



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Contribution à l'étude du quorum sensing chez *Brucella Melitensis* 16M: analyse de la synthèse et de la dégradation des molécules signal

Lemaire, Julien

Award date:
2004

[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 A L'ETUDE DU QUORUM SENSING CHEZ *BRUCELLA MELITENSIS* 16M :

ANALYSE DE LA SYNTHÈSE ET DE LA DÉGRADATION DES MOLECULES SIGNAL

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

Julien LEMAIRE
Juin 2004

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 du Quorum Sensing chez *Brucella melitensis* 16M :
Analyse de la synthèse et de la dégradation des molécules signal**

LEMAIRE Julien

Résumé

"L'Union fait la Force". Ce constat très simple a été mis en application par un nombre impressionnant d'organismes, dont les bactéries. En effet, ces dernières utilisent des phéromones (molécules signal) qui s'accumulent dans l'environnement de façon dépendante de la densité cellulaire et permettent de réguler certaines fonctions, comme par exemple la formation de biofilm bactérien. Ce phénomène a été baptisé le "Quorum Sensing". Chez les bactéries à Gram négatif, les molécules signal synthétisées sont appelées acyle-homosérine lactones (AHLs). Elles sont utilisées afin de réguler, entre autres, des processus physiologiques impliqués dans l'établissement de relation symbiotique ou pathologique. *Brucella melitensis* est une bactérie à Gram négatif, pathogène intracellulaire facultative, responsable de la brucellose chez les animaux de rente ou "fièvre de Malte" chez l'homme. Au laboratoire, deux AHLs ont été isolées du surnageant de culture de *Brucella*, mais aucune synthétase d'AHLs n'a encore été caractérisée.

Durant ce mémoire, nous avons analysé un mutant appelé B. 16M $\Delta hdtS$. Cette souche de *Brucella* est délétée dans un gène homologue à un gène codant une synthétase putative d'AHLs chez l'organisme *Pseudomonas fluorescens*. Dans un premier temps, nous avons déterminé si ce mutant produisait toujours des AHLs. Par la suite, nous avons étudié chez ce mutant le taux de production de deux composants du système de sécrétion de type IV, un facteur de virulence régulé par le "quorum sensing", ainsi que sa capacité à se multiplier dans des cellules.

Afin de déterminer l'implication des AHLs dans la virulence de *Brucella*, ces deux dernières expériences ont également été effectuées sur une souche de *Brucella* produisant une lactonase, enzyme capable de dégrader les AHLs. Pour ce faire, nous avons introduit dans *Brucella* un plasmide contenant le gène codant une lactonase de *Bacillus spp.*, appelée AiiA.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2004

Promoteur: Prof. J.-J. Letesson

Je commencerai bien entendu par remercier le professeur Jean-Jacques Letesson pour avoir trouvé une petite place pour ranger mes grands pieds dans son laboratoire durant ces six mois écoulés.

J'aimerais aussi remercier du fond du cœur mes deux tutrices. Merci à toi Rose-May de m'avoir aidé durant la rédaction de mon introduction, de m'avoir fait découvrir le monde fabuleux de "l'écriture scientifique". Bonjour à Arthur et à Jeanne. Un tout grand merci à Chantal pour ce voyage dans le monde du quorum sensing. Merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse et ton encadrement hors paire (si si!). Et ce malgré tous les problèmes rencontrés...

Merci aux deux autres occupants du local 208: Jon et Nico. Merci pour tous les bons délires, les discussions passionnantes, les "pauses fenêtres",... tous ces moments inoubliables.

Mais ce mémoire n'aurait pas été le même sans mes autres compères. Richard pour commencer bien entendu (car bon, Richard c'est Richard ;-)), merci pour ta bonne humeur perpétuelle et tes réflexions atypiques irremplaçables. Johann pour toutes ces longues discussions dont on oublie parfois (souvent même) le déclencheur. Cédric pour ce fou rire inoubliable dans la pièce autoclave (mais c'est quoi cette odeur?). Aurore pour la touche féminine indispensable à cette équipe des "mémor(is)ants 2004". Merci aussi à Anne-Michèle et Stéphanie pour les poissons, les bonbons, les parties de "chat" et tout le reste.

Merci aussi à tous ceux qui m'ont "supporté" pendant ces quelques mois : le professeur Xavier De Bolle pour sa bonne humeur et sa gentillesse, Anne, Zette, Marie (qu'elle soit grande ou petite!), Sandrine, Sophie, Caroline, Valérie, Régis et Christian. Merci à tous pour vos conseils et tous ces bons moments.

Je m'en voudrais de ne pas remercier le groupe Gémo pour sa disponibilité et son accueil toujours chaleureux ainsi qu'Anne-Marie et Monique. Merci aussi à Godefroid d'avoir réussi à décoincer mon petit robinet (no comment) ainsi qu'aux occupants du bout du couloir.

Merci donc à tous pour le cadre chaleureux et l'ambiance inoubliable de ce mémoire.

Je tiens aussi à remercier les armoires, portes, imprimantes, tables et autres objets en tout genre d'avoir sans cesse été dans mon chemin. Merci pour toutes les bosses et oedèmes.

Quant à toi, *Brucella*, chère bactérie, je voudrais te remercier pour m'avoir montré ce fabuleux côté de la science: quant tout foire et que personne ne sait pourquoi... Aurais-tu eu peur du nouveau BL3? Nous te devons beaucoup de cheveux blancs...

Merci d'avance à vous, membres du jury, pour votre temps précieux consacré à ce mémoire.

Un énorme merci à ceux qui ont partagé avec moi ces années d'études, bien remplies en déconnades, soirées entre amis et autres joyeusetés. Merci à toi Benji, Nico, Vincent, Phil, Yanick, Jean-Phi ainsi qu'à Johann, Richard, Gene, Cédric, Antoine, Yves, ... Merci à l'équipe URBO (mon second labo), l'équipe URBV (et son rotavap), l'équipe URBC ainsi que tous les autres.

Je terminerai en remerciant tous ces êtres qui me sont chers. Mes parents pour tout ce qu'ils ont fait pour moi, pour la confiance qu'ils me portent depuis toutes ces années (ce n'est pas grave si vous ne comprenez rien à mon mémoire!!!). Courage frangin!!! Toute ma famille et amis proches ou devenus un peu plus lointains mais toujours présents en cas de besoin.

Et enfin, merci infiniment à celle qui a le plus de mérite! Merci Delphine de m'avoir soutenu et encouragé durant ce mémoire. Merci pour tous ces moments passés, présents et futurs. Je te dois énormément...

Table des matières

INTRODUCTION	2
1. AVANT-PROPOS	2
2. LE QUORUM-SENSING.....	2
2.1. <i>Définition</i>	2
2.2. <i>Exemples concrets</i>	3
2.3. <i>Importance de l'étude du quorum sensing</i>	4
2.4. <i>Les mots de la communication bactérienne</i>	5
2.4.1. La communication via une acyle-homosérine lactone (AHL).....	5
2.4.2. Définition du terme auto-inducteur.....	6
2.4.3. La communication via un oligo-peptide.....	6
2.4.4. L'espéranto bactérien : la communication AI-2.....	7
2.4.5. La communication via AI-3 : pourparlers entre la bactérie et son hôte.....	7
3. LE PHENOMENE DE QUORUM SENSING LIE AUX ACYLE-HOMOSERINE LACTONES.....	8
3.1. <i>Les acyle-homosérine lactones : les mots du système de communication</i>	9
3.1.1. La structure de AHLs.....	9
3.1.2. La stabilité des AHLs.....	9
3.1.2.1. Les facteurs environnementaux.....	9
3.1.2.2. Les lactonases et acylases.....	10
3.1.2.2.1. La lactonase.....	10
3.1.2.2.2. L'acylase.....	10
3.1.3. Les rôles secondaires des AHLs.....	10
3.2. <i>Les synthétases : les cordes vocales du système de communication</i>	11
3.2.1. La synthèse des AHLs par LuxI.....	11
3.2.1.1. La synthèse.....	11
3.2.1.2. L'interaction enzyme-substrat.....	12
3.2.2. LuxM et AinS, la seconde famille de synthétase	12
3.2.2.1. LuxM chez <i>Vibrio harveyi</i>	12
3.2.2.2. AinS chez <i>Vibrio fisheri</i>	13
3.2.3. La synthétase putative HdtS.....	13
4. UTILISATION DE BIOSENSEURS SPECIFIQUES POUR LA DETECTION D'ACYLE-HOMOSERINE LACTONES.....	14
4.1. <i>Définition d'un biosenseur</i>	14
4.2. <i>Les biosenseurs dans le cadre du quorum sensing</i>	14

5.	LE GENRE <i>BRUCELLA</i> ET LA BRUCCELLOSE.....	15
5.1.	<i>Brucella</i> , bactérie pathogène.....	15
5.1.1.	Généralités.....	15
5.1.2.	Historique.....	15
5.1.3.	Caractéristiques bactériologiques et génétiques.....	15
5.2.	La Brucellose.....	16
5.3.	<i>Brucella</i> : stratagèmes infectueux.....	17
5.4.	Le quorum sensing chez <i>Brucella</i>	18
5.4.1.	Détection d' AHLs chez <i>Brucella</i>	18
5.4.2.	Le mystère de la synthétase de <i>Brucella</i>	18
5.4.3.	Les régulateurs du QS chez <i>Brucella</i>	18
	OBJECTIFS DU MEMOIRE.....	20
	RESULTATS.....	22
1.	ETUDE DU RÔLE DE <i>hdtS</i> DANS LE QUORUM SENSING.....	22
1.1.	Création d'un mutant de délétion <i>hdtS</i> chez <i>Brucella</i>	22
1.2.	Etude phénotypique de <i>B. 16M ΔhdtS</i>	22
1.2.1.	Analyse de la production d' acyle-homoserine lactones (AHLs) par la souche <i>B. 16M ΔhdtS</i>	22
1.2.2.	Analyse de la production de la protéine VirB8 dans la souche <i>B. 16M ΔhdtS</i>	23
1.2.3.	Analyse de l' expression de l' opéron <i>virB</i> dans la souche <i>B. 16M ΔhdtS</i>	24
1.2.4.	Analyse du mutant <i>ΔhdtS</i> en modèle cellulaire.....	26
1.3.	Complémentation du mutant <i>ΔhdtS</i>	27
1.3.1.	Construction du pMR 10 <i>cat-hdtS</i>	27
1.3.2.	Conjugaison.....	29
1.3.3.	Analyse de la production de la protéine VirB8 dans la souche <i>B. 16M ΔhdtS</i> complétementée.....	29
2.	EXPRESSION D'UNE LACTONASE CHEZ <i>BRUCELLA</i>	30
2.1.	Construction du pBBR <i>mcs1-aiiA</i>	30
2.2.	Conjugaison.....	33
2.3.	Observation du phénotype.....	33
2.3.1.	Analyse de la dégradation d' AHLs par lactonase.....	33
2.3.2.	Analyse de la production des protéines VirB8 et VirB9.....	35
2.3.3.	Analyse de la souche produisant la lactonase en modèle cellulaire.....	36

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	39
1. ANALYSE DU MUTANT $\Delta hdtS$	39
1.1. <i>Analyse de la production d'AHLs</i>	39
1.2. <i>Analyse de la production de la protéine VirB8 dans la souche B. 16M $\Delta hdtS$</i>	39
1.3. <i>Analyse de la virulence du mutant $\Delta hdtS$ en modèle cellulaire</i>	40
1.4. <i>Conclusion</i>	40
1.5. <i>Perspectives</i>	41
2. ANALYSE PHENOTIPIQUE D'UNE SOUCHE DE <i>BRUCELLA</i> PRODUISANT UNE LACTONASE.....	42
2.1. <i>Analyse de la production des protéines VirB8 et VirB9 dans une souche</i> <i>produisant une lactonase</i>	42
2.2. <i>Analyse de la virulence d'une souche privée d'AHLs dans un modèle</i> <i>cellulaire</i>	43
2.3. <i>conclusion</i>	43
2.4. <i>Perspectives</i>	43
MATERIEL ET METHODES	46
1. MATERIEL.....	46
1.1. <i>Solutions et milieux</i>	46
1.1.1. Solutions d'antibiotiques et autres.....	46
1.1.2. Milieux de culture.....	46
1.1.2.1. Milieu riche pour <i>E. coli</i> : milieu LB (Luria Bertani).....	46
1.1.2.2. Milieu riche pour <i>Brucella</i> : milieu 2YT.....	46
1.2. <i>Souches bactériennes et plasmides</i>	47
1.2.1. Souches bactériennes.....	47
1.2.2. Plasmides.....	47
2. METHODES.....	48
2.1. <i>Techniques relatives à l'ADN</i>	48
2.1.1. Extraction d'ADN plasmidique.....	48
2.1.2. Restriction d'ADN plasmidique purifié.....	48
2.1.2.1. Restriction diagnostique.....	48
2.1.2.2. Restriction préparative.....	48
2.1.3. Electrophorèse en gel d'agarose.....	49
2.1.4. Extraction d'ADN d'un gel d'agarose.....	49
2.1.5. Réaction de ligation.....	50
2.1.6. Polymérase Chain Reaction.....	50
2.2. <i>La conjugaison bactérienne</i>	51

2.3. Transformation bactérienne.....	52
2.4. Techniques relatives aux protéines : analyse de l'expression d'une protéine par Western blot.....	52
2.4.1. Préparation d'extraits protéiques totaux.....	52
2.4.2. La technique du Western blot.....	53
2.4.2.1. Electrophorèse en gel polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE).....	53
2.4.2.2. Préparation et chargement des échantillons.....	54
2.4.2.3. Transfert sur membrane de nitrocellulose.....	54
2.4.2.4. Immunodétection.....	54
2.4.2.4.1. Etape de « Blocking ».....	55
2.4.2.4.2. Mise en présence de l'anticorps primaire.....	55
2.4.2.4.3. Mise en présence de l'anticorps secondaire.....	55
2.4.2.4.4. Révélation.....	55
2.5. Méthodes de détection de la production de N-acyl homosérine lactones.....	56
2.5.1. Cocultures.....	56
2.5.2. Extraction d'AHLs chez Brucella.....	56
2.6. Techniques d'infection lors d'analyse de virulence.....	57
2.7. Analyse de l'activité de promoteur.....	58

BIBLIOGRAPHIE.....	60
---------------------------	-----------

Table des abréviations.

Abrév.	Nom complet	Description sommaire
2YT	2 x Yeast Extract	Milieu de culture bactérien adapté à <i>Brucella</i>
ACP	Acyl carrier protein	Protéine porteuse de chaîne acyle
AHL	Acyle-homosérine lactone	Molécule signal du quorum sensing chez les bactéries à Gram négatifs
AI	Auto-inducteur	Molécule signal dans le quorum sensing
<i>aph</i>		Cassette de résistance à la kanamycine
<i>bla</i>	β -lactamase	Gène de résistance à l'ampicilline
<i>cat</i>	Cm-acétyltransférase	Gène de résistance au chloramphénicol
CDS	Coding sequence	Séquence codante d'un gène
Cm	Chloramphénicol	Antibiotique
DO	Densité optique	Mesure du nombre de bactéries
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside	Inducteur du <i>plac</i> par répression de LacI
Kan	Kanamycine	Antibiotique
Kpb	Kilo paire de base	10 ³ paires de bases nucléotidiques
LB	Luria Bertani	Milieu de culture bactérien
LPA	Acide lysophosphatidique	Composant membranaire
LPS	Lipopolysaccharide	Feuillet lipidique externe de la membrane externe des bactéries à Gram négatifs
Mb	Mégabase	10 ⁶ paires de bases nucléotidiques
MOI	Multiplicity of infection	Calcul du nombre de bactéries/cellules hôtes
Nal	Acide nalidixique	Antibiotique
ORF	Open reading frame	Phase ouverte de lecture
pb	Paire de base	Deux nucléotides appariés
PBS	Phosphate buffer saline	Solution phosphatée saline à osmolarité physiologique
PCR	Polymerase chain reaction	Technique permettant l'amplification de fragment d'ADN
QS	Quorum sensing	Phénomène de communication bactérienne
RLU	Relative Light Unit	Unité de luminescence
rpm	Rotation par minute	Unité de centrifugation
RPMI		Milieu de culture
SAM	S-adénosyl méthionine	Donneur universel de méthionine
Tet	Tétracycline	Antibiotique
TLC	Thin Layer Chromatography	Méthode utilisée pour détecter les AHLs
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β D-galactopyranoside	Produit utilisé dans les tests blanc-bleu

"The only explanation I can think of is that a multitude of bacteria are stronger than a few, and thus by union are able to overcome obstacles too great for the few"

Erwin F. Smith

"If a bacteria think that she's alone in the world, she will not produce toxin and will not form biofilm"

Bonnie L. Bassler

INTRODUCTION

INTRODUCTION



Figure 1. Utilisation de protéases par la bactérie en vue d'obtenir des nutriments.
Reproduit de (Redfield, 2002).

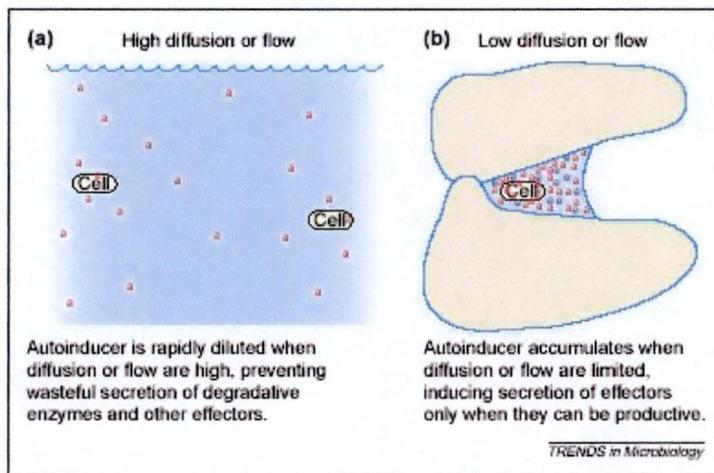


Figure 2. Utilisation des phéromones comme senseur de diffusion.
Reproduit de (Redfield, 2002).

INTRODUCTION

1. Avant-propos

Il y a plusieurs millions d'années l'homme préhistorique découvrait ce qui est aujourd'hui devenu la devise de la Belgique : "l'Union fait la Force". Mais les bactéries l'ont fait bien avant lui. La simple action de se regrouper a permis aux bactéries d'effectuer des tâches extraordinaires qu'il aurait été impossible à réaliser pour l'une d'entre elles isolée. Pour faciliter la coordination des efforts du groupe, un système de communication s'est développé. Il repose sur un langage dont les mots correspondent à des signaux chimiques diffusibles. Ce phénomène de communication bactérienne a été baptisé le phénomène de "Quorum Sensing" (QS).

2. Le Quorum Sensing

2.1. Définition

Le phénomène de QS est classiquement défini comme un système de régulation dépendant de la densité cellulaire (Fuqua *et al.*, 1994). Les bactéries produisent des molécules de faible poids moléculaire que l'on appelle phéromones. Ces molécules diffusent à travers la membrane et s'accumulent dans le milieu environnant au fur et à mesure que le nombre de bactéries augmente. La concentration en phéromone permet 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 peuvent ainsi générer une réponse coordonnée.

Une nouvelle vision du QS a été apportée par Rosemary J. Redfield (Redfield, 2002): le QS n'est-il pas un simple effet de "diffusion sensing"? Comme la bactérie est incapable de faire de la phagocytose, elle libère des enzymes afin de dégrader les macromolécules en petites unités qui peuvent dès lors être internalisées (figure 1). Certaines bactéries sont aussi capables d'augmenter la disponibilité en nutriments en sécrétant des sidérophores, des antibiotiques,... Tout ceci peut être bénéfique pour la bactérie uniquement lorsque la diffusion et le taux de renouvellement du milieu extracellulaire sont limités (figure 2). Ainsi les molécules sécrétées et les produits utilisables restent aux alentours de la bactérie.

La diffusion et le flux dans l'environnement naturel peuvent être extrêmement imprévisibles (un sol avant et après une averse par exemple). Les bactéries capables de produire et de détecter les phéromones peuvent dès lors s'adapter rapidement à ces changements. En effet, ces phéromones régulent entre autres la production de substances qui sont sécrétées dans le milieu extracellulaire : des protéases chez *Erwinia carotovora* (Jones *et al.*, 1993), des antibiotiques et des rhamnolipides chez *Pseudomonas aeruginosa* (Pearson *et al.*, 1997) ou encore des sidérophores chez *Burkholderia cepacia* (Darling *et al.*, 1998).

Le but de ce travail n'est pas de démontrer laquelle de ces deux visions du QS est la meilleure. Néanmoins, la vision du QS comme senseur de la densité cellulaire et comme outil de communication étant la plus ancienne et la plus répandue, elle sera la philosophie dont sera imprégné ce mémoire.

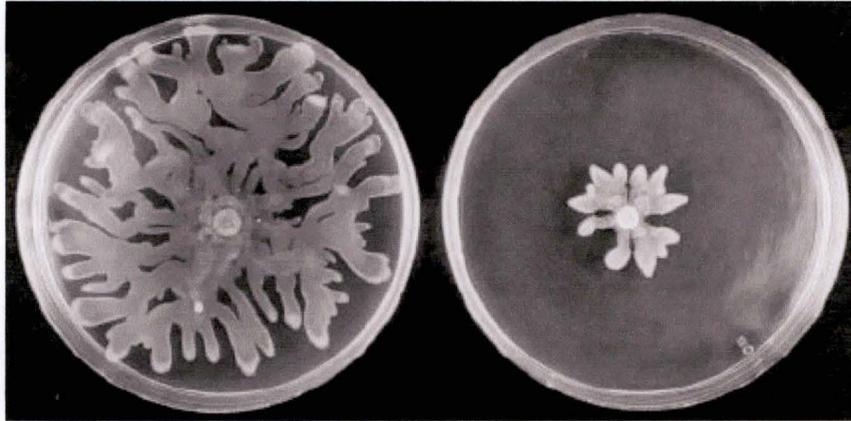


Figure 3. Illustration du phénomène de swarming chez *Pseudomonas aeruginosa*.
Reproduit de (Reimann *et al.*, 2002)

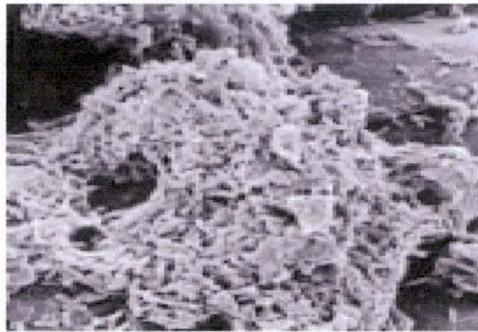
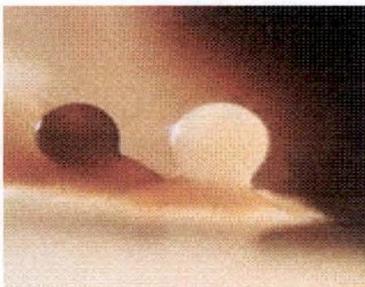


Figure 4. Biofilm formé par *Pseudomonas aeruginosa* dans les poumons.
Reproduit de : <http://www.nature.com/nature/journal/v413/n6858/images/413860aa.0.jpg>

a)



b)

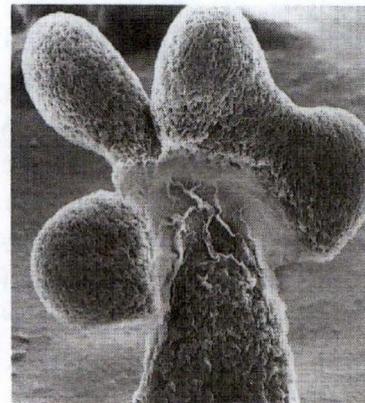


Figure 5. a) Photographie d'un corps fructifère visible à l'œil nu. b) Micrographie électronique d'un corps fructifère de *Myxococcus xanthus*. Sa taille est d'environ 80 μm .
Reproduit de N.A. CAMPBELL, Biology.

2.2. Exemples concrets

Les avantages d'une communication bactérienne sont nombreux, en voici quelques exemples :

- Chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, le phénomène de QS lui permet d'estimer la densité de population dans l'environnement qu'elle colonise et d'exprimer ses facteurs de virulence à haute densité de population uniquement. Le swarming¹ (Reimann *et al.*, 2002) (figure 3), la production d'élastase et de rhamnolipides (Pearson *et al.*, 1997) sont d'autres facteurs régulés par le QS chez *Pseudomonas aeruginosa*.

- La capacité de coordonner une réponse permet également de nouveaux modes de croissance pour certaines bactéries:
 - La formation de biofilms chez *Pseudomonas aeruginosa* (figure 4). Un biofilm est une matrice polysaccharidique formée et colonisée par des bactéries d'une même espèce ou d'espèces différentes (Winans and Bassler, 2002). Des analyses microscopiques ont révélé que ces structures n'étaient pas un simple amas de cellules emprisonnées dans une matrice exopolysaccharidique mais qu'on y trouvait entre autres des canaux aqueux permettant l'hydratation des bactéries, la distribution de nutriments et l'évacuation des déchets. De plus, la structure du biofilm en château fort protège les bactéries contre les antibiotiques et contre la réponse immunitaire de l'hôte infecté.

 - La sporulation en corps fructifères chez *Myxococcus xanthus* (Winans and Bassler, 2002) (figure 5). Ceci offre une chance de survie à ces bactéries dans un environnement qui se détériore. En effet, dans un milieu riche, les bactéries individuelles 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. Les corps fructifères permettent de disséminer des spores sur un rayon assez large, spores qui redonneront des bactéries lorsque les conditions environnementales seront propices à leur développement.

¹ Swarming : Déplacement en masse d'une population bactérienne dans une direction.

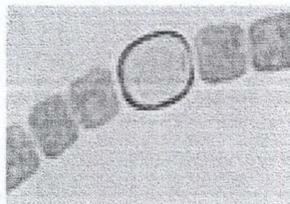


Figure 6. Photographie d'un hétérocyste entouré de cellules phototrophes chez une cyanobactérie.

Reproduit de : <http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Prokaryotes/Nostocaceae/Anabaena10.html>

- Pour les bactéries de l'espèce *Anabaena*, le développement d'un langage a permis de répartir les tâches dans la population bactérienne (Winans and Bassler, 2002). Ces cyanobactéries vivent en formant des filaments de cellules phototrophes parsemés d'hétérocystes dont la seule fonction est de fixer l'azote (figure 6). Cet azote est ensuite partagé aux autres cellules qui, en contrepartie, fournissent aux hétérocystes les éléments nutritifs dont ils ont besoin pour survivre.
- L'exemple le plus étudié de communication bactérienne est probablement la production de lumière par *Vibrio fischeri* (Nealson, 1977). Lorsqu'un seuil de densité de population est atteint, les bactéries produisent de la lumière. Ce phénomène permet à *V. fischeri* de développer une vie symbiotique avec certains poissons marins et calamars en colonisant l'organe lumineux de ces derniers. La bactérie a dès lors accès à une niche écologique exclusive et l'organisme marin utilise cette lumière pour attirer ses proies ou effrayer ses prédateurs.

Les scientifiques ont longtemps pensé que le QS n'était réservé qu'à l'accomplissement de fonctions très spécialisées chez quelques rares bactéries. Il apparaît aujourd'hui que la plupart des bactéries possèdent au minimum un système de QS impliqué dans diverses fonctions biologiques.

2.3. Importance de l'étude du quorum sensing

L'étude de la communication au sein du monde bactérien apporte, outre un accroissement de la connaissance scientifique, une foule d'informations qui pourront être utilisées dans la lutte contre les bactéries pathogènes. En effet, en comprenant les mécanismes impliqués dans le phénomène du QS, il sera possible de mettre au point des outils capables de perturber les bactéries par inhibition de la synthèse des signaux de communication ou par destruction pure et simple de ceux-ci.

Mais une fois de plus l'homme ne cherche qu'à reproduire ce que la nature a déjà inventé. Dans le domaine de la dégradation des molécules signal, l'espèce bactérienne *Bacillus*, par exemple, produit une enzyme, une lactonase pour être plus précis, dont la fonction est de cliver les molécules signal les rendant de la sorte inactives (Dong *et al.*, 2002). Concernant l'inhibition de la communication, l'algue *Delisea pulchra* se protège des attaques bactériennes en sécrétant des molécules capables d'induire chez les bactéries la dégradation des régulateurs transcriptionnels du QS (Hentzer and Givskov, 2003).

Ces deux cas de figure ont déjà trouvés des applications:

- Le phénomène de résistance aux antibiotiques par un nombre croissant de bactéries pathogènes est une menace réelle et une alternative serait d'utiliser ces molécules perturbatrices du QS. Le but ne serait plus d'éliminer les pathogènes à l'aide de molécules chimiques mais bien de leur faire croire qu'ils sont en nombre insuffisant pour envahir l'hôte, laissant ainsi plus de temps à l'organisme pour mettre en place un système de défense adéquat. Le développement de résistance par sélection naturelle sera dès lors plus lent.

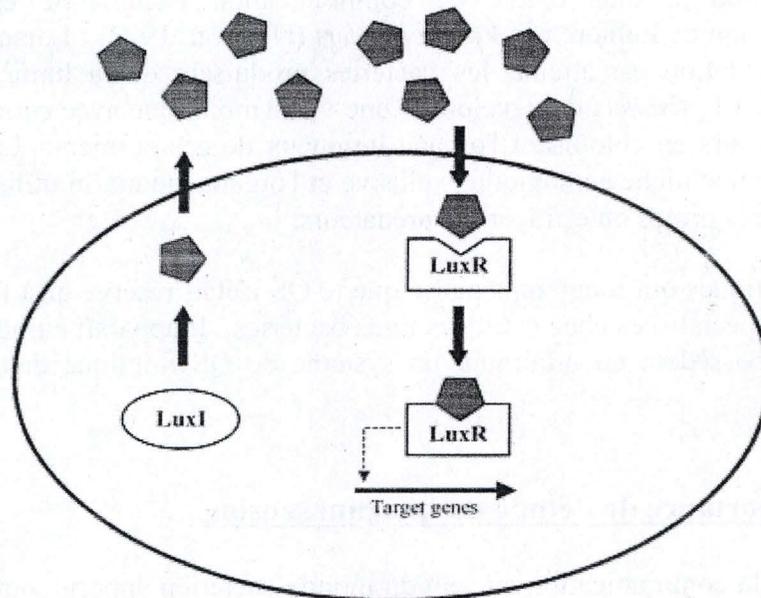


Figure 7. Le phénomène de QS chez les bactéries Gram négatives. LuxI, la synthétase. LuxR le régulateur transcriptionnel. L'AHL est représenté par les pentagones rouges.
Reproduit de (Winans and Bassler, 2002).

- L'utilisation de gène ^{QS} codant pour des lactonases au sein d'espèces végétales permettrait de limiter les dégâts subits dans certaines cultures en offrant au végétal une résistance à son espèce pathogène (Dong *et al.*, 2001).

Mais une compréhension globale du phénomène de QS apporte déjà son lot d'applications:

- Dans le domaine agroalimentaire, la mise au point de biosenseurs capables de détecter la présence de molécules signal permet de déceler rapidement une contamination par une espèce bactérienne dans une denrée alimentaire.
- En influant sur la communication bactérienne il sera possible d'optimiser la production d'antibiotiques en fermenteur par certaines souches bactériennes. Il ne faudra plus attendre qu'une haute densité cellulaire soit atteinte avant d'obtenir un début de production.

Ce petit aperçu pratique étant terminé, penchons nous à présent sur ce phénomène extraordinaire qu'est la communication bactérienne. Le terme auto-inducteur, abrégé AI, va être par la suite souvent utilisé. Ce terme correspond au type de molécule signal employé dans la communication bactérienne et sera défini plus précisément au chapitre 2.3.2.

2.4. Les mots de la communication bactérienne

A ce jour quatre grands systèmes de communication basés sur la nature des phéromones produites ont été découverts dans le monde bactérien : la communication via les auto-inducteurs 1 (AI-1) : un oligo-peptide (Dunny and Leonard, 1997) (figure 9) ou une acyle-homosérine lactone (AHL) (Eberhard *et al.*, 1981) (figure 7), via un auto-inducteur 2 (AI-2) (Surette *et al.*, 1999) (figure 10 et 11) et via un auto-inducteur 3 (AI-3) (Sperandio *et al.*, 2003). Ces quatre systèmes reposent sur un canevas commun, seule la nature des composants diffère d'un système à l'autre. Ce canevas peut être résumé comme suit: la bactérie produit et libère une phéromone qui va s'accumuler dans le milieu extracellulaire. La bactérie perçoit ce signal et lorsqu'une concentration minimale est atteinte, la bactérie répond au signal en modifiant l'expression de gènes cibles.

Penchons nous un instant sur ces différents systèmes de communication.

2.4.1. La communication via une acyle-homosérine lactone (AHL)

Le signal utilisé dans ce type de communication est l'AHL, aussi appelé auto-inducteur 1 (AI-1). Ce système n'a été observé jusqu'à présent que chez les bactéries à Gram négatifs. L'organisme modèle de ce mode de communication, illustré à la figure 7, est *Vibrio fischeri* (Eberhard *et al.*, 1981). Deux protéines contrôlent le phénomène de QS: une protéine LuxI, qui est une synthétase d'AHLs (pentagones rouges) et une protéine LuxR, qui est un régulateur transcriptionnel appartenant à la famille des régulateurs transcriptionnels possédant un domaine de liaison à l'AHL et un domaine de liaison à l'ADN en hélix-turn-hélix (HTH). Les AHLs produites par la synthétase vont diffuser au travers de la membrane et s'accumuler dans le milieu extracellulaire. La protéine LuxR se lie à l'AHL lorsque le seuil critique en signal est atteint. Le complexe LuxR-AHL va alors chez *Vibrio fischeri* se lier au promoteur de gènes cibles de la luminescence et activer leur transcription.

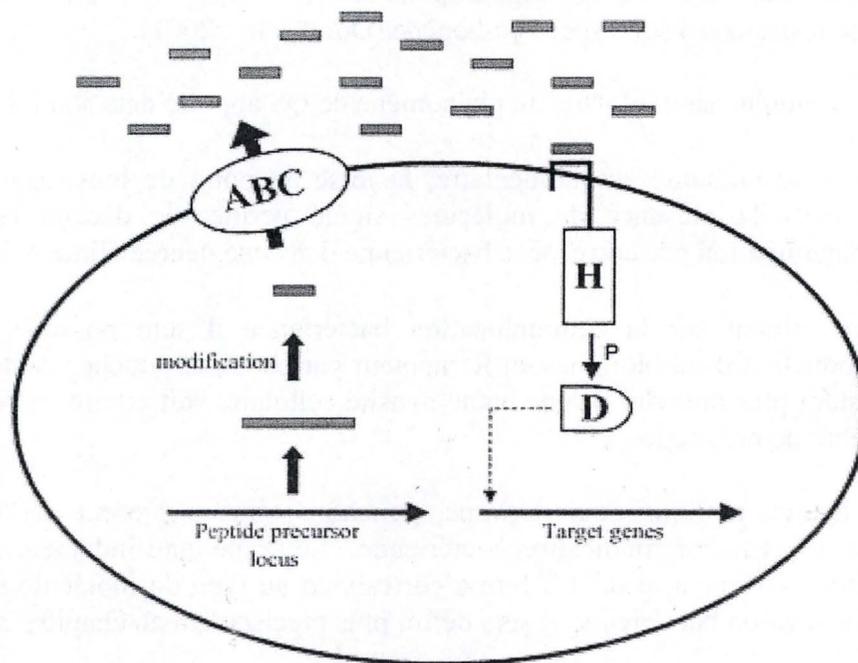


Figure 8. Le système de QS chez les bactéries Gram positives. La grande barre verte représente le précurseur peptidique. Les petites barres vertes représentent les oligopeptides matures. "ABC" pour ATP Binding casette. H, le résidu histidine du senseur. D, le résidu aspartate du régulateur de réponse. Reproduit de (Winans and Bassler, 2002).

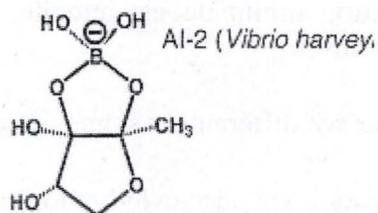


Figure 9. Illustration de la phéromone AI-2 de *Vibrio harveyi*. Reproduit de (Federle and Bassler, 2003)

2.4.2. Définition du terme auto-inducteur

Le terme 'auto-inducteur' a été maintes fois employé au cours de ce chapitre sans jamais être clairement défini. Un auto-inducteur est, comme son nom l'indique, une molécule capable d'induire sa propre production. Dans le cas du phénomène de QS impliquant les AHLs, le gène codant pour la synthétase de l'auto-inducteur est transcrit constitutivement à un niveau basal, occasionnant de la sorte une production basale d'AHL.

La transcription du gène de la synthétase est induite par un homologue du régulateur transcriptionnel LuxR lié à la molécule signal. Lorsque la population bactérienne augmente, la quantité d'AHL s'accroît inévitablement créant grâce à LuxR un feed-back positif et donc une production accrue de phéromones (figure 8)

2.4.3. La communication via un oligo-peptide

La phéromone signal produite par les bactéries peut être un oligo-peptide. Ce système n'a été observé jusqu'à présent que chez les bactéries à Gram positifs. La transmission du signal est effectuée grâce à un mécanisme de transfert de phosphate basé sur un système à deux composants, comme illustré à la figure 9 (Dunny and Leonard, 1997).

Ce mode de communication a été largement étudié chez *Bacillus subtilis* (figure 9). La synthèse d'un précurseur peptidique (grande barre verte) est suivie d'une modification aboutissant à des oligo-peptides dits "matures" (petites barres vertes). Ces oligo-peptides matures sont exportés de la bactérie via une pompe ABC (ATP binding cassette) et vont s'accumuler dans le milieu extracellulaire. La concentration en oligo-peptides matures augmente avec la densité de population.

Un système de transduction du signal à deux composants est responsable de la détection des oligo-peptides et de la transmission de l'information dans la cellule bactérienne. Cette transduction du signal se déroule via une cascade de phosphorylation (P). Le senseur est composé de deux domaines : un premier capable de "sentir" le peptide et un second domaine, une histidine kinase. Le régulateur est lui aussi composé de deux domaines : le premier recevant un phosphate du domaine histidine kinase du senseur et le second servant de liaison à l'ADN. La cascade de transduction du signal aboutit à la modification de l'expression de gènes responsables de la compétence, de la synthèse d'antibiotique, d'enzymes hydrolytiques,... via l'activation d'un régulateur transcriptionnel appelé ComA (Guillen *et al.*, 1989).

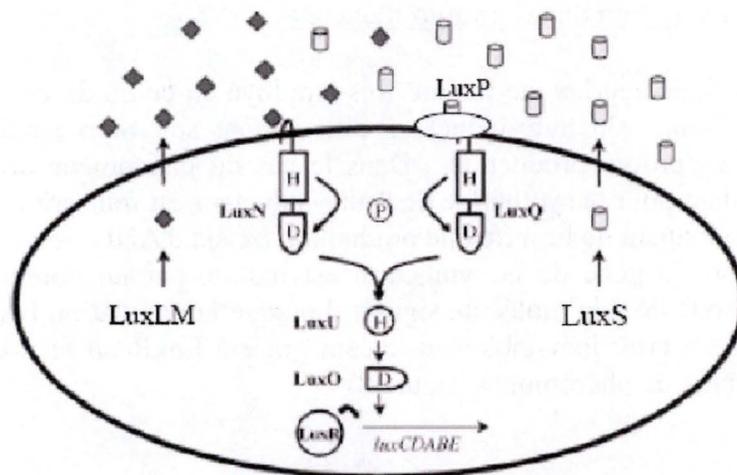


Figure 10. Illustration de la communication via la phéromone AI-2 chez *Vibrio harveyi*. L'AI-2 est représenté sous forme de petit cylindre. LuxS la synthétase de l'AI-2 et LuxPQ son senseur. LuxU et LuxO, les intervenants du phospho-relais. LuxR, un régulateur transcriptionnel.
Adapté de (Miller and Bassler, 2001).

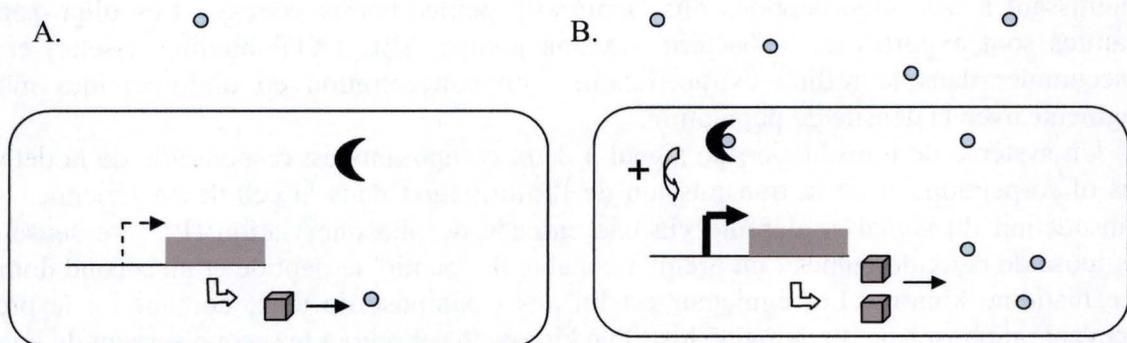


Figure 11. Illustration du phénomène de feed-back positif induit par un auto-inducteur (dans ce cas: une AHL ○) chez une bactérie Gram négative. Le régulateur transcriptionnel homologue à LuxR (☾). Le gène de la synthétase (rectangle gris), la synthétase d'AHL (carré gris).

A: lorsque la population bactérienne est basse.
B: lorsque la population bactérienne est importante.

2.4.4. L'espéranto bactérien: la communication AI-2

La phéromone AI-2 a été identifiée comme étant un furanosyl borate diester (Schauder *et al.*, 2001) (figure 10) et décrite comme un signal universel facilitant la communication inter-espèces. Elle est utilisée par de nombreuses bactéries à Gram positifs et à Gram négatifs, ce qui conforte l'idée que cette molécule signal est impliquée dans la communication entre espèces. Les gènes régulés par l'AI-2 commencent seulement à être identifiés. Il y a par exemple les gènes codant le système de sécrétion de type III chez l'*E.coli* entéro-pathogénique (Sperandio *et al.*, 1999) ou la production de protéases chez *Porphyromonas gingivalis* (Burgess *et al.*, 2002) ou encore l'opéron *virB* chez *Shigella flexneri* (Day and Maurelli, 2001).

Vibrio harveyi, organisme modèle de ce système de communication, utilise l'AI-2 pour savoir si elle est en majorité ou en minorité dans un environnement donné et ainsi adapter son comportement. L'AI-2 produite par la synthétase LuxS s'accumule dans l'environnement et peut être reconnue par le senseur LuxPQ (Schauder *et al.*, 2001) (figure 11).

A faible densité de population, l'absence de phéromones provoque l'auto-phosphorylation du senseur LuxQ. S'en suit une cascade d'évènements de transfert de phosphate aboutissant à la phosphorylation de LuxO. Celui-ci, dans son état phosphorylé, réprime indirectement l'expression de l'opéron *luxCDABE* encodant les protéines nécessaires à la production de lumière.

Lorsque la population atteint un seuil critique, la quantité de phéromones devient suffisante pour se lier au senseur qui dès lors, change son activité kinase en activité phosphatase. Ceci aura pour effet final la déphosphorylation de LuxO, ce qui le rend inactif. Un régulateur transcriptionnel, appelé LuxR, active dès lors la transcription de l'opéron *luxCDABE*. Ce régulateur appartient à la famille des régulateurs transcriptionnels possédant un domaine de liaison à l'ADN en helix-turn-helix (HTH) de type TetR.

2.4.5. La communication via un AI-3 : pour parler entre la bactérie et son hôte

De nombreuses interactions ont été décrites entre procaryotes et eucaryotes, comme la colonisation d'organes lumineux de poissons, la flore intestinale chez les animaux, ... (Sperandio *et al.*, 2003). Ces interactions ne peuvent se faire sans une certaine communication entre la bactérie et son hôte. Il est assez tentant de penser que le QS pourrait être le langage utilisé lors de telles interactions, surtout lorsque l'on sait que le signaling entre cellules eucaryotes est aussi effectué via des hormones. La communication procaryote/eucaryote pourrait donc se baser sur les auto-inducteurs 3 (AI-3) que l'on considère comme des hormones, et sur les hormones de l'hôte. Ainsi, la noradrénaline, une hormone eucaryote dérivée du métabolisme d'acides aminés tout comme les auto-inducteurs bactériens AI-1 et AI-2, induit la croissance bactérienne (Lyte *et al.*, 1996).

L'étude d'*E.coli* entéro-hémorragique par l'équipe de Sperandio a montré qu'un mutant LuxS était incapable de synthétiser son système de sécrétion de type III (Sperandio *et al.*, 2003). Néanmoins, l'ajout d'AI-2 ne restaure pas le phénotype, ce qui laisse penser qu'une autre hormone soit impliquée, à savoir l'AI-3. LuxS est une enzyme métabolique impliquée principalement dans la détoxification de la SAM suite à l'action de méthyltransférase et l'AI-2 est un sous-produit de ce processus. La mutation de LuxS empêche donc la production de l'AI-2 mais inhibe aussi la voie de détoxification qui pourrait être la source du troisième type d'auto-inducteur.

Organisme	Fonctions régulées	Homologue LuxI/LuxR	Signal HSL	Référence
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Transfert conjugatif du plasmide Ti	TraI/TraR	3-oxo-C ₈ -HSL	(Piper <i>et al.</i> , 1993)
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Synthèse d'exoenzymes, d'antibiotiques et de violacéine	CviI/CviR	C ₆ -HSL	(McClellan <i>et al.</i> , 1997)
<i>Erwinia carotovora</i>	Synthèse de facteurs de virulence extracellulaires et d'antibiotique (carbapenem)	ExpI/ExpR	3-oxo-C ₆ -HSL	(Bainton <i>et al.</i> , 1992)
<i>Erwinia stewartii</i>	Synthèse d'exopolysaccharides capsulaires	EsaI/EsaR	3-oxo-C ₆ -HSL	(Beck von Bodman and Farrand, 1995)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sécrétion d'enzymes extracellulaires, formation de biofilm, synthèse de rhamnolipides, de facteurs de virulence	LasI/LasR RhlI/RhlR	3-oxo-C ₁₂ -HSL C ₄ -HSL	(Passador <i>et al.</i> , 1993 ; Latifi <i>et al.</i> , 1996)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Interaction avec le rhizome, nodulation, inhibition de la croissance, expression de gènes de la rhizosphère	RhiI/RhiR CinI/CinR	C ₆ -HSL 3-hydroxy-7-cis-C ₁₄ -HSL	(Lithgow <i>et al.</i> , 2000)
<i>Vibrio fischeri</i>	Bioluminescence	LuxI/LuxR	3-oxo-C ₆ -HSL	(Engebrecht <i>et al.</i> , 1983)
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Agrégation et mobilité	YesI/YesR YtbI/YtbR	3-oxo-C ₆ -HSL C ₈ -HSL	(Atkinson <i>et al.</i> , 1999)

Tableau 1. Aperçu de quelques organismes possédant des homologues LuxI/LuxR: la fonction régulée, les protéines régulatrices et le signal utilisé.

Après avoir survolé ces différents modes de communications au sein du monde bactérien, intéressons nous maintenant plus particulièrement au phénomène de QS chez les bactéries à Gram négatifs.

3. Le phénomène de quorum sensing lié aux acyle-homoserine lactones

Ce mémoire aborde la thématique du QS chez *Brucella melitensis* 16M, une bactérie à Gram négatif chez qui a été détecté des AHLs dont une a été caractérisée chimiquement : il s'agit d'une C₁₂-HSL (Taminiau *et al.*, 2002). C'est pourquoi dans la suite de ce travail seul le système de QS en rapport avec les AHLs sera détaillé.

Le QS chez les bactéries à Gram négatifs 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*. Cette bactérie est devenue le paradigme de la communication via les AHLs. Ce phénomène de QS a par la suite été observé chez de nombreuses bactéries et est impliqué dans différentes fonctions (tableau 1).

Les AHLs étant à la base du système de QS chez de nombreuses bactéries à Gram négatifs, attardons nous un instant sur la description de ces AHLs.

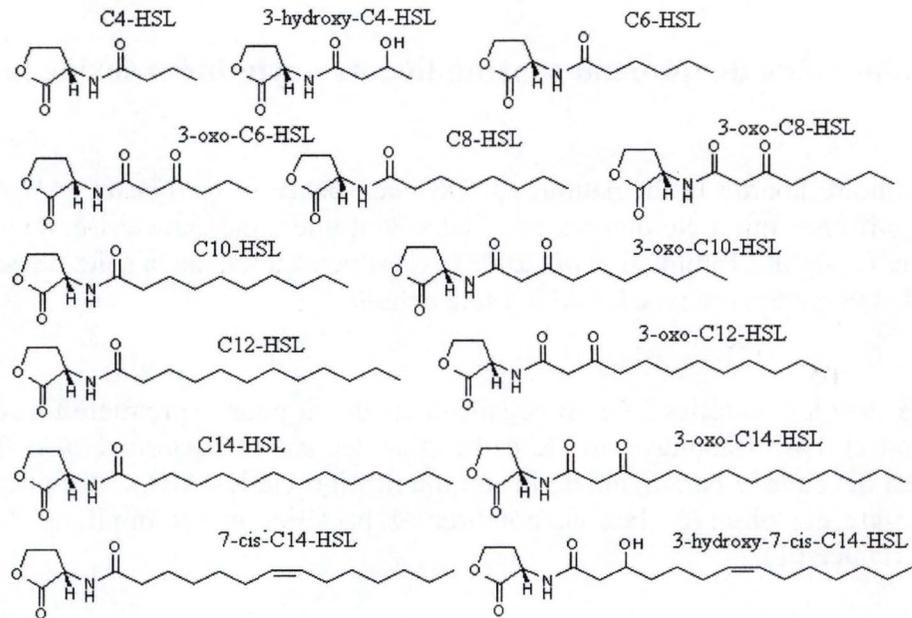


Figure 12. Aperçu de quelques unes des molécules d'AHLs identifiées chez les bactéries Gram négatives.

Reproduit de <http://www.nottingham.ac.uk/quorum/AHLs.htm>

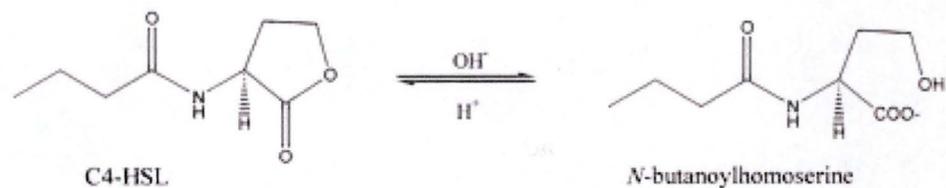


Figure 13. Représentation de la forme fermée (active) et ouverte (inactive) de l'anneau lactone. Reproduit de (Yates *et al.*, 2002).

3.1. Les acyle -homosérine lactones : les mots du système de communication

Dans cette partie, trois thèmes seront abordés : la structure, la stabilité et les rôles secondaires des AHLs.

3.1.1. La structure des AHLs

Les AHLs sont composées d'un anneau homosérine lactone et d'une chaîne acyle dont la longueur diffère selon les AHLs. Cette chaîne acyle est composée de 4 à 18 carbones. Les liaisons dans cette chaîne peuvent être saturées ou non, avec ou sans substituant, en général un hydroxyle (CH-OH) ou un carbonyle (C=O) sur le carbone C3 de la chaîne acyle (figure 12). La longueur de cette chaîne acyle et les substitutions des chaînes latérales sont des déterminants spécifiques pour la reconnaissance par le récepteur (Parsek *et al.*, 1999). Ceci est illustré par l'organisme *Rhizobium leguminosarum*. Celui-ci produit des AHLs dont la C₆-HSL et la 3-hydroxy-7-cis-C₁₄-HSL, reconnues chacune par un régulateur transcriptionnel spécifique, à savoir RhiR et CinR respectivement.

3.1.2. La stabilité des AHLs

L'AHL, comme toutes molécules biologiques, est soumise à un turn-over qui peut être d'origine enzymatique ou non enzymatique. Dans le cas présent, le turn-over résulte de la lyse de l'anneau homosérine lactone. Sont donc distingués deux états : une forme active avec un anneau fermé et une forme inactive avec un anneau ouvert (figure 13). Certains facteurs environnementaux vont influencer l'équilibre entre la forme ouverte ou fermée de l'anneau homosérine lactone, à savoir la température et le pH (Yates *et al.*, 2002). La longueur de la chaîne acyle va elle aussi influencer cet équilibre. Mais les facteurs environnementaux ne sont pas les seuls responsables de la dégradation des AHLs puisqu'à ce jour deux groupes d'enzymes capables d'inactiver les AHLs ont été découvertes : les lactonases (Dong *et al.*, 2001) (figure 14) et les acylases (Leadbetter and Greenberg, 2000) (figure 15).

3.1.2.1. Les facteurs environnementaux

La température et la longueur de la chaîne acyle sont deux facteurs interdépendants. Une température élevée provoque la lyse de l'anneau homosérine lactone, mais il apparaît que les AHLs possédant une longue chaîne acyle sont plus stables à des températures élevées (Yates *et al.*, 2002).

L'effet du pH n'a été observé que dans des conditions s'écartant de la situation physiologique. Dans des conditions alcalines, la plupart des AHLs deviennent instables (Yates *et al.*, 2002). Un environnement alcalin accélère donc le processus de dégradation des AHLs et augmente dès lors le seuil requis pour activer les senseurs de QS.

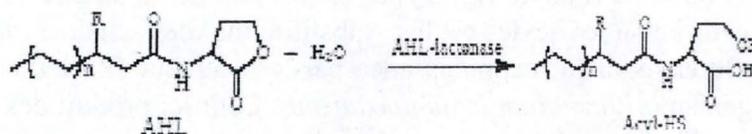


Figure 14. Mécanisme de dégradation de l'AHL par clivage de l'anneau homosérine lactone par une lactonase.
Reproduit de (Wang *et al.*, 2004)

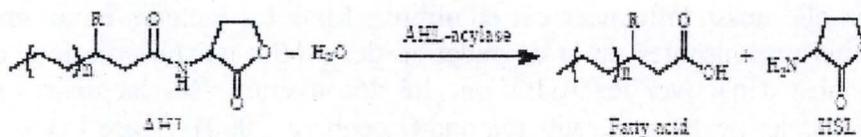


Figure 15. Mécanisme de dégradation de l'AHL par clivage du lien amide de l'homosérine lactone par une acylase.
Reproduit de (Wang *et al.*, 2004)

3.1.2.2. Les lactonases et les acylases

Il semble acquis que certaines bactéries soient capables d'interrompre les "conversations" bactériennes en produisant des enzymes inactivatrices d'AHLs. Deux groupes d'enzymes ont déjà été identifiées : les lactonases et les acylases.

3.1.2.2.1. La lactonase

Le premier gène codant une lactonase a été isolé au sein de l'espèce bactérienne à Gram positif *Bacillus* et a été appelée *aiiA* (Dong *et al.*, 2002). Il est assez curieux de constater qu'une bactérie ne produisant pas d'AHLs dépense de l'énergie à produire des enzymes capables de dégrader de telles molécules. Néanmoins, lorsque dans un environnement donné plusieurs espèces bactériennes sont en compétition, le fait qu'une espèce soit capable d'annihiler le système de communication d'une espèce compétitive lui confère un avantage certain. D'autres bactéries ont par la suite été identifiées comme productrices de lactonases, aussi bien à Gram positif qu'à Gram négatif tel *Agrobacterium tumefaciens* (Matthysse *et al.*, 2000). Mais la production de telles enzymes ne se limite pas au monde bactérien.

La lactonase hydrolyse le lien ester de l'anneau homoserine lactone de l'AHL (figure 14) (Dong *et al.*, 2001). La lactonase possède un spectre d'action très large puisqu'elle est capable d'hydrolyser toutes les sortes d'AHLs (Wang *et al.*, 2004). La longueur de la chaîne acyle et la substitution du 3^{ème} carbone de cette chaîne n'influencent que très faiblement l'activité de l'enzyme. Seul le groupement amide et le groupement cétone du premier carbone de la chaîne acyle semble important pour la reconnaissance enzyme-substrat (Wang *et al.*, 2004).

3.1.2.2.2. L'acylase

Les acylases forment le second groupe d'enzymes capables d'inactiver les AHLs. Identifiées entre autres chez *Variovorax paradoxus*, espèce bactérienne ne produisant elle non plus aucune AHL (Leadbetter and Greenberg, 2000) et les bactéries de l'espèce *Ralstonia* (Lin *et al.*, 2003), les acylases hydrolysent le lien amide de l'AHL (figure 15). Mais ces enzymes n'ont pas pour seul but la destruction des AHLs. En effet *Variovorax paradoxus* utilise les molécules d'AHL comme source d'énergie et d'azote (Leadbetter and Greenberg, 2000)

3.1.3. Les rôles secondaires des AHLs

En plus de se servir des AHLs pour coordonner l'infection d'un organisme, ces molécules signal peuvent interférer avec les systèmes de régulation de l'hôte, comme le système immunitaire et le système circulatoire. Ainsi Telford *et al.* ont mis en évidence l'effet immunodépresseur provoqué par la N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL) sur le système immunitaire de l'hôte (Telford *et al.*, 1998). La 3-oxo-C₁₂-HSL a également un effet vasodilatateur (Lawrence *et al.*, 1999). *Pseudomonas aeruginosa* produit une 3-oxo-C₁₂-HSL qui permettrait à la bactérie, via cet effet vasodilatateur, de maintenir un approvisionnement en nutriments sur le site de l'infection en augmentant localement le débit sanguin (Lawrence *et al.*, 1999).

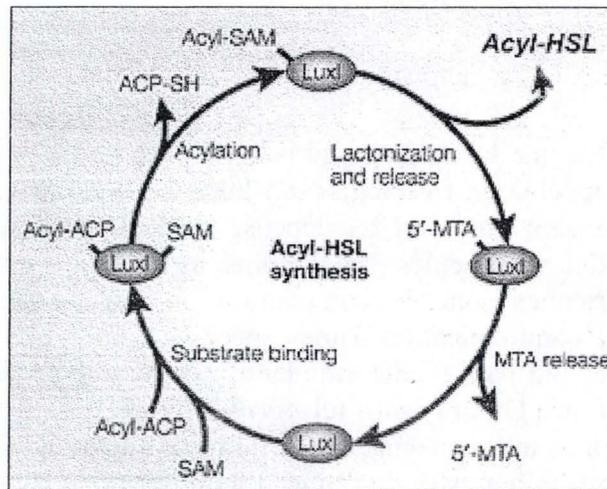


Figure 16. Synthèse de l'acyle-HSL. LuxI, la synthétase. SAM, le S-adénosyl méthionine. Acyl-ACP, l'acyle fixée à l'acyl carrier protein. L'ACP-SH, l'acyl carrier protein sans la chaîne acyle. L'acyle-HSL, l'acyle homosérine lactone. Le 5'-MTA, le 5'-methylthioadenosine.
Reproduit de (Fuqua *et al.*, 2001).

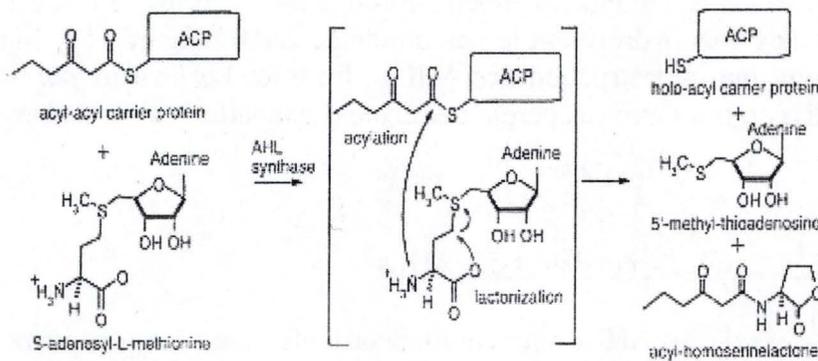


Figure 17. Illustration du mécanisme général de la synthèse d'AHLs.
Reproduit de (Watson *et al.*, 2002).

Après avoir parcouru ces quelques paragraphes sur les AHLs, intéressons nous maintenant aux différentes synthétases responsables de la production des phéromones.

3.2. Les synthétases : les cordes vocales du système de communication

Chez *Vibrio fischeri*, la synthétase responsable de la synthèse de la N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C₆-HSL) est appelée LuxI. Des homologues de LuxI ont été identifiés chez plus de cinquante autres bactéries. D'autres synthétases d'AHLs non similaires à LuxI ont été caractérisées chez certaines bactéries, comme par exemple LuxM chez *Vibrio harveyi* (Bassler *et al.*, 1993).

Les bactéries peuvent produire plus d'une sorte d'AHL. Chacune d'entre elles est généralement impliquée dans des fonctions différentes, ce qui crée une opportunité d'interaction entre différents systèmes de QS dans le même organisme (Blosser-Middleton and Gray, 2001). C'est le cas de *Rhizobium leguminosarium* qui produit au moins six AHLs différentes, à savoir une C₆-HSL, une 3-oxo-C₆-HSL, une C₇-HSL, une C₈-HSL, une 3-oxo-C₈-HSL et une 3-OH-C₁₄-HSL (Blosser-Middleton and Gray, 2001).

Au cours des paragraphes suivants seront décrites successivement les différentes synthétases, à savoir LuxI, LuxM, AinS et HdtS.

3.2.1 La synthèse des AHLs par LuxI

Il a été démontré que la synthèse d'AHL est couplée à la biosynthèse des acides aminés et des acides gras (Val and Cronan, 1998). L'anneau homoserine lactone est dérivé d'un S- adénosyl méthionine (SAM) et la partie acyle provient d'une acyl carrier protein (ACP).

3.2.1.1. La synthèse

Le processus de synthèse des AHLs par la synthétase LuxI se résume comme décrit à la figure 16 (Schaefer *et al.*, 1996). LuxI recrute une acyle-ACP qui va fournir la chaîne acyle et le SAM qui sera le donneur d'amine. La synthétase LuxI va ensuite catalyser la réaction d'acylation qui va permettre de greffer l'acyle sur le SAM et libérer l'ACP. La lactonisation de l'anneau se produit ce qui entraîne la libération de l'AHL. L'étape finale se résume en la libération du 5'-methylthioadenosine (5'-MTA) (Parsek *et al.*, 1999). Une vision plus détaillée de la synthèse est proposée à la figure 17.

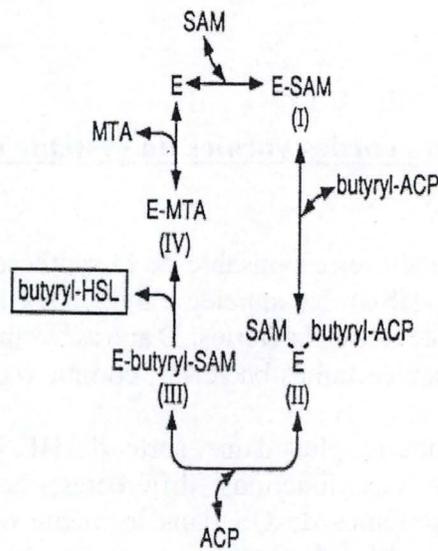


Figure 18. Modèle de la synthèse d'AHL ici illustré pour la synthèse de butyryl-HSL. E pour la synthétase. SAM, le S-adenosyl méthionine. Butyryl-ACP, l'acyle fixée à l'acyl carrier protein. Le MTA, le 5'-methylthioadenosine. Reproduit de (Parsek *et al.*, 1999).

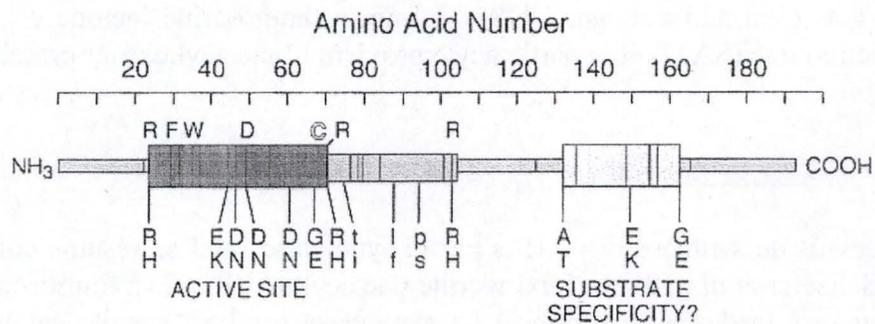


Figure 19. Diagramme du poly-peptide LuxI. En rouge le site actif. En orange une zone importante pour la conformation du site actif. En jaune, le site de fixation spécifique du substrat. Reproduit de (Hanzelka *et al.*, 1997).

3.2.1.2. L'interaction enzyme-substrat

Un premier modèle présuppose que l'enzyme fixe en premier lieu l'acyle-ACP via la formation d'un lien thioester aboutissant de la sorte à un intermédiaire enzyme/acyle-ACP. La SAM se fixerait au complexe par une attaque nucléophile. Ce modèle soutient que l'acyle-ACP se fixe à l'enzyme via un résidu cystéine ou sérine. Cependant, la mutation de tels résidus ne perturbe en rien la synthèse des AHLs (Hanzelka *et al.*, 1997). Le second modèle propose que l'enzyme fixe d'abord la SAM et ensuite l'ACP (Parsek *et al.*, 1999). C'est ce dernier modèle, illustré à la figure 18, qui est actuellement favorisé.

Toutes les réactions impliquées dans la reconnaissance spécifique enzyme/substrat sont loin d'être connues. Cependant des expériences de mutagenèses dirigées et aléatoires ont permis de situer des résidus importants dans les interactions de l'enzyme avec le substrat (Hanzelka *et al.*, 1997) (figure 19). Les lettres situées au-dessus du diagramme correspondent aux premières lettres des acides aminés conservés à 100% chez douze homologues LuxI. Les lettres situées au-dessous du diagramme correspondent aux mutations effectuées. La zone rouge contient la majorité des acides aminés extrêmement bien conservés et est proposée comme étant le site actif de l'enzyme. La zone orange est définie comme étant une zone importante pour la conformation du site actif. La zone jaune contient beaucoup moins de résidus conservés mais pourrait bien être le site de fixation du substrat. Ceci serait dû au fait que les différents homologues LuxI lient des chaînes acyles de longueurs différentes.

3.2.2. LuxM et AinS, la seconde famille de synthétase

Une seconde famille de synthétase d'AHLs a été identifiée chez deux espèces du genre *Vibrio*, il s'agit de LuxM (ou LuxLM) chez *Vibrio harveyi* et AinS chez *Vibrio fisheri*. Il s'agit bien là d'une nouvelle famille car LuxM ne présente aucune homologie de séquence avec LuxI et les autres synthétases mais bien avec AinS (Gilson *et al.*, 1995).

3.2.2.1. LuxM chez *Vibrio harveyi*

Vibrio harveyi est une bactérie marine libre chez qui le contrôle des gènes de luminescence se fait grâce au QS. La régulation de l'opéron *luxCDABE* est un peu particulière puisqu'elle fait intervenir deux types de signaux qui fonctionnent en parallèle (Bassler *et al.*, 1993). Premièrement, comme la plupart des bactéries à Gram négatif, *V. harveyi* communique via une phéromone de type AHL : la N-(3-hydroxybutanoyl)-L-homoserine lactone (3-hydroxy-C₄-HSL). Deuxièmement, les gènes de luminescence de *V. harveyi* sont également régulés par une AI-2. La production de 3-hydroxy-C₄-HSL ne dépend pas d'une protéine type LuxI mais bien de LuxL et LuxM (LuxLM). Bien que le mode d'action de cette enzyme ne soit pas connu, un mutant de *V. harveyi* dans ces gènes ne produit plus d'AHLs.

3.2.2.2. AinS chez *Vibrio fischeri*

La production de 3-oxo-C₆-HSL chez *V. fischeri* est dirigée par LuxI et permet la régulation de l'opéron *luxCDABE* via le régulateur LuxR (Gilson *et al.*, 1995). Une seconde phéromone, la N-(3-oxooctanoyl)-L-homoserine lactone (C₈-HSL), peut elle aussi réguler cet opéron via LuxR. Cependant, un mutant LuxI est toujours capable de produire la C₈-HSL. Il a été montré que la synthétase responsable de la production de cette C₈-HSL est AinS (Gilson *et al.*, 1995). AinS ne présente aucune homologie protéique avec LuxI, mais bien avec LuxM de *V. harveyi*.

AinS est capable, comme LuxI, de produire son AHL à partir de SAM et d'acyle-ACP (précisément un octanoyl-ACP) (Hanzelka *et al.*, 1999). Cependant, AinS est aussi capable d'utiliser un acyle-CoA (un octanoyl-CoA) comme substrat et ce de manière relativement efficace. Comme LuxI est incapable d'utiliser cet octanoyl-CoA, AinS pourrait, chez *V. fischeri*, synthétiser la C₈-HSL dans un environnement où LuxI est incapable de synthétiser la 3-oxo-C₆-HSL. Cette hypothèse pourrait en partie expliquer la présence de deux familles différentes de synthétase d'AHLs dans un même organisme.

3.2.3. La synthétase putative HdtS

L'équipe de Laue a démontré qu'un gène nommé *hdtS* chez l'organisme *Pseudomonas fluorescens* exprimé chez *E. coli* entraîne la production d'AHLs (Laue *et al.*, 2000). HdtS pourrait donc constituer une nouvelle famille de synthétase d'AHLs.

Pseudomonas fluorescens est une bactérie du sol qui colonise les racines des plantes et est capable, à forte densité de population uniquement, de produire du 2,4-diacetylphloroglucinol, un antifongique puissant. Différentes AHLs ont été caractérisées chez cette bactérie : la N-hexanoyl-L-homoserine lactone (C₆-HSL), la N-decanoyl-L-homoserine lactone (C₁₀-HSL) et la N-(3-hydroxytetranoyl)-L-homoserine lactone (3-hydroxy-C₁₄-HSL), ce qui a donné son nom à la synthétase (H=hexa, D=deca, T=tetradeca, S=synthétase) (Laue *et al.*, 2000).

D'après les résultats d'analyse de séquences, HdtS ne présente pas d'homologie avec les familles de synthétases LuxI et LuxM mais présente des similarités avec des acyle-transférases (Laue *et al.*, 2000), tel PlsC chez *E. coli*. Chez *E. coli*, PlsC catalyse le transfert de chaîne acyle provenant d'un acyle-ACP ou d'un acyle-CoA sur l'acide lysophosphatidique (LPA) pour former l'acide phosphatidique, qui, comme le LPA, est un intermédiaire phospholipidique important dans la synthèse de la membrane cellulaire (Coleman, 1990). HdtS possède deux motifs extrêmement bien conservés chez les acyle-transférases tant eucaryotes que procaryotes. Ces motifs correspondent à des sites de fixation d'acyle-CoA et d'acyle-ACP. HdtS pourrait donc bien être une acyle-transférase qui transfère des chaînes acyles sur un substrat tel la SAM pour générer des AHLs. Il est aussi possible que HdtS serve à synthétiser des substrats requis pour la synthèse des AHLs effectuée elle par une autre enzyme (Laue *et al.*, 2000). Les données actuelles ne permettent pas encore de trancher.

Les synthétases sont donc un des piliers de tout système de communication lié aux AHLs. L'identification de ces "cordes vocales" chez un organisme d'intérêt est une étape clef dans le processus de compréhension du QS chez cet organisme. Mais comment peut-on isoler un gène responsable de la production d'AHLs? Quelle technique permet de détecter cette production de phéromones? Le chapitre ci-après aura pour but de donner quelques éléments de réponse à ces questions.

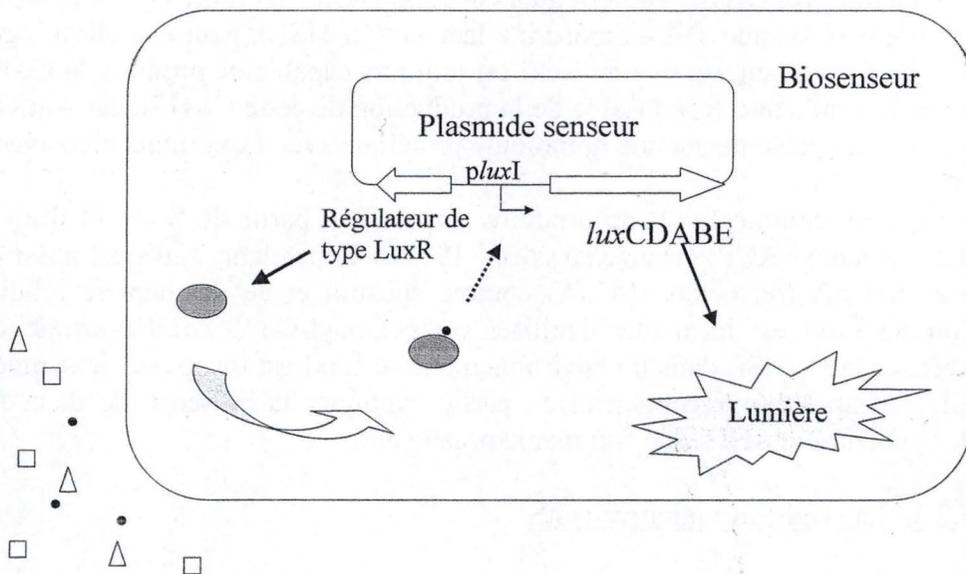


Figure 20. Fonctionnement d'un biosenseur d'AHLs.
 L'organisme biosenseur possède un plasmide senseur composé d'un gène codant un régulateur transcriptionnel (rond gris), un promoteur activable par ce régulateur (*luxI*) et un gène rapporteur, ici l'opéron *luxCDABE*.
 La production de lumière n'aura lieu que lorsque le biosenseur sera mis en présence d'AHLs exogènes (petits ronds noirs).

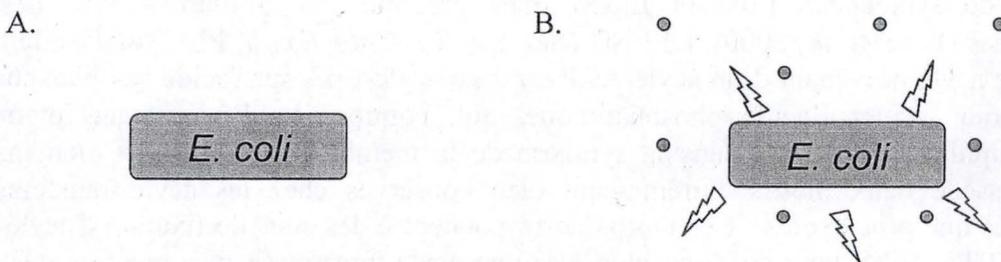


Figure 21. Illustration du fonctionnement d'un biosenseur à AHLs.
 A. Biosenseur en absence d'AHLs : pas de production de lumière.
 B. Biosenseur en présence d'AHLs : production de lumière.

4. Utilisation de biosenseurs spécifiques pour la détection d'acyl-homosérine lactones

4.1. Définition d'un biosenseur

Un biosenseur est un organisme biologique capable de détecter la présence de molécules d'intérêts. Les biosenseurs sont utilisés dans des domaines très divers, comme par exemple la détection de polluants dans un sol, de métaux lourds ou même d'AHLs...

4.2. Les biosenseurs dans le cadre du quorum sensing

Les études du QS ont débutées avec l'analyse de phénotypes facilement observables comme par exemple la bioluminescence. Mais un tel phénotype est un cas particulier de quelques bactéries. Il a donc été nécessaire de développer de nouveaux outils afin d'étudier le phénomène du quorum sensing dans l'ensemble du monde bactérien, outils dont le phénotype est facilement observable. Une porte s'est alors ouverte grâce à la construction de biosenseurs capables de détecter la présence d'AHLs.

Les biosenseurs à AHLs sont donc des souches bactériennes qui ne produisent pas d'AHLs. Ils expriment néanmoins un régulateur transcriptionnel capable de lier les AHLs et d'activer un promoteur régulant l'expression de gènes rapporteurs dont le phénotype est facilement observable, comme la luminescence (figure 20). L'activation de ces rapporteurs ne peut dès lors avoir lieu que lorsque le biosenseur est en présence d'une source exogène d'AHLs (figure 21).

Les AHLs connues à ce jour présentent une chaîne carbonée allant de 4 à 18C. Au vu de cette variabilité, il a été nécessaire de développer différents systèmes de biosenseurs spécifiques à une gamme d'AHLs. Ces différents systèmes offrent ensemble une détection de toutes les AHLs connues (Winson *et al.*, 1998).

Le système biosenseur le plus simple est d'utiliser une souche mutée dans la production d'AHLs et chez qui le QS régule un phénotype facilement observable, comme par exemple la luminescence chez *V. fischeri* (Nealson, 1977). Les autres systèmes se basent sur l'utilisation de plasmide contenant un gène codant un régulateur transcriptionnel et son promoteur cible fusionné à un rapporteur, à savoir l'opéron *luxCDABE* de *Photobacterium luminescens* permettant la production de lumière (Winson *et al.*, 1998) (Swift *et al.*, 1999). Ce système peut être facilement introduit dans une souche d'*E.coli*, très largement utilisée et ne produisant pas d'AHLs.

Avant de passer au phénomène du QS chez *Brucella*, nous consacrerons un chapitre à cette bactérie dont ce mémoire fait sujet.

<i>Brucella sp.</i>	Organisme(s) hôte
<i>Brucella melitensis</i> 16M	petits ruminants
<i>Brucella abortus</i>	bovin
<i>Brucella suis</i>	porc
<i>Brucella canis</i>	chien
<i>Brucella ovis</i>	bélier
<i>Brucella neotomae</i>	rat du désert
<i>Brucella cetacea</i>	cétacés
<i>Brucella pinnipediae</i>	morses, otaries

Tableau 2. Liste des différentes espèces de *Brucellae* connues à ce jour ainsi que leur hôte respectif.

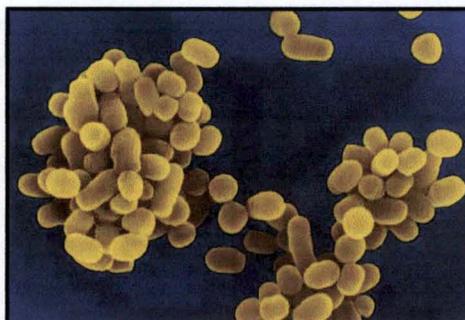


Figure 22. Micrographie électronique à balayage de *Brucella abortus*.
Reproduit de : www.med.se.edu:85/ghaffar/brucel-dk.jpg

5. Le genre *Brucella* et la brucellose

5.1. *Brucella*, bactérie pathogène

5.1.1. Généralités

Brucella sp. est un genre bactérien de la famille des α -protéobactéries. Ce groupe comprend, entre autres, les organismes bactériens tels *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Rickettsia* et *Bartonella*, ayant en commun avec *Brucella* un biotope où les interactions avec la cellule eucaryote sont importantes (Moreno, 1998). Les bactéries du genre *Brucella* ont été remarquées du fait de la maladie infectieuse chronique, appelée brucellose, dont elles sont responsables (Godfroid *et al.*, 2003).

5.1.2. Historique

C'est en 1887 que le médecin-capitaine Bruce, établi alors à Malte, isole l'agent causal d'une fièvre ondulante, appelée "fièvre de Malte" et sévissant sur cette île. Ce n'est que quelques années plus tard que le lait de chèvre est identifié comme source de la contamination de la population. Chez les animaux, c'est un vétérinaire danois, Bang, qui isole le germe responsable de l'avortement enzootique chez les bovidés. Il faudra attendre 1920 pour que le genre *Brucella* soit proposé afin d'y inclure *B. melitensis* et *B. abortus*. Depuis lors, d'autres espèces ont été décrites et nommées en fonction de l'hôte dans laquelle elles ont été isolées et des propriétés métaboliques et antigéniques observées (Corbel, 1984) (tableau 2). *B. melitensis* est la plus invasive (10 bactéries suffisent pour provoquer la maladie chez l'homme) et la plus répandue dans le monde.

5.1.3. Caractéristiques bactériologiques et génétiques

Les *Brucellae* sont des petits coccobacilles dont la taille oscille entre 0,5 à 0,7 μm de diamètre et 0,6 à 1,5 μm de long (figure 22) ne gardant pas la coloration de Gram. Les différentes espèces de *Brucella* sont décrites comme étant asporulées et immobiles, ne possédant pas de capsules (Corbel, 1984).

Concernant les conditions de croissance de *Brucella*, celles-ci sont comprises dans un intervalle de 20 à 40°C, la température idéale étant 37°C. Certaines souches nécessitent en plus une atmosphère contenant 5 à 10% de CO₂. Nonobstant ces conditions idéales, la croissance de *Brucella* reste lente (3 à 4 jours). Les *Brucellae* sont sensibles à la pasteurisation et les conditions de survie en dehors de l'hôte dépendent fortement des conditions environnementales. Ainsi, la bactérie peut survivre plus de 8 mois dans un avorton à l'ombre, 2 à 3 mois dans un sol humide (Godfroid *et al.*, 2003).

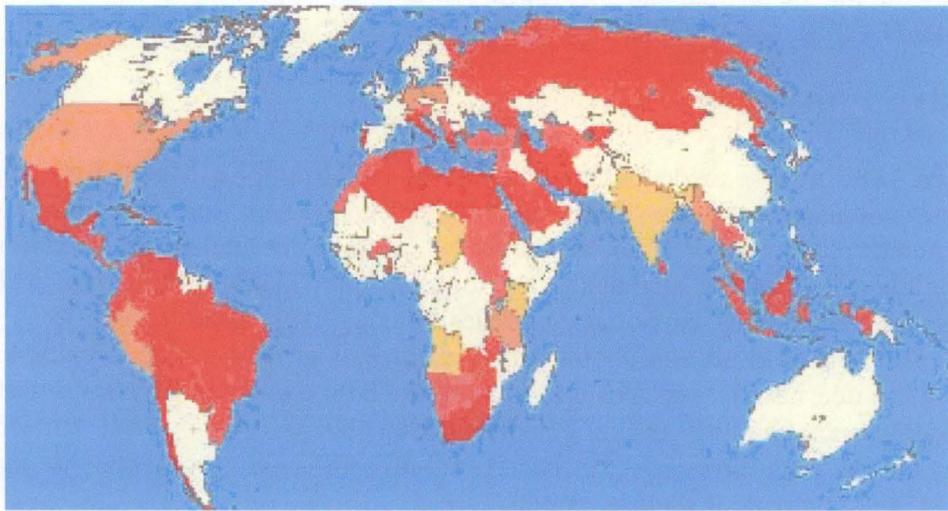


Figure 23. Répartition de la brucellose dans le monde en 1999. Les zones rouges représentent les zones les plus touchées par la maladie.
Reproduit de : www.rvc.ac.uk

La majorité des *Brucellae* présentent un génome de 3,3 Mb distribué en deux chromosomes de 2,12 et 1,18 Mb respectivement et contenant 3 197 ORF's (DeIVecchio *et al.*, 2002). Aucun échange génétique naturel n'a été mis en évidence chez *Brucella* (O'Callaghan and MacMillan, 2001).

5.2. La Brucellose

Le symptôme cardinal de la brucellose chez l'animal est l'avortement chez la femelle et des problèmes de stérilité chez le mâle. Ceci constitue dès lors un problème économique et social très important dans les pays méditerranéens, orientaux, asiatiques et d'Amérique du sud où le domaine agricole constitue une des principales ressources de la population (Godfroid *et al.*, 2003) (figure 23).

L'homme est sensible à toutes les espèces de *Brucella*, ce qui constitue un problème majeur de santé publique. La brucellose humaine est le plus souvent liée à une contamination par *B. melitensis* et est connue sous diverses appellations, tels mélitococcie, fièvre de Malte, fièvre ondulante ou fièvre méditerranéenne. Néanmoins, l'homme n'est pas un hôte spécifique de *B. melitensis*, tout au plus un hôte secondaire ou accidentel. L'homme s'infecte généralement du fait de son contact avec des animaux d'élevages malades ou morts et par ingestion de produits infectés (lait non pasteurisé, produits laitiers crus, ...) (Boschioli *et al.*, 2001), ce qui est assez courant dans les pays en voie de développement. La brucellose humaine est également considérée comme une maladie professionnelle car les risques de contamination sont inhérents à certaines professions (éleveurs, vétérinaires, chercheurs,...).

Il n'y a sans doute pas, mis à part la grippe, d'affection plus variée dans sa symptomatologie que la brucellose: fièvre intermittente, tremblements, douleurs articulaires, céphalées, irritabilité, dépression et sueurs nocturnes font parties des symptômes les plus courants (Sauret and Vilissova, 2002). Actuellement, aucun vaccin n'est disponible pour l'homme, ce qui classe *Brucella* dans les pathogènes de type III (pas de vaccin disponible mais un traitement existe). L'OMS préconise un traitement antibiotique lourd à base de doxycycline et de rifampicine. La brucellose est aussi, de part son rang de pathogène type III, considérée comme une arme de bioterrorisme et son utilisation est strictement réglementée.

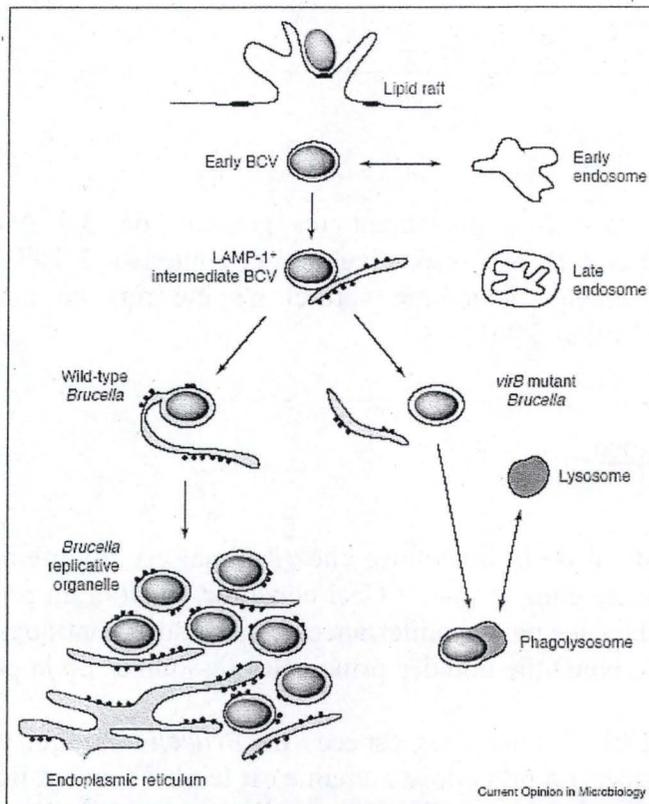


Figure 24. Représentation du trafic intracellulaire de *Brucella*.
Reproduit de (Celli and Gorvel, 2004)

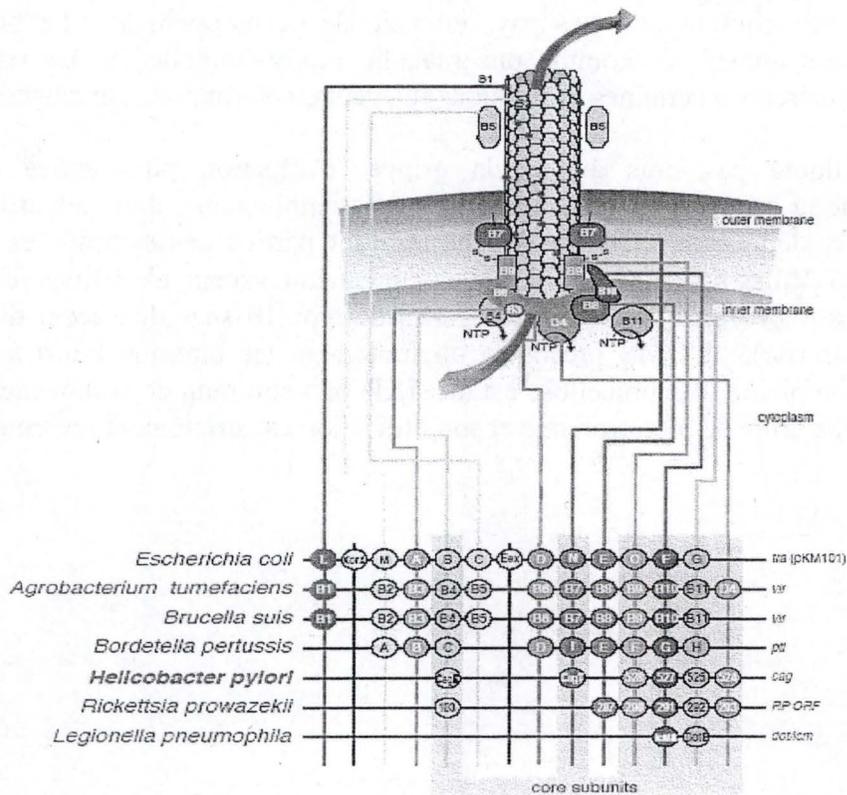


Figure 25. Localisation des différentes protéines constituant le système de sécrétion de type IV chez *A. tumefaciens*.
Reproduit de (Covacci *et al.*, 1999)

5.3. *Brucella*: stratagèmes infectieux

Les *Brucellae* sont capables de pénétrer les muqueuses suite à une inhalation ou une ingestion mais sont également capables de rentrer dans l'hôte suite à une lésion cutanée (Enright *et al.*, 1990). Les bactéries gagnent ensuite les voies lymphatiques où elles pénètrent les cellules phagocytaires (macrophages) ou les neutrophiles. Les *Brucellae* persistent pendant une longue période dans les nœuds lymphatiques qui drainent le site de l'inoculation. Si les bactéries ne sont pas éliminées à ce stade, elles se propagent dans le corps via la voie sanguine, ce qui explique la multitude d'organes infectés par la bactérie.

Les *Brucellae* ont la capacité de pénétrer et de survivre à la fois dans les cellules phagocytaires professionnelles (tels les macrophages) et dans les cellules phagocytaires non professionnelles (tels les trophoblastes) (Detilleux *et al.*, 1990). Cette stratégie lui permet d'échapper de la sorte aux mécanismes extracellulaires de défense de l'hôte, tel que le complément et les anticorps.

Brucella étant un pathogène intracellulaire facultatif, sa survie dépend de sa capacité à transformer l'environnement de la cellule hôte, souvent hostile, en un lieu propice à sa multiplication (Boschioli *et al.*, 2001). Or, la bactérie une fois entrée dans la cellule est prise dans l'engrenage de la voie de dégradation lysosomale. Sa seule issue est le détournement de la voie classique de fusion phago-lysosomale (Celli *et al.*, 2003) (figure 24). Lors de son entrée, la bactérie se trouve enfermée dans un phagosome qui va fusionner avec un endosome précoce. *Brucella* va détourner ce phagosome afin de l'empêcher de fusionner avec les lysosomes, échappant ainsi à une mort certaine. *Brucella* va alors se répliquer dans un compartiment possédant des caractéristiques du réticulum endoplasmique, appelé vacuole de réplication (Celli *et al.*, 2003).

La recherche de mutant incapable de survivre et de se multiplier dans les cellules a débouché sur la découverte chez *Brucella* d'un système de sécrétion de type IV (SSTIV) homologue à l'opéron *virB* d'*A. tumefaciens*. Le SSTIV est un complexe multi-protéiques servant à sécréter des macromolécules, du DNA ou des facteurs de virulence (Christie and Vogel, 2000). Ce complexe de 11 protéines est illustré à la figure 25.

L'opéron *virB* est essentiel pour la survie intracellulaire et la réplication de *B. melitensis*. Une souche délétée dans cet opéron n'est plus capable de se multiplier ni dans les cellules HeLa, ni en macrophage, modèles cellulaires utilisés en laboratoire pour étudier la virulence de *Brucella* (Delrue *et al.*, 2001).

5.4. Le quorum sensing chez *Brucella*

Pour mener à bien son cycle infectieux, *Brucella* doit, comme toutes les bactéries pathogènes, être capable de réguler très précisément la production de ses facteurs de virulence. Le phénomène du QS se présente dès lors comme un facteur potentiellement impliqué dans ce processus de régulation.

5.4.1. Détection d'AHLs chez *Brucella*

Au laboratoire, deux sortes d'AHLs ont été détectées dans le surnageant d'une culture de *Brucella* 16M rapportant ainsi pour la première fois la production d'AHLs chez un pathogène intracellulaire (Taminiau *et al.*, 2002). La première fut caractérisée chimiquement par spectrométrie de masse comme étant une C₁₂-HSL. La seconde molécule ne fut pas caractérisée chimiquement, la quantité extraite ayant été probablement insuffisante, mais serait, suivant un profil TLC, une 3-oxo-C₁₂-HSL.

Il est à noter que *Brucella* produit peu d'AHLs. Dix-huit litres de culture ont en effet été nécessaires afin d'identifier les molécules signal alors que quatre à six litres de cultures sont suffisants pour d'autres bactéries (Taminiau *et al.*, 2002).

5.4.2. Le mystère de la synthétase de *Brucella*

A ce jour, aucun gène codant une synthétase d'AHLs n'a encore été caractérisé chez *Brucella*. La recherche d'éventuels homologues aux synthétases LuxI et LuxLM s'étant avérée infructueuse.

5.4.3. Les régulateurs du QS chez *Brucella*

Deux régulateurs transcriptionnels impliqués dans le QS ont été caractérisés chez *Brucella melitensis*, il s'agit de VjbR et BabR. Tous deux sont des membres de la famille de régulateur LuxR de *Vibrio fischeri*. Il a été montré que VjbR est capable d'activer la transcription de l'opéron *virB* (Delrue, 2002).

MEMOIRE

DU

OBJETS

OBJECTIFS DU MÉMOIRE

L'apparition dans le début des années 90 des premières publications sur le phénomène de "quorum sensing", un système de régulation dépendant de la densité cellulaire, fit évoluer la vision de bactérie isolée vers celle de communauté bactérienne. Chez *Brucella*, deux régulateurs transcriptionnels, VjbR et BabR, appartenant à la famille de LuxR, ainsi que deux acyle-homosérine lactones (AHLs) ont été identifiées. L'une d'entre elles a été caractérisée, il s'agit de la C₁₂-HSL. Cependant, aucune synthétase d'AHLs n'a encore été caractérisée chez *Brucella*.

Récemment, une troisième famille de synthétase a été mise en évidence chez *Pseudomonas fluorescens*. Ceci a ouvert une nouvelle piste dans la recherche de la synthétase de *Brucella*. Dans le génome de *B. melitensis*, un gène présente une homologie de séquence avec le gène *hdtS* identifié chez *P. fluorescens*. Nous disposons au laboratoire d'une souche délétée pour ce gène.

Ce mémoire a pour but de répondre à deux questions: "*Brucella* produit-elle toujours des AHLs lorsque le gène *hdtS* est délété?" et "Les AHLs jouent-elles un rôle lors de l'infection de cellules?"

Durant ce mémoire, nous avons cherché à savoir si HdtS est une synthétase d'AHLs chez *Brucella*. Pour cela, nous avons analysé le phénotype d'un mutant $\Delta hdtS$ sur trois niveaux : la production d'AHLs, la production de composants impliqués dans la formation du système de sécrétion de type IV (contrôlé par le QS) ainsi que la capacité à infecter des cellules. Nous espérons ainsi pouvoir déterminer si ce gène code réellement une synthétase d'AHLs chez *Brucella*.

Afin d'évaluer le rôle des AHLs dans la virulence de *Brucella*, nous avons analysé le phénotype d'une souche produisant une lactonase, enzyme capable de dégrader les AHLs. Si une différence de phénotype entre une souche sauvage et une souche produisant une lactonase est observée, alors nous pourrions suggérer que la présence d'AHLs est importante pour que *Brucella* puisse mener à bien son processus infectieux.

RESULTATS

RESULTATS

1. Etude du rôle de *hdtS* dans le quorum sensing chez *Brucella*

1.1. Création d'un mutant de délétion *hdtS* chez *Brucella*

Un mutant de délétion pour le gène *hdtS* a été réalisé par remplacement de la séquence codante du gène d'intérêt par un gène codant la résistance à un antibiotique (technique du remplacement allélique) (Denoel *et al.*, 1997). La séquence codante du gène *hdtS* a été remplacée par le gène conférant la résistance à la kanamycine (cassette *aph*); ce gène est sous la dépendance de son propre promoteur et contient un terminateur de transcription (C. Deschamps, thèse en cours). La souche ainsi construite a été appelée B. 16M $\Delta hdtS$.

1.2. Etude phénotypique de B. 16M $\Delta hdtS$

1.2.1. Analyse de la production d'acyle-homosérine lactones (AHLs) par la souche B. 16M $\Delta hdtS$

Pour savoir si HdtS est impliquée dans la synthèse d'AHLs chez *Brucella*, la production d'AHLs a été analysée dans la souche B. 16M $\Delta hdtS$ et comparée à celle d'une souche sauvage B. 16M (wt).

Pour ce faire, nous avons utilisé la technique d'extraction d'AHLs. Cette technique a pour but d'isoler du surnageant de culture de bactéries les AHLs en utilisant un solvant organique dans lequel cette molécule est soluble. Un litre de surnageant a été extrait deux fois à l'aide de dichlorométhane puis resuspendu dans de l'éthyle acétate.

Le produit de l'extraction est resuspendu dans 100 μ l d'éthyle acétate afin de concentrer les AHLs. Une fraction de l'extraction des deux souches a été testée avec un biosenseur d'AHLs (*E. coli* JM109 pSB1075) afin de savoir si ces molécules signal étaient présentes dans le surnageant des cultures. La luminescence produite par le biosenseur a été mesurée trois heures plus tard à l'aide d'un luminomètre (Microlumat LB96P, EG&G Berthold), afin de quantifier la RLU (Relative Light Unit). Le contrôle négatif a été réalisé au moyen du solvant dans lequel ont été resuspendus les AHLs et le contrôle positif au moyen de (C_{12} -HSL) synthétique.

Nous avons observé que le contrôle positif était correct et que le mutant $\Delta hdtS$ avait une production d'AHLs légèrement inférieure à la souche sauvage (figure 1).

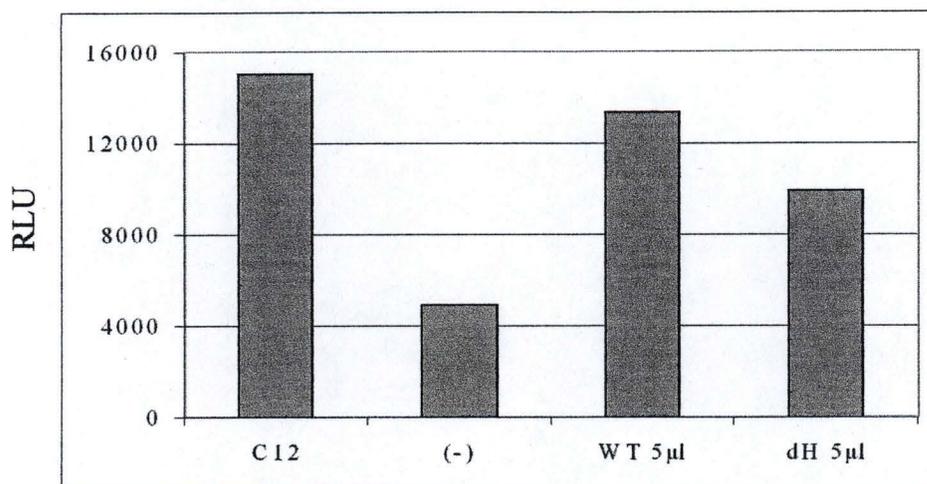


Figure 1. Histogramme illustrant la production d'AHLs par une souche B. 16M $\Delta hdtS$ et wt révélée par le biosenseur *E. coli* JM109 pSB1075.

5 μ l du produit de l'extraction des souches B. 16M $\Delta hdtS$ (dH) et wt (WT) ont été ajoutés à la culture du biosenseur.

Contrôle positif : culture du biosenseur + 2 μ l (C_{12} -HSL) synthétique (10 mM) (C12).

Contrôle négatif : culture du biosenseur + 5 μ l d'éthyle acétate (solvant de resuspension des AHLs).

Brucella produisant peu d'AHLs et la technique d'extraction étant lourde à réaliser dans le cas d'une bactérie pathogène, nous avons décidé d'analyser le phénotype de notre mutant à grâce à d'autres techniques, à savoir l'analyse de la virulence du mutant $\Delta hdtS$ et l'analyse de la production de la protéine VirB8, protéine faisant partie du système de sécrétion de type IV (SSTIV) dans la souche B. 16M $\Delta hdtS$. Nous avons réalisé les expériences sur VirB en nous basant sur le fait que l'ajout d'AHLs à une culture de B. 16M entraîne la répression de l'expression de l'opéron *virB* (Taminiau *et al.*, 2002).

1.2.2. Analyse de la production de la protéine VirB8 dans la souche B. 16M $\Delta hdtS$

Il a été montré au laboratoire que dans une souche sauvage, le profil de production de la protéine VirB8 se présente comme suit: la production est induite en début de phase exponentielle pour atteindre un maximum en fin de phase exponentielle (après 24h de culture) et ensuite décroît progressivement. Cette diminution pourrait être due à une augmentation de la quantité d'AHLs dans le milieu. Si le mutant $\Delta hdtS$ n'est plus capable de synthétiser des AHLs, nous nous attendons à ce que la production de la protéine VirB8 ne soit plus réprimée et continue à être produite après 24h de culture. Dès lors, la production de cette protéine a été analysée par la technique du Western blot dans la souche B. 16M $\Delta hdtS$ et dans la souche wt en utilisant des anticorps dirigés contre la protéine VirB8 (cet anticorps nous a été fourni par Christian Baron, Department of Biology, McMaster University, Hamilton, Canada).

Des cultures liquides de 50 ml de 2YT ont été inoculées à une DO_{600nm} initiale de 0,05 à partir de précultures d'une nuit des souches B. 16M wt et B. 16M $\Delta hdtS$.

Des échantillons de 10 ou 5 ml de ces cultures ont été prélevés après 24h et 48h de croissance en milieu riche puis inactivés 2h à 80°C.

Après centrifugation des échantillons, les culots bactériens ont été lavés dans un tampon PBS, puis concentrés afin d'obtenir une suspension totale d'extraits bactériens dont la DO_{600nm} correspond à 6.

25 μ l de chaque échantillon ont été analysés par Western blot au moyen de l'anticorps anti-virB8. Afin de s'assurer que la même quantité de protéines a été chargée sur le gel pour chaque échantillon, un contrôle de chargement a été réalisé. Celui-ci a consisté à hybrider la membrane du Western blot précédent avec un anticorps dirigé contre la protéine Omp1 dont la production est constitutive chez *Brucella*.

Nous avons observé que dans la souche B. 16M $\Delta hdtS$ la production de la protéine VirB8 est plus élevée par rapport à la souche wt à 24h et est encore plus prononcée à 48h (figure 2).

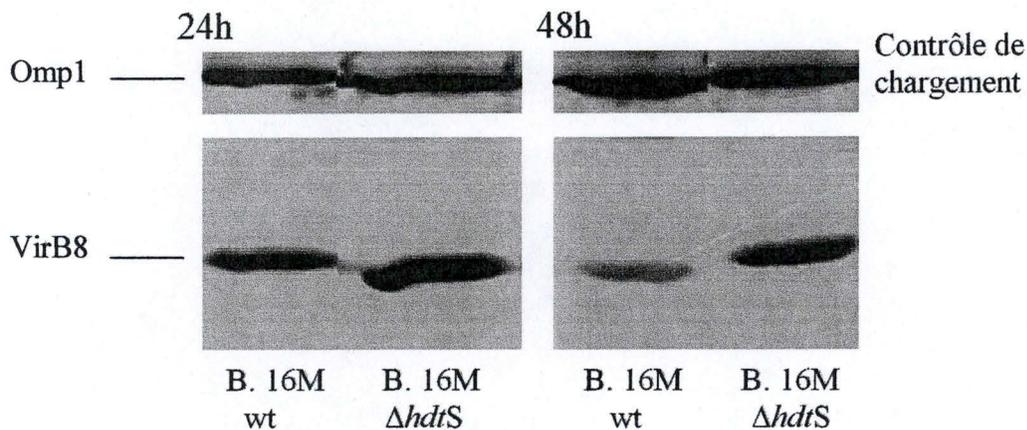


Figure 2. Analyse du taux de production de la protéine VirB8 en western blot sur les extraits bactériens totaux des souches B. 16M $\Delta hdtS$ et wt. La détection de la protéine a été effectuée au moyen d'un anticorps anti-virB8.

Le contrôle de chargement a été réalisé avec des anticorps dirigés contre la protéine Omp1.

Afin de savoir si l'effet observé chez B. 16M $\Delta hdtS$ est bien dû à une absence d'AHLs et donc à une régulation transcriptionnelle, nous avons suivi l'expression de l'opéron *virB* le long de la croissance dans les souches B. 16M wt et $\Delta hdtS$.

1.2.3. Analyse de l'expression de l'opéron *virB* dans la souche B. 16M $\Delta hdtS$

L'activité du promoteur de *virB* (*pvirB*) a été analysée le long de la courbe de croissance dans les souches B. 16M wt et $\Delta hdtS$. Cette analyse a été réalisée en utilisant comme système rapporteur les gènes *luxAB*. Ceux-ci proviennent de l'organisme *Vibrio fischeri* et codent les protéines capables de produire de la lumière en présence d'un substrat, le N-décyl aldéhyde. Nous avons utilisé un plasmide, le pJD27 *pvirB* dans lequel le promoteur de *virB* a été cloné en amont des deux gènes *luxAB* (C. Deschamps, thèse en cours) (figure 3) (le pJD27 a été fourni par le Dr Essenberg, Department of Biochemistry ; Oklahoma State University).

Ce plasmide possède le gène de résistance à l'ampicilline (*bla*) et est répliquatif chez *Brucella* car il possède une origine de répllication compatible avec sa machinerie de répllication.

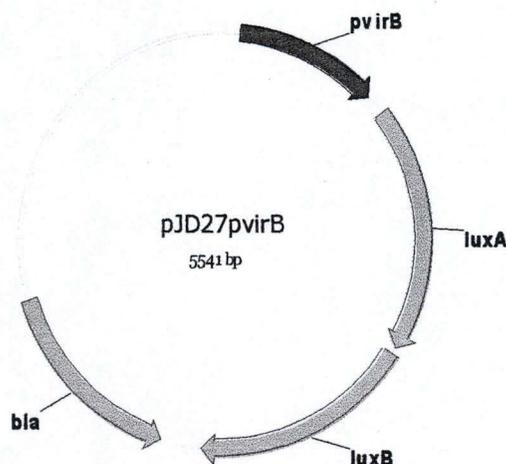


Figure 3. Représentation du plasmide pJD27 *pvirB*. Le promoteur de *virB* est placé en amont des gènes rapporteurs *luxAB*. Ce plasmide possède un gène de résistance à l'ampicilline (*bla*).

Le plasmide pJD27 *pvirB* a été introduit dans les souches B.16M Δ *hdtS* et wt par électroporation. Les nouvelles souches ainsi obtenues ont été appelées B. 16M Δ *hdtS* pJD27 *pvirB* et B. 16M wt pJD27 *pvirB*.

La luminescence émise par les bactéries grâce aux gènes rapporteurs a été quantifiée à l'aide d'un luminomètre (Microlumat LB96P, EG&G Berthold) afin de quantifier la RLU (Relative Light Unit).

Des cultures liquides de 50 ml de 2YT ont été inoculées à une DO_{600nm} initiale de 0,05 à partir de précultures d'une nuit des souches B. 16M Δ *hdtS* pJD27 *pvirB* et B. 16M wt pJD27 *pvirB*.

Des échantillons de 1ml de ces cultures bactériennes ont été prélevés à différentes phases de croissance. Après mesure de la DO_{600nm} , 25 μ l de substrat ont été ajoutés à l'échantillon et 200 μ l ont été utilisés afin de mesurer la luminescence.

L'expérience a été réalisée deux fois en utilisant deux clones indépendants de la souche B.16M Δ *hdtS* pJD27 *pvirB*. Nous observons une activité de *pvirB* supérieure dans le mutant Δ *hdtS* par rapport à la souche wt (figure 4).

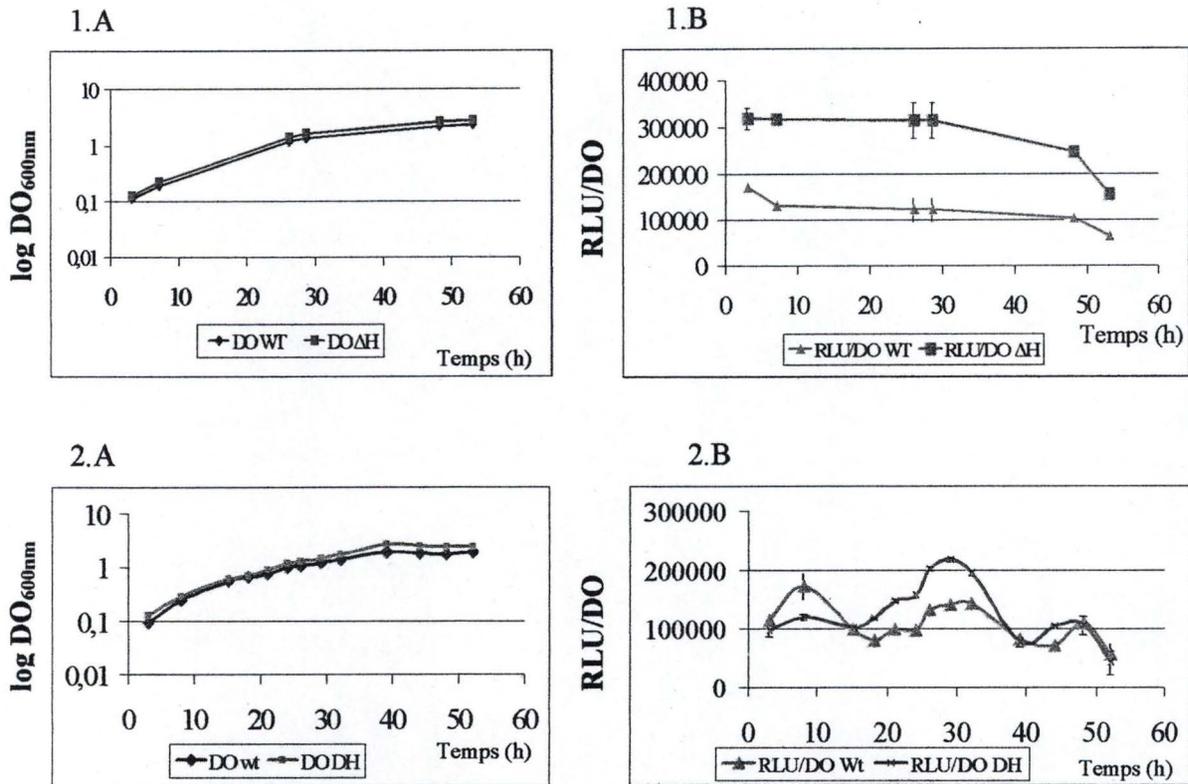


Figure 4. Graphe illustrant les cinétiques de croissance des souches B. 16M $\Delta hdtS$ pJD27 *pvirB* et B. 16M wt pJD27 *pvirB* et d'expression de l'opéron *virB* dans ces mêmes souches en milieu riche. Deux clones indépendants pour chaque souche ont été utilisés (clones 1 et 2).
 1. A: courbe de croissance des cultures de B. 16M $\Delta hdtS$ pJD27 *pvirB* et B. 16M wt pJD27 *pvirB* (\blacklozenge et \blacksquare); B: cinétique d'expression de *pvirB::luxAB* de ces mêmes souches (\blacktriangle et \times).
 2. A: courbe de croissance des cultures de B. 16M $\Delta hdtS$ pJD27 *pvirB* et B. 16M wt pJD27 *pvirB* (\blacklozenge et \blacksquare) indépendantes des deux premières; B: cinétique d'expression de *pvirB::luxAB* de ces mêmes souches (\blacktriangle et \times).
 La croissance est exprimée en DO_{600nm} : densité optique mesurée à 600nm. La mesure de luminescence est exprimée en RLU (Relative Light Units) ramenée sur la DO_{600nm} . En abscisse se trouve l'échelle du temps (en heure).
 Nous pouvons observer que l'activité du promoteur de *virB* est supérieure dans la souche B.16M $\Delta hdtS$ par rapport à la wt.

1.2.4. Analyse du mutant $\Delta hdtS$ en modèle cellulaire

Le mutant $\Delta hdtS$ a été testé en modèle cellulaire (cellules HeLa et macrophages) afin d'observer si la délétion du gène *hdtS* pouvait avoir un effet sur la capacité du mutant à survivre et se multiplier en cellules. Comme contrôle positif nous avons utilisé le mutant $\Delta vjbR$ connu pour être atténué dans de tel modèle (Delrue *et al.*, 2001).

Une concentration de trois cent bactéries/cellules a été utilisée pour réaliser l'infection. Quarante-huit heures après le début de l'infection, les cellules ont été lysées et les *Brucella* récupérées afin de procéder à un comptage.

L'expérience a été réalisée avec les souches B. 16M wt et B.16M $\Delta hdtS$ dans le modèle HeLa et avec les souches B. 16M wt, B. 16M $\Delta hdtS$ et B. 16M $\Delta vjbR$ dans le modèle macrophage.

Le mutant $\Delta hdtS$ est diminué dans sa capacité d'infection (figure 5). Le contrôle de l'expérience, le mutant $\Delta vjbR$, est quant à lui bien atténué dans sa virulence.

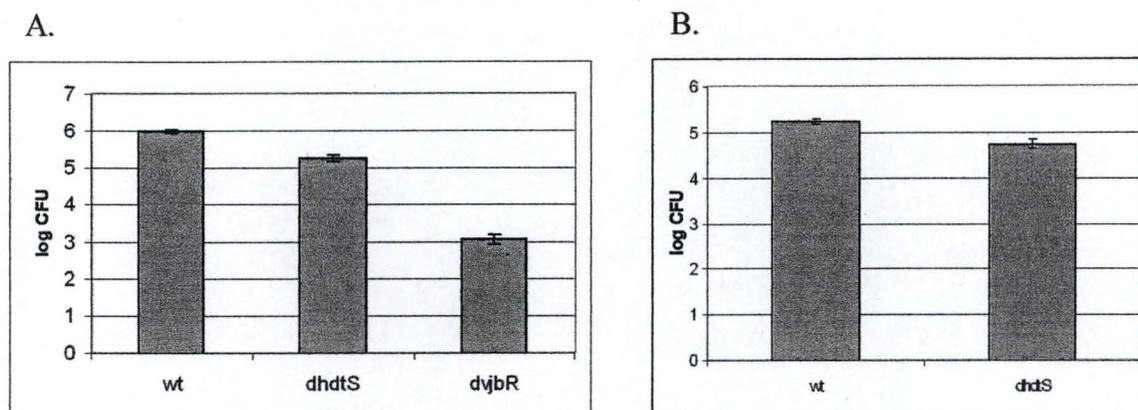


Figure 5. Analyse de la virulence de *Brucella* en cellules HeLa (A) et en macrophages bovins (B) après 48h d'infection. Les souches utilisées sont B. 16M wt (wt), B. 16M $\Delta hdtS$ (dhdtS) et B. 16M $\Delta vjbR$ (dvjbR). Les résultats sont exprimés en logarithme de *Brucella* vivantes (CFU) par puits.

1.3. Complémentation du mutant $\Delta hdtS$

Pour affirmer que le phénotype observé est bien dû à l'enzyme HdtS, le mutant doit être complété. Pour cela, une copie sauvage du gène encodant HdtS est apportée au moyen d'un plasmide. Nous avons analysé si le phénotype sauvage était restauré chez le mutant. Si le phénotype observé chez notre mutant est dû à la délétion de *hdtS*, alors l'apport en trans d'une copie fonctionnelle du gène *hdtS* devrait restaurer le phénotype sauvage chez ce mutant.

1.3.1. Construction du pMR10 cat-*hdtS*

L'apport de la copie sauvage du gène *hdtS* a été réalisée en introduisant chez *Brucella* un plasmide portant une copie sauvage d'*hdtS*. Ce plasmide, appelé pMR10 cat-*hdtS*, dérive du plasmide pBBR mcs1-*hdtS*. Ce dernier possède la CDS d'*hdtS* placé sous la dépendance du promoteur *lacZ* mais il n'est pas compatible avec le plasmide pJD27 utilisé dans nos analyses d'expression de pvirB. Ces deux plasmides possèdent en effet les mêmes origines de répllication. La région contenant la séquence codante d'*hdtS* de *B. melitensis* a donc été clonée directionnellement dans un plasmide, le pMR10 cat, possédant une origine de répllication compatible avec celle du pJD27.

La région contenant *hdtS* a été excisée du pBBR mcs1-*hdtS* à l'aide des enzymes *Bam*H I et *Xho* I puis liguée au plasmide pMR10 cat préalablement traité avec les mêmes enzymes. La séquence codante *hdtS* se trouve ainsi sous la dépendance du promoteur de *lacZ*. Le plasmide ainsi obtenu s'appelle pMR10 cat-*hdtS* (C. Deschamps, thèse en cours) (figure 6).

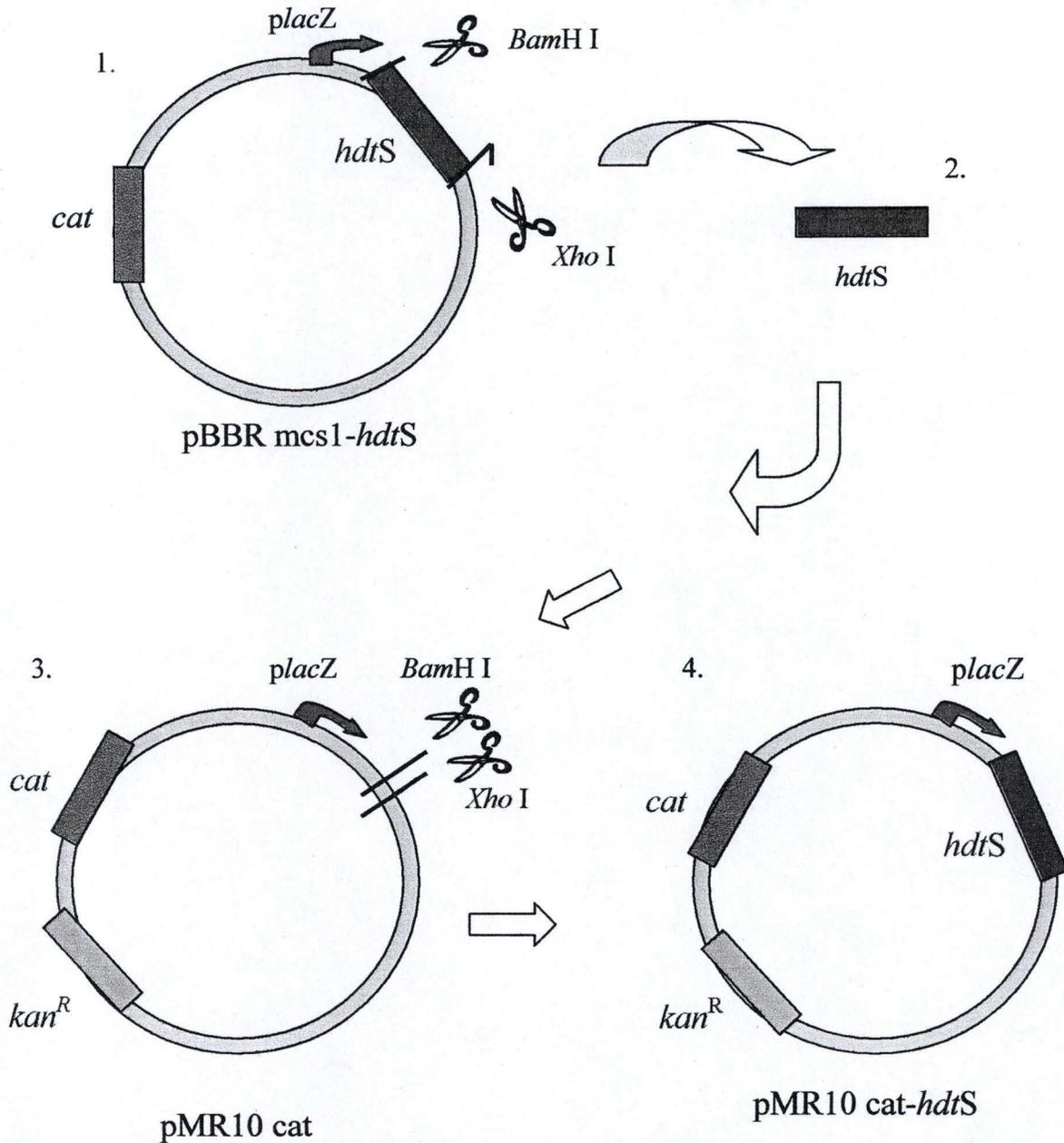


Figure 6. Illustration de la construction du pMR10 cat-*hdtS*.

1. Le plasmide pBBR mcs1-*hdtS* a été traité avec les enzymes *Bam*H I et *Xho* I afin d'en extraire la région contenant le gène d'*hdtS*.
2. Le fragment excisé a été purifié sur gel d'agarose.
3. Le plasmide pMR10 cat a été traité avec les mêmes enzymes que le pBBR mcs1-*hdtS*.
4. Le fragment contenant la séquence codant d'*hdtS* a été ligué au pMR10 cat restreint à l'aide d'une T4 DNA ligase.

Des *E.coli* DH10B CaCl₂ compétentes ont été transformées avec le produit de ligation. Les clones recombinants ont été sélectionnés sur un milieu contenant du chloramphénicol et de la kanamycine.

Afin de vérifier que ces clones possédaient bien le plasmide pMR10 cat-*hdtS*, des minipréparations d'ADN ont été réalisées sur 12 clones. Des restrictions diagnostiques ont ensuite été réalisées en utilisant les enzymes *Bam*H I et *Xho* I. Les profils attendus étant une bande de 814 pb, taille de l'insert, et une bande à environ 9500 pb pour le vecteur pMR10 cat vide. C'est ce que nous avons observé pour les 12 clones à la figure 7.



Figure 7. Restriction diagnostique sur 12 minipréparations d'ADN de clones recombinants. Les enzymes *Bam*H I et *Xho* I ont été utilisées afin de vérifier que les clones possèdent bien le plasmide pMR10 cat-*hdtS*. Les profils attendus étant une bande à 814 pb pour l'insert et une à environ 9500 pb pour le vecteur pMR10 cat vide. Le marqueur utilisé (M) est le DNA Hyperladder I (Bioline).

1.3.2. Conjugaison

Pour introduire le plasmide d'intérêt pMR10 cat-*hdtS* dans les souches de *Brucella*, des conjugaisons ont été réalisées entre bactéries donneuses *E.coli* S17 et *B. 16M* Δ *hdtS*. Des *E.coli* S17 CaCl₂ compétentes ont été transformées d'une part avec le plasmide pMR10 cat-*hdtS* et d'autre part avec le pMR10 cat. Ce dernier nous a servi de contrôle afin de voir si le plasmide en lui-même ne perturbe en rien la bactérie. Pour rappel, ce plasmide est résistant au chloramphénicol et à la kanamycine. Les transformants ont donc été sélectionnés sur un milieu contenant ces deux antibiotiques.

Après la conjugaison, les clones transconjugants ayant reçu le plasmide pMR10 cat ou pMR10cat-*hdtS* ont été sélectionnés sur un milieu contenant de l'acide nalidixique, du chloramphénicol et de la kanamycine.

1.3.3. Analyse de la production de la protéine VirB8 dans la souche *B. 16M* Δ *hdtS* complémentée

N'ayant pas disposé du temps nécessaire pour réaliser cette expérience, l'analyse du mutant complémenté fait partie des perspectives de ce travail.

2. Expression d'une lactonase chez *Brucella*

Comme expliqué dans l'introduction au point 3.1.2.2.1., une lactonase est une enzyme capable de dégrader les AHLs par clivage dans l'anneau lactone. *Brucella* possédant un système de QS, nous avons étudié le phénotype d'une souche de *Brucella* produisant une lactonase. Le plasmide pBBR mcs1-*aiiA* a été construit afin d'amener le gène de la lactonase de *Bacillus sp.*, nommé *aiiA*, dans *Brucella*. Nous nous attendons donc à perturber le phénomène de communication par destruction des AHLs.

2.1. Construction du pBBR mcs1-*aiiA*

Le plasmide pBBR mcs1-*aiiA* dérive d'un plasmide nommé pME6863 qui nous a été donné par Reimann (Reimann *et al.*, 2002). Ce plasmide porte la CDS d'une lactonase appelée AiiA venant de *Bacillus sp.* ainsi que le gène de résistance à la tétracycline. La tétracycline étant utilisée lors de traitement antibiotique contre la brucellose, nous ne pouvions utiliser ce plasmide dans nos travaux sur *Brucella*. En conséquence de cela la CDS de l'*aiiA* a été transférée dans un pBBR mcs1 résistant au chloramphénicol.

Le plasmide pME6863 a été restreint par les enzymes *Kpn* I et *Sac* I pour libérer un fragment de 905 pb correspondant à la CDS de l'*aiiA*. Ce fragment a été ligué au pBBR mcs1 préalablement restreint par les mêmes enzymes. La CDS de l'*aiiA* se trouve ainsi sous la dépendance du promoteur de *lacZ* (figure 8). Le plasmide ainsi obtenu s'appelle pBBR mcs1-*aiiA*. Ce plasmide possède une origine de réplication compatible avec la machinerie de réplication de *Brucella* est donc capable de se maintenir dans *Brucella*.

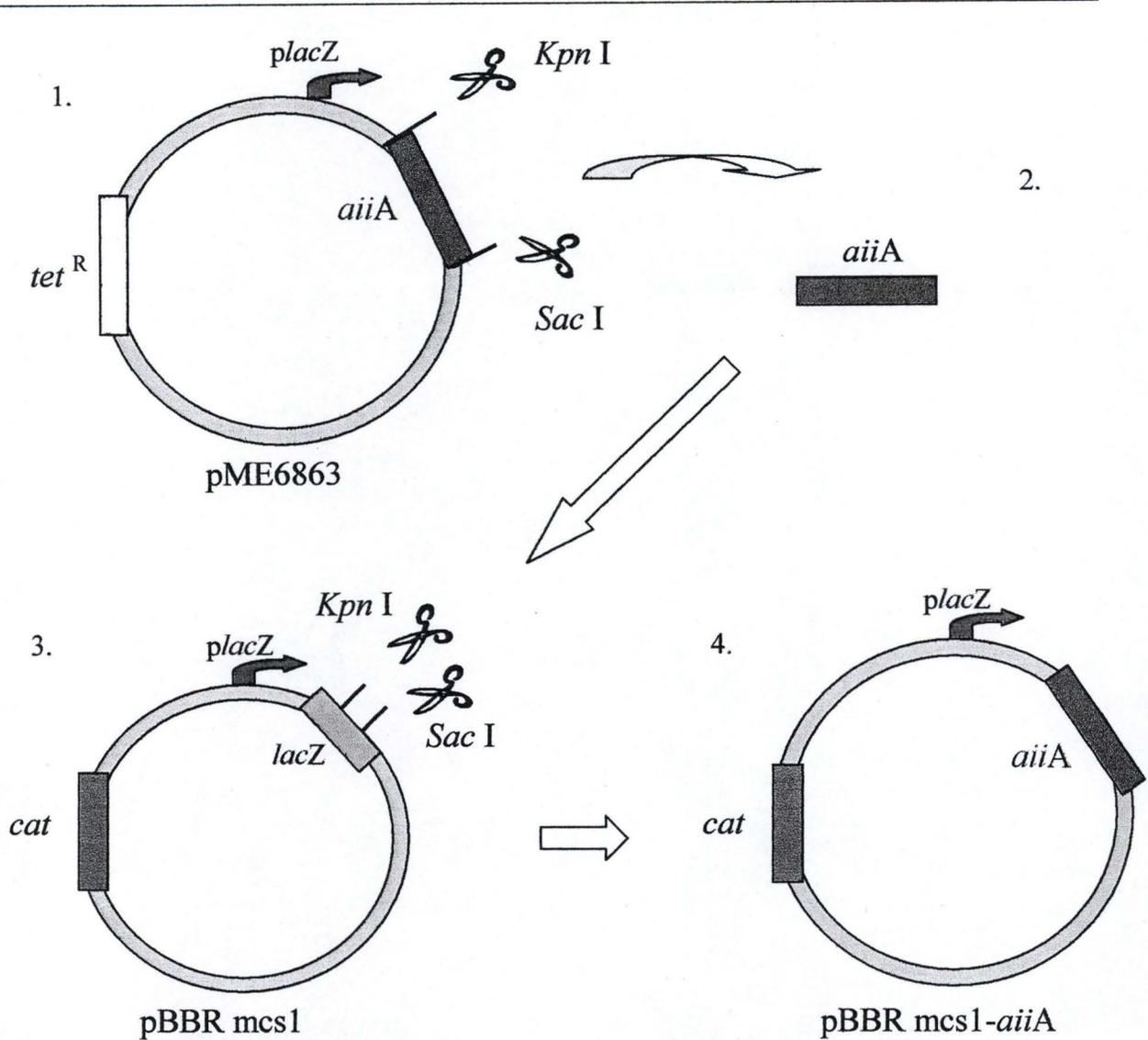


Figure 8. Illustration de la construction du pBBR mcs1-*aiiA*.

1. Le plasmide pME6863 a été traité avec les enzymes *Kpn* I et *Sac* I afin d'en extraire la région contenant la CDS de la lactonase.
2. Le fragment excisé a été purifié sur gel d'agarose.
3. Le plasmide pBBR mcs1 a été traité avec les mêmes enzymes que le pME6863.
4. Le fragment contenant la séquence codant de l'*aiiA* a été ligué au pBBR mcs1 restreint à l'aide d'une T4 DNA ligase.

Des *E.coli* DH10B CaCl₂ compétentes ont été transformées avec le produit de ligation et étalées sur milieu contenant du chloramphénicol, de l'IPTG et du X-Gal afin de sélectionner les clones recombinants.

Afin de vérifier que les clones possèdent le plasmide pBBR mcs1-*aiiA*, une PCR sur colonies a été effectuée sur quatre clones recombinants (colonies blanches), sur un clone non recombinant (colonie bleue) ainsi que sur une colonie contenant le pME6863 en utilisant les primers M13 reverse et M13 forward. Ces amorces s'hybrident au début et à la fin du gène *lacZ*. Le profil attendu étant une bande à 1049 pb pour les clones recombinants ainsi que pour le clone contenant le pME6863 et une bande à 211 pb pour le clone contenant le plasmide refermé sur lui-même. Les profils observés pour les quatre clones sont ceux attendus (figure 9).

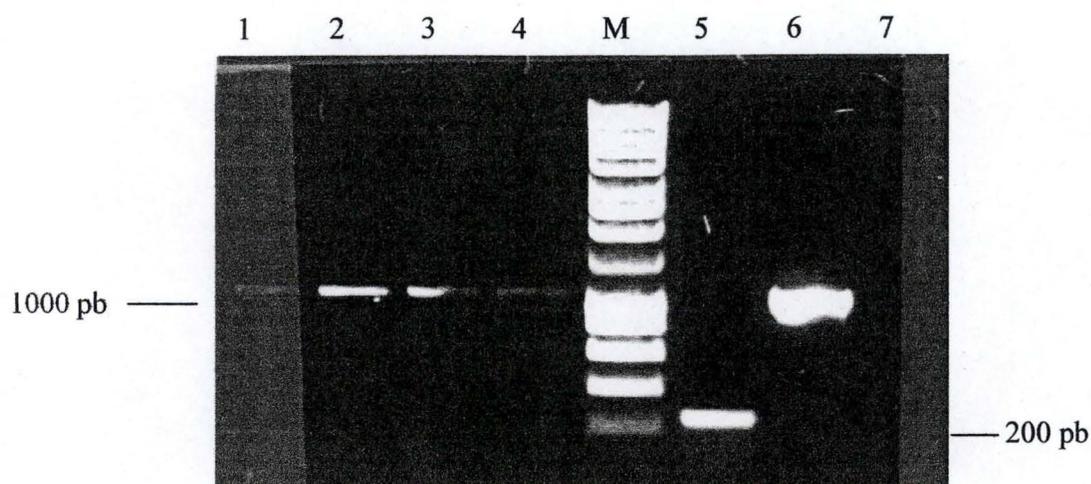


Figure 9. PCR sur colonies effectuées sur différentes colonies d'*E.coli* DH10B. Les primers M13 reverse et M13 forward ont été utilisés afin de vérifier que les clones possèdent bien le plasmide avec la lactonase. La taille attendue pour un clone recombinant est une bande de 1049 pb.

Piste 1, 2, 3 et 4 : PCR sur 4 colonies de ligation.

Piste 5 : contrôle négatif : PCR sur une colonie bleue (taille attendue : 211 pb)

Piste 6 : contrôle positif : PCR sur le pME6863 (taille attendue : 1049 pb)

Piste 7 : contrôle négatif : PCR sur un blanc

M : marqueur de poids moléculaire (DNA Hyperladder I, Bioline)

En parallèle, une seconde vérification a été effectuée sur les clones transformants: des minipréparations d'ADN sur quatre clones ont été réalisées et des restrictions diagnostiques ont été effectuées en employant l'enzyme de restriction *Not* I. Le profil attendu pour le pBBR *mcs1-aiiA* restreint avec cette enzyme étant une bande à 2913 pb et une seconde bande à 2597 pb. Ce profil correspond à celui observé suite à la restriction diagnostique des quatre clones (figure 10).

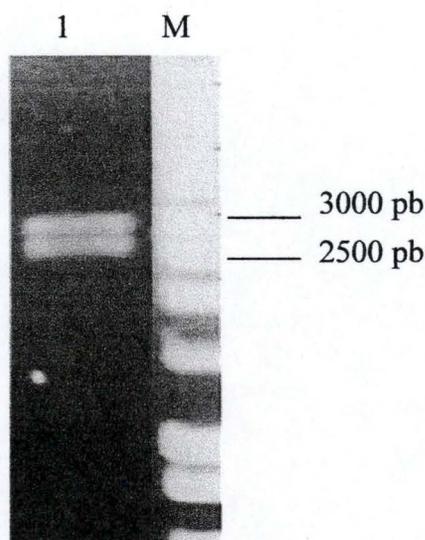


Figure 10. Restriction diagnostique d'une minipréparation d'ADN d'un clone recombinant. L'enzyme *Not I* a été employée afin de vérifier que les clones possèdent bien le plasmide avec la lactonase. Les profils attendus étant une bande à 2913 pb et une seconde à 2597 pb.

Piste 1 : pBBR *mcs1-aiiA* restreint par l'enzyme de restriction *Not I*

M : marqueur de poids moléculaire (DNA Hyperladder I, Bioline)

2.2. Conjugaison

Afin d'introduire le plasmide pBBR *mcs1-aiiA* dans la souche *B. 16M*, des conjugaisons ont été réalisées entre bactéries donneuses *E.coli* S17 et *Brucella* (Nal^R). Des *E.coli* S17 CaCl₂ compétentes ont été transformées avec d'une part le plasmide contenant le fragment de la lactonase et d'autre part le plasmide vide. La sélection des transformants a été effectuée à l'aide d'un milieu contenant du chloramphénicol. Pour rappel, le plasmide contient un gène de résistance au chloramphénicol.

Après la conjugaison, les clones transconjugants ayant reçu le plasmide pBBR *mcs1* ou pBBR *mcs1-aiiA* ont été sélectionnés sur un milieu contenant de l'acide nalidixique et du chloramphénicol.

2.3. Observation du phénotype

2.3.1. Analyse de la dégradation d'AHLs par la lactonase

Pour savoir si la lactonase exprimée chez *Brucella* est capable de dégrader les AHLs, nous avons tenté de vérifier cette dégradation. Comme expliqué précédemment, *Brucella* produit peu de molécules signal. La dégradation a donc été observée suite à l'ajout d'AHLs synthétique dans la culture de *Brucella*.

La visualisation de la dégradation des AHLs s'est faite à l'aide d'un biosenseur capable de détecter la présence d'AHLs et de répondre à celles-ci en produisant de la lumière. La souche biosenseur utilisée s'appelle *E.coli* JM109 pBS1075 et est capable de détecter des AHLs à longue chaîne carbonée, ce qui convient à notre analyse puisque l'AHL identifiée chez *Brucella* est constituée d'une chaîne à 12 carbones. Le système rapporteur est l'opéron luminescent *luxCDABE* provenant de *Photobacterium luminescens* (Winson *et al.*, 1998).

A partir de cultures 10 ml en milieu riche des trois biosenseurs, de la souche B. 16M pBBR mcs1 et B. 16M pBBR mcs1-*aiiA*, des cocultures ont été réalisées.

Un aliquot de 3 ml de culture de B. 16M pBBR mcs1-*aiiA* a été prélevé et 1,5 µl de (C₁₂-HSL) synthétique y a été ajouté. Un aliquot de 3 ml de la même culture a été prélevé mais n'ont pas subi l'ajout de (C₁₂-HSL) synthétique. La même opération a été réalisée avec la culture de B. 16M pBBR mcs1 et ces quatre cultures ont été placées pendant 3h à une température de 37°C.

Les quatre cultures de *Brucella* ont chacune été partagées en trois cultures auxquelles ont été ajoutées un biosenseur. Les quatre cocultures ont été placées pendant 3h à 37°C.

La luminescence produite par les biosenseurs a été mesurée à l'aide d'un luminomètre (Microlumat LB96P, EG&G Berthold) afin de quantifier les RLU (Relative Light Unit).

Les résultats obtenus sont représentés sur le graphe de la figure 11. Nous observons que la lactonase AiiA produite par *Brucella* est fonctionnelle, une diminution de la bioluminescence étant observée lors de coculture avec B. 16M pBBR mcs1-*aiiA* par rapport à la coculture avec la souche B. 16M pBBR mcs1.

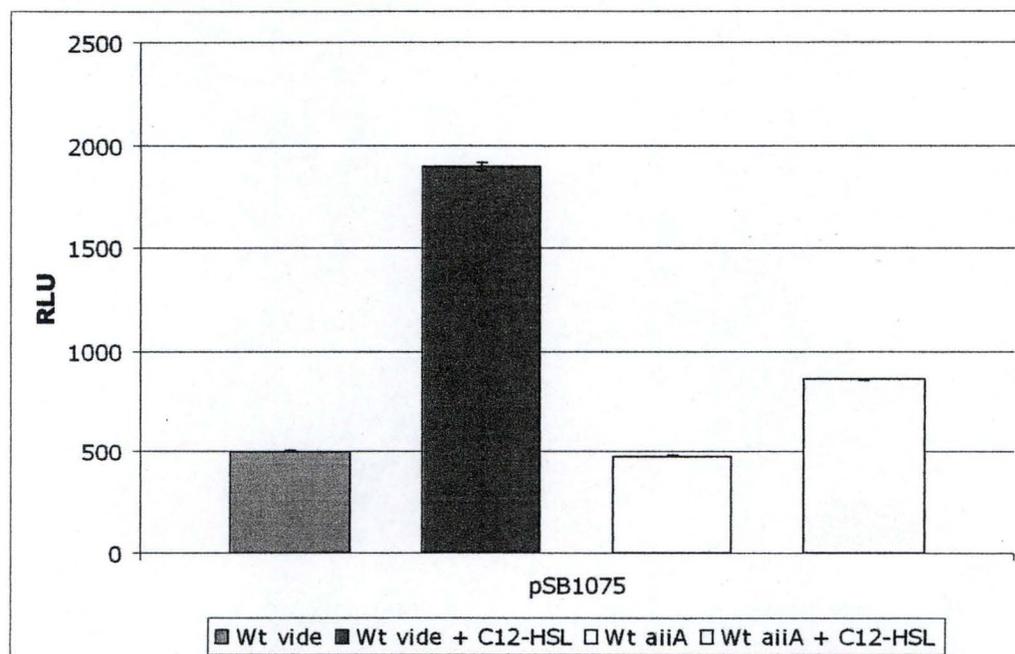


Figure 11. Graphe illustrant la dégradation des AHLs par la lactonase AiiA.

La luminescence produite par le biosenseur *E.coli* JM109 pSB1075 suite à une coculture avec une souche B.16M pBBR mcs1 (Wt vide) ou B.16M pBBR mcs1-*aiiA* (Wt aiiA) a été mesurée afin d'observer le phénomène de dégradation des AHLs par la lactonase AiiA. Des AHLs synthétiques (C₁₂-HSL) ont été ajoutées aux cultures afin de visualiser plus facilement ce phénomène de dégradation.

La mesure de luminescence est exprimée en RLU (Relative Light Units).

2.3.2. Analyse de la production des protéines VirB8 et VirB9

Comme nous l'avons observé précédemment, l'expression de l'opéron *virB* est réprimée en présence d'AHLs. Une souche de *Brucella* capable de produire une lactonase ne devrait donc plus présenter cette répression. Afin de vérifier cette hypothèse, la production des protéines VirB8 et VirB9 a été analysée par Western blot dans la souche B. 16M pBBR *mcs1-aiiA* et B. 16M pBBR *mcs1*. Cette analyse a été réalisée en suivant la production des protéines VirB8 et VirB9 à l'aide d'anticorps dirigés contre ces deux protéines.

Des cultures liquides de 50 ml de 2YT ont été inoculées à une DO_{600nm} initiale de 0,05 à partir de précultures d'une nuit des souches B. 16M pBBR *mcs1-aiiA* et B. 16M pBBR *mcs1*.

Des échantillons de 10 ou 5 ml de ces cultures bactériennes ont été prélevés à différentes phases de croissance, à savoir 0h, 7h, et 24h puis inactivés 2h à 80°C. Après centrifugation des échantillons, les culots bactériens ont été lavés dans un tampon PBS, puis concentrés afin d'obtenir une suspension totale d'extraits bactériens dont la DO_{600nm} correspond à 6.

20 µl de chaque échantillon ont été analysés par Western blot au moyen des anticorps anti-VirB8 et anti-VirB9.

Afin de s'assurer que la même quantité de protéines a été chargée sur le gel pour chaque échantillon, un contrôle de chargement a été réalisé. Celui-ci a consisté à hybrider la membrane du Western blot avec un anticorps spécifique de la protéine Omp1 dont la production est constitutive chez *Brucella*. Nous observons qu'une souche exprimant une lactonase présente un profil de production de protéines VirB supérieur à celui d'une souche sans lactonase (figure 12). La répression exercée par les phéromones sur la production de protéines VirB semble donc être levée suite à la dégradation des AHLs.

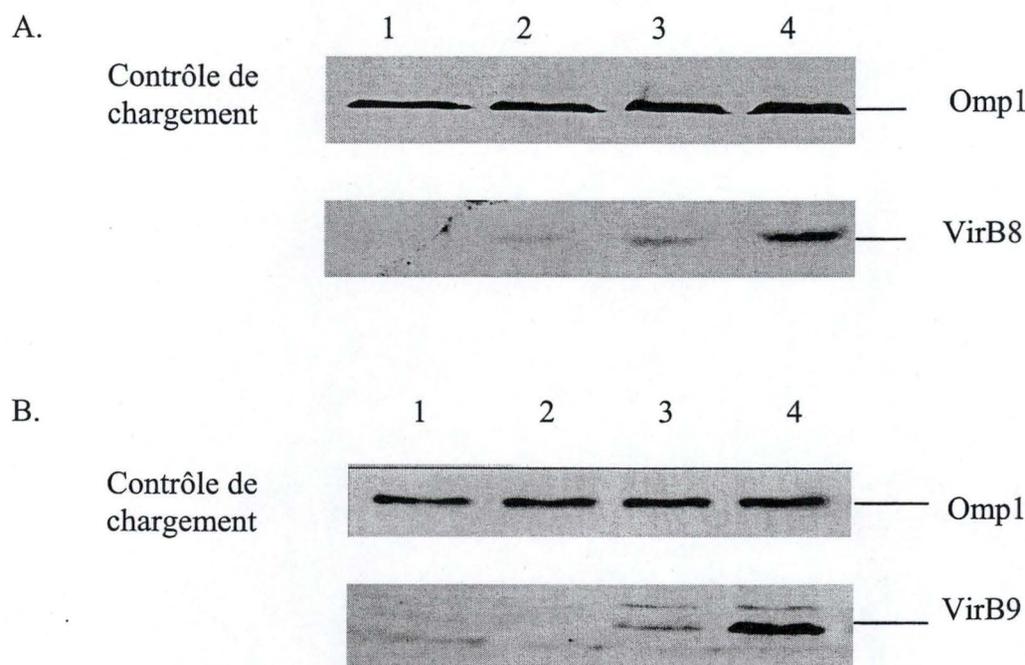


Figure 12. Résultats du western blot réalisé sur des extraits protéiques d'une souche B. 16M pBBR mcs1 et B. 16M pBBR mcs1-aiiA. La production des protéines VirB8 et VirB9 a été suivie à l'aide de leurs anticorps respectifs. Le contrôle de chargement a été réalisé avec des anticorps dirigés contre la protéine Omp1.

A: au moyen de l'anticorps anti-VirB8

Piste 1 : B. 16M pBBR mcs1, 0h
 Piste 2 : B. 16M pBBR mcs1-aiiA, 0h
 Piste 3 : B. 16M pBBR mcs1, 24h
 Piste 4 : B. 16M pBBR mcs1-aiiA, 24h

B: au moyen de l'anticorps anti-VirB9

Piste 1 : B. 16M pBBR mcs1, 7h
 Piste 2 : B. 16M pBBR mcs1-aiiA, 7h
 Piste 3 : B. 16M pBBR mcs1, 24h
 Piste 4 : B. 16M pBBR mcs1-aiiA, 24h

2.3.3. Analyse de la souche produisant la lactonase en modèle cellulaire

La souche exprimant la lactonase a été testée en modèle cellulaire afin d'observer si la dégradation des AHLs pouvait avoir un effet sur la capacité du mutant à survivre et se multiplier en macrophages. Nous avons utilisé le mutant $\Delta vj b R$ comme contrôle positif (Delrue *et al.*, 2001).

Une concentration de 300 bactéries/cellules a été utilisée pour réaliser l'infection. Les cellules ont été lysées après des temps d'incubation d'une, vingt-quatre et quarante-huit heures et les *Brucella* ont été récupérées afin de procéder à un comptage. L'expérience a été réalisée avec une souche B. 16M wt possédant le plasmide vide, une souche B. 16M wt exprimant la lactonase et une souche B. 16M $\Delta vj b R$. Pour la souche de *Brucella* exprimant la lactonase, nous n'observons aucune diminution de virulence (figure 13). Le mutant $\Delta vj b R$ étant quant à lui bien atténué dans sa virulence.

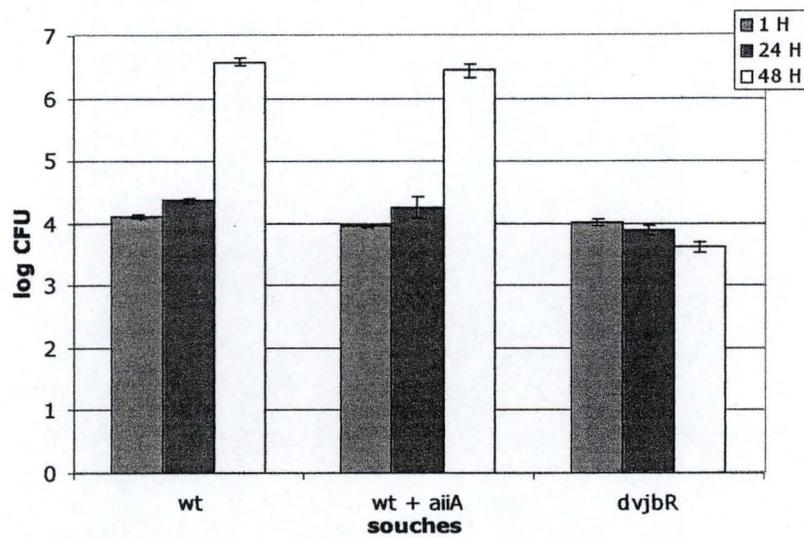


Figure 13. Analyse de la virulence de *Brucella* en macrophages bovins après 1, 24 et 48h d'infection. Les souches utilisées sont B. 16M pBBR mcs1 (wt), B. 16M pBBR mcs1-*aiiA* (wt + *aiiA*) et B. 16M Δ *vjbR* (*dvjBR*). Les résultats sont exprimés en logarithme de *Brucella* vivantes (CFU) par puits.

CONCLUSIONS

ET

PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Durant ce mémoire sur *Brucella melitensis*, bactérie pathogène intracellulaire facultative, deux objectifs ont été suivis. Etant donné qu'aucun gène codant une synthétase d'AHLs n'a été à ce jour caractérisé chez *Brucella*, le premier objectif du mémoire fut d'analyser un gène appelé *hdtS*. Celui-ci a été choisi car il présente une homologie de séquence avec le gène *hdtS* caractérisé chez *Pseudomonas fluorescens* et codant une synthétase d'AHLs putative.

1. Analyse du mutant $\Delta hdtS$

1.1. Analyse de la production d'AHLs

Dans l'hypothèse où le gène *hdtS* coderait une synthétase d'AHLs, nous nous attendons à observer une diminution de la présence d'AHLs dans le surnageant d'une culture de B. 16M $\Delta hdtS$.

Le résultat de l'extraction d'AHLs sur un litre de culture nous indique une faible diminution de production dans la souche B. 16M $\Delta hdtS$ par rapport à la souche wt. Ce qui signifierait que la souche délétée dans le gène *hdtS* est toujours en mesure de produire des AHLs.

Néanmoins, nous ne pouvons pas tirer de conclusion suite à ce résultat. En effet, cette diminution n'est pas significative. La différence de production d'AHLs peut être trop infime pour être significativement mise en exergue par la souche biosenseur.

Au vu des contraintes et autres désagréments que présente cette manipulation, nous nous sommes tournés vers l'analyse de la production de la protéine VirB8, protéine impliquée dans la formation de système de sécrétion de type IV et régulé par le quorum sensing (Delrue, 2002).

1.2. Analyse de la production de la protéine VirB8 dans la souche B. 16M $\Delta hdtS$

L'ajout de (C₁₂-HSL) synthétiques à une culture bactérienne entraîne la répression de l'expression de protéines VirB (Taminiau *et al.*, 2002). Nous nous sommes donc intéressés à la protéine VirB8 et nous nous attendons à ce que la souche B. 16M $\Delta hdtS$ ne réprime plus la production de cette protéine comme cela est observé dans la souche sauvage.

Le résultat obtenu lors de l'analyse de la production de cette protéine dans la souche B. 16M $\Delta hdtS$ et wt par Western blot le long d'une courbe de croissance bactérienne correspond à ce que nous attendions, à savoir que le mutant présente un profil de production différent de la souche sauvage. La quantité de protéines VirB8 produite est légèrement supérieure dans le mutant $\Delta hdtS$ en fin de la phase exponentielle (après 24h). Une fois le maximum atteint, la production de VirB8 diminue dans la souche sauvage alors que celle-ci reste élevée dans la souche B. 16M $\Delta hdtS$.

Cette observation indique que la répression de production de cette protéine dans la souche B. 16M $\Delta hdtS$ n'a plus lieu, sous-entendant que le mutant $\Delta hdtS$ n'est plus capable de produire des AHLs.

Le deuxième volet de l'étude sur VirB s'est déroulé au point de vue transcriptionnel. Nous avons voulu déterminer si le résultat observé en traductionnel était du à une répression transcriptionnelle de l'opéron *virB* ou bien s'il était du à une répression pré ou post-traductionnelle.

Comme l'a montré Bernard Taminiau au laboratoire, la présence de (C₁₂-HSL) a un effet sur le taux d'expression de l'opéron *virB*. L'analyse de l'expression de cet opéron dans le mutant $\Delta hdtS$ nous permettrait dès lors de déterminer si les AHLs sont responsables de la diminution de production de la protéine VirB chez la souche sauvage. Nous nous attendons à observer un taux d'activité du promoteur de *virB* supérieure dans le mutant $\Delta hdtS$ et ce tout au long de la courbe de croissance.

Les résultats obtenus au moyen des deux clones du mutant $\Delta hdtS$ nous indiquent qu'en fin de phase exponentielle (soit après 24h) le taux d'activité de *pvirB* est supérieur dans le mutant $\Delta hdtS$ par rapport à la souche sauvage. Pour le résultat à 48h, le premier clone se comporte comme nous l'attendions, à savoir que l'activité de *pvirB* y est supérieure par rapport à la wt. Le second clone ayant lui une activité de *pvirB* équivalente à la souche wt.

Ces résultats nous fournissent une explication concernant le fait que le taux de production de protéines VirB8 est supérieur dans le mutant $\Delta hdtS$ par rapport à la sauvage: le taux de transcription de l'opéron *virB* est plus élevé dans le mutant $\Delta hdtS$. Les AHLs ne seraient plus produites dans le mutant $\Delta hdtS$ et ne pourraient donc plus réprimer l'activité de *pvirB*.

1.3. Analyse de la virulence du mutant $\Delta hdtS$ en modèle cellulaire

L'analyse du mutant B. 16M $\Delta hdtS$ en infection cellulaire à l'avantage de fournir une indication sur le caractère essentiel que pourrait avoir *hdtS* lors d'un processus infectieux. Des infections ont donc été réalisées en cellules HeLa et en macrophages.

Afin de pouvoir affirmer qu'un mutant soit atténué en virulence, il est bon de considérer qu'une diminution d'un logarithme dans le nombre de CFU doit être observée. Nous pouvons donc dire que le mutant $\Delta hdtS$ n'est pas atténué dans sa virulence. Le gène *hdtS* n'aurait donc pas un rôle essentiel dans le processus de virulence.

1.4. Conclusion

Les différents résultats obtenus ne permettent pas de déterminer si *hdtS* est responsable ou pas de la production d'AHLs chez *Brucella*. Le fait que la régulation de la production de la protéine VirB8 ne soit plus observée dans un mutant $\Delta hdtS$ peut provenir d'une absence de production d'AHLs.

Mais il faut se rappeler que, comme cité dans l'introduction au point 3.2.3., *hdtS* présente une homologie de séquence avec le gène *plsC* d'*E. coli*.

PlsC est une 1-acyl-glycérol-3-phosphate acyltransférase, ce qui signifie que cette enzyme utilise l'acyl-CoA ou un acyl-ACP afin de transférer un acide gras sur un 1-acyl-glycérol-phosphate, un des composants importants de la membrane.

Nous pouvons donc émettre comme autre hypothèse un effet dû à la membrane. En effet, il a été montré chez *E. coli* que la mutation d'un gène codant une enzyme impliquée dans la synthèse membranaire affectait la production de certaines protéines (Inoue *et al.*, 1997). De la sorte, ce qui a été observé à propos de VirB8 pourrait ne pas relever d'une absence d'AHLs mais bien d'un effet indirect dû à la mutation d'*hdtS*, gène codant une enzyme impliquée dans la synthèse membranaire.

1.5. Perspectives

Ayant utilisé un mutant pour nos analyses, la première expérience à réaliser suite à ce travail est de compléter le mutant $\Delta hdtS$ en lui rapportant une copie fonctionnelle du gène. Ceci est indispensable afin de confirmer que nos observations sont bien dues à la délétion du gène *hdtS*.

Afin d'approfondir l'analyse d'*hdtS* en tant que gène codant une synthétase d'AHLs putatif, d'autres expériences pourraient être réalisées.

Nous pourrions réitérer la manipulation de complémentation en n'apportant non plus une copie fonctionnelle du gène *hdtS* dans le mutant mais bien une copie du gène *plsC* d'*E.coli*. De la sorte, si le phénotype sauvage est restauré dans le mutant $\Delta hdtS$, alors ce que nous avons observé chez le mutant ne serait pas dû à une absence de synthétase mais bien à autre chose.

Cette dernière idée de complémentation peut aussi être réalisée dans l'autre sens. Il serait intéressant d'analyser le résultat d'une complémentation via l'apport du gène *hdtS* dans une souche d'*E.coli* délétée pour le gène *plsC*. Cette souche d'*E.coli* a un phénotype facilement observable: sa croissance est normale à 30°C mais est ralentie à 42°C. Si l'apport du gène *hdtS* restaure la croissance à 42°C, nous aurions dès lors un argument supplémentaire pour le rôle d'*hdtS* dans le processus de synthèse membranaire (Coleman, 1990).

Si le phénotype sauvage est restauré dans le mutant $\Delta hdtS$ suite à la complémentation, cela signifierait que le gène *hdtS* cloné sur le plasmide pMR10 cat est fonctionnel et que la protéine HdtS est produite. Un des arguments les plus intéressants serait d'arriver à faire produire les AHLs de *Brucella* par une souche ne produisant pas d'AHLs grâce à l'apport du plasmide pMR10 cat-*hdtS* utilisé lors de la complémentation. Cette expérience a été réalisée par Laue avec le gène *hdtS* de *P. fluorescens* chez *E.coli* (Laue *et al.*, 2000). Au laboratoire, l'expérience a été réalisée chez *E.coli* avec le gène *hdtS* de *Brucella*, mais elle s'est révélée infructueuse. Un des arguments avancés fut de dire qu'*E.coli* n'était peut-être pas assez proche de *Brucella* d'un point de vue phylogénique et ne disposerait donc pas de tous les éléments nécessaires à la production d'AHLs. Nous pourrions donc envisager d'apporter le plasmide pMR10 cat-*hdtS* dans une souche sauvage de *Brucella* et analyser si cette dernière produit plus d'AHLs.

Nous pourrions aussi analyser l'activité du promoteur d'*hdtS* à l'aide des gènes rapporteurs *luxAB* comme cela a été fait avec le promoteur de l'opéron *virB*. Ceci est justifié par le fait qu'au sein des bactéries à Gram négatifs utilisant les AHLs comme molécules signal pour le phénomène de QS, le gène codant une synthétase d'AHLs est régulé par ces mêmes AHLs (cf. point 2.5. de l'introduction). Nous pourrions analyser l'activité de ce promoteur dans la souche sauvage et dans le mutant $\Delta hdtS$. Si *hdtS* code bien une synthétase, alors l'activité de son promoteur pourrait être en augmentation le long de la courbe de croissance. Nous pourrions aussi réaliser cette expérience dans les mutants $\Delta vjbR$ et $\Delta babR$, deux régulateurs transcriptionnels impliqués dans le phénomène de QS.

Ces différentes expériences permettraient d'éclaircir le rôle d'*hdtS* en tant que synthétase d'AHLs et/ou d'enzyme impliquée dans la synthèse membranaire.

Dans le cas où *hdtS* ne serait pas un gène codant une synthétase d'AHLs, une nouvelle recherche dans le génome de *Brucella* pourrait être envisagée. Le criblage de banques ayant été jusqu'à présent réalisé à l'aide de biosenseurs, il serait bon d'essayer de développer une nouvelle approche.

Nous pourrions utiliser un gène toxique, tel *sacB*, placé sous la dépendance d'un promoteur dont l'activité est dépendante d'un régulateur transcriptionnel activé en présence d'AHLs. De la sorte, une souche produisant des AHLs induirait le système ce qui la mènerait vers une mort certaine. Ce système, introduit dans une banque de mutants transpositionnels, permettrait d'isoler sur un milieu riche en sucrose les colonies n'induisant pas le système toxique. Dans les colonies ainsi isolées, nous pourrions trouver, parmi tous les mutants où le transposon s'est inséré dans un gène codant un régulateur transcriptionnel, un mutant dans un gène codant une synthétase d'AHLs.

Le second volet de ce mémoire concernait l'effet de l'introduction d'un gène codant une lactonase chez *Brucella*. Notre intention par la même étant d'observer si nous parvenions à perturber le phénomène de quorum sensing. Si tel était le cas, cela signifierait que *Brucella* synthétise des AHLs afin de réguler l'expression de certains gènes.

2. Analyse phénotypique d'une souche de *Brucella* produisant une lactonase

Après s'être assuré que la lactonase était bien capable de dégrader les AHLs, nous avons observé le phénotype d'une souche produisant une lactonase selon deux approches différentes: en suivant le taux de production de la protéine VirB et en regardant sa virulence en infection.

2.1. Analyse de la production des protéines VirB8 et VirB9 dans une souche produisant une lactonase

En réalisant cette expérience, nous nous attendions à obtenir des résultats similaires à ceux récoltés avec le mutant $\Delta hdtS$. En effet, si les AHLs sont responsables de la répression du taux de production de la protéine VirB8, la non production et la dégradation des AHLs devraient avoir le même effet. En fin de phase exponentielle, lorsque la production atteint son maximum, nous observons que la quantité des protéines VirB8 et 9 est plus importante dans la souche produisant la lactonase, recoupant ainsi ce qui a été observé dans le mutant $\Delta hdtS$. Après 48h de culture, nous observons toujours une légère surproduction de protéines dans la souche produisant la lactonase mais cette production est beaucoup moins importante qu'en fin de phase exponentielle.

Ce résultat nous indique que: - Premièrement, la lactonase dégrade la molécule responsable de la répression de la production de protéines VirB. Cette molécule peut être l'AHL, mais nous ne savons pas ce que dégrade exactement la lactonase, d'autres molécules pourraient être elles aussi dégradées.

- Deuxièmement, le fait que nous observions une diminution de la protéine VirB après 48h et ce malgré la présence de la lactonase sous-entend que d'autres mécanismes sont impliqués dans la régulation de la virulence.

2.2. Analyse de la virulence d'une souche privée d'AHLs dans un modèle cellulaire

L'analyse de la souche de *Brucella* produisant la lactonase en infection cellulaire à été réalisée dans la même perspective que celle réalisée avec le mutant $\Delta hdtS$, mais ici, nous voulons savoir si les AHLs sont importantes ou pas pour mener à bien un processus infectieux.

2.3. Conclusion

L'ajout de (C_{12} -HSL) exogènes à une culture de *Brucella* produisant une lactonase nous à permis d'observer que cette enzyme était capable de dégrader les AHLs. Nous avons ensuite observé qu'une souche de *Brucella* produisant une lactonase avait un taux de production de protéines VirB8 et VirB9 supérieur par rapport à une souche ne produisant pas de lactonase, mais que ceci ne modifiait en rien sa capacité d'infection de macrophages. La dégradation d'AHLs ne modifie donc en rien la virulence de *Brucella*.

2.4. Perspectives

Nous pourrions aussi envisager de réaliser l'expérience opposée à ce qui a été fait, à savoir l'effet de l'addition d'AHLs lors d'une infection. Cette expérimentation aurait en même temps un but plus général. En effet, il est intrigant de constater qu'en conditions expérimentales *Brucella* est beaucoup moins infectieuse que dans des conditions naturelles. Or, dans l'environnement, que ce soit dans le sol ou même dans un intestin, *Brucella* est en présence d'autres espèces bactériennes produisant des AHLs. La culture de *Brucella* dans un milieu contenant des AHLs exogènes et l'addition d'AHLs durant l'infection (les AHLs étant capables de diffuser au travers des membranes eucaryotes (Williams *et al.*, 2004)) seraient intéressantes à réaliser afin d'observer si le pouvoir infectieux de *Brucella* en serait modifié.

Nous pourrions aussi analyser une souche de *Brucella* produisant la lactonase en modèle murin afin de suivre la virulence sur plusieurs semaines. Si aucune différence n'est observée sur 48h par rapport à une souche ne produisant pas cette enzyme, il n'en n'est peut être pas de même sur une plus longue période. La hausse de production de protéines VirB8 et 9 pourrait se révéler être un avantage impossible à observer sur un laps de temps aussi court.

Pour conclure, une dernière hypothèse concernant la production d'AHLs chez *Brucella* peut être envisagée. Si, suite aux expériences proposées, le gène *hdtS* était écarté de son rôle putatif dans la synthèse d'AHLs, qu'aucun autre gène candidat à cette fonction ne sortait lors d'un nouveau criblage de la banque de *Brucella* et sachant qu'une dégradation des AHLs ne perturbe pas *Brucella* durant son cycle infectieux, alors pourquoi ne pas envisager que *Brucella* ne possède pas de synthétase classique d'AHLs, mais plutôt une voie de synthèse encore non-décrite dans d'autres bactéries et qui, de plus, pourrait être fonctionnelle dans certaines conditions seulement. Le fait que *Brucella* possède des régulateurs transcriptionnels comprenant un domaine de liaison aux AHLs (VjbR et BabR) n'exclut en rien l'absence d'une synthétase classique, c'est en effet ce qui est observé chez l'organisme *Photobacterium luminescens*. Cette bactérie pathogène pour un nombre impressionnant d'insectes et vivant en symbiose avec un nématode possède plusieurs gènes codant des régulateurs de la famille LuxR mais aucune synthétase d'AHLs n'a été caractérisée (Duchaud *et al.*, 2003).

Brucella pourrait utiliser les molécules signal produites par les autres bactéries présentes afin de pouvoir distinguer un environnement extracellulaire, remplis d'AHLs, d'un environnement intracellulaire. Il a en effet été démontré que des AHLs sont présentes dans un intestin de ruminant (Erickson *et al.*, 2002).

Cette nouvelle donnée pourrait ouvrir une nouvelle fenêtre sur la compréhension du phénomène de QS chez *Brucella*, modifiant par la même notre manière d'aborder la bactérie lors de nos expérimentations. *Brucella* n'aurait donc pas fini de nous étonner...

MATERIEL

ET

METHODES

Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Solutions et milieux

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
Ampiciline (Amp)	H ₂ O	100mg/ml	100µg/ml
Carbéniciline	H ₂ O	50mg/ml	50µg/ml
Chloremphénicol (Cm)	EtOH 100%	20mg/ml	20µg/ml
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)	H ₂ O	1M	1mM
Kanamycine (Kan)	H ₂ O	50mg/ml	50µg/ml
Streptomycine (Sm)	H ₂ O	10mg/ml	10µg/ml
5-bromo-4-chloro-3-indoyl-βD-galactopyranoside (X-gal)	diméthylformamide	20mg/ml	20µg/ml

1.1.2. Milieux de culture

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

Hydrolysate de caséine (peptone Gibco BRL)	1g/100 ml
NaCl	0,5g/100 ml
Yeast extract	0,5g/100 ml
Agar	1,5% (pour du LB solide)

Le milieu est autoclavé 20 minutes à 120°C. Le milieu est refroidi à 55°C puis additionné des antibiotiques ou autres additifs avant d'être coulé dans des boîtes de Petri.

1.1.2.2. Milieu riche pour *Brucella* : milieu 2YT

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

1.2. Souches bactériennes et plasmides

1.2.1. Souches bactériennes

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), ϕ 80dlacZ Δ lacX74, *endA1*, *recA1*, *deoR* Δ (*ara*, *leu*)7697, *araD139*, *galU*, *galK*, *nupG*, *rpsL* λ^- .

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 répllication de tout plasmide possédant l'origine de répllication ori R6K.

Génotype : *recA*, *thi pro hsdRM*⁺ RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7 lysogenised with λ pir phage

E. coli JM109 : Cette souche d'*E. coli* est utilisée comme biosenseur lors de test de détection d'AHLS (Yanisch-Perron *et al.*, 1985).

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.

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.

1.2.2. Plasmides

pBBR mcs1 : Ce plasmide à faible taux de répllication de 4707 pb possède une région appelée oriT requise pour le transfert du plasmide. Il contient également l'origine de répllication REP, qui est compatible avec la machinerie de répllication de *Brucella*. Il peut également se trouver en présence de plasmides contenant d'autres origines de répllication comme ColE1 et p15A. On y retrouve également un gène de résistance au chloramphénicol (*cat*) (Kovach *et al.*, 1995).

pMR10 cat : Le pMR10 cat est un plasmide répllicatif chez *Brucella* à faible nombre de copie. Il possède une origine de répllication RK2oriV. Il possède un gène de résistance à la kanamycine et un gène de résistance au chloramphénicol.

pME6863 : Ce plasmide contient le gène de la lactonase (*aiiA*). Il comporte un gène de résistance à la tétracycline (Reimann *et al.*, 2002).

pBS1075 : Ce plasmide a été utilisé pour les expériences de détection des AHL's (Winson *et al.*, 1998).

2. Méthodes

2.1. Techniques relatives à l'ADN

2.1.1. 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.

Le protocole pour la minipréparation ainsi que pour la maxipréparation d'ADN génomique est disponible dans le manuel "Plasmid DNA Purification" de Macherey-Nagel ainsi qu'en annexe.

2.1.2. 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.

2.1.2.1. 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.
 - 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 phageλ en 1 heure à 37°C dans un volume de 25 µl)
 - 2 µl de tampon de restriction 10X
 - Porter le volume à 20 µl 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 1 à 2 µl de Bleu alourdisseur d'électrophorèse et déposer sur gel d'agarose.

2.1.2.2. 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.
- ❖ Le temps d'incubation à la température *ad hoc* est de deux heures.

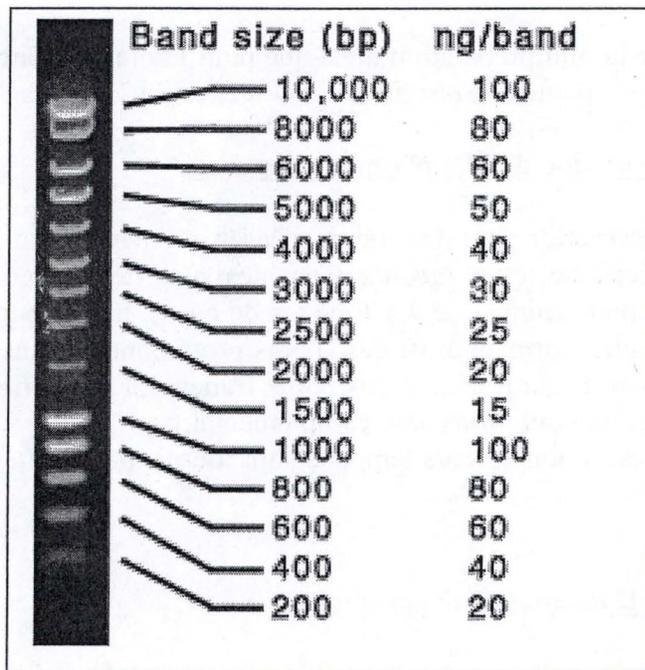


Figure 1. Marqueur de taille pour gel d'agarose DNA Hyperladder I (Bioline)

2.1.3. 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 (Molecular Biology Grade. Ref: EP-0010-05) dans du tampon TAE 1X.
 - Porter à ébullition. 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 TAE1 X.
 - 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.

Les solutions sont reprises en annexe.

Marqueurs de tailles pour gel d'agarose DNA :

Le marqueur utilisé est l'Hyperladder I (Bioline) (figure 1).

2.1.4. Extraction 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. Le Kit MBI Fermentas est utilisé. Cette méthode repose sur l'utilisation de billes de silices auxquelles l'ADN adhère spécifiquement, les sels et les impuretés peuvent ainsi être éliminés.

Le protocole est disponible dans le "DNA Extraction Kit" de MBI Fermentas et en annexe.

2.1.5. Réaction de ligation

Pour lier de manière covalente des fragments d'ADN, l'enzyme ADN ligase du phage T4 est utilisée. Elle catalyse la formation de liens phosphodiester 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^{++} .

Le protocole est disponible dans le guide technique de la "T4 DNA Ligase" d'Invitrogen et en annexe.

2.1.6. Polymerase chain reaction (PCR)

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 comprend 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.

Méthode :

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

- 2 µl de primer 1 (10 µM).
- 2 µl de primer 2 (10 µM).
- 4 µl de dNTP de 20 mM chacun.
- 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 ».
- 0,75 µl de Taq polymérase (*Thermophilus aquaticus*) (Biotools)
- Pfx (*Pyrococcus*) (Invitrogen)
- de l'eau pure pour porter le volume final à 50 µl.
- 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.

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. Le plasmide d'intérêt doit quant à lui contenir une origine de transfert.

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 (Nal^R).
- 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 frais de manière à ce que les bactéries se trouvent dans la phase exponentielle de croissance quelques heures après (3-4 heures environ).
- Avant la conjugaison, centrifuger la culture de *E. coli* S17 et de *Brucella* pendant 15-20 minutes à 3500 rpm afin de culotter les cellules. Eliminer au maximum les surnageants afin d'éliminer toute trace d'antibiotique.
- Resuspendre dans un volume final de 1 ml de 2YT.
- Placer un filtre stérile 0,22µm de 82 mm de diamètre sur une boîte de pétri bien sèche de 2YT sans antibiotique. Y déposer 100 µl de culture de *B. melitensis* et 100 µl d'*E. coli* S17.
- Mélanger et étaler les gouttes de bactéries sur la totalité du filtre à l'aide d'une anse en plastique.
- Laisser incuber au moins 1 heure à 37°C.
- Transférer le filtre dans une boîte de Pétri vide. Y déposer 1ml de 2YT et récupérer les bactéries à l'aide d'une anse en plastique en grattant délicatement la surface du filtre.
- Récupérer le milieu enrichi en bactérie dans un Eppendorf. Effectuer une dilution 10 et 100 fois pour un plasmide low copy (1000 fois pour un plasmide medium copy).
- Étaler 150µl de chaque suspension bactérienne sur un milieu 2YT sélectif (acide nalidixique + marqueur du plasmide). 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 :

Une goutte (3 à 5µl) d' *E. coli* S17 et de *Brucella* est déposée sur deux milieux sélectifs. Le premier contenant de l'acide nalidixique et le second contenant l'antibiotique auquel résistent les *E. coli* S17 donneuses (résistance due au plasmide d'intérêt).

La coloration de Gram :

Afin de distinguer les bactéries à Gram positifs des bactéries à Gram négatifs, 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 à Gram positifs gardent le colorant retenu par la couche de muréine. Une contre-coloration permet de colorer les bactéries à Gram négatifs en rouge.

- Prélever quelques bactéries de la colonie à examiner.
- Déposer une goutte de bactérie diluée sur une lame.
- Faire sécher à l'aide de la flamme d'un bec bunsen.
- Couvrir la lame d'alcool et flamber afin de fixer les bactéries, laisser refroidir.
- Couvrir de violet de gentiane (1 minute).
- Eliminer l'excès de colorant et couvrir de lugol (1 minute).
- Rincer à l'eau, bien décolorer 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 à Gram positifs (elles restent colorées en bleu violet). Les bactéries qui perdent leur coloration bleue sont dites à Gram négatifs.

2.3. Transformation bactérienne

La transformation bactérienne consiste à faire entrer de l'ADN exogène (dans ce cas, un plasmide) dans une bactérie. Ceci nécessite un traitement préalable rendant la paroi et la membrane bactérienne perméables à l'ADN : la bactérie est alors dite compétente. Un choc thermique ou électrique doit alors être appliqué pour induire la capture de l'ADN par la cellule.

Le protocole concernant ce type de transformation, que soit via un choc électrique ou thermique, est disponible dans le "Molecular Cloning", A Laboratory Manual, Sambrook and Russel ainsi qu'en annexe.

2.4. Techniques relatives aux protéines : analyse de l'expression d'une protéine par Western Blot**2.4.1. Préparation d'extraits protéiques totaux**

- La veille, ensemercer une culture 10 ml de 2YT à une DO de 0,05 avec une préculture.
- Incuber une nuit à 37°C sous agitation.
- Inactiver les *Brucella* 2 heures à 80°C.
- centrifuger les cultures 15 minutes à 3000 rpm afin de culotter les cellules.
- Resuspendre dans 2,5 ml de PBS et mesurer la DO_{600nm}.

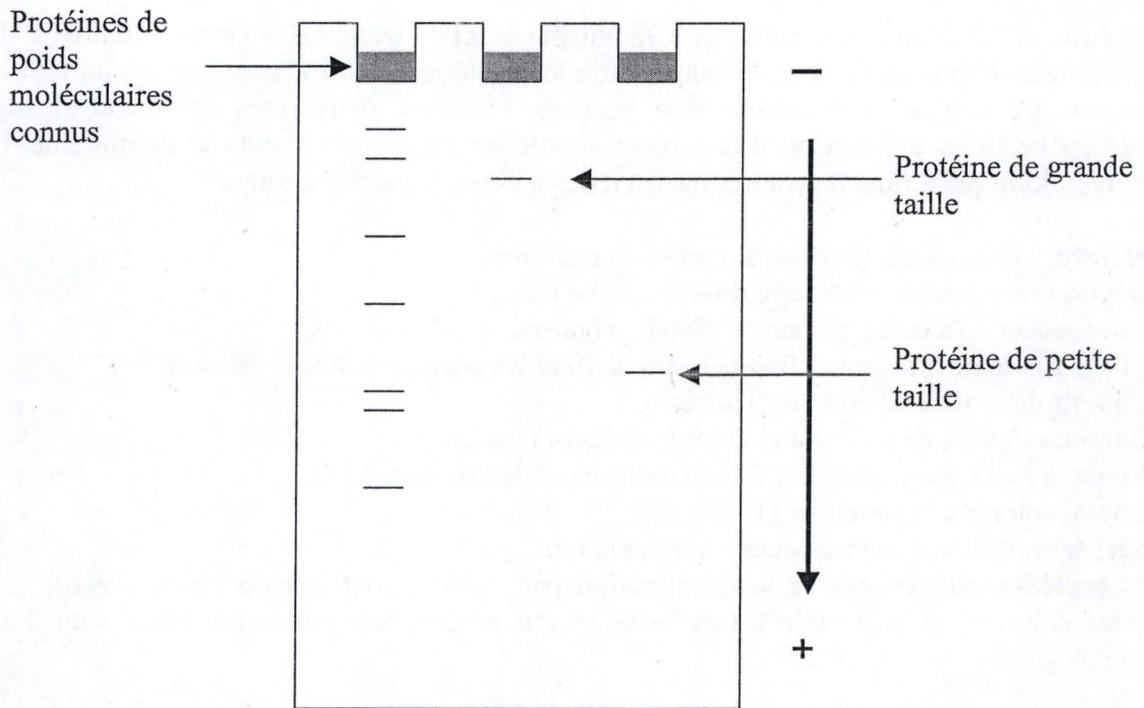


Figure 2. Schéma représentant la migration sur gel polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) de deux types de protéines ayant des tailles différentes. Les tailles des protéines d'intérêt peuvent être estimées par comparaison aux protéines de tailles connues du marqueur.

Afin de charger la même quantité de protéines pour chaque extrait, nous diluons un peu de l'extrait afin de mesurer la DO. Nous effectuons ensuite les concentrations nécessaires afin que chaque extrait soit à une DO de 6.

Composition du PBS:

KH₂PO₄ : 2 mM
Na₂ HPO₄ : 10 mM
KCl : 2,7 mM
Na Cl : 137 mM

2.4.2. La technique du 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 :

- La séparation 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.

Les différentes solutions et tampons employés sont repris en annexe.

2.4.2.1. 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 2).

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. La technique de préparation du gel est reprise en annexe.

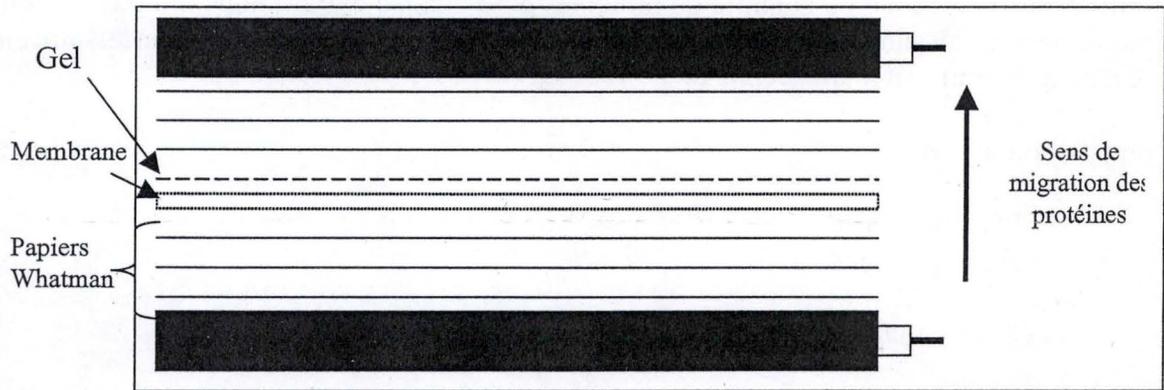


Figure 3 : Technique de transfert « semi-dry » basée sur le champ électrique produit entre deux électrodes.

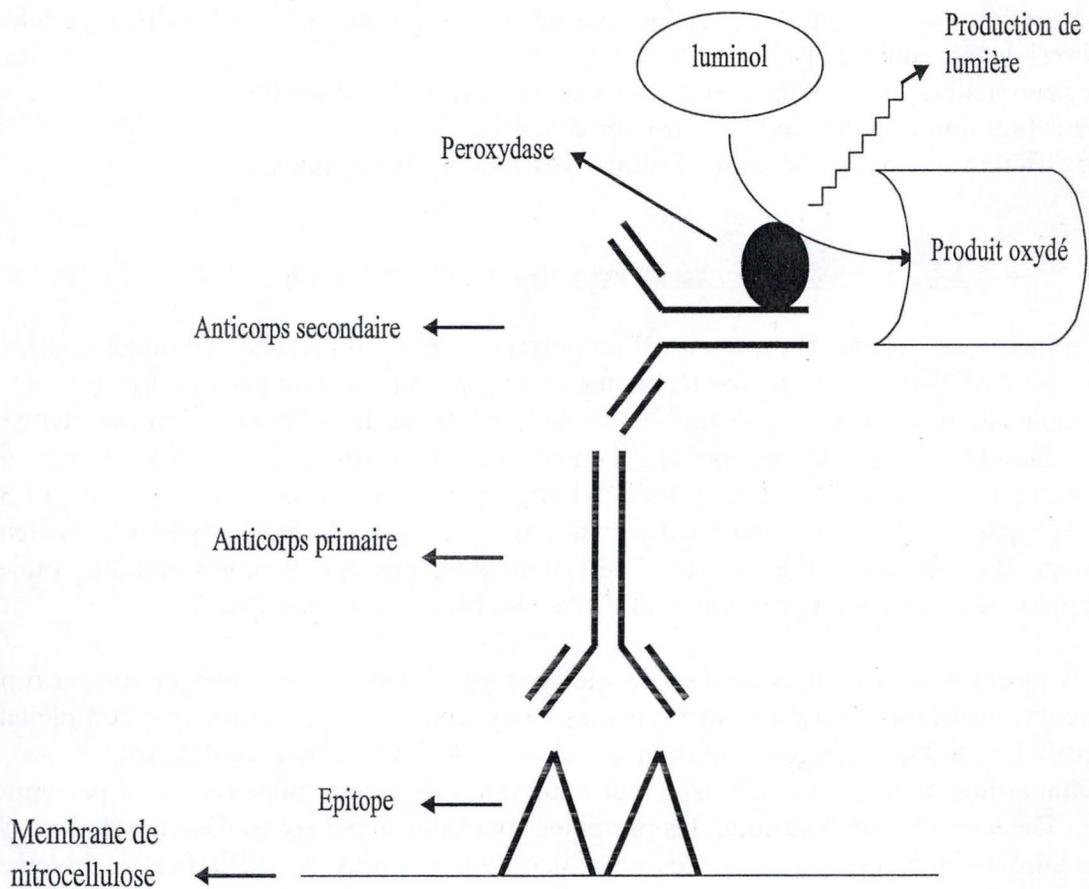


Figure 4. Méthode de détection en deux étapes: un anticorps primaire spécifique à un épitope est reconnu par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Cette enzyme catalyse une réaction d'oxydation qui produit de la lumière.

2.4.2.2. Préparation et chargement 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.

Comme marqueur, nous avons utilisé le marqueur de poids moléculaire Bio Rad Low Range.

Migration :

L'appareil est fixé sur 30 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.

2.4.2.3. 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 3).

Protocole :

- Découper une membrane de nitrocellulose ainsi que 6 papiers Whatman (1 mm d'épaisseur) aux dimensions du gel.
 - Les papiers Whatman sont humidifiés dans le tampon de transfert.
 - L'ensemble du montage est placé dans l'appareil de transfert (semi dry).
 - Afin que le transfert des protéines soit optimal, l'ampérage doit être environ égal à 3 mA par cm² de membrane de nitrocellulose. Le voltage doit varier entre 10 et maximum 14 V.
-
- La durée du transfert varie quant à elle entre 30 minutes et deux heures, en fonction de la taille des protéines à faire transférer (la vitesse de transfert des protéines dépend de leur poids moléculaire : plus le poids moléculaire est élevé, plus le transfert sera lent) et cette durée doit tenir compte de la thermorésistance des protéines.

2.4.2.4. 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 reconnaissant l'anticorps primaire permet de détecter la protéine d'intérêt. De plus, étant conjugué à la peroxydase, une enzyme qui catalyse une réaction produisant de la lumière, la détection sera d'autant plus aisée (figure 4).

2.4.2.4.1. 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.

Enlever la solution de blocking faire 5 rinçages de 3 minutes avec du PBS-Tween 0,05%.

2.4.2.4.2. 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 µg/ml.

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

- faire cinq rinçages avec du PBS-Tween 0,05% pendant 3 minutes.

2.4.2.4.3. 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-souris 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 5 rinçages de 3 minutes avec la solution PBS-Tween 0,05% sous agitation.

2.4.2.4.4. 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 cm² x 0.125 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

2.5. Méthodes de détection de la production de N-acyl homosérine lactones

La détection des AHLs est réalisée grâce à des biosenseurs. Dans le cadre de ce travail, trois plasmides senseurs bioluminescents ont été employés : le pSB1142, le pSB1075 et le pSB401. La détection de la lumière produite par les senseurs bioluminescents se fait grâce à un luminomètre (Microumat LB96P, EG&G Berthold) (Winson *et al.*, 1998).

2.5.1. Cocultures

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

Méthode :

- Inoculer d'une part 5 ml de LB avec une colonie de bactéries dont on veut tester la production d'AHLs et d'autre part 5 ml de LB avec une colonie de bactéries portant un plasmide senseur bioluminescent.
- Incuber une nuit à 37°C sous agitation.
- Le lendemain, ajouter 2 ml de la culture de senseur diluée 10 fois à 2 ml de la culture à tester.
- Incuber 1h à 37°C sous agitation.
- Déposer 200µl de ce mélange dans une plaque multipuits.
- Mesurer la quantité de lumière produite au luminomètre.

2.5.2. Extraction d'AHLs chez *Brucella*

Principe :

L'extraction d'AHL's 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 AHLs (Daniels *et al.*, 2002).

Méthode :

- Inoculer 10 ml de milieu contenant les antibiotiques appropriés avec une colonie de cellules dont les AHL's vont être extraites.
- Laisser incuber à 37°C sous agitation.

- Le lendemain inoculer 50 ml de milieu contenant les antibiotiques appropriés avec la préculture.
- Le lendemain inoculer 500 ml de milieu contenant les antibiotiques appropriés avec la culture de 50 ml.
- Après 2-3 jours d'incubations, centrifuger 15 min à 3500 rpm afin de culotter les cellules.
- Récupérer le surnageant, le filtrer et ensuite le mélanger à un volume de dichlorométhane acide (ajouter 1,5 ml/l d'acide acétique glacial 99-100%, Vel 4042).
- Récupérer à l'aide d'un ballon décanteur la phase organique dans laquelle se trouvent les AHL's.
- Répéter l'extraction avec la phase aqueuse.
- Les résidus aqueux sont éliminés de la phase organique grâce à du $MgSO_4$ anhydre (Aldrich, 20,809-4).
- Filtrer la solution à l'aide d'un filtre de 0,45 μm (Whatman, 24cm, 114V, 1214240).
- Evaporer le solvant au rotavap. Récupérer les AHLs présentes sur la paroi du ballon dans quelques ml d'éthyle acétate à l'aide d'une pipette Pasteur. Evaporer à l'aide d'un flux à azote.
- Resuspendre les AHLs dans 50 μl final d'éthyle acétate. Evaporer. Conserver à sec à 4°C.

2.6. Technique d'infection lors d'analyse de virulence

Préparation des cellules eucaryotes :

Au jour J-1, à partir de flasques de macrophages bovins ou de cellules HeLa en sous-confluence:

- Eliminer le surnageant.
- Ajouter 3 ml de PBS additionné de trypsine en veillant à immerger le fond du flasque.
- Après quelques secondes, éliminer le surplus de solution et incuber 10 minutes à 37°C.
- Décrocher les cellules grâce à 10 ml de RPMI de chez GIBCO® (Invitrogen).
- Centrifuger la solution récoltée 10 min à 1000 rpm puis vider le surnageant.
- Resuspendre dans 1 ml de RPMI et insérer 20 μl dans une chambre de comptage.
- Multiplier par $2 \cdot 10^5$ la moyenne de trois lignes de cette chambre.
- Diluer pour arriver à une densité de $5 \cdot 10^4$ cellules/ml.
- Dispatcher 500 μl par puits.

En parallèle, ensemercer 5 ml de 2YT avec des antibiotiques de la souche infectante à tester.

L'infection :

Le jour J:

- Laver deux fois par centrifugation (10 min à 3500 rpm) et resuspendre les cultures bactériennes afin d'éliminer les antibiotiques.
- Mesurer la DO_{600nm} . Une DO_{600nm} de 1 équivaut à une culture de $3 \cdot 10^9$ bactéries par ml.
- Calculer le volume à ajouter à 5 ml de RPMI en tablant sur une MOI d'environ 1000, soit $5 \cdot 10^7$ bactéries par ml.
- Mettre 500 μl /puits du RPMI ensemercé.
- Centrifuger les plaques 10 min à 1200 rpm afin que les bactéries entre en contact avec les cellules. Laisser incuber 1 heure à 37°C.
- Laver deux fois avec 500 μl de PBS/puits et remplacer par 500 μl de RPMI additionné de gentamycine afin d'éliminer les bactéries extracellulaires.
- Laisser incuber classiquement 1, 24 ou 48h à 37°C.

- Quand le temps imparti est écoulé, laver 3 fois avec 500 µl de PBS.
- Ajouter 200 µl de Triton X-100 0,1% afin de lyser les cellules et laisser incuber 15 min à température ambiante.
- Récupérer les bactéries (le surnageant) et procéder à différentes dilutions de 10 en 10.
- Etaler les dilutions sur boîte de pétri.
- Après environ 3 jours à 37°C, dénombrer les CFU (Colony Forming Unit) comme décrit ci-dessous.

Calcul de la MOI :

Pour chaque solution de RPMIensemencée, effectuer des dilutions de 10 en 10 jusqu'à 10^{-7} . Ensuite, étaler 20 µl des dilutions allant de 10^0 à 10^{-7} sur boîte de pétri. Incuber 3 jours.

2.7. Analyse de l'activité de promoteur

L'analyse de l'activité du promoteur de l'opéron *virB* a été mesurée à l'aide du plasmide pJD27 *pvirB*. Ce plasmide contient les gènes *luxAB*, codants pour des enzymes capables de produire de la lumière à partir d'un réactif, le N-décyl aldéhyde.

- Ensemencer 10 ml de milieu 2YT contenant les antibiotiques adéquats avec la souche de *Brucella* contenant le plasmide pJD27 *pvirB*. Incuber à 37°C.
- Le lendemain matin, inoculer une culture 50 ml de 2YT avec la préculture.

Mesure de l'activité :

- Prélever 1 ml de culture dans une cuvette pour spectrophotomètre.
- Ajouter 25 µl de substrat. Resuspendre et laisser incuber précisément 5 min à température ambiante.
- Prélever 200 µl de ce mélange et le déposer dans une plaque multipuits (Greiner n°756076, plaques 96 puits noires). Réaliser cette opération deux fois supplémentaires afin d'obtenir des triplicatas.
- Après 5 min, mesurer la luminescence (RLU) à l'aide d'un luminomètre type Microlumat LB96P (EG&G Berthold).
- Afin de standardiser la mesure obtenue, la RLU est divisée par la DO_{600nm} .

BIBLIOGRAPHIE

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.
- Blosser-Middleton, R. S. & Gray, K. M. (2001). Multiple N-acyl homoserine lactone signals of *Rhizobium leguminosarum* are synthesized in a distinct temporal pattern. *J Bacteriol* **183**, 6771-7.
- Boschiroli, M. L., Foulongne, V. & O'Callaghan, D. (2001). Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* **4**, 58-64.
- Burgess, N. A., Kirke, D. F., Williams, P., Winzer, K., Hardie, K. R., Meyers, N. L., Aduse-Opoku, J., Curtis, M. A. & Camara, M. (2002). LuxS-dependent quorum sensing in *Porphyromonas gingivalis* modulates protease and haemagglutinin activities but is not essential for virulence. *Microbiology* **148**, 763-72.
- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D. M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. & Gorvel, J. P. (2003). *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* **198**, 545-56.
- Christie, P. J. & Vogel, J. P. (2000). Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol* **8**, 354-60.
- Coleman, J. (1990). Characterization of *Escherichia coli* cells deficient in 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. *J Biol Chem* **265**, 17215-21.
- Corbel, M. J. (1984). Properties of *Brucella*-phages lytic for non-smooth *Brucella* strains. *Dev Biol Stand* **56**, 55-62.
- Daniels, R., De Vos, D. E., Desair, J., Raedschelders, G., Luyten, E., Rosemeyer, V., Verreth, C., Schoeters, E., Vanderleyden, J. & Michiels, J. (2002). The cin quorum sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. *J Biol Chem* **277**, 462-8.
- Darling, P., Chan, M., Cox, A. D. & Sokol, P. A. (1998). Siderophore production by cystic fibrosis isolates of *Burkholderia cepacia*. *Infect Immun* **66**, 874-7.
- Day, W. A., Jr. & Maurelli, A. T. (2001). *Shigella flexneri* LuxS quorum-sensing system modulates virB expression but is not essential for virulence. *Infect Immun* **69**, 15-23.
- Delrue, R. M. (2002). Contribution à l'analyse des mécanismes moléculaires impliqués dans le trafic intracellulaire de *Brucella melitensis* 16M. Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur.
- 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.
- DelVecchio, V. G., Kapatral, V., Elzer, P., Patra, G. & Mújer, C. V. (2002). The genome of *Brucella melitensis*. *Vet Microbiol* **90**, 587-92.
- Denoel, P. A., Crawford, R. M., Zygmunt, M. S., Tibor, A., Weynants, V. E., Godfroid, F., Hoover, D. L. & Letesson, J. J. (1997). Survival of a bacterioferritin deletion mutant of *Brucella melitensis* 16M in human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* **65**, 4337-40.
- Detilleux, P. G., Deyoe, B. L. & Cheville, N. F. (1990). Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. *Infect Immun* **58**, 2320-8.
- Dong, Y. H., Gusti, A. R., Zhang, Q., Xu, J. L. & Zhang, L. H. (2002). Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* **68**, 1754-9.

- Dong, Y. H., Wang, L. H., Xu, J. L., Zhang, H. B., Zhang, X. F. & Zhang, L. H. (2001). Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* **411**, 813-7.
- Duchaud, E., Rusniok, C., Frangeul, L., Buchrieser, C., Givaudan, A., Taourit, S., Bocs, S., Boursaux-Eude, C., Chandler, M., Charles, J. F., Dassa, E., Derosé, R., Derzelle, S., Freyssinet, G., Gaudriault, S., Medigue, C., Lanois, A., Powell, K., Siguier, P., Vincent, R., Wingate, V., Zouine, M., Glaser, P., Boemare, N., Danchin, A. & Kunst, F. (2003). The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photobacterium luminescens*. *Nat Biotechnol* **21**, 1307-13.
- Dunny, G. M. & Leonard, B. A. (1997). Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **51**, 527-64.
- Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Neilson, K. H. & Oppenheimer, N. J. (1981). Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* **20**, 2444-9.
- Enright, F. M., Araya, L. N., Elzer, P. H., Rowe, G. E. & Winter, A. J. (1990). Comparative histopathology in BALB/c mice infected with virulent and attenuated strains of *Brucella abortus*. *Vet Immunol Immunopathol* **26**, 171-82.
- Erickson, D. L., Nsereko, V. L., Morgavi, D. P., Selinger, L. B., Rode, L. M. & Beauchemin, K. A. (2002). Evidence of quorum sensing in the rumen ecosystem: detection of N-acyl homoserine lactone autoinducers in ruminal contents. *Can J Microbiol* **48**, 374-8.
- 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.
- Gilson, L., Kuo, A. & Dunlap, P. V. (1995). AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins. *J Bacteriol* **177**, 6946-51.
- Godfroid, J., Al-Mariri, A., Walravens, K. & Letesson, J. J. (2003). Brucellose bovine. *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail*. 869-889
- Guillen, N., Weinrauch, Y. & Dubnau, D. A. (1989). Cloning and characterization of the regulatory *Bacillus subtilis* competence genes *comA* and *comB*. *J Bacteriol* **171**, 5354-61.
- Hanzelka, B. L., Stevens, A. M., Parsek, M. R., Crone, T. J. & Greenberg, E. P. (1997). Mutational analysis of the *Vibrio fischeri* LuxI polypeptide: critical regions of an autoinducer synthase. *J Bacteriol* **179**, 4882-7.
- 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.
- Hentzer, M. & Givskov, M. (2003). Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* **112**, 1300-7.
- Inoue, K., Matsuzaki, H., Matsumoto, K. & Shibuya, I. (1997). Unbalanced membrane phospholipid compositions affect transcriptional expression of certain regulatory genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**, 2872-8.
- Jones, S., Yu, B., Bainton, N. J., Birdsall, M., Bycroft, B. W., Chhabra, S. R., Cox, A. J., Golby, P., Reeves, P. J., Stephens, S. & et al. (1993). The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Embo J* **12**, 2477-82.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., 2nd & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175-6.
- 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** (Pt 10), 2469-80.
- Lawrence, R. N., Dunn, W. R., Bycroft, B., Camara, M., Chhabra, S. R., Williams, P. & Wilson, V. G. (1999). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule, N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone, inhibits porcine arterial smooth muscle contraction. *Br J Pharmacol* **128**, 845-8.
- Leadbetter, J. R. & Greenberg, E. P. (2000). Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J Bacteriol* **182**, 6921-6.
- Lin, Y. H., Xu, J. L., Hu, J., Wang, L. H., Ong, S. L., Leadbetter, J. R. & Zhang, L. H. (2003). Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol Microbiol* **47**, 849-60.
- Lyte, M., Frank, C. D. & Green, B. T. (1996). Production of an autoinducer of growth by norepinephrine cultured *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiol Lett* **139**, 155-9.
- Matthysse, A. G., Yarnall, H., Boles, S. B. & McMahan, S. (2000). A region of the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome containing genes required for virulence and attachment to host cells. *Biochim Biophys Acta* **1490**, 208-12.
- 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. (1977). Autoinduction of bacterial luciferase. Occurrence, mechanism and significance. *Arch Microbiol* **112**, 73-9.
- O'Callaghan, D. & MacMillan, A. (2001). *Brucella*. *Animal and Ectoparasitic source infections*. 1991-2010
- 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.
- 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.
- Redfield, R. J. (2002). Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiol* **10**, 365-70.
- Reimann, C., Ginet, N., Michel, L., Keel, C., Michaux, P., Krishnapillai, V., Zala, M., Heurlier, K., Triandafillu, K., Harms, H., Defago, G. & Haas, D. (2002). Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* **148**, 923-32.
- Sauret, J. M. & Vilissova, N. (2002). Human brucellosis. *J Am Board Fam Pract* **15**, 401-6.
- 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.
- Schauder, S., Shokat, K., Surette, M. G. & Bassler, B. L. (2001). The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol Microbiol* **41**, 463-76.
- Sperandio, V., Mellies, J. L., Nguyen, W., Shin, S. & Kaper, J. B. (1999). Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 15196-201.
- Sperandio, V., Torres, A. G., Jarvis, B., Nataro, J. P. & Kaper, J. B. (2003). Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8951-6.

- 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., Williams, P. & Stewart, G. S. (1999). N-acylhomoserine lactones and Quorum sensing in proteobacteria. *Cell-cell signaling in bacteria*. G.M. Dunny and S.C. Winans. Washington, D.C.: 291-314
- Taminiau, B., Daykin, M., Swift, S., Boschiroli, 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**, 3004-11.
- Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tomkins, P. T., Appleby, P., Sewell, H., Stewart, G. S., Bycroft, B. W. & Pritchard, D. I. (1998). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun* **66**, 36-42.
- Val, D. L. & Cronan, J. E., Jr. (1998). In vivo evidence that S-adenosylmethionine and fatty acid synthesis intermediates are the substrates for the LuxI family of autoinducer synthases. *J Bacteriol* **180**, 2644-51.
- Wang, L. H., Weng, L. X., Dong, Y. H. & Zhang, L. H. (2004). Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching AHL-lactonase. *J Biol Chem*.
- Williams, S. C., Patterson, E. K., Carty, N. L., Griswold, J. A., Hamood, A. N. & Rumbaugh, K. P. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer enters and functions in mammalian cells. *J Bacteriol* **186**, 2281-7.
- Winans, S. C. & Bassler, B. L. (2002). Mob psychology. *J Bacteriol* **184**, 873-83.
- 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.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-19.
- Yates, E. A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S. R., Sockett, R. E., Goldner, M., Dessaux, Y., Camara, M., Smith, H. & Williams, P. (2002). N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **70**, 5635-46.

SECRETARIAT BIOLOGIE
F.U.N.D.P.
Rue de Bruxelles, 59
B 5000 NAMUR (Belgique)
Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / 72 44 20

16 JUIN 2004