg/ml	50µg/ml
Streptomycine (Sm)	H ₂ O	10mg/ml	10µg/ml
Chloremphénicol (Cm)	EtOH 100%	30mg/ml	10µg/ml
Tétracycline (Tet)	EtOH 70%	12,5mg /ml	12,5µg/ml
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)	H ₂ O	1M	1mM
5-bromo-4-chloro-3-indoyl-βD-galactopyranoside (X-gal)	diméthylformamide	2mg/ml	2µg/ml

5.1.1.2 Milieux de culture

5.1.1.1.1. Milieu riche pour E. coli : milieu LB : (Luria Bertani)

- Hydrolysate de caséine (peptone Gibco BRL) 1g/100ml
- NaCl 0,5g/100ml
- Yeast extract 0,5g/100ml

Le milieu est autoclavé (20 minutes à 120°C)

-Agar 1,5% si l'on désire du LB solide.

Le milieu est refroidi à 55°C puis additionné des antibiotiques ou autres additifs avant d'être coulé dans des boîtes de Petri.

5.1.1.1.2. Milieux riches pour *Brucella*

5.1.1.1.2.1. Le milieu 2YT

Ce milieu a la même composition de base que le LB mais la concentration en Yeast extract est 2 fois plus élevée.

- NaCl 0,5g/100ml
- Yeast Extract 1g/100ml
- Hydrolysate de caséine (peptone Gibco BRL) 1g/100ml
- Agar 2g/100ml si l'on désire du 2YT solide

Le milieu est autoclavé 20 minutes à 120°C

5.1.1.1.2.2. Le milieu TSAYE

- Tryptic soy agar 40g/l
- Yeast extract 0,1g/100ml

Le milieu est autoclavé (20 minutes à 120°C)

5.1.2. Souches bactériennes et plasmides

5.1.2.1 Souches bactériennes

5.1.2.1.1 *E.coli* DH10B

Cette souche est utilisée pour la transformation par divers plasmides ou produits de ligation, dans les différentes étapes de clonage.

Son génotype est le suivant : F⁻, mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), φ80dlacZΔlacX74, endA1, recA1, deoR Δ(ara, leu)7697, araD139, galU, galK, nupG, rpsL λ.

5.1.2.1.2 *E.coli* S17

La souche d'*E.coli* S17 est résistante à la streptomycine (Sm^R), septinomycine (Sp^R) et la triméthoprim (Tp^R). Cette souche d'*E.coli* possède notamment les caractéristiques d'intérêt suivantes :

RP4⁺ : l'intégration du plasmide RP4 dans le chromosome bactérien permet le transfert conjugatif d'un plasmide mobilisable (contenant une origine de transfert) de la bactérie S17 vers une bactérie receveuse.

λ pir: la bactérie produit la protéine π qui permet la réplication de tout plasmide possédant l'origine de réplication ori R6K.

Génotype : *recA, thi pro hsdR M^r RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7* lysogenised with λ pir phage

5.1.2.1.3 E.coli JM109

Cette souche est utilisée pour la transformation des divers plasmides senseurs. Son génotype est le suivant : F' *traD36, proAB, lacI^q, lacZ Δ M15, recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, Δ (lac-proAB), mcrA*.

5.1.2.1.4 Chromobactérium violaceum CV026

Chromobactérium violaceum est une bactérie Gram négative produisant un pigment violet, la violacéine. La souche CV026 est un mutant Mini-Tn5, muté dans la synthétase *cviI* provenant de *C. violaceum* ATCC31532. CV026 est utilisée comme senseur puisqu'elle permet de détecter la production d'N-acyl HSL. Elle pousse à 30°C.

Génotype : Hg^r, *cviI* : :Tn5*xylE*, Km^r, spontaneous Sm^r (McClean, et al., 1997).

5.1.2.1.5 Brucella sp

La souche de *B. melitensis* 16M Nal^R est représentative de l'espèce *B. melitensis*. *B. melitensis* 16M est une souche de phénotype lisse, l'agglutination se produit avec un anti-sérum M.

Cette souche est résistante à l'acide nalidixique (Nal^R). Elle a été reçue de A. MacMillan et a été isolée sur le terrain en 1955.

5.1.2.2 Plasmides

P Gem-T Easy (Promega)

Ce plasmide, commercialisé par Promega est adapté pour le clonage de produits PCR. Il dérive du pGem-5Zf(+) linéarisé en *EcoRV* au niveau du gène *lacZ α* , ce qui permet de détecter les plasmides recombinants grâce à un test blanc/bleu. Une ou plusieurs thymidines ont été ajoutées aux extrémités 3', empêchant le plasmide de se refermer sur lui-même et permettant de liguer un fragment PCR avec une grande efficacité. En effet, l'enzyme ADN polymérase Biotools ajoute une base A aux extrémités 3' des fragments PCR les rendant compatibles avec les extrémités du vecteur pGEM-T Easy. Le pGemT est un plasmide à taux élevé de réplication qui porte le gène *bla*, codant pour la résistance à l'ampicilline (figure 5.1)

pBBRmcs4

Ce plasmide de 4950 pb, possède le gène *bla* et une région appelée oriT correspondant au gène requis pour le transfert du plasmide. Il contient également l'origine de réplication REP, qui est compatible avec la machinerie de réplication de *Brucella*. Il peut également se trouver en présence de plasmides contenant d'autres origines de réplication comme ColE1 et p15A. Un site multiple de clonage (mcs) est inclus dans le gène *lacZ*, ce qui permet de screener rapidement les plasmides recombinants via un test blanc/bleu. Ce plasmide a un faible taux de réplication (10 à 15 copies par cellules) (Kovach, et al., 1994) (figure5.1).

pBBRmcs1

Ce plasmide de 4707 pb possède les mêmes caractéristiques que le pBBRmcs4. Le gène *bla* a été remplacé par le gène de résistance au chloramphénicol (*cat*) (Kovach, et al., 1994) (figure5.1).

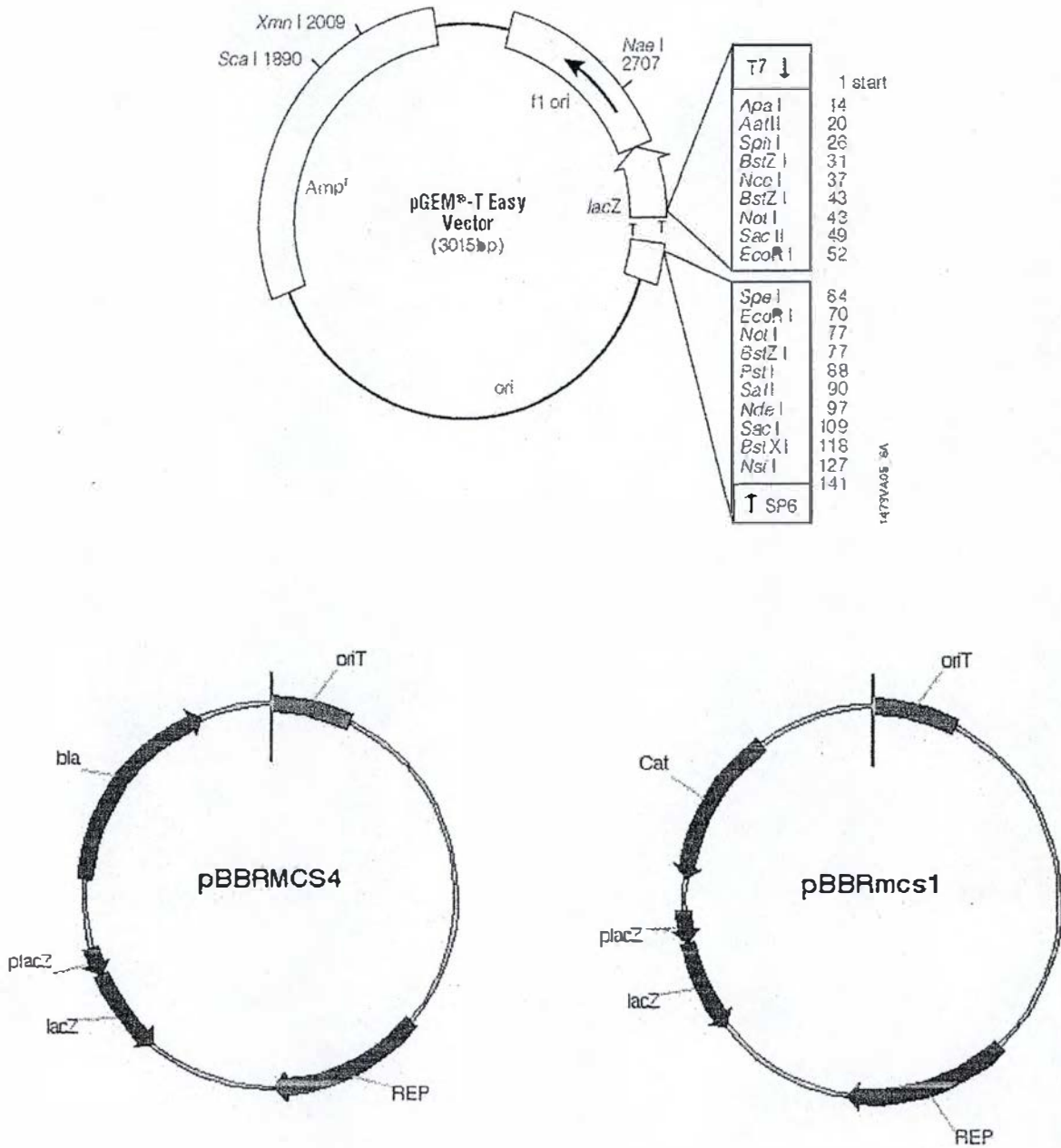


Figure 5.1 : Représentation des plasmides pGemT, pBBRmcs4 et pBBRmcs1

pSB401

pSB401 est un plasmide de 10500 pb qui permet la détection de N-acylHSL à courtes chaînes. Il contient en effet le gène *luxR*, le promoteur *luxI* (de *V. fischeri*) ainsi que les gènes rapporteurs *luxCDABE* (de *Photobacterium luminescens*). pSB401 dérive du pACYC184, et porte donc l'origine de répllication p15A ainsi que le gène de résistance à la tétracycline. C'est un plasmide à faible taux de répllication (18 à 20 de copies) (figure 5.2) (Winson, et al., 1998)

pSB1075

Ce plasmide de 10300 pb permet de détecter la présence de N-acyl HSL à longues chaînes car il porte les gènes *lasR*, le promoteur de *lasI* (de *P.aeruginosa*) ainsi que les gènes rapporteurs *luxCDABE* (de *P.luminescens*). pSB1075 dérive du pUC18, un plasmide à grand nombre de copies (500 à 700 copies par cellules) contenant le gène *bla* (figure 5.2) (Winson, et al., 1998).

pSB1142

Comme pSB1075, pSB1142 possède gènes *lasR*, le promoteur de *lasI* (de *P.aeruginosa*) ainsi que les gènes rapporteurs *luxCDABE* (de *P.luminescens*) et détecte donc la présence de N-acyl HSL à longue chaîne de carbone. Mais il dérive du pACYC 184, il a donc un faible taux de répllication et possède le gène encodant la résistance à la tétracycline (figure 5.2).

pBL59

Ce plasmide dérive du pBluescript II SK(+), il contient le fragment de 2,4 kb du génome de *P. fluorescens* F113 contenant le gène *hdtS*. Ce plasmide nous a aimablement été fourni par le laboratoire de Paul Williams à Nottingham (Laue, et al., 2000).

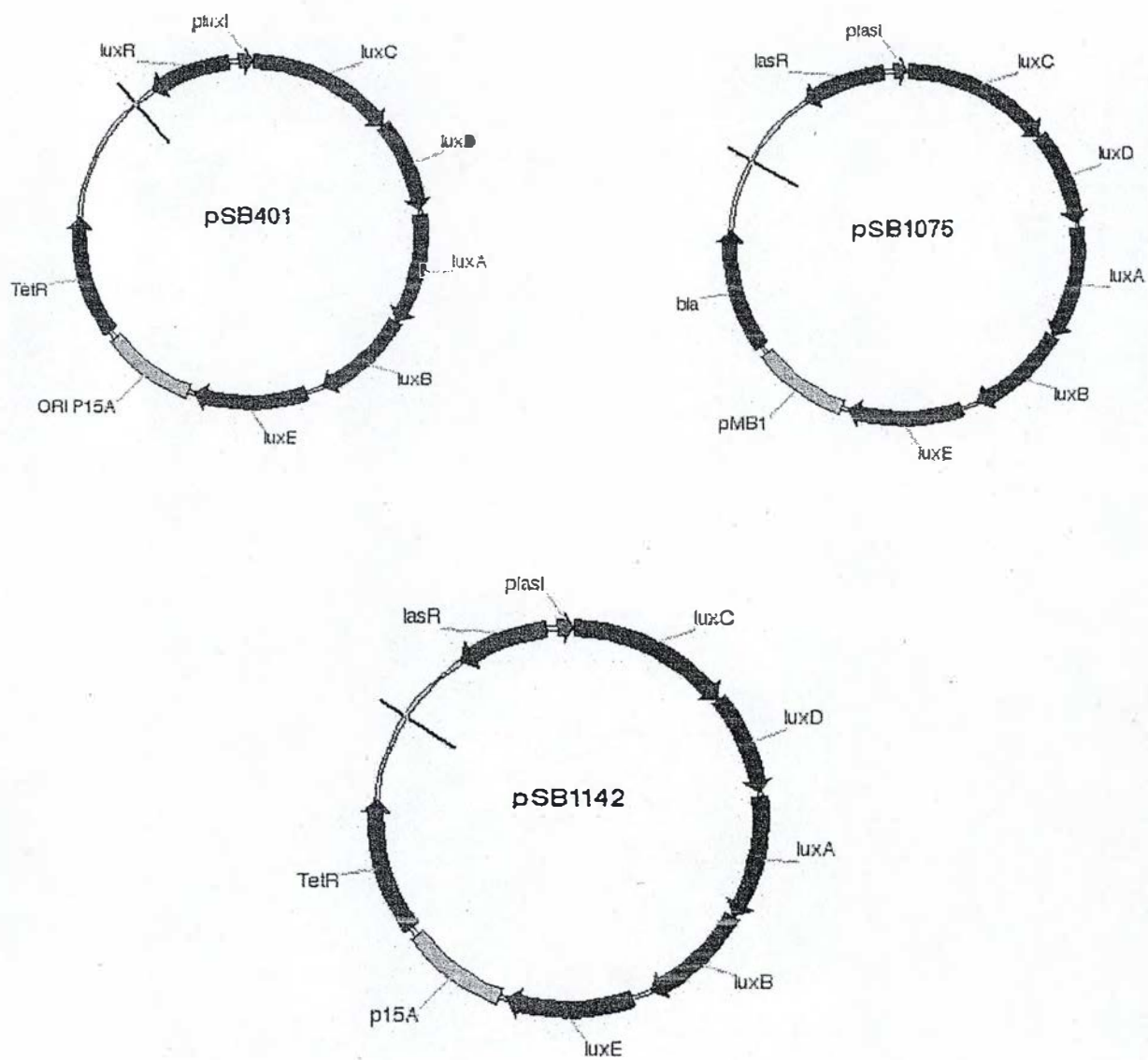


Figure 5.2 : représentation des plasmides senseur luminescents pSB401, pSB1075, pSB1142

5.2. Méthodes

5.2.1 Techniques relatives à l'ADN

5.2.1.1 Préparation de cellules CaCl₂ compétentes

Les cellules DH10B sont rendues compétentes par un traitement avec une solution de CaCl₂ 60 mM + glycérol 15% froid afin de rendre la membrane plasmique perméable à l'ADN.

- Lancer une préculture:ensemencer 20 ml de LB avec une colonie de cellules DH10B et laisser incuber une nuit à 37°C sous agitation.
- Le matin, inoculer 400 ml de LB avec 20 ml de la préculture et incuber à 37°C sous agitation jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 0,3 à 0,4.
- Laisser la culture 10 minutes sur glace.
- Centrifuger 10 minutes à 3000 rpm afin de culoter les cellules. Eliminer le surnageant.
- Resuspendre les bactéries culotées dans 80 ml final de CaCl₂ 60 mM + glycérol 15% stérile et froid.
- Centrifuger pendant 5 minutes à 2500 rpm. Eliminer le surnageant.
- Resuspendre les cellules dans 80 ml final de CaCl₂ 60 mM + glycérol 15% froid.
- Laisser 30 minutes sur glace.
- Centrifuger pendant 5 minutes à 2500 rpm.
- Resuspendre dans 16 ml final de CaCl₂+glycérol 15%.
- Aliquoter en 0,2 ml et 0,4 ml et stocker à -80°C.

5.2.1.2 Transformations de bactéries CaCl₂ compétentes

Le but de l'opération est de faire pénétrer un plasmide à l'intérieur d'une bactérie dont la membrane a été rendue perméable à l'ADN par le traitement au CaCl₂ + glycérol 15%. La souche utilisée pour cette manipulation est *E. coli* DH10B.

- Ajouter 1 à 10 µl de la solution contenant le plasmide (mélange de ligation, ADN préparé, etc.) à 100 µl de cellules compétentes de la souche désirée.
- Laisser sur glace pendant environ 30 minutes.
- Réaliser un choc thermique : incuber les cellules à 42°C pendant 2 minutes.
- Ajouter 0.5 ml de milieu LB.
- Incuber au moins 20 minutes à 37°C.
- Etaler de 50 à 100 µl de cellules sur LB Agar contenant le milieu de sélection adéquat.

Témoins de transformation :

- Transformer des bactéries avec un vecteur non restreint afin de vérifier la compétence des cellules.
- Cellules compétentes subissant les conditions de transformation sans ADN, étalées sur un milieu riche non sélectif comme contrôle de viabilité des cellules compétentes.

5.2.1.3 Test blanc/ bleu

Ce test permet de détecter facilement les bactéries DH10B portant un plasmide recombinant. En effet, les éléments génétiques portés par la souche DH10B (_80dlacZ_lacX74) ne lui permettent pas d'avoir une activité β -galactosidase normale. Il peut néanmoins y avoir une complémentation intragénique avec un plasmide apportant *LacI* (fragment non opérationnel du gène de régulation de l'opéron lactose) et un fragment du gène *lacZ* (partie N-terminale de la β -galactosidase). Lorsque cette complémentation est effectuée, la bactérie possède une β -galactosidase fonctionnelle. Celle-ci est mise en évidence par son action sur le X-gal (20 mg/ml dilué 1000 fois dans le milieu) substrat chromogène qui donne un composé bleu lorsqu'il est clivé. Quand le test est blanc, il met en évidence les bactéries ayant acquis un plasmide qui contient un insert au niveau du *mcS*, car celui-ci disrupte le gène *lacZ'*, la β -galactosidase n'est donc plus fonctionnelle. Quand le test est bleu, la β -galactosidase est fonctionnelle, le gène *lacZ'* n'est pas disrupté. L'IPTG, dans le milieu de culture, permettra l'expression de *lacZ* car il inhibe *lacI*.(figure 5.3).

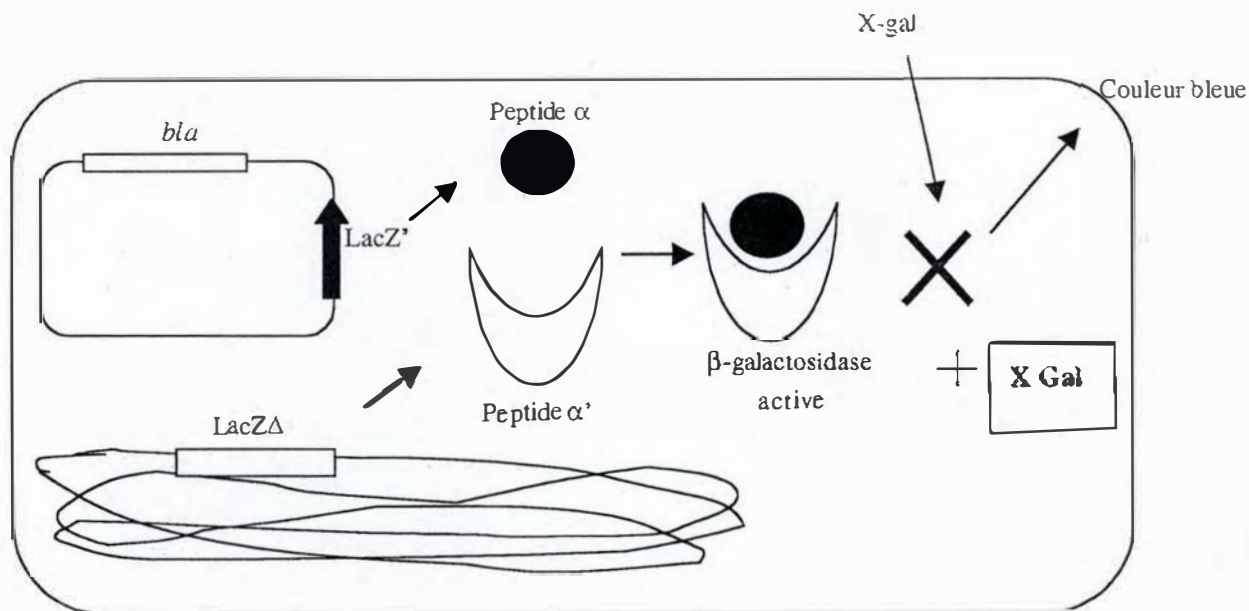


Figure 5.3 : Mécanisme utilisé dans le test Blanc/Bleu : complémentation de *lacZ Δ*

5.2.1.4 Extraction d'ADN plasmidique

Ces techniques permettent d'isoler et de purifier les plasmides produits par des bactéries. La préparation d'ADN plasmidique comprend 5 étapes : la lyse alcaline des bactéries, l'élimination des protéines et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique, le lavage de l'ADN et enfin sa resuspension.

Les tampons utilisés pour les préparations d'ADN chez *E. coli*

S1 Tampon de resuspension : 50 mM Tris-Hcl, 10 mM EDTA, RNase A 100 μ g /ml, pH8,0. Se conserve à 4°C.

S2 tampon de lyse : 200 mM NaOH, 1% SDS . Se conserve à t° ambiante.

S3 stoppe la lyse : 2,8M Kac, pH5,2. S3 se conserve à 4°C.

N2 tampon d'équilibration : 100 mM Tris, 15% éthanol, 900 mM KCl ajusté avec H3PO4 pH6,3.

N3 tampon de lavage : 100 mM Tris, 15% éthanol, 1150 mM KCl ajusté avec H3PO4 à pH6,3.

N5 tampon d'éluion : 150 mM Tris, 15% éthanol, 1000 mM KCl ajusté avec H3PO4 à pH8,5.

5.2.1.4.1 Préparation d'ADN en petite quantité (minipréparation d'ADN plasmidique)

Chez *E.coli*

- Ensemencer 5 ml de milieu LB liquide (+ antibiotiques) avec une colonie isolée.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation.
- Centrifuger 1,5 ml de la culture liquide dans un eppendorf à une vitesse de 14000 rpm pendant 10 minutes. Ensuite éliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot cellulaire dans 300 µl de S1.
- Ajouter 300 µl de S2 pour lyser les bactéries. Mélanger doucement par retournements, incuber 5 minutes maximum à température ambiante.
- Ajouter 300 µl de S3 et mélanger doucement par retournements, incuber 10 minutes sur glace.
- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 14000 rpm et récupérer ensuite le surnageant.
- Précipiter l'ADN en ajoutant 0,7 volume d'isopropanol. Vortexer
- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 14000 rpm. Eliminer le surnageant.
- Ajouter 1ml d'éthanol 70% froid pour le lavage
- Centrifuger 10 minutes à 14000 rpm. Eliminer prudemment le surnageant
- Sécher le culot.
- Resuspendre dans 20µl d'H₂O distillée stérile.
- Stocker à -20°C.

Chez *Brucella*

Les tampons utilisés lors de l'extraction d'ADN plasmidique chez *Brucella* sont différents de ceux utilisés chez *E. coli* car les structures membranaires de ces deux bactéries sont différentes.

Méthode

- Ensemencer 5ml de milieu liquide (2YT + antibiotiques) avec une colonie isolée.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation.
- Centrifuger 1,5 ml de la culture dans un eppendorf (pendant 5 minutes à 13000 rpm) et éliminer le surnageant.
- Ajouter 0,2 ml de tampon A et resuspendre le culot.
- Ajouter 0,4 ml de tampon de lyse. Fermer et mélanger lentement en retournant 15 à 20 fois.
- Laisser reposer 10 minutes à la température ambiante.
- Neutraliser avec 0,3 ml de tampon B. Agiter lentement 15 à 20 fois. Il se produit une floculation.

- Maintenir le tube dans la glace pendant 10 minutes.
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 10 minutes.
- Récupérer le surnageant.
- Ajouter un volume égal de phénol/chloroforme. Inverser le tube 15 à 20 fois.
- Centrifuger à 5000 rpm pendant 5 minutes à 4°C.
- Prélever la phase aqueuse supérieure et transvaser dans un nouveau tube.
- Précipiter avec 1 ml d'éthanol froid (-20°C) 100%, retourner 15 à 20 fois et laisser à -80°C pendant 10 minutes.
- Centrifuger à 13500 rpm pendant 10 minutes à 4°C.
- On obtient un petit culot blanchâtre (précipité). Eliminer le surnageant.
- Ajouter 50 µl d'eau et resuspendre le culot.

Solutions :

Tampon A :(solution stock 10X)

- 400mM Tris hydroxyméthyle aminométhane (Tris base) (biorad).
- 20mM disodique (merck).
- ajuster à pH 8 avec de l'acide acétique.

Solution de lyse (solution stock 4%) : -100 mM de Tris base

- 4 % de SDS
- dissoudre à chaud avec l'agitateur

Pour usage ajouter un égal volume de NaOH 0,4N (1,6/100 ml)

Tampon B : 3 M sodium acétate, pH 5,5

Tampon C : - 10 mM de Tris base

- 2 mM d'EDTA disodique
- ajuster à pH 8 avec de l'acide acétique

5.2.1.4.2 Préparation d'ADN plasmidique en moyenne quantité

(midipréparation d'ADN plasmidique)

Cette technique utilise le kit Nucleobond Qiagen et inclut une chromatographie sur colonne Nucleobond AX 100 échangeuse d'anions qui permet de préparer une quantité importante d'ADN plasmidique en éliminant les protéines, l'ARN et l'ADN génomique.

- Ensemencer 100 ml de milieu LB liquide (+ antibiotiques) dans un erlen de 500 ml avec une colonie isolée.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation.
- Centrifuger la culture pendant 15 minutes à 3000 rpm. Eliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 4 ml de S1.
- Ajouter 4 ml de S2 et mélanger doucement par retournements.
- Laisser incuber 5 minutes maximum à température ambiante.
- Ajouter 4 ml de S3, mélanger par retournements, laisser 10 minutes sur glace. Il se produit une floculation.
- Filtrer le lysat à l'aide d'un filtre humidifié pour éliminer les déchets cellulaires.
- Equilibrer une colonne NUCLEABOND AX100 avec 4 ml de N2.
- Déposer le lysat filtré sur la colonne équilibrée, l'ADN s'accroche à la résine.
- Laver la colonne 2 fois avec 5 ml de N3.
- Eluer l'ADN avec 5 ml de N5. L'éluat est récupéré dans un corex de 15 ml.
- Ajouter 0,7 volume d'isopropanol tout en mélangeant pour précipiter l'ADN.
- Centrifuger à 13000 rpm à 4°C pendant 20 minutes.
- Ajouter 4ml d'éthanol 70% froid.
- Centrifuger 10 minutes à 13000 rpm.
- Eliminer l'éthanol et sécher le culot.
- Resuspendre l'ADN dans 100 µl d'eau distillée stérile.

5.2.1.5 restriction d'ADN plasmidique purifié

Les enzymes de restriction sont des endonucléases qui permettent de cliver l'ADN double-brin de manière spécifique: elles reconnaissent des sites de restrictions, constitués par une séquence souvent palindromique, de 4 à 6 paires de bases. La coupure peut être décalée d'un brin par rapport à l'autre, formant ainsi des "bouts protrudants". Dans le cas où cette coupure n'est pas décalée, la restriction génère des bouts francs. La ligation d'un tel bout protrudant n'est possible qu'avec un bout protrudant complémentaire.

Les enzymes de restriction et leurs tampons sont fournis par Roche Molecular Biochemical et Biolabs.

Restriction diagnostique :

La restriction diagnostique permet d'identifier des plasmides selon les sites de restrictions qu'ils possèdent ou pas et de quantifier l'ADN. L'ADN restreint est séparé selon la taille des fragments par une électrophorèse en gel d'agarose.

- Mélanger dans un eppendorf:
 - 1 à 2 µl d'ADN plasmidique purifié
 - 2 µl de tampon de restriction 10X

-1 µl d'enzyme de restriction. Entre 2 et 10 unités d'enzyme par µg d'ADN (1 unité correspondant à la quantité d'enzyme nécessaire pour restreindre complètement 1 µg d'ADN du phage λ en 1 heure à 37°C dans un volume de 25 µl)

- Porter le volume à 20µl avec de l'H₂O distillée stérile.

- Incubation d'une heure et trente minutes à 37°C. La température peut cependant varier en fonction de l'enzyme utilisée.

- Ajouter 3 µl de Bleu alourdisseur d'électrophorèse et déposer sur gel d'agarose.

Restriction préparative :

La restriction préparative permet de restreindre des plasmides ou fragments d'ADN en vue de constructions futures. Préalablement à la restriction, il faut calculer :

- La quantité nécessaire d'ADN à restreindre pour la ligation. La ligation nécessite un minimum de 200 ng du plus gros fragment.

- La quantité d'enzyme nécessaire pour une restriction optimale. La quantité d'unité(s) enzymatique(s) nécessaire(s) (Q) est donnée par la formule :

$$Q = (48.5)(qp)(np)/(tp)(n\lambda)$$

qp : la quantité de plasmide en µg,

tp : la taille du plasmide en kpb,

np : le nombre de site(s) de restriction dans le plasmide.

nλ : le nombre de sites de restriction pour la même enzyme dans le phage λ.

-Le temps d'incubation à la température *ad hoc* est de deux heures.

5.2.1.6 Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose à utiliser sera donc inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer. La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Les fragments sont visualisés grâce au bromure d'éthidium. Le bromure d'éthidium se lie à l'ADN bicaténaire en s'intercalant entre les bases de la double hélice. Etant fluorescente, la molécule marque l'ADN et celui-ci est ainsi visible sous les UV. La fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à sa taille mais également à la quantité d'ADN présente. Ainsi en connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de taille, nous pouvons estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison à l'intensité de la fluorescence.

Méthode :

- Préparer le volume de gel souhaité : dissoudre 0,8 à 2% d'agarose dans du tampon TAE 1X. Porter à ébullition jusqu'à ce que la solution soit limpide.
- Quand la solution est tiède, couler le gel sur le support *ad hoc* muni d'un peigne permettant de faire les puits de chargement et ajouter 2 µl de bromure d'éthidium (2mg/ml) avant la polymérisation du gel.
- Après solidification de l'agarose, immerger le gel dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon TAE 1X.
- Déposer les échantillons dans les puits : environ 10 µl d'ADN par puits additionné de bleu alourdisseur.
- Migration : l'ADN chargé négativement migre de la borne négative vers la borne positive. La différence de potentiel appliquée est d'environ 100 V.
- Visualiser l'ADN du gel sous UV.

Solutions :

Bleu d'électrophorèse

- | | |
|----------------------|-------|
| -bleu de bromophénol | 0,1% |
| -glycérol | 50% |
| -EDTA | 100mM |
| -SDS | 1% |

Tampon d'électrophorèse TAE (50X concentré)

- | | |
|--------------------------|-------------------------------------|
| -Tris | 2M |
| - EDTA | 100ml d'une solution de 0,5M, pH 8. |
| - acide acétique glacial | 0,95M |
- Porter le volume à un litre avec de l'eau distillée

Marqueurs de tailles pour gel d'agarose DNA

Hyperladder (Bioline) (figure 5.4)

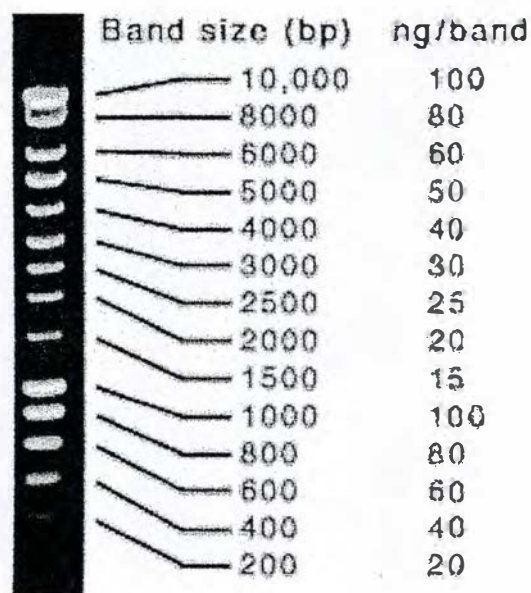


Figure 5.4: Marqueur de taille pour gel d'agarose DNA Hyperladder (bioline)

5.2.1.7 Exctraction d'ADN d'un gel d'agarose

Cette technique permet de récupérer un fragment d'ADN d'un gel d'agarose isolé au cours de l'électrophorèse, principalement afin d'utiliser ce fragment dans des constructions futures. On utilise le Kit MBI Fermentas. Cette méthode repose sur l'utilisation de billes de silices auxquelles l'ADN adhère spécifiquement, les sels et les impuretés peuvent ainsi être éliminés.

- Exciser le fragment d'intérêt du gel à l'aide d'un scalpel ; peser le morceau d'agar
- Ajouter 3 volumes de *Binding solution* pour un volume de gel.
- Incuber 10 minutes à 55°C pour dissoudre l'agarose.
- Passer la solution de silice du kit au vortex pour bien resuspendre les billes de silice.
- Ajouter 2 µl de cette solution de silice par µg d'ADN; passer au vortex.
- Incuber 10 minutes à 55°C.
- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm.
- Retirer le surnageant.
- Ajouter au culot 500 µl de solution de lavage du kit; resuspendre au vortex
- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm.

- Répéter 3 fois l'opération.
- Resuspendre le culot dans 20 µl d'eau stérile.
- Incuber à 55°C pendant 10 minutes.
- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm.
- Récupérer le surnageant.
- Conserver à - 20°C.
-

5.2.1.8 Purification d'ADN

L'ADN doit être purifié avant d'être utilisé dans diverses réactions, telles que la ligation ou le séquençage. En effet la solution dans laquelle se trouve l'ADN peut contenir différents sels, provenant des tampons des enzymes de restriction, qui perturberaient le fonctionnement des réactions ultérieures.

Le kit MBI Fermentas, utilisé pour purifier l'ADN à partir d'un gène d'agarose peut également servir à la purification d'une solution d'ADN. Le protocole est le même. Nous avons également utilisé le kit Micro Bio-Spin Chromatography Columns de Bio-Rad qui fournit des colonnes de polyacrylamide auxquelles s'attachent spécifiquement l'ADN ou les protéines, permettant d'éliminer les sels.

5.2.1.9 Réaction de ligation

Pour lier de manière covalente des fragments d'ADN, on utilise l'enzyme ADN ligase du phage T4. Elle catalyse la formation de liens phosphodiesters entre l'hydroxyle 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' d'une extrémité proche. Pour être active l'enzyme nécessite la présence d'ATP et d'ions Mg⁺⁺.

Méthode :

- Dans un eppendorf, placer un mélange de deux fragments à liguer dans les proportions suivantes :

$$\frac{\text{ng vecteur} \times \text{taille insert} \times 3}{\text{Taille vecteur (kb)}} = \text{ng insert}$$

- Ajouter 1 µl de DNA ligase T4
- Ajouter 1/10 du volume total de tampon de ligation 10X
- Compléter avec de l'eau distillée stérile
- Incuber à 14-16°C pendant 10 à 14 heures si les extrémités sont protrudantes, ou quelques heures à 25°C si les extrémités sont à bouts francs

Témoins à utiliser :

- Un vecteur restreint dont le mélange de ligation ne contient pas de ligase : les molécules de ce vecteur restent linéaires et sont incapables de transformer efficacement des *E. coli* compétentes. Les colonies apparues sur milieu sélectif après transformation s'expliquent par la présence de vecteurs non restreints. Ce témoin permet d'évaluer la proportion des transformants dus aux vecteurs non restreints.
- Un vecteur restreint dont le mélange de ligation contient la ligase mais pas l'insert permet de vérifier l'efficacité de la ligase.

5.1.2.10 Polymerase chain reaction (PCR)

Introduction :

La PCR (Polymerase Chain Reaction) permet l'amplification de fragments d'ADN. Des amorces nucléotidiques d'environ 20 bases, complémentaires de la séquence se trouvant de chaque côté de la région-cible, s'hybrident chacune à un des deux brins. La longueur de la séquence cible est déterminée par la distance entre les deux amorces. Une ADN polymérase thermostable est utilisée pour synthétiser à partir de l'extrémité 3'-OH de chaque amorce un brin d'ADN.

Un cycle PCR consiste en 3 étapes:

- la dénaturation, à 95°C, permet de séparer les deux brins.
- l'hybridation des amorces s'effectue à une température dépendante de la température de melting des amorces utilisées, c'est-à-dire entre 50 et 72°C.
- l'élongation, à 72 °C, permet la polymérisation des brins.

En répétant ce cycle une trentaine de fois, on augmente de façon exponentielle le nombre de copies de la région cible.

La température d'hybridation utilisée est inférieure à la température de melting T_m des amorces. Celui-ci se calcule de la façon suivante : $T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$. Les amorces devront contenir environ le même pourcentage de bases G-C que l'ADN cible. Il est également recommandé, de façon à limiter les amplifications non spécifiques, que l'amorce contienne un excès de G-C à l'extrémité et au centre et que les deux/trois dernières bases de l'extrémité 3' soient A/T. Les ponts hydrogènes formés par ces bases étant au nombre de deux, la liaison est moins forte et permet une initiation de l'hybridation par l'enzyme plus accessible.

Les amorces utilisées pour les amplifications PCR lors de ce travail sont décrites dans le tableau 5.1.

Tableau 5.1

Noms des amorces	Séquences	Région amplifiée
HdtS-amont xhoI	ccgctcgagcaatacagatgcttctttatct	Amplifie l'ORF <i>hdtS</i> avec l'amorce HdtS-aval pstI
HdtS-aval pstI	ggaaactgcagcaaggatcacacgccca	Amplifie l'ORF <i>hdtS</i> avec l'amorce HdtS-amont xhoI
LasI-amont	gggatatcatgatcgtacaaattggtcgg	Amplifie l'ORF <i>lasI</i> de <i>P.aeruginosa</i> avec l'amorce LasI-aval
LasI-aval	gggatattctcatgaaaccgccagtgcg	Amplifie l'ORF <i>lasI</i> de <i>P.aeruginosa</i> avec l'amorce LasI-amont
PGemT-aval	ggaaacagcctatgaccatg	Cette amorce universelle s'hybride au niveau de la partie amont du gène <i>lacZ</i>
PGemT-amont	gttttcccagtcacgacg	Cette amorce universelle s'hybride au niveau de la partie aval du gène <i>lacZ</i>
M13 Reverse (M13R)	ggaaacagcctatgaccatg	Cette amorce universelle s'hybride au niveau de la partie amont du gène <i>lacZ</i>

Méthode :

Le mélange de réaction est réalisé dans un eppendorf pour PCR:

- 5 µl de primer 1 (10 µM).
- 5 µl de primer 2 (10 µM).
- 2 µl de dNTP à 5 mM chacun.
- de l'eau pure pour porter le volume final à 50 µl.
- 5 µl de tampon d'ADN polymérase (Taq ou Pfx) concentrée 10X.
- environ 250 ng d'ADN portant la région à amplifier appelée ADN « template ».
- 0,5 µl de Taq polymérase (*Thermophilus aquaticus*) (Biotools)
- Pfx (*Pyrococcus*) (Invitrogen)
- Pour vérifier l'amplification du fragment cible, déposer 1/10 de la réaction PCR sur gel d'agarose.
- Conserver le produit à -20°C.

Témoin négatif

La PCR est réalisée sans ADN à amplifier, cela permet de vérifier que les composés nécessaires à la réaction ne sont pas contaminés par de l'ADN étranger.

PCR sur colonies :

Dans cette méthode, l'ADN n'est pas récupéré des clones bactériens. Une partie de la colonie est additionnée au mélange PCR et c'est lors de la première dénaturation à 95°C que les cellules sont lysées et libèrent leur ADN.

Purification des produits PCR :

Les produits PCR doivent être purifiés afin d'éliminer tous les constituants des tampons qui inhiberaient les réactions ultérieures. Nous avons utilisé le kit MBI fermentas ainsi que le kit Gene Clean Turbo for PCR Cartridges de Bio101.

5.1.2.11 Séquençage

Pour séquencer les fragments d'ADN, nous avons utilisé le kit ABI PRISM dye terminator de Perkin Elmer. La réaction de séquençage est basée sur le principe de Sanger (1977). Cette technique est basée sur la polymérisation d'un fragment d'ADN par PCR, à partir d'une amorce nucléotidique. Le mélange de réaction contient des déoxynucléotides et des didéoxynucléotides marqués à la fluorescéine. La présence de didéoxyribonucléotides arrête la polymérisation, ce qui permet d'obtenir une population de brins tronqués représentant la séquence d'ADN, chacun émettant à une longueur d'ondes bien précise. Le produit de réaction de séquençage est mis sur gel de polyacrylamide: les brins tronqués de différentes tailles migrent dans le gel. Grâce aux quatre couleurs différentes, représentant chacune un nucléotide, le parcours du gel donne la séquence.

Protocole : kit Perkin Elmer

Le mélange de réaction est réalisé dans un tube PCR :

- Entre 200 et 500 ng d'ADN (bicaténaire) à séquencer.
- 1 µl de primer, à la concentration de 3,2 pmoles/µl.
- Ajouter 2 µl du mix de réaction (ABI PRISM) contenant les dNTP, les ddNTP, l'enzyme polymérase
- Ajouter 6 µl de tampon TrisHCl MgCl₂.
- Amener le volume final à 20 µl avec de l'eau distillée.

Cycles.

- 1 min à 96°C.
- 25 cycles de: - 10 sec à 96°C.
 - 10 sec à 50°C.
 - 4 min à 60°C.
- maintenir à 4°C ou stocker à -20°C.

Purification :

Avant d'analyser les produits PCR par le séquenceur automatique, il est nécessaire de les purifier afin d'éliminer les nucléotides marqués non incorporés.

- Ajouter aux 20 µl de solution PCR, 50 µl d'éthanol 95%, 2 µl d'acétate de potassium 3M, pH 4,8.
- Mixer, vortexer et placer sur glace 10 min.
- Centrifuger 30 minutes à 14000 rpm.
- Eliminer le surnageant.
- Ajouter 250 µl d'éthanol 70%.
- Centrifuger 15 min à 14000 rpm à 4°C.
- Eliminer le surnageant.
- Secher le culot .
- Les échantillons sont ensuite resuspendus et mis sur gel du séquenceur automatique ABI-PRISM.

5.2.2 La conjugaison bactérienne

La conjugaison entre bactéries Gram négatives est un transfert latéral de matériel génétique. La bactérie donneuse transfère un plasmide conjugatif vers une bactérie receveuse. La conjugaison se fait grâce à un contact entre bactéries, via un pili sexuel. La souche donneuse possède le plasmide RP4 intégré dans son chromosome. Ce plasmide code pour les protéines nécessaires au transfert conjugatif.

Méthode :

- Préparer deux précultures : Ensemencer, d'une part, 10 ml de LB liquide avec des *E. coli* S17 (RP4+) donneuses contenant le plasmide d'intérêt avec l'antibiotique approprié. D'autre part, ensemencer 10 ml de 2YT liquide une colonie de *Brucella* receveuse (NaIR).
- Incuber les deux précultures durant une nuit à 37°C sous agitation.
- Le jour de la conjugaison, prélever 1 ml de la préculture d'*E. coli* S17 et ensemencer 9 ml de LB liquide de manière à ce que les bactéries se trouvent dans la phase exponentielle de croissance quelques heures après.
- Avant la conjugaison, centrifuger la culture de *E. coli* S17 pendant 30 minutes à 2500 rpm afin de culotter les cellules. Eliminer les surnagants et effectuer deux lavages dans du LB liquide pour éliminer les antibiotiques.
- Resuspendre dans un volume final de 1 ml de LB
- Les cultures de *Brucella* sont centrifugées 30 minutes à 2500 rpm. Le culot est resuspendu dans 10 ml de LB.
- Placer un filtre stérile 0,22µm de 82 mm de diamètre sur une boîte de pétri contenant du 2YT, y déposer 100 µl de culture de *B. melitensis* et 100 µl d'*E. coli* S17 lavées et resuspendues.
- Mélanger et étaler les gouttes de bactéries sur la totalité du filtre.
- Laisser incuber au moins 1 heure à 37°C.
- Transférer le filtre dans une boîte de Pétri vide et récupérer les bactéries sur le filtre dans 3 ml de NaCl 0.9% .
- Récupérer 150µl de la suspension bactérienne et l'étaler sur un milieu 2YT sélectif. Etaler également cette suspension bactérienne diluée 10 et 100 fois. L'acide nalidixique est utilisé pour sélectionner les *B. melitensis* et éliminer les *E. coli* S17 donneuses qui y sont sensibles.
- Incuber 3-4 jours à 37°C.

Contrôles

Les bactéries donneuses *E. coli* S17 sont étalées sur un milieu sélectif contenant de l'acide nalidixique et les *Brucella* (NaI^R) receveuses sont étalées sur un milieu additionné de l'antibiotique auquel résistent les *E. coli* S17 donneuses

La coloration de Gram :

Afin de distinguer les bactéries Gram négatives des bactéries Gram positives, il faut réaliser une coloration de Gram. Pour ce faire les bactéries sont d'abord colorées au violet de gentiane. Ce colorant s'accumule chez les deux bactéries, mais après traitement au lugol, seule les bactéries Gram positives gardent le colorant retenu par la couche de muréine. Une contre-coloration permet de colorer les bactéries Gram négative en rouge.

- Déposer une goutte de NaCl 0,9% sur une lame porte-objet.
- Prélever quelques bactéries de la colonie à examiner.
- Déposer ces bactéries dans la goutte et étaler sur la lame.
- Laisser sécher.
- Couvrir la lame d'alcool et flamber, laisser refroidir.
- Couvrir de violet de gentiane (1 minute).
- Eliminer l'excès de colorant et couvrir de lugol (30 secondes).
- Rincer à l'eau, décolorer prudemment à l'éthanol, rincer de nouveau à l'eau.
- Contre colorer à la safranine (1 minute).
- Sécher et observer au microscope à immersion.

Les bactéries qui résistent à la décoloration par l'alcool sont dites Gram positives (elles restent colorées en bleu violet). Les bactéries qui perdent leur coloration bleue sont dites Gram négatives.

5.2.3 Techniques relatives aux protéines : analyse de l'expression d'une protéine par Western Blot

5.2.3.1 Préparation d'extraits protéiques totaux

- La veille, ensemencer 10 ml de 2YT contenant les antibiotiques appropriés avec les souches de *Brucella* d'intérêt. Incuber 24 heures à 37°C sous agitation.
- Inactiver les *Brucella* 2 heures à 80°C.
- centrifuger les cultures 10 minutes à 3000 rpm afin de culotter les cellules.
- Laver 2X les cellules dans 5 ml de PBS.

-Disruption de cellules :

le disrupteur de cellules utilisé est le *Cell Disruption, one shot, Constant Systems LTD*. Son rôle est d'entraîner l'éclatement des bactéries par changement rapide de pression, permettant ainsi d'obtenir toutes les protéines produites par la bactérie.

Fonctionnement :

la pression utilisée pour l'éclatement d'une cellule de *Brucella* est de 2 kilobars. Lorsque la haute pression désirée est atteinte par l'appareil, le piston descend. A ce moment, environ 6 ml d'échantillon sont introduits à l'intérieur du cylindre à haute pression. Ensuite, le piston va compresser l'échantillon et l'éjecter à une très grande vitesse à travers un orifice étroit. Le transfert rapide de l'échantillon d'une région soumise à une haute pression à une région de basse pression entraîne la disruption des cellules de l'échantillon. Lorsque l'échantillon sort de l'orifice, il heurte la tête du disrupteur et redscend de manière radiale le long des parois qui constituent alors une large surface de refroidissement et permettent donc d'éviter la dégradation des protéines.

En pratique :

- Laver une fois le disrupteur à l'alcool puis 3 fois à l'eau.
- Déposer l'échantillon dans la chambre inférieure, appliquer la pression et récupérer l'échantillon disrupté.
- Rincer 1 fois le disrupteur à l'alcool puis 3 fois à l'eau.

5.2.3.2 Dosage protéique

5.2.3.2.1 Le dosage BCA

La méthode de dosage BCA est utilisée pour évaluer la quantité de protéines dans les extraits totaux réalisés.

Mode opératoire

1-Réaliser une courbe étalon

- On utilise pour cela la BSA (Bovine Serum Albumine) dont la concentration est connue. Différentes dilutions de la solution de BSA sont réalisées à partir d'une solution stock de 10 mg/ml. Les concentrations obtenues suite aux dilutions effectuées sont les suivantes :

- 1 mg/ml
- 0,8 mg/ml
- 0,6 mg/ml
- 0,4 mg/ml
- 0,2 mg/ml
- 0,1 mg/ml
- 0 mg/ml (blanc)

- Ajouter à chaque dilution 200 µl du mélange de réactifs A/B suivant le rapport 50 :1
- Incuber 30 minutes à 37°C
- Mesurer la densité optique à 550 nm.
- La droite étalon peut alors être tracée en plaçant sur l'axe des ordonnées les concentrations protéiques et sur l'axe des abscisses la DO correspondante.

- Diluer nos échantillons protéiques 2X, 4X, 8X et non-dilué.
- Ajouter à chaque dilution 200 µl du mélange de réactifs A/B suivant le rapport 50 :1
- Incuber 30 minutes à 37°C
- Mesurer la densité optique à 550 nm.

Connaissant la DO de chaque échantillon, leur concentration peut être calculée sur base de la droite étalon.

Solutions et matériels

- Toutes les mesures s'effectuent dans une plaque 96 puits
- BSA : Solution stock 10X
- Réactif BCA :

1 volume de réactif B :	CuSO ₄ (Pierce)
50 volumes de réactif A :	BCA protein assay reagent A (Pierce)

5.2.3.3 Le western blot

Le western blot permet de détecter une protéine parmi d'autres. Cette méthode combinant l'électrophorèse en gel de polyacrylamide et la spécificité des anticorps comporte trois étapes :

- Le fractionnement d'un mélange de protéines par une électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes en présence de SDS.
- L'électrotransfert des protéines du gel sur une membrane de nitrocellulose.
- La détection immunologique de la protéine d'intérêt.

5.2.3.3.1 Electrophorèse en gel polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)

Le principe de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium ou « SDS-PAGE » est une technique de séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire dans un réseau tridimensionnel formé par la polymérisation des chaînes de polyacrylamide. Les gels de polyacrylamide sont le résultat de la polymérisation de monomères d'acrylamide. La réaction est initiée par le persulfate d'ammonium (APS) et catalysées par du TEMED (tétraméthylidamide). Les gels de polyacrylamide présentent l'avantage d'avoir une taille de pores sélectionnable, puisque la concentration totale en acrylamide est inversement proportionnelle à la quantité d'agent réticulant.

Le β -mercaptoéthanol présent dans le mélange protéique à fractionner permet la rupture des ponts disulfures, formant des chaînes polypeptidiques constitutives complètement dépliées. Le SDS, détergent anionique déroule les structures protéiques et se fixe stoechiométriquement à leurs chaînes, leur conférant une charge négative égale par unité de masse. Dans un champ électrique, les protéines sont donc séparées en fonction de leur poids moléculaire uniquement. Les petites protéines auront moins de difficultés à traverser le réseau de polyacrylamide que les grosses. Elles migreront donc plus rapidement et plus loin (figure 5.5).

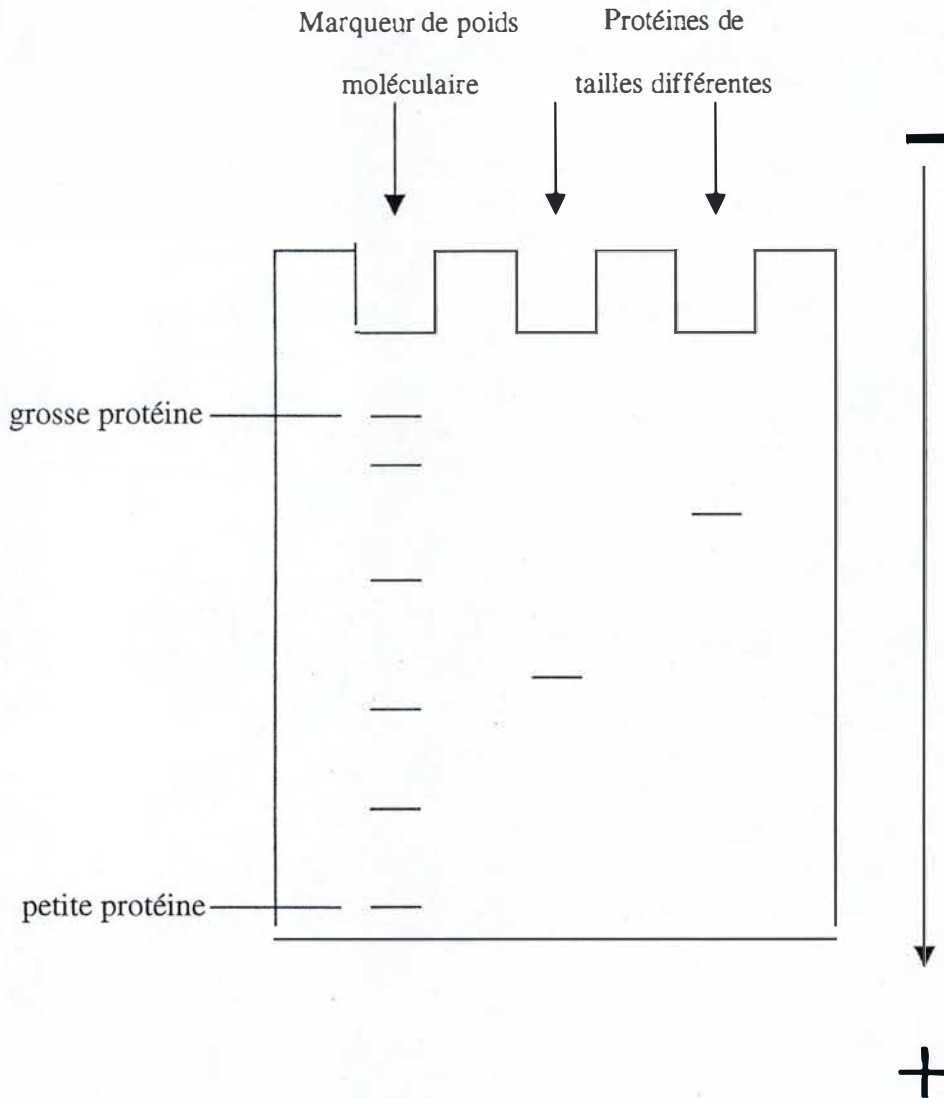


Figure 5.5

Schéma représentant la migration sur gel polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) de deux types de protéines ayant des tailles différentes. Les tailles des protéines d'intérêt peuvent être estimées par comparaison aux protéines de tailles connues du marqueur.

Le gel de polyacrylamide est constitué de deux parties : le stacking gel ou gel de tassement qui a pour rôle de concentrer les protéines avant la séparation, et le running gel ou gel de séparation.

Préparation du gel.

Le Running Gel, à 12% de polyacrylamide

Pour 30 ml

Eau	9,9ml
acrylamide	12 ml
1,5M Tris (pH8,8)	7.5 ml
SDS 10%	0,3 ml
APS 10%	0,3 ml
TEMED	12 μ l

- Couler la solution entre les deux plaques de verre préalablement fixées sur leur support.
- Déposer 1ml d'isopropanol sur le gel pour permettre sa polymérisation, en effet l'oxygène de l'air inhibe la polymérisation.
- Lorsque le gel est polymérisé, enlever l'isopropanol par inversion du montage.

Solutions

Composition de la solution de polyacrilamide 30% :

Acrylamide : 29,2%
Bisacrylamide : 0,8%
Ajouter H₂O

Cette solution est filtrée et stockée à 4°C.

Le Stacking Gel

Pour 10 ml

Eau	3,3 ml
acrylamide	1 ml
Tris 0,5 M pH6,8	1,5 ml
SDS 10%	0,06 ml
APS 10%	0,06 ml
TEMED	6 μ l

Placer le peigne entre les deux plaques de verre avant de couler le Stacking gel. Le couler jusqu'à ce que le liquide arrive au sommet des puits. Laisser polymériser puis retirer lentement le peigne. Remplir les puits avec le tampon d'électrophorèse (SDS-PAGE buffer 1X).

Composition du SDS PAGE buffer 10X

Tris base : 30,35gr

Glycine : 144gr

SDS : 10gr

Amener le volume à 1 litre

Préparation des échantillons

Le volume correspondant à la quantité de protéines à charger est fonction de la concentration en protéines de chacun des extraits. Il faut ajouter à ce volume un tampon de chargement protéique à base de bleu de bromophénol dont la concentration-stock est 5x. On veillera à ce que le volume à charger dans les puits soit identique de sorte à assurer une migration équivalente dans toutes les pistes.

Faire bouillir les échantillons 10 minutes avant de les charger dans les puits du gel afin de dénaturer les protéines.

Tampon de chargement protéique 5X (pour 20 ml)

50% Glycérol :	10 ml
25% β -mercapto-éthanol :	5 ml
10% SDS :	2 gr
Tris 1,5M pH6,8 :	13 ml
0,005% Bleu de Bromophénol :	0,0005 gr

Chargement des échantillons

Un puits est utilisé par un marqueur de poids moléculaire (Bio Rad Kaléidoscope Polypeptide Standart).

Migration

L'appareil est fixé sur 40 mA et le voltage peut varier jusqu'à un maximum de 600 Volts. La durée de migration est fonction du pourcentage du gel et de la distance de séparation entre les différentes protéines du marqueur protéique.

5.2.3.3.2 Transfert sur membrane de nitrocellulose

Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose est un transfert de type semi-dry. Une différence de potentiel est appliquée entre le gel de polyacrylamide et une membrane de nitrocellulose permettant aux protéines chargées négativement d'être transférées sur la membrane de nitrocellulose formant ainsi une réplique du gel. (figure 5.6)

SDS 0,037%

Méthanol 200 ml

Porter à volume avec de l'eau distillée

- Membrane de nitrocellulose : Hybond ECL
- Appareil de transfert : Trans-Blot SD Semi Dry Transfer
- Whatman Chromatography paper

5.2.3.3 Ponceau

La qualité du transfert ainsi que celle du chargement en protéines dans les différentes pistes peut être visualisée par une coloration aspécifique des protéines au rouge ponceau. Celui-ci colore les protéines sur la membrane de nitrocellulose. Cette coloration s'effectue par simple immersion de la membrane dans le colorant, suivie immédiatement par des rinçages à l'eau distillée afin d'ôter l'excédent de colorant. Cette coloration est ensuite éliminée par un rinçage au PBS 1X.

Ponceau 1X :

Dissoudre 0,5g de Ponceau S dans 1 ml d'acide acétique glacial, amener à 100 ml avec de l'eau.

5.2.3.4 Immunodétection.

Cette étape se base sur une technique de révélation dite indirecte où un anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt reconnaît son épitope et s'y fixe. Un anticorps secondaire, qui reconnaît l'anticorps primaire permet de détecter la protéine d'intérêt étant donné qu'il est conjugué à la peroxydase, enzyme qui catalyse une réaction produisant de la lumière (figure5.7).

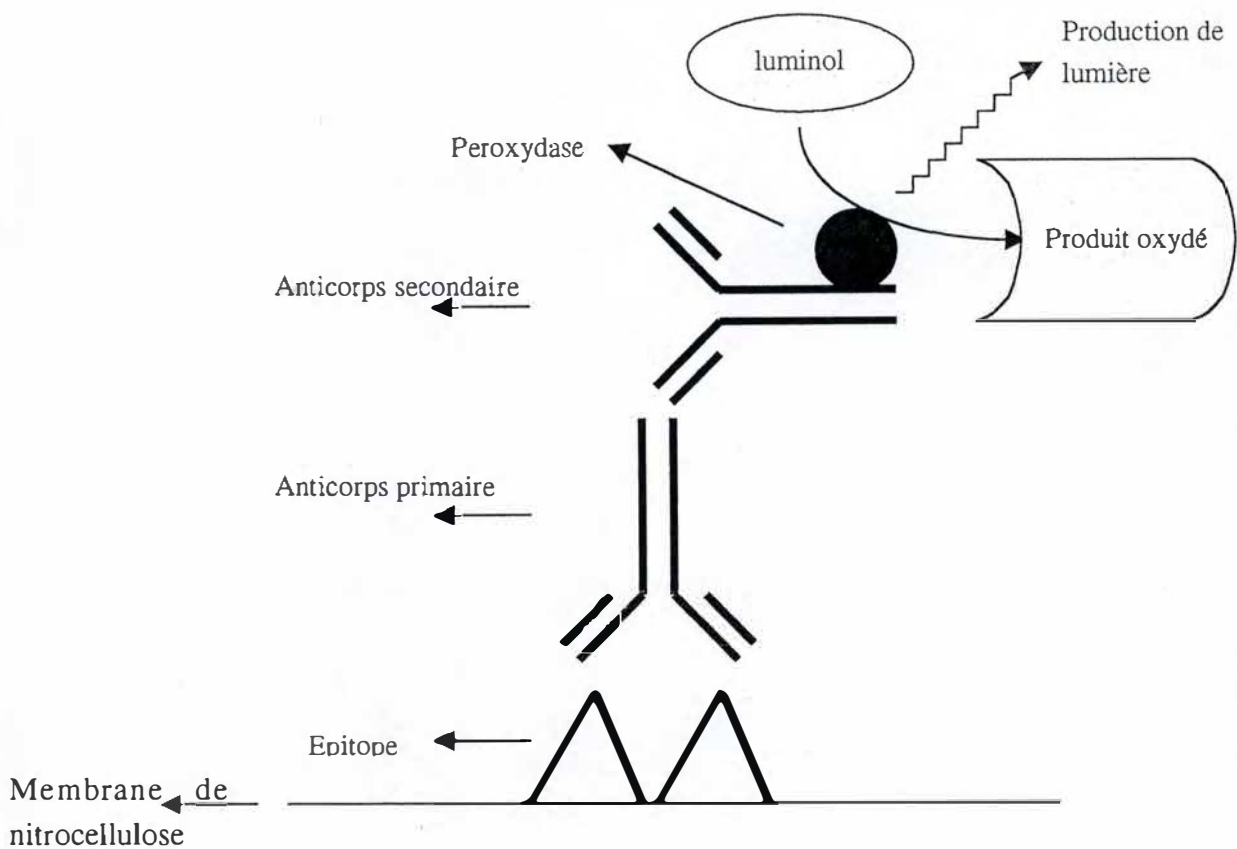


Figure 5.7:

Méthode de détection en deux étapes: un anticorps primaire spécifique à un épitope est reconnu par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Cette enzyme catalyse une réaction d'oxydation qui produit de la lumière.

5.2.3.3.4.1 Etape de " blocking "

Avant de mettre la membrane de nitrocellulose en présence de l'anticorps primaire, une étape préliminaire consiste à saturer les sites non spécifiques de la membrane pour éviter un bruit de fond important lors de la révélation. Pour cela, la membrane est incubée pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation dans une solution de Blocking contenant des protéines de lait. Cette étape peut aussi se faire à 4°C pendant une nuit. Par la suite, une réaction de compétition permettra un déplacement des protéines du lait, fixées de manière non spécifiques, en faveur des anticorps primaires dirigés spécifiquement contre un épitope.

Solution de Blocking

PBS 1X

Lait en poudre 5%

Tween 0,05%

PBS 10X : solution stock 10X

KH_2PO_4 7,5mM

Na_2HPO_4 40mM

NaCl 690mM

KCl 13,5mM

Enlever la solution de blocking faire deux rinçages avec du PBS-Tween 0,05%. Ensuite, laver la membrane 1X15 minutes et 2X 5 minutes sous agitation dans du PBS-Tween 0,05%.

PBS tween 0.05% (500 ml)

50 ml de PBS stock 10X

450 ml d'eau H_2O

250 μl de Tween

5.2.3.3.4.2 Mise en présence de l'anticorps primaire

- La membrane de nitrocellulose est déposée dans une solution de PBS contenant un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt, pendant une heure sous agitation.

La concentration du réactif immunologique varie de 1 à 50 mg/ml, en fonction de l'affinité des immunoglobulines pour leur épitope. Pour une immunodétection, les anticorps sont dilués à une concentration de 1 à 50 $\mu\text{g/ml}$.

- Récupérer la solution contenant les anticorps et conserver à -20°C .

- faire deux rinçages avec du PBS-Tween 0,05%. Ensuite, laver la membrane 1X 15 minutes et 2X 5 minutes sous agitation dans du PBS-Tween 0,05%.

5.2.3.3.4.3 Mise en présence de l'anticorps secondaire

L'anticorps secondaire est dirigé contre le domaine F(c) de l'anticorps primaire. Il est conjugué à la peroxydase, enzyme permettant l'émission de lumière par l'oxydation d'un substrat peracide (le luminol) en un composé oxydé. L'émission de lumière est amplifiée par la présence d'agents chimiques comme les phénols.

L'anticorps secondaire utilisé est un anticorps de chèvre anti mouse HRP (DAKO)

- Mettre la membrane en présence de l'anticorps secondaire à la dilution recommandée par la firme le commercialisant, sous agitation pendant une heure.
- Faire deux rinçages puis laver 3X 15 minutes la membrane avec la solution PBS-Tween 0,05% sous agitation.

5.2.3.3.4.4 Révélation

La technique de détection utilise les réactifs ECL S1 et S2 (Amersham Pharmacia Biotech) et se déroule en chambre noire.

- La membrane est mise en présence d'un mélange en volume égal des deux solutions ECL: S1 et S2. Ce volume est fonction de la surface à couvrir: surface en $\text{cm}^2 \times 0.125 \text{ ml}$. Mélanger S1 et S2 et en recouvrir la membrane sur la face où les protéines ont été transférées.
- Incuber durant une minute.
- Eliminer la solution de détection et placer la membrane recouverte d'un film plastique (type SaranWrap) dans une cassette de révélation, et exposer à un film autoradiographique pendant différentes temps en fonction de l'intensité du signal: 10 secondes, 30 secondes, 60 secondes, 5 minutes et 10 minutes.

Une fois S1 et S2 mélangées, l'activité maximale de la peroxydase a lieu 1 à 5 minutes après le mélange puis elle décroît en fonction du temps.

- Les bandes d'intérêt sont révélées par un bain de révélateur: le film est plongé dans la cuve jusqu'à ce qu'apparaissent des bandes.
- Passer le film une dizaine de secondes dans le fixateur. Rincer abondamment à l'eau de ville et laisser sécher.

Garder la membrane pour positionner les bandes en fonction des puits chargés et pour renseigner de l'échelle de taille.

Solutions et matériels

Solution de révélation Kodack

Fixateur Kodack

5.2.4 Méthodes de détection de la production de N-acyl homosérine lactones

La détection des N-acyl homosérine lactones est réalisée grâce à des biosenseurs. Dans le cadre de ce travail, trois plasmides senseurs bioluminescents (pSB1142, pSB1075, pSB401)

ainsi que la souche bactérienne CV026 ont été utilisés. La détection de la lumière produite par les senseurs bioluminescents se fait grâce à une caméra. (réf) dans le cas de cultures solides. Lorsqu'il s'agit de cultures liquides la lumière produite est mesurée par un luminomètre (réf). Si le senseur utilisé est CV026, un pigment violet est observé quand il est mis en présence de N-acyl HSL à courtes chaînes. Pour détecter la présence d'HSL à longues chaînes, il faut ajouter à la culture de CV026 une HSL synthétique à courte chaîne. L'ensemble de la culture apparaîtra donc violette, sauf là où se trouvent les HSL à longues chaînes, qui inhibant l'effet de l'HSL à courte chaîne conduisent à la formation d'une zone blanche (McClean, et al., 1997).

5.2.4.1 Cotransformations

La production de N-acyl HSL peut être détectée si la souche senseur est transformée avec un plasmide contenant un gène susceptible de produire des N-acylHSL. Le produit de la transformation est étalé sur un milieu sélectif contenant les antibiotiques appropriés. Après une nuit d'incubation, une colonie est restreinte, puis la lumière produite par cette colonie est mesurée.

5.2.4.2 Cocultures

On peut également mettre en évidence la production d'HSL en mélangeant une culture liquide de cellules contenant un plasmide senseur à une culture de cellules produisant des HSL.

Méthode

- Lancer deux cultures : ensemercer d'une part 5 ml de LB avec une colonie de cellules dont on veut tester la production d'HSL. D'autre part, ensemercer 5 ml de LB avec une colonie de cellules portant un plasmide senseur bioluminescent. Les cultures sont lancées sans antibiotiques si les deux souches sont résistantes à des antibiotiques différents étant donné que l'on sera amené à mélanger les cultures.
- Incuber une nuit à 37°C sous agitation.
- Le lendemain, ajouter 2 ml de la culture de senseur à 2 ml de la culture à tester.
- Incuber 1h à 37°C sous agitation.
- Déposer 200µl de ce mélange dans une plaque multipuit.
- Mesurer la quantité de lumière produite au luminomètre.

5.2.4.3 Cross-streak

Cette technique permet également de détecter la production d'HSL par des cellules bactériennes.

Méthode

- Sur une boîte de pétri contenant du LB agar avec IPTG, mais sans antibiotique, déposer le senseur suivant une ligne verticale à l'aide d'une anse de platine.
- Etaler ensuite horizontalement les cellules à tester. (figure 5.8)
- L'éventuelle lumière produite est détectée à la caméra.

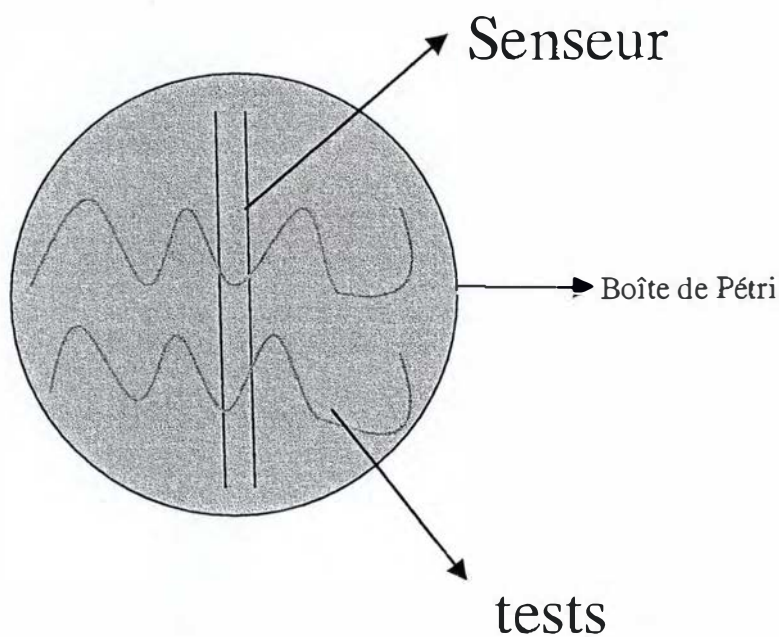


Figure 5.8 : les cellules dont la production d'HSL est testée et les cellules senseurs sont étalées perpendiculairement les unes par rapport aux autres, permettant aux HSL produites de diffuser vers le senseur

5.2.4.4 TLC (Thin Layer Chromatography)

La production de N-acyl HSL par une souche bactérienne d'intérêt peut être mise en évidence par différentes techniques qui analysent directement les extraits d'HSL. Nous avons utilisé la technique de la TLC.

5.2.4.4.1 Extractions d'HSL

Principe

L'extraction d'HSL repose sur la différence de solubilité des divers constituants du surnageant d'une culture dans un solvant organique donné. Nous avons mélangé le surnageant des cultures d'intérêt au dichlorométhane, solvant organique dans lequel se dissolvent les N-acyl homosérine lactones.

Méthode :

- Le matin, lancer une préculture :ensemencer 10 ml de LB, contenant les antibiotiques appropriés, avec une colonie de cellules dont les HSL vont être extraites.
- Laisser incuber la journée à 37°C sous agitation.
- Le soir, inoculer 500 ml de LB contenant les antibiotiques appropriés avec la préculture.
- Le lendemain, centrifuger 15 minutes à 3500 rpm à t° ambiante afin de culotter les cellules.
- Récupérer les surnagants et les mélanger au solvant dichlorométhane dans un ballon décanteur. Le rapport dichlorométhane/surnagent doit être environ de 1/3.
- Récupérer la phase organique, dans laquelle se trouvent les HSL.
- Centrifuger la phase organique 5' à 5000 rpm
- Répéter l'extraction avec la phase supérieure.
- L'eau est éliminée de la phase organique grâce à du MgSO₄ anhydre.
- La solution est filtrée à l'aide d'un buchner portant un filtre de 0,45 µm.
- Sécher la solution extraite au rotavap.
- Resuspendre les HSL dans 100 µm d'acétonitrile.

5.2.4.4.2 TLC

Les HSL extraites sont ensuite soumises à une chromatographie sur couche mince. Cette technique permet de séparer les HSL en fonction de leur hydrophobicité.

Principe :

La chromatographie sur couche mince est basée sur le principe de la partition d'un soluté entre une phase stationnaire et une phase liquide. La phase stationnaire est une couche d'eau liée à un support de silice et la phase mobile est constituée d'un solvant non miscible à l'eau.

Méthode :

- Verser 250 ml de solvant organique dans une cuve rectangulaire.

Composition du solvant : 45% hexane dans de l'acétone

- Attendre environ 1 h que la cuve soit saturée en solvant.

- Charger une petite quantité (1 à 7 μ l) d'échantillon d'HSL extraits, sur une plaque de silice (Silica gel 60F25.4 (Merck)) à l'aide d'un tips capillaire afin que la tache soit la plus petite possible.

- Déposer la plaque dans la cuve saturée en solvant organique. Le volume du solvant dans la cuve est calculée afin que les échantillons se situent juste au dessus de la surface de ce solvant.

Le solvant progresse par capillarité sur la plaque de silice. Plus le soluté est hydrophobe, plus il a d'affinité pour le solvant organique et plus il migre loin.

- Quand le solvant organique a atteint la face supérieure de la plaque de silice celle-ci est retirée de la cuve.

Visualisation des HSL :

La présence d'HSL est révélée par les senseurs bioluminescents et CV026.

Méthode

- La veille, lancer une culture de senseur (CV026, JM109(pSB1075), JM109(pSB401), JM109(pSB1142)) avec les antibiotiques appropriés.

- Incuber la nuit sous agitation, à la température adéquate pour chaque senseur, CV026 pousse à 30°C et *E. coli* JM109 à 37°C.

- Le lendemain, ensemercer la culture de senseurs dans du LB agar 30% :

- 30 ml de LB liquide
- 15 ml LB agar
- 5 ml de la culture de senseur

-Couler cette solution sur la plaque de silice afin de former un overlay ou couche de senseur.

-Incuber une nuit à 30°C sans agitation.

Les senseurs vont produire un signal détectable là où les HSL auront migré. Cette technique permet de détecter la production d'HSL par une bactérie donnée, d'identifier l'HSL produite en fonction de son profil de migration et d'évaluer la quantité d'HSL produite (Shaw, et al., 1997) (figure 5.9)

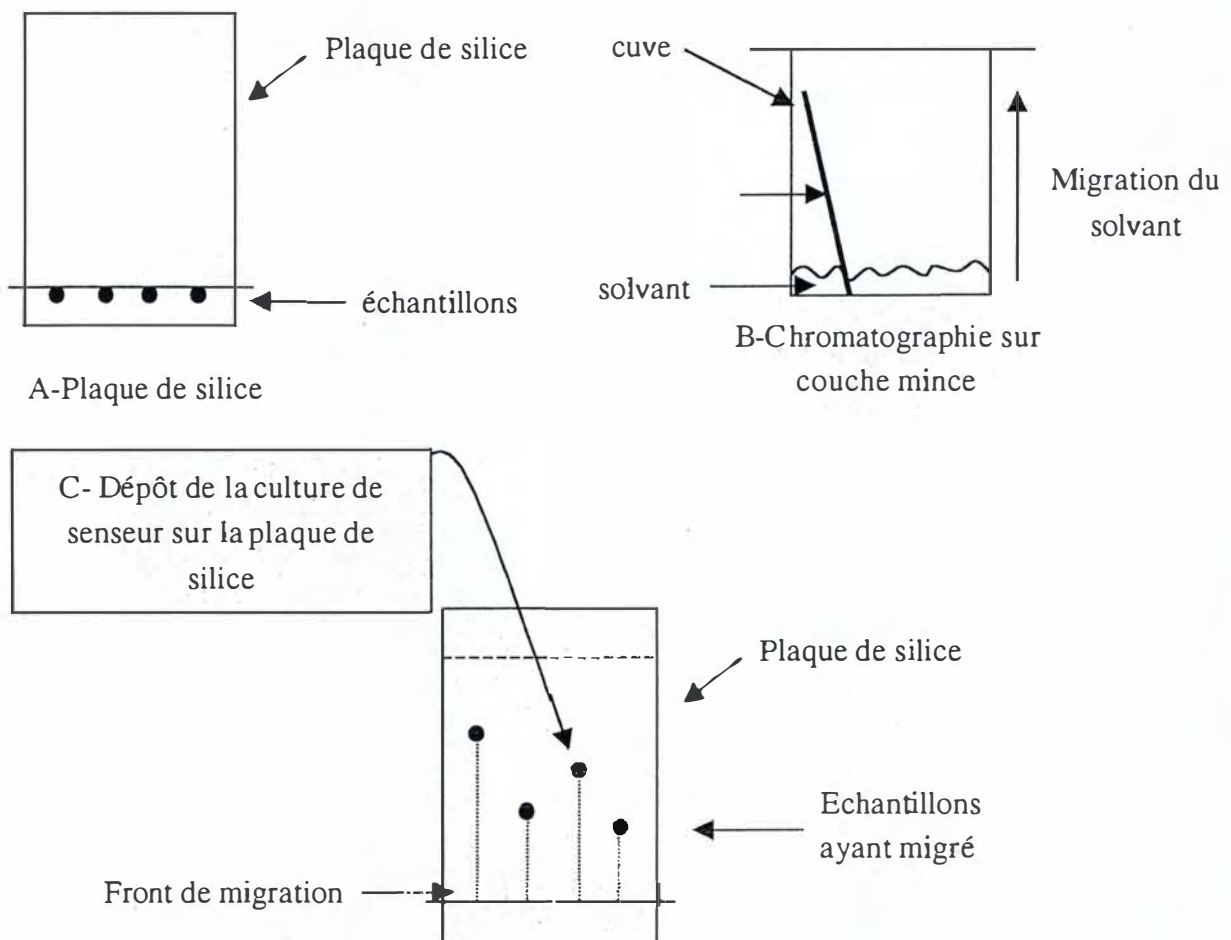


Figure 5.9 : TLC

A-Plaque de silice

B-Migration des échantillons en fonction de l'hydrophobicité

C-Détection des N-acyl HSL par un overlay de senseur. La plaque est incubée une nuit à 30°C.

BIBLIOGRAPHIE

6 BIBLIOGRAPHIE

Bassler, B. L., Wright, M., Showalter, R. E. & Silverman, M. R. (1993). Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol Microbiol* 9, 773-86.

Boschioli, M. L., Foulongne, V. & O'Callaghan, D. (2001). Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* 4, 58-64.

Boschioli, M. L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Allardet-Servent, A., Cazevielle, C., Liautard, J. P., Ramuz, M. & O'Callaghan, D. (2002). The *Brucella suis virB* operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc Natl Acad Sci US A* 99, 1544-9.

Brint, J. M. & Ohman, D. E. (1995). Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J Bacteriol* 177, 7155-63.

Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczar, I., Bassler, B. L. & Hughson, F. M. (2002). Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 415, 545-9.

Corbel, M. J. (1997). Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* 3, 213-21.

Covacci, A., Telford, J. L., Del Giudice, G., Parsonnet, J. & Rappuoli, R. (1999). *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 284, 1328-33.

Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. & Greenberg, E. P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295-8.

de Kievit, T. R. & Iglewski, B. H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* 68, 4839-49.

Delrue, R. M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J. P. & Letesson, J. J. (2001). Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol* 3, 487-97.

- Dunny, G. M. & Leonard, B. A. (1997). Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **51**, 527-64.
- Dunny, G. M. & Winans S. C. (1999). Cell-Cell Signalling in Bacteria.
- Eberhard, A. (1972). Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J Bacteriol* **109**, 1101-5.
- Fuqua, C., Burbea, M. & Winans, S. C. (1995). Activity of the *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer regulator TraR is inhibited by the product of the *traM* gene. *J Bacteriol* **177**, 1367-73.
- Fuqua, C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. (1996). Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **50**, 727-51.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density- responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**, 269-75.
- Gambello, M. J. & Iglewski, B. H. (1991). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol* **173**, 3000-9.
- Gilson, L., Kuo, A. & Dunlap, P. V. (1995). AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins. *J Bacteriol* **177**, 6946-51.
- Hanzelka, B. L. & Greenberg, E. P. (1996). Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: evidence that S-adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis. *J Bacteriol* **178**, 5291-4.
- Hanzelka, B. L., Parsek, M. R., Val, D. L., Dunlap, P. V., Cronan, J. E., Jr. & Greenberg, E. P. (1999). Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. *J Bacteriol* **181**, 5766-70.
- Holden, I., Swift, I. & Williams, I. (2000). New signal molecules on the quorum-sensing block. *Trends Microbiol* **8**, 101-4; discussion 103-4. _00001718 _00001718.
- Holden, M. T., Ram Chhabra, S., de Nys, R., Stead, P., Bainton, N. J., Hill, P. J., Manefield, M., Kumar, N., Labatte, M., England, D., Rice, S., Givskov, M., Salmond, G. P., Stewart, G. S., Bycroft, B. W., Kjelleberg, S. & Williams, P. (1999). Quorum-sensing

cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **33**, 1254-66.

Hwang, I., Li, P. L., Zhang, L., Piper, K. R., Cook, D. M., Tate, M. E. & Farrand, S. K. (1994). TraI, a LuxI homologue, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid N-acylhomoserine lactone autoinducer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4639-43.

Kaiser, D. (2001). Building a multicellular organism. *Annu Rev Genet* **35**, 103-23.

Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop, R. M., 2nd & Peterson, K. M. (1994). pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**, 800-2.

Laue, B. E., Jiang, Y., Chhabra, S. R., Jacob, S., Stewart, G. S., Hardman, A., Downie, J. A., O'Gara, F. & Williams, P. (2000). The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology* **146**, 2469-80.

Lestrade, P., Delrue, R. M., Danese, I., Didembourg, C., Taminiou, B., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Tang, C. M. & Letesson, J. J. (2000). Identification and characterization of in vivo attenuated mutants of *Brucella melitensis*. *Mol Microbiol* **38**, 543-51.

Lewin, B. (1994). Genes V. Oxford.

Losick, R. & Kaiser, D. (1997). Why and how bacteria communicate. *Sci Am* **276**, 68-73.

McClellan, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S., Bycroft, B. W., Stewart, G. S. & Williams, P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* **143**, 3703-11.

Miller, M. B. & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**, 165-99.

More, M. I., Finger, L. D., Stryker, J. L., Fuqua, C., Eberhard, A. & Winans, S. C. (1996). Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* **272**, 1655-8.

Moreno, E. (1998). Genome evolution within the alpha Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? *FEMS Microbiol Rev* **22**, 255-75.

Nealson, K. H. & Hastings, J. W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev* **43**, 496-518.

Nealson, K. H., Platt, T. & Hastings, J. W. (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* **104**, 313-22.

O'Callaghan, D. & MacMillan, A. (2001). *Brucella*.

Parsek, M. R. & Greenberg, E. P. (2000). Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8789-93.

Parsek, M. R., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., Jr. & Greenberg, E. P. (1999). Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4360-5.

Passador, L., Cook, J. M., Gambello, M. J., Rust, L. & Iglewski, B. H. (1993). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* **260**, 1127-30.

Pearson, J. P., Pesci, E. C. & Iglewski, B. H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* **179**, 5756-67.

Pesci, E. C. & Iglewski, B. H. (1997). The chain of command in *Pseudomonas* quorum sensing. *Trends Microbiol* **5**, 132-4; discussion 134-5.

Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P. & Iglewski, B. H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11229-34.

Pierson III, L. S., Wood, D. W. & Pierson, E. A. (1998). homoserine lactone-mediated gene regulation in plant associated bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 207-225.

Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R. & Palva, E. T. (1993). A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Embo J* **12**, 2467-76.

- Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. & Gorvel, J. P. (1999). *Brucella abortus* invasion and survival within professional and nonprofessional phagocytes.
- Salmond, G. P., Bycroft, B. W., Stewart, G. S. & Williams, P. (1995). The bacterial 'enigma': cracking the code of cell-cell communication. *Mol Microbiol* 16, 615-24.
- Schaefer, A. L., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., Jr. & Greenberg, E. P. (1996). Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9505-9.
- Shadel, G. S. & Baldwin, T. O. (1991). The *Vibrio fischeri* LuxR protein is capable of bidirectional stimulation of transcription and both positive and negative regulation of the luxR gene. *J Bacteriol* 173, 568-74.
- Shaw, P. D., Ping, G., Daly, S. L., Cha, C., Cronan, J. E., Jr., Rinehart, K. L. & Farrand, S. K. (1997). Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6036-41.
- Shih, G. C., Kahler, C. M., Swartley, J. S., Rahman, M. M., Coleman, J., Carlson, R. W. & Stephens, D. S. (1999). Multiple lysophosphatidic acid acyltransferases in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 32, 942-52.
- Sitnikov, D. M., Schineller, J. B. & Baldwin, T. O. (1995). Transcriptional regulation of bioluminescence genes from *Vibrio fischeri*. *Mol Microbiol* 17, 801-12.
- Sitnikov, D. M., Shadel, G. S. & Baldwin, T. O. (1996). Autoinducer-independent mutants of the LuxR transcriptional activator exhibit differential effects on the two lux promoters of *Vibrio fischeri*. *Mol Gen Genet* 252, 622-5.
- Sola-Landa, A., Pizarro-Cerda, J., Grillo, M. J., Moreno, E., Moriyon, I., Blasco, J. M., Gorvel, J. P. & Lopez-Goni, I. (1998). A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol* 29, 125-38.
- Surette, M. G., Miller, M. B. & Bassler, B. L. (1999). Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1639-44.

- Swift, S., Throup, J. P., Williams, P., Salmond, G. P. & Stewart, G. S. (1996). Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype. *Trends Biochem Sci* 21, 214-9.
- Taminiau, B., Daykin, M., Swift, S., Boschioli, M. L., Tibor, A., Lestrade, P., De Bolle, X., O'Callaghan, D., Williams, P. & Letesson, J. J. (2002). Identification of a Quorum-Sensing Signal Molecule in the Facultative Intracellular Pathogen *Brucella melitensis*. *Infect Immun* 70, 3004-3011.
- Tang, H. B., DiMango, E., Bryan, R., Gambello, M., Iglewski, B. H., Goldberg, J. B. & Prince, A. (1996). Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect Immun* 64, 37-43.
- Watnick, P. & Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 182, 2675-9.
- Watson, W. T., Minogue, T. D., Val, D. L., von Bodman, S. B. & Churchill, M. E. (2002). Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. *Mol Cell* 9, 685-94.
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J. & Salmond, G. P. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 25, 365-404.
- Williams, P., Camara, M., Hardman, A., Swift, S., Milton, D., Hope, V. J., Winzer, K., Middleton, B., Pritchard, D. I. & Bycroft, B. W. (2000). Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355, 667-80.
- Winson, M. K., Camara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chhabra, S. R., Daykin, M., Bally, M., Chapon, V., Salmond, G. P., Bycroft, B. W. & et al. (1995). Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9427-31.
- Winson, M. K., Swift, S., Fish, L., Throup, J. P., Jorgensen, F., Chhabra, S. R., Bycroft, B. W., Williams, P. & Stewart, G. S. (1998). Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiol Lett* 163, 185-92.
- Withers, H., Swift, S. & Williams, P. (2001). Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4, 186-93.

Young, E. J. (1995). An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis* 21, 283-9; quiz 290.

Zhu, J., Oger, P. M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P. J., Farrand, S. K. & Winans, S. C. (2000). The bases of crown gall tumorigenesis. *J Bacteriol* 182, 3885-95.